

**Valor diagnóstico de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR) en la Enfermedad Fúngica Invasora (EFI) causada por hongos de los géneros *Candida*, *Histoplasma* y *Cryptococcus*.
Revisión sistemática y Metanálisis**

Jannet Zapata Bailarín¹

Trabajo presentado para optar por el Título de Magíster en Microbiología y Bioanálisis con énfasis en Micología Médica,
Posgrado en Microbiología

Asesora:
Dra. Luz Elena Cano Restrepo²

Medellín
Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
2012

**Valor diagnóstico de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR) en la Enfermedad Fúngica Invasora (EFI) causada por hongos de los géneros *Candida*, *Histoplasma* y *Cryptococcus*.
Revisión sistemática y Metanálisis**

1. Jannet Zapata Bailarín

Bacterióloga y Laboratorista Clínica, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
Estudiante de Maestría en Microbiología y Bioanálisis, Universidad de Antioquia.
Medellín, Colombia.

bailarin54@gmail.com

2. Luz Elena Cano Restrepo

Bacterióloga y Laboratorista Clínica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
PhD en Inmunología. Universidade de São Paulo, Brasil.
Jefe, Grupo de Micología Médica y Experimental
Corporación Investigaciones Biológicas (CIB), Universidad de Antioquia (UdeA),
Universidad Pontificia Bolivariana (UPB), Medellín, Colombia.
Profesora Titular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia.

lcano@cib.org.co

DIRECCIÓN FÍSICA DE CONTACTO (1,2)

1. Laboratorio Docente, Asistencial e Investigativo. Escuela de Microbiología,
Universidad de Antioquia.

Carrera 51 A # 62-42 Avenida Juan del Corral. Medellín. Colombia

Teléfono +57(4) 5166990 ext 118

2. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).

Dirección: Carrera 72 A N° 78 B 141, Barrio Robledo, Medellín, Colombia.

Teléfono: + 57 (4) 4035950 ext 206 Fax: 4415514. A.A 7378

CONFLICTO DE INTERESES: ninguno reportado

NUMERO DE DIAGRAMAS: 1

NUMERO DE FIGURAS: 3

NUMERO DE TABLAS: 4

RESUMEN EN ESPAÑOL

El término *Enfermedad Fúngica Invasora* (EFI) fue recientemente definido e incorporado por El Grupo Colaborativo de Infecciones Fúngicas Invasoras de la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer en conjunto con su par de Estados Unidos de América, el Grupo de Estudio de Micosis del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas conocidos por la sigla EORTC/MSG para resaltar la condición de **enfermedad** producida por la infección causada por hongos (11), por lo cual este término se incluye en esta revisión. Así, la EFI es una patología con alta letalidad, su incidencia ha aumentado notablemente en los últimos años, por lo que el diagnóstico oportuno permite un tratamiento temprano. Igualmente, la EORTC/MSG clasificó los episodios de infección fúngica en categorías *posible*, *probable* o *demostrada*, dentro de esta última categoría el método diagnóstico incluye las tinciones y/o cultivos que demuestren levaduras u hongos filamentosos en sangre o muestra clínica de cavidad estéril o estudio histológico con evidencia de invasión fúngica. Estas técnicas presentan diversas limitaciones por lo que se viene incrementando el desarrollo de métodos de identificación molecular basados en la amplificación de ácidos nucleicos del microorganismo responsable de dichas micosis; dentro de estos métodos se encuentra la Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) que ha demostrado tener una alta sensibilidad y especificidad para detectar diferentes microorganismos.

El presente estudio evaluó el valor diagnóstico de este método para detectar hongos de los géneros *Candida*, *Histoplasma* y *Cryptococcus* en muestras biológicas humanas realizando una revisión sistemática de la literatura y el correspondiente metanálisis. La búsqueda de la información se realizó en diferentes bases de datos electrónicas utilizando las palabras claves

Cryptococcus, Histoplasma, Candida, Real Time Polymerase Chain Reaction, qPCR, en español, inglés y portugués. Para garantizar la calidad de la información, los estudios debían describir la población, la muestra clínica, la cantidad de muestra analizada, la técnica utilizada para la extracción del ácido nucléico, el diseño de los cebadores, la descripción del gen o de la secuencia blanco, el estudio de comparación con método de referencia, la descripción del grupo control, y los datos para calcular la sensibilidad y especificidad; el número de muestras clínicas analizadas debía ser superior a 25 en cada estudio. La búsqueda inicial arrojó un total de 3.263 referencias, a las que se les aplicó criterios de inclusión y exclusión. Diez artículos originales cumplieron las características mencionadas.

Se obtuvo una sensibilidad clínica global de 0,850 (0,780-0,900); una especificidad global de 0,980 (0,970-0,990) con un intervalo de confianza de 95%.

Conclusión: el método de detección de hongos agentes causantes de EFI, debe ser aquel que sea capaz de detectar el microorganismo en fases tempranas de la enfermedad, para que se reduzca la alta mortalidad en los pacientes inmunocomprometidos y en particular los neutropénicos. Los valores predictivos en este caso juegan un papel muy importante; en este estudio la qPCR presentó valores superiores a 0,80 utilizando casos probados, por lo que no se puede inferir a los casos que define la EORTC/MSG, como probables y posibles.

PALABRAS CLAVES: *Cryptococcus, Histoplasma, Candida, Real Time Polymerase Chain Reaction, qPCR, EFI.*

INTRODUCCIÓN

La incidencia de la Enfermedad Fúngica Invasora (EFI) se ha incrementado en los últimos años (12, 13), ésta afecta principalmente y de forma directa a personas con compromiso en su inmunidad (14, 15), como es el caso de los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana VIH (16-18), pacientes con enfermedades hematológicas malignas (19), o se presentan después de tratamientos quirúrgicos mayores (20), terapia antirretroviral,

quimioterapia, trasplantes de órganos sólidos (21), tratamientos antimicrobianos de amplio espectro (22) o por la implantación de alimentación parenteral (23, 24). Es así como un número importante de hongos, considerados como simbiosis (25), se vienen identificando como agentes causales de infecciones en el humano.

Junto a estas micosis invasoras u oportunistas, coexisten otras micosis, causadas por hongos muy adaptados a la supervivencia en los tejidos infectados. Algunas de ellas se comportan como micosis profundas, y se caracterizan porque se distribuyen en determinadas zonas geográficas, donde resultan endémicas (26).

Este tipo de micosis ocasionan cuadros difíciles de reconocer, debido a que los signos clínicos, y síntomas son a menudo inespecíficos (27).

El diagnóstico microbiológico convencional de las EFI se basa en el aislamiento e identificación de los hongos responsables, empleando medios de cultivo idóneos (28-30), este método puede requerir entre 48 y 72 horas o varias semanas antes de ofrecer un resultado dependiendo del microorganismo implicado (31). Debido a esta limitación se han desarrollado métodos de detección de antígenos y anticuerpos, detección de metabolitos como el D-arabinitol, D-manitol, 1-3-β-glucano y métodos enzimáticos que permiten mejorar la oportunidad del diagnóstico fúngico; sin embargo, cada una de estas técnicas presentan diversas limitaciones, presentando resultados falsos positivos y negativos que deben tenerse en cuenta para obtener su máximo rendimiento (28).

De igual forma desde hace más de dos décadas se vienen reportando estudios que utilizan los principios de la biología molecular para amplificar el material genético de dichos microorganismos (3, 32-34). Dentro de estos métodos se encuentra la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), que se caracteriza por su rapidez, sensibilidad y robustez, sin embargo, la normalización y la validación todavía no se han alcanzado para estas plataformas (11, 35, 36).

A pesar de esta limitación, se ha observado que dichas técnicas presentan una sensibilidad, especificidad y oportunidad diagnóstica superior a los métodos de referencia tradicionales, pudiendo además cuantificar la cantidad del microorganismo en la muestra analizada. Es por eso que con el presente Metanálisis se pretende determinar el valor diagnóstico del método molecular **Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)** para detectar hongos de los géneros *Candida*, *Histoplasma* y *Cryptococcus* causantes de EFI.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el valor diagnóstico de la técnica molecular qPCR para identificar la presencia de hongos de los géneros *Candida*, *Histoplasma* y *Cryptococcus* en muestras clínicas de pacientes humanos según lo reportado en la literatura científica en el periodo 2000-2012.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Describir y evaluar los resultados obtenidos en los estudios sobre la utilidad del método molecular qPCR en el diagnóstico de EFI ocasionada por hongos de los géneros *Candida*, *Histoplasma* y *Cryptococcus* en muestras biológicas.
2. Calcular la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo del método molecular qPCR utilizado en el diagnóstico de EFI utilizando los datos reportados en la literatura científica entre el periodo 2000 y 2012.

MARCO TEÓRICO

1. Enfermedad Fúngica Invasora (EFI):

El Grupo EORTC/MSG en su primera versión publicada en 2002 (37), clasificó los episodios de infección fúngica en categorías *posible*, *probable* o *demostrada*, definiendo un lenguaje homogéneo para ser usado en el diseño y resultado de estudios clínicos. Estos criterios de consenso fueron recientemente revisados (11) e incorporaron el término *enfermedad fúngica invasora* (EFI) para resaltar la condición de enfermedad producida por la infección causada por hongos, por lo que en esta revisión se incluye este término.

Los criterios del consenso EORTC/MSG recientemente revisados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Resumen de criterios diagnósticos revisados de enfermedad Fúngica invasora según consenso EORT/MSG (11)

Factores del hospedero	Historia de Neutropenia reciente Receptor de trasplantes de precursores hematopoyéticos Uso de corticosteroides por más de tres semanas Uso de inmunosupresores en los últimos tres meses Inmunodeficiencia primaria
Criterios clínicos	Enfermedad respiratoria baja: con al menos uno de los siguientes criterios: nódulos con o sin halo, creciente aéreo o cavidad Traqueobronquitis Rinosinusitis Sinusitis en estudio de imágenes con al menos uno de los siguientes criterios: dolor agudo, escara nasal, compromiso de paredes óseas, cavidad paranasal Infección del sistema nervioso central con al menos uno de los siguientes criterios: lesiones focales o reforzamiento meníngeo Candidiasis diseminada (al menos uno de los siguientes criterios post candidemia): lesión en “ojo de buey” en hígado/bazo o exudados en la retina
Criterios micológicos	Directos: tinciones o cultivos positivos Indirectos: galactomanano, 1-3-β-Dglucano, antígeno Cryptococcico

Infección probada	Tinción y/o cultivo que demuestre levaduras u hongo filamentosos en sangre o muestra clínica de cavidad estéril o estudio histológico con evidencia de invasión fúngica.
Infección probable	Factores de hospedero más criterios clínicos y criterios micológicos
Infección posible	Factores del hospedero más criterios clínicos sin criterios micológicos
Micosis endémica probada	Criterios microbiológicos: Directos: tinciones o cultivos positivos Indirectos: presencia de anticuerpos anti-Coccidioides en líquido cefalorraquídeo, banda de paracoccidioidina en suero, antígeno de <i>Histoplasma</i> en orina, sangre o líquido cefalorraquídeo.
Micosis endémica probable	Presencia de un factor del hospedero, además de un cuadro clínico compatible con micosis endémica y criterios microbiológicos
Micosis endémica posible	Este término no se define, debido a que los factores del hospedero y los criterios clínicos no son suficientemente específicos.

Nota: las micosis endémicas incluyen histoplasmosis, blastomicosis, coccidioidomicosis, paracoccidioidomicosis, esporotricosis, y la infección por *Penicillium marneffe*.

2. Enfermedad Fúngica Invasora ocasionada por distintas especies de los géneros *Candida*, *Histoplasma* y *Cryptococcus*

2.1 *Candida spp*:

El Género *Candida* comprende más de 200 especies, ampliamente distribuidas en la naturaleza. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular.

En aproximadamente el 95-97% de las infecciones invasoras están implicadas cinco especies, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei*, siendo estas dos últimas resistentes a los azoles, así como a los antimicóticos utilizados comúnmente (38, 39).

En Latinoamérica (40), *C. albicans* se presenta en una frecuencia del 34,3%, seguida de *C. parapsilosis* (21%) y *C. tropicalis* (17%) . En Colombia esta prevalencia es de (43,6%) para *C. albicans* seguida de *C. tropicalis* (23,4%), *C. parapsilosis* (13,9%), *C. glabrata* (9,5%), *C. guilliermondii* (3,6 %), *C. krusei* (3,3%) (41, 42).

Generalmente, se comportan como organismos comensales y patógenos oportunistas, frecuentemente aisladas de mucosas donde habitualmente son consideradas como colonizadoras (43, 44). La candidiasis invasora representa el 75% de las infecciones invasoras por hongos en pacientes hospitalizados en Estados Unidos; su frecuencia varía de acuerdo con el servicio de hospitalización y los factores de riesgo del paciente (45), presentando un mayor riesgo los que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos (UCI) (34, 46) y pacientes con cáncer (47, 48). La tasa de mortalidad ha sido estimada entre 40 y 54% (49, 50).

La principal fuente de infección del humano es la microflora endógena, cuando aumenta la población de levaduras debido al compromiso inmune, la alteración de la piel o las mucosas debido al uso de dispositivos intravasculares, quemaduras graves o cirugías recientes o de forma secundaria a tratamientos antimicrobianos de amplio espectro ocurre sobrecolonización e invasión (51). La invasión de los tejidos implica activación enzimática de fosfolipasas, lipasas, proteasas, adhesinas y el cambio morfológico de blastoconidia o pseudohifa e

hifa que posibilitan la angioinvasión y la diseminación hematológica (44, 52). Además, tiene la capacidad de formar biopelículas, que las hacen menos vulnerables a la acción de los antimicóticos, debido a que la matriz extracelular excluye o limita el acceso de éstos (53). Las fuentes de infección exógenas son las manos del personal de la salud, el contacto con material contaminado como soluciones parenterales, soluciones oftálmicas, manejo postoperatorio, dispositivos médicos como catéteres, válvulas cardíacas, respiradores, entre otros (46, 54, 55).

Diagnóstico:

El diagnóstico de candidiasis invasora se basa en métodos microbiológicos como el directo, el cultivo y la histopatología que permiten demostrar la presencia del hongo en el tejido y en la detección de un número de biomarcadores como anticuerpos, antígenos y DNA de la levadura (28, 56). El diagnóstico de la candidiasis invasora es difícil, porque generalmente no hay signos ni síntomas específicos de la infección (27), es difícil diferenciar la infección de la colonización (44, 57), además en estos enfermos coexiste la infección fúngica con otras morbilidades, por lo que se comprende que en la práctica clínica haya que sospechar la enfermedad en situaciones de riesgo elevado (58). Presenta un reto microbiológico, ya que los procedimientos tradicionales tienen escasa capacidad diagnóstica y se positivizan tardíamente en el curso de la enfermedad (59).

Pruebas microbiológicas:

Examen directo: provee un resultado rápido que confirma la presencia del hongo en el nivel de género. Se basa en el empleo de colorantes o fluorocromos que se unen inespecíficamente a la pared fúngica (60), como la tinción de Gram (61) la tinción con blanco de calcoflúor, o las tinciones adecuadas (Grocott-Gomori methenamine-silver stain, GMS), ácido periódico-Schiff (PAS) que permiten diferenciar entre colonización e invasión, por lo que las biopsias son prueba definitiva de invasión tisular (28, 62) Las levaduras son fáciles de observar, pudiéndose apreciar las blastoconidias redondas, ovaladas

o alargadas de 4-8mm, unigemantes, de pared delgada con pseudohifas o hifas a excepción de *C. glabrata* que sólo produce blastoconidias.

Cultivo: permite el aislamiento del agente causal, lo que es indispensable para una correcta identificación del mismo y, en caso de estar indicados, hace posible la práctica de estudios de sensibilidad o estudios epidemiológicos. Las levaduras del género *Candida* son poco exigentes, crecen con facilidad en 24-48h a 35-37°C en medios habituales como el agar dextrosado de Sabouraud con/sin cloranfenicol, y en medios utilizados para bacterias.

Otra forma de probar una candidiasis invasora es el aislamiento de *Candida spp.* en un hemocultivo coincidiendo con un cuadro clínico compatible (37).

Identificación de las especies de *Candida*

La identificación de los hongos levaduriformes se puede llevar a cabo atendiendo a criterios morfológicos, bioquímicos, inmunológicos o genéticos (63). Los criterios morfológicos pueden ser, macro o microscópicos. Los macroscópicos tienen en cuenta el aspecto de las colonias al crecer en los diferentes medios de cultivo usados en el laboratorio de microbiología. Ciertas características microscópicas son muy útiles para la identificación de algunas especies de levaduras. Las más utilizadas son las pruebas del tubo germinal, la formación de hifas, blastoconidias, clamidosporas y artrosporas (28).

Entre los criterios bioquímicos o enzimáticos se destacan los medios cromógenos, diseñados para el aislamiento e identificación presuntiva de algunas especies de *Candida*. El fundamento de los mismos se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas de las levaduras, mediante la hidrólisis de un sustrato cromógeno en presencia de un indicador de la enzima. Una de las principales ventajas de estos medios es que permite detectar la existencia de infecciones causadas por varias especies de *Candida* e incluso hacer una presunción de especie, útil a la hora de implantar la terapia antifúngica inicial (64).

No obstante, para la identificación de la mayor parte de las especies de levaduras deben utilizarse técnicas basadas en la asimilación de diferentes fuentes de carbono o nitrógeno (auxonograma), que se realiza sobre un medio

sintético base. También se han desarrollado técnicas inmunológicas para la identificación de levaduras (65), que se basan en la aglutinación de partículas de látex utilizando un anticuerpo monoclonal específico de *C. albicans*, *C. krusei* o *C. dubliniensis*, respectivamente (66).

Pruebas inmunológicas

Dentro de estas técnicas se utiliza la detección de antígenos y anticuerpos o de componentes fúngicos estructurales o metabólicos como el (1-3)- β -D-glucano, el D-arabinitol o el ADN. Estas técnicas hasta ahora presentan importantes limitaciones y ninguna tiene la suficiente fiabilidad para su uso habitual en el laboratorio de microbiología clínica (67).

Detección de manano y anti-manano

La detección, mediante ELISA, de antígeno manano y de anticuerpos frente a este antígeno de *Candida* está disponible comercialmente desde hace años. Recientemente se ha evaluado la utilidad de esta técnica en sujetos neutropénicos, comprobándose que en estos pacientes un resultado negativo permitiría excluir una Candidiasis Invasora, debido a su elevado valor predictivo negativo (95%) (68). Además, se ha constatado que la presencia de anticuerpos anti-manano se asocia a un mayor riesgo de Candidiasis Invasora en pacientes neutropénicos, y que se adelanta a la aparición de manifestaciones clínicas (69). Sin embargo, debido a la alta prevalencia de anticuerpos anti-manano en la población sana o colonizada, se han investigado otros anticuerpos más específicos de Candidiasis Invasora. Entre ellos, destacan los dirigidos contra antígenos expresados en la fase micelial de *C. albicans* (anti-micelio) y contra los antígenos citoplasmáticos.

Detección de anticuerpos antimicelio

Este método detecta anticuerpos contra antígenos expresados en la fase micelial de *C. albicans* pero que también es positiva en los pacientes con Candidiasis Invasora por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* o *C. dubliniensis*. La técnica presenta buenos resultados de sensibilidad (84,4%) y especificidad (94,7%) para el diagnóstico de Candidiasis Invasora, cuando se utiliza un título de anticuerpos antimicelio > 1:160 (70).

Detección de (1-3)- β -D-glucano (BG)

El (1-3)- β -D-glucano es un componente abundante de la pared celular de los hongos, donde tiene una función estructural muy importante. Se libera durante la infección por la mayoría de los hongos de importancia clínica (candidiasis, aspergilosis, neumocistosis) y no se encuentra en los mamíferos, la mayoría de las bacterias o los virus. Actualmente existen cuatro pruebas comercializadas para su detección con fines diagnósticos, aunque las cuatro pruebas detectan BG, presentan diferencias en su límite de detección y, por tanto, son necesarios puntos de corte diferentes en cada una de las pruebas comercializadas (71). Se trata de un marcador panfúngico por lo que un resultado positivo no permite identificar la especie; además, su detección presenta resultados falsos positivos debido a la contaminación de materiales de laboratorio con BG, en tratamientos con inmunoglobulinas humanas intravenosas, polisacáridos antitumorales (lentinano y polisacárido K), albúmina, factores de coagulación, proteínas plasmáticas, quimioterapia antitumoral, amoxicilina- ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam (72). Los sueros hemolizados, algunas bacteriemias por gram positivos (*Streptococcus spp.*) y gramnegativos (*Alcaligenes spp.* y *Pseudomonas aeruginosa*) son otras causas conocidas de resultados falsos positivos; los falsos negativos se asocian con la existencia de sueros hiperpigmentados (bilirrubina y triglicéridos elevados), el tratamiento empírico o profilaxis antifúngica y con especies que liberen poca cantidad de BG durante la infección (72, 73).

Pruebas moleculares

Las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos como la PCR, la PCR anidada (Nested PCR), la PCR en tiempo real (Real time PCR, qPCR) la hibridización *in situ* (*in situ* Hybridization), la hibridización *in situ* con fluorescencia (Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)) y la secuenciación de los productos del DNA amplificados se cuentan entre las técnicas disponibles que ofrecen grandes ventajas como alta sensibilidad y especificidad, rapidez y la posibilidad de establecer en forma cuantitativa la presencia o ausencia de agentes infecciosos en el hospedero afectado. Muchos de estos estudios se realizan con muestras que son inoculadas con diferentes especies de *Candida*

(74), comprobando posteriormente la capacidad de detección del microorganismo inoculado, así como la correcta identificación de la especie. Algunos de estos trabajos incluyen además la aplicación del método previamente ensayado, en muestras clínicas de pacientes hospitalizados (75), y sólo unas pocas se realizan únicamente con muestras clínicas sospechosas de candidiasis (76).

2.2 *Cryptococcus spp.* :

Cryptococcus neoformans y *Cryptococcus gattii*, son levaduras patógenas para el hombre (77). Los miembros del complejo *C. neoformans/C. gattii* se pueden agrupar en dos especies relacionadas, *C. neoformans*, conformadas por las variedades *grubii* (serotipo A) y *neoformans* (serotipo D), un híbrido de *C. neoformans* serotipo AD; y *C. gattii*, con los serotipos B y C (78).

La criptococosis es adquirida fundamentalmente por inhalación de las células levaduriformes. La infección pulmonar primaria es frecuentemente asintomática y puede ser contenida y erradicada dentro de un granuloma; sin embargo, dependiendo de los factores de riesgo del hospedero, el tamaño del inóculo y la virulencia de la cepa, el microorganismo puede diseminarse de forma aguda o luego de un período de latencia a sitios extrapulmonares, teniendo particular predilección por el sistema nervioso central (79).

Los factores responsables de la patogenicidad de las especies de *Cryptococcus* se encuentran en la cápsula (80, 81), la capacidad de adherencia y las proteínas con actividad enzimática, como las proteinasas (81), las fosfolipasas, la fenoloxidasa y la ureasa (81, 82)

La mortalidad reportada por estas levaduras varía entre el 10% y el 30% en regiones donde el tratamiento es limitado (79, 83). *C. neoformans* es uno de los principales microorganismos responsables de infecciones en individuos inmunocomprometidos, como los pacientes con leucemia, linfomas, sarcoidosis, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Cushing's y los pacientes que consumen altas dosis de corticoesteroides como los transplantados, sin embargo, la población más susceptible es la infectada por el VIH (16, 84). Aunque ambas especies de levaduras infectan el sistema nervioso central, *C. gattii* tiene mayor tropismo por el parénquima cerebral comparado con *C. neoformans*, lo cual se asocia con una terapia que a menudo debe ser suministrada por un período más largo de tiempo (85, 86), además se ha aislado principalmente de personas inmunocompetentes (87, 88).

En 2007, Lizarazo y colaboradores publicaron un estudio clínico y epidemiológico de la Criptococosis en Colombia, donde se encontró que el 97,5% de los casos entre 1997 a 2005 correspondían a neurocriptococosis, el 82,7% fueron hombres con predominio de adultos jóvenes, la infección por el VIH fue de 78,1%, la incidencia promedio anual fue de 2,4 casos en un millón de habitantes, pero en los pacientes con VIH se aumentó a 3 casos por mil habitantes (89).

Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico de rutina son generalmente invasivos y no discriminan los grupos genotípicos de estas levaduras (90). El diagnóstico de la criptococosis se realiza por examen directo con tinta china, por ensayos de histopatología o por detección del antígeno polisacárido capsular (84, 91, 92)

Pruebas microbiológicas:

Examen directo: El examen directo en fresco se realiza rutinariamente utilizando tinta china. Se mezcla una gota del sedimento del líquido cefalorraquídeo con una gota de tinta china, y la levadura aparece sobre un fondo oscuro envuelta de una zona no teñida que es la cápsula. Su tamaño es variable y puede tener un diámetro doble o triple al de la célula(84) .

Examen histológico: En el examen histológico se observa la presencia de levaduras capsuladas. Para ello se utilizan una serie de tinciones como la de plata-metenamina (Grocott-Gomori) o mucicarmina que tiñe la pared de las levaduras (93, 94).

Cultivo: El aislamiento de la levadura por cultivo de sangre y líquido cefalorraquídeo se realiza por cultivo preferencial en el medio de agar de Sabouraud al que se le ha añadido antibacterianos como el cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias. No se debe usar cicloheximida (Actidiona) ya que las especies de *Cryptococcus* se inhiben en su presencia (95). La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, aunque también crecen a 25°C. Las especies de *Cryptococcus* se desarrollan bien en medios bacteriológicos generales como agar sangre, Ruiz Castañeda y medios líquidos para

Hemocultivos, o en medios que contienen extractos acuosos de semilla de girasol que promueven la síntesis de la enzima fenoloxidasa que cataliza la oxidación de unos sustratos difenólicos en productos similares a la melanina (80), estos sustratos hacen que las colonias queden de un color pardo que permite diferenciarlas de otras levaduras como *Candida* u otras especies como *Cryptococcus laurentii*.

Identificación de las especies de *Cryptococcus*:

La identificación específica de *C. neoformans* requiere de estudios fisiológicos como son el crecimiento a 37°C, y pruebas de asimilación y utilización de azúcares como el inositol, la asimilación de la creatinina, y la producción de ureasa (96), antes de 15 min mientras que otras especies de levaduras ureasa positivas tardan mucho más tiempo en producirla. Se han descrito algunas excepciones, de *C. neoformans* que no producen ureasa (97). El uso de agar canavanina glicina azul de bromotimol (CGB) diferenciará a *C. neoformans* de *C. gattii* porque las colonias de *C. gattii* conducen a un cambio en el color del material de amarillo a azul resultante de la asimilación de glicina. *C. neoformans* no produce cambio de color en el agar CGB (98).

Pruebas inmunológicas

la detección del antígeno capsular de *Cryptococcus* es uno de los métodos alternativos al cultivo que ha demostrado una mayor utilidad diagnóstica en el campo de las enfermedades infecciosas. Esta técnicas pueden emplear anticuerpos policlonales o monoclonales antiglicuroxilomanano (99). La mayor parte de ellas están basadas en la aglutinación de partículas de látex o en el enzimoimmunoanálisis, y se emplean en muestras de LCR, hematológicas, secreciones respiratorias y orina. Los falsos positivos son infrecuentes, aunque se han descrito en presencia de factor reumatoide, infecciones por *Trichosporon spp.*, algunas bacterias y neoplasias (100).

En enfermos VIH positivos con criptococosis, la sensibilidad de esta técnica es cercana al 100% en LCR y alrededor del 95% en sangre, cifras superiores a las del examen microscópico y el cultivo. Los títulos que se consideran positivos

dependen de la técnica empleada, pero generalmente títulos de 1/8 indican enfermedad activa (101, 102). Asimismo, la técnica puede emplearse para evaluar la evolución de los enfermos, realizando determinaciones seriadas del antígeno. Títulos en LCR superiores a 1/1.024 son indicativos de mal pronóstico y de posible fallo terapéutico. Tras la aparición de la terapia antirretroviral combinada, la criptococosis ha disminuido significativamente en enfermos con sida; sin embargo, se ha empezado a detectar como una micosis emergente en otros grupos de enfermos. En enfermos inmuno- deprimidos no VIH positivos, la criptococosis suele aparecer como una infección diseminada, con fiebre, pérdida de peso y alteraciones de conciencia, con tendencia a la focalización pulmonar. En estos enfermos la sensibilidad de la detección antigénica es sólo del 75% en LCR o sangre, e incluso menor si sólo presentan una infección pulmonar localizada (103).

Pruebas moleculares

Hay pocos estudios publicados con un número significativo de muestras (104); no obstante, se utilizan técnicas moleculares para la identificación de *Cryptococcus* en cultivo, así como para su clasificación y tipificación (105-107).

2.3 Histoplasma:

La histoplasmosis es una micosis sistémica causada por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* (108), patógeno primario que es endémico en América; sin embargo hay reportes de caso en áreas no endémicas causada por dicho hongo (1, 109). Éste puede diseminarse a todo el sistema retículo-endotelial por vía hematógena a través de los macrófagos que contienen las levaduras fagocitadas (110); sin embargo, cuando los pacientes tienen alterada su respuesta inmune, como en el caso de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y en aquellos que se encuentran recibiendo tratamiento con inmunosupresores, la infección se puede reactivar, ocasionar enfermedad y llevar a la muerte si no es tratada a tiempo (111, 112). También se han descrito algunos casos de histoplasmosis diseminada en individuos inmunocompetentes (113, 114).

Recientemente se publicó un estudio de cohorte retrospectivo realizado en Colombia sobre Histoplasmosis en pacientes con VIH, clasificados según el protocolo de 1993 del Centro para el Control de las Enfermedades CDC (Atlanta, Estados Unidos) (45). En dicho estudio se identificó la infección por *H.capsulatum* en 44 casos (6,2%) de 709 pacientes, en los tres primeros meses posterior al diagnóstico de VIH; la mortalidad reportada en dicho estudio fue de 47,4% en los pacientes que no alcanzaron a recibir o no completaron la terapia antifúngica (115).

Diagnóstico:

Pruebas microbiológicas:

El diagnóstico confirmatorio de dicha patología se realiza aislando *H. capsulatum* a partir de las muestras clínicas; sin embargo, esta técnica posee la gran limitación del tiempo requerido para el diagnóstico debido al crecimiento lento del hongo (108, 116). Además, esta técnica tiene una sensibilidad discreta y debe realizarse en instalaciones que cumplan con los criterios de bioseguridad para manejo de patógenos del grupo 3, instalaciones que no están disponibles en muchos laboratorios asistenciales (117).

Pruebas serológicas

La detección de anticuerpos tiene una utilidad limitada en el diagnóstico de esta micosis. Los anticuerpos aparecen entre la segunda y la sexta semana de infección y, por tanto, no suelen servir para detectar la infección aguda aunque pueden ayudar a diagnosticar las complicaciones crónicas de esta infección, así como la meningitis (118). En enfermos VIH positivo con histoplasmosis sólo son detectables en el 50% de los casos y la presencia de un título aislado sólo indica que el paciente ha tenido contacto con *H. capsulatum*.

La detección de un antígeno polisacárido de *Histoplasma capsulatum* en suero y orina se ha convertido en una técnica alternativa al cultivo de gran utilidad diagnóstica. Su principal limitación es que no se encuentra disponible fuera de zonas endémicas, no se ha comercializado (119) y puede presentar reacción cruzada con antígenos similares de otros hongos como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffe* y *Blastomyces dermatitidis*, favoreciendo los falsos positivos (120, 121). La sensibilidad es más elevada en orina (80-90%) que en suero y lavado broncoalveolar (50-80%), y ha sido validada para enfermos VIH positivos con infección diseminada. Recientemente se ha observado que en pacientes no VIH, la antigenuria y la antigenemia son de menor cuantía, por lo que la sensibilidad de esta prueba desciende al 60-75%. Por ello, en enfermos inmunocompetentes con histoplasmosis aguda pulmonar, se recomienda realizar las determinaciones de antígeno en lavado broncoalveolar, donde ha mostrado una sensibilidad del 93% (122, 123).

Pruebas moleculares:

El desarrollo de la biología molecular y las técnicas de PCR (polymerase chain reaction) han permitido la detección del ADN de *H. capsulatum*. Varios protocolos de PCR anidada (nested PCR) se han desarrollado para dicho propósito, estas incluyen un número de secuencias blanco de interés del DNA del hongo (124-127). También se han desarrollado plataformas de PCR en tiempo real que minimizan el contacto con el hongo por parte del operario y determinan la cantidad del hongo en muestras biológicas (7, 128).

3. Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real:

La reacción en cadena de la polimerasa, PCR (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN molde (129).

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse las hebras de ADN para que vuelvan a duplicarlas.

El proceso de detección de un agente infeccioso por amplificación genética se desarrolla de manera habitual en tres etapas. La primera consiste en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra biológica, seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante reacción en cadena de la polimerasa, es decir, la PCR propiamente dicha. Finalmente, en la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la PCR (amplicones) (130).

Para realizar esta técnica se necesitan los 4 desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTP), sustratos para polimerizar nuevo ADN; dos cebadores o iniciadores (primers), oligonucleótidos que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN. Son secuencias cortas, de seis a cuarenta nucleótidos, normalmente de 18 a 22, que permiten que la polimerasa inicie la reacción. Deben estar situados enfrentados y a poca distancia. Delimitan la zona de ADN a amplificar, es decir, corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se desea replicar; iones divalentes como el magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), o algún otro catión divalente. También se puede emplear manganeso (Mn^{2+}), para mutagénesis de ADN mediante PCR, ya que altas concentraciones de Mn^{2+} incrementan la tasa de error durante la síntesis de ADN. Actúan como cofactores de la polimerasa; iones monovalentes, como el potasio; una solución

tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa; ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de 70°C (la más común es la polimerasa Taq); ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar y un equipo o Termociclador, que mantiene la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo (129).

En la PCR en tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (131).

4. Revisión sistemática (RS) y Metanálisis:

La revisión sistemática es un tipo de estudio que recopila todas las investigaciones publicadas sobre un tema determinado, las evalúa críticamente para obtener conclusiones que resumen hacia donde se dirigen predominantemente las evidencias existentes sobre la pregunta de interés. Estos estudios sintetizan todas las investigaciones realizadas en el pasado sobre un tema concreto, se llevan a cabo siguiendo de forma rigurosa pasos lógicos que tienen en cuenta la calidad de los estudios.

El enfoque sistemático implica la planeación y su consignación en un protocolo, por tanto, este tipo de investigación se consideran estudios secundarios, porque para su construcción se utilizan como fuentes la información ya consignada en estudios primarios (132).

La construcción de una pregunta de interés y la planificación anticipada de todos los pasos que se llevan a cabo, descritos detalladamente en un protocolo garantizan que la RS se realice con el rigor característico de un proyecto de investigación.

Los pasos que se siguen para realizarla son:

- i) identificación de un problema,
- ii) definición de la pregunta de investigación,
- iii) elaboración de criterios de inclusión y exclusión para la localización de estudios relevantes,
- iv) valoración crítica de la calidad de las investigaciones,
- v) recopilación de datos de los estudios individuales,
- vi) interpretación y presentación de los resultados, y
- vii) formulación de conclusiones y recomendaciones (132).

Las RS se aplican en la evaluación de ensayos clínicos de vacunas y medicamentos y recientemente en la evaluación de pruebas diagnósticas.

El Metanálisis corresponde a un conjunto de técnicas estadísticas mediante las cuales se combinan los resultados de la RS para obtener parámetros de

medida globales, contribuyen a buscar siempre la mejor evidencia disponible para tomar decisiones acerca de la pregunta o tema de interés. Es un proceso en dos etapas. En un primer paso se calcula un estadístico que resume los datos de cada estudio. En los estudios de evaluación de pruebas diagnósticas cada estudio es resumido, no por un índice como en los de evaluación de tratamientos, sino por dos índices que describen la validez de la prueba. Habitualmente, estos dos índices son sensibilidad y especificidad. En un segundo paso se calculan los índices globales como promedios ponderados de los índices individuales. El Meta-análisis debería realizarse sólo si los estudios se han realizado con pacientes clínicamente similares, han evaluado pruebas comparables y han usado pruebas de referencia (“gold standard”) también comparables (133).

5. Evaluación de las pruebas diagnósticas:

Una prueba diagnóstica es considerada de buena calidad si es capaz de clasificar correctamente a los miembros de la población a la que se aplica, dando resultados positivos en las personas enfermas y negativos en las carentes de la enfermedad de estudio (134).

La calidad de una prueba diagnóstica se mide en términos de validez y seguridad. La validez de una prueba es el grado en que mide lo que se supone debe medir y para determinarla se debe comparar con otra prueba de probada eficacia en la enfermedad de estudio o con el verdadero resultado en el caso de que pueda ser conocido. Estos términos de comparación se denominan patrón áureo, “gold standard” o criterio de referencia. La validez se mide a través de la sensibilidad y la especificidad de la prueba. La seguridad de una prueba es la capacidad para predecir la presencia o ausencia de enfermedad y se mide en términos de los valores predictivos, positivo y negativo (134).

Para calcular la validez de la prueba se escoge un grupo de pacientes que según el criterio de referencia padecen la enfermedad y a otro grupo de individuos que según el mismo criterio están sanos.

MÉTODOLOGIA

Estrategias de búsqueda de la información

Primera etapa: Se realizó una búsqueda electrónica en PubMed®, LILACS®, Scielo®, ScienceDirect® y SpringerLink® y en Bases de Datos Cochrane entre octubre de 2011 y enero de 2012 sin ninguna restricción de lengua ni límites de fecha, utilizando palabras claves y, cuando fue apropiado, los términos MeSH (Medical Subject Headings) oportunos.

La estrategia de búsqueda se adaptó a cada base de datos para poder encontrar los estudios primarios que utilizaran la técnica qPCR con fines diagnósticos.

No se incluyeron en esta revisión datos no publicados ni resúmenes de congresos.

Segunda etapa: se analizó en detalle los títulos, resúmenes y palabras claves de todas las referencias encontradas en la primera etapa, verificando que estos apartados tuvieran las palabras claves *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Candida*, Real Time PCR, y qPCR en inglés, español o portugués.

Tercera etapa: En las listas de referencia de los estudios identificados y de las revisiones relevantes se buscaron manualmente otros trabajos susceptibles de ser incluidos.

Selección de la información:

Para disminuir los sesgos de selección de la información, uno de los investigadores realizó un primer cribado de las referencias recuperadas en la búsqueda en función de si el título de las mismas se ajustaba a los criterios de inclusión previamente establecidos. Se eliminaron aquellas referencias cuyo título no correspondía a los objetivos del estudio y que no cumplían los criterios de inclusión (tabla 2), además de descartar las duplicadas. Así, de un total

inicial de referencias de 3.263, tras la exclusión de 3.173 (exclusión primaria) quedaron 126 preseleccionadas (inclusión primaria).

Posteriormente, se procedió a la lectura del resumen de estas 126 referencias y se seleccionaron 10 (diagrama 1).

Criterios de Exclusión:

Como criterios de exclusión se definieron los siguientes:

- Estudios relacionados con la identificación de micosis ocasionadas por *Candida*, *Histoplasma* o *Cryptococcus* con metodología diferente a qPCR.
- Estudios con muestras clínicas provenientes de sitios no estériles.
- Estudios con menos de 25 muestras clínicas analizadas.
- Estudios que utilicen casos sospechosos de infección y que no utilicen un método de referencia para comparar el diagnóstico molecular.
- Estudios en modelos animales o que incluyan hongos de impacto ambiental.
- Estudios que utilicen la qPCR para epidemiología molecular o estudios genéticos de los hongos de interés en este estudio.
- Estudios relacionados con qPCR, que no incluyan estudios con muestras clínicas o que las hayan falseado con cepas de referencia.
- Estudios que determinen la validación del método a través de la determinación de sensibilidad y especificidad analítica y no clínica
- Reportes de caso, revisiones de tema o capítulos de libro.

Tabla 2:

Criterios de inclusión considerados para la selección de artículos en la revisión sistemática y Metanálisis

1. Referencias con estudios originales en español, inglés o portugués que suministren datos primarios que utilicen la técnica qPCR
2. Referencias que describan la población seleccionada, la muestra clínica utilizada, el diseño del estudio (prospectivo, retrospectivo), la cantidad de muestra utilizada y la técnica de extracción del ácido nucleico, el

diseño de cebadores, descripción del gen y/o secuencia blanco.
3. Referencias que realicen estudio de comparación con el método de referencia o “gold standard”
4. Referencias con, al menos, un número de sujetos humanos, no en experimentación, de 25 y que incluyan un grupo control.

Manejo de la información

La información seleccionada fue almacenada en el administrador de referencias bibliográficas Mendeley Desktop 1.3®, las características de calidad así como los datos de identificación de cada artículo seleccionado fueron tabuladas en el procesador de datos Microsoft Excel®.

Para el cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos, se utilizó el programa estadístico Meta-DISc (ES) ® versión 1.1.1 de la Unidad de Bioestadística Clínica del Hospital Ramón y Cajal de Madrid España.

Análisis estadístico: Metanálisis

En cada estudio incluido en la RS se calcularon la Sensibilidad (Se), especificidad (Sp) y valores predictivos (VPP, VPN) con un intervalo de confianza del 95%, estos mismos indicadores se calcularon de forma global. Los estudios que no presentaban datos con bastante detalle como para calcular la Se y la Sp fueron excluidos de la síntesis estadística. La Se y la Sp fueron agregadas al mismo tiempo.

Se incluyó el gráfico SROC (summary receiver operating characteristic) donde se representa de forma gráfica los diferentes estudios incluidos con su Se (o tasa de verdaderos positivos) sobre el eje «y» y la 1-Sp (o tasa de falsos positivos) sobre el eje «x». Cada punto representa la tasa de verdaderos positivos/falsos positivos para un estudio dado. Los puntos a lo largo de la diagonal indican estudios que muestran pruebas diagnósticas no valorables (la

tasa de verdaderos positivos igual a la de falsos positivos, y la prueba no fue capaz de discriminar entre enfermos y sanos).

Sin embargo, los puntos en la esquina superior izquierda indican estudios que muestran una exactitud diagnóstica más valorable (una tasa de verdaderos positivos que se aproxima a 1,0 y una tasa de falsos positivos que se aproxima a 0,0).

Consideraciones Éticas

Este estudio se encuentra clasificado en la legislación local como una investigación sin riesgo para los pacientes (Resolución del Ministerio de Salud 8430 de 1993). No se realiza intervención alguna sobre pacientes. Dada su naturaleza documental (Estudio secundario, basado en información de estudios primarios) no se registran problemas relacionados con la seguridad de sujetos, ni conflictos mayores con las consideraciones éticas dispuestas en la declaración de Helsinki.

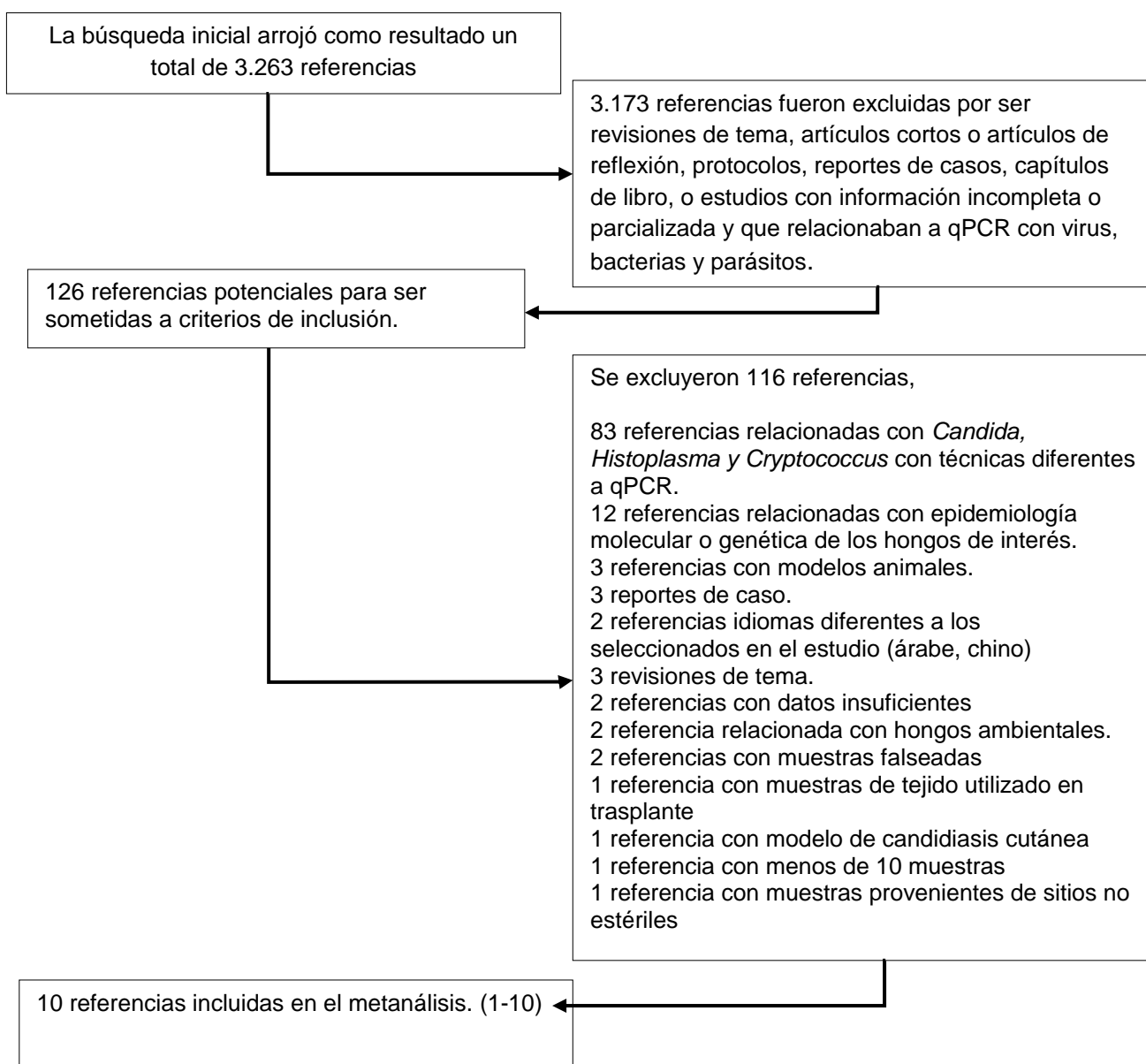
RESULTADOS

Análisis cualitativo:

Identificación y selección de los estudios:

En la búsqueda inicial se recolectaron 3.263 artículos que fueron filtrados teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión explicitados anteriormente. Se obtuvo un total de 126 artículos a los que se les revisó con detalle los criterios de calidad de la información. Posteriormente, tras eliminar las referencias que no cumplían estrictamente dichos criterios quedaron 10 referencias originales que fueron sometidas a metanálisis para cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos (Diagrama 1).

Diagrama 1: Proceso de selección de la información



Características de los artículos seleccionados:

Las 10 referencias seleccionadas utilizaron la técnica qPCR para detectar los hongos *Candida spp* e *Histoplasma capsulatum* (tabla 2). No se encontró ningún estudio que validara la técnica utilizando como unidad de análisis las especies de *Cryptococcus* y que cumplieran los criterios de inclusión explicitados en esta revisión. Un estudio realizado por Veron y colaboradores (104) desarrolló la técnica molecular para detectar esta levadura pero solo utilizó 7 muestras clínicas, por lo que no fue incluido en esta revisión.

El 90% de las referencias realizaron estudios de sensibilidad y especificidad analítica, en conjunto se evaluó un total de 1.884 muestras, provenientes de pacientes con enfermedad fúngica invasora probada según los criterios de clasificación de la EORTC/MSG para candidiasis e histoplasmosis, y de personas sanas que actuaron como grupo control. Las muestras evaluadas fueron líquido cefalorraquídeo, fluido pulmonar, sangre total, lavado broncoalveolar, medula ósea, suero, bilis, biopsias de tejido de hígado y pulmón, humor acuoso y vítreo, a las que se les extrajo el material genético con métodos caseros y comerciales, siendo el más representativo el método de extracción QIAmp DNA Minikit (Qiagen. Hilden. Germany) (tabla 3). Para el análisis de sensibilidad clínica no se incluyeron las muestras que provenían de sitios no estériles con el fin de garantizar la homogeneidad de los datos.

Los 10 estudios reportaron la utilización del cultivo como método de referencia; aunque Buitrago y colaboradores (3) utilizaron en 4 de 14 pacientes, la detección de anticuerpos contra *Histoplasma capsulatum* para el diagnóstico de la infección, en cuyo caso no fueron tenidos en cuenta para el cálculo de la sensibilidad clínica en esta revisión. Por otro lado la mayoría de los estudios utilizaron la técnica qPCR para detectar concomitantemente el DNA de otros microorganismos responsables de EFI como *Aspergillus spp*, en estos casos se extrajo la información necesaria para calcular la sensibilidad y especificidad de la técnica molecular para detectar las especies de *Candida* e *Histoplasma*, es por eso que algunos datos reportados por los autores (2, 4, 8), no corresponden a los calculados en este metanálisis.

El rango de sensibilidad analítica, osciló entre 5 fg y 10 fg de DNA por microlitro de muestra analizada, la especificidad analítica reportada en todos los estudios fue de 100% y la secuencia de amplificación que más se utilizó se encuentra en la región ITS 1, ITS 2 de las subunidades 18S y 28S del rRNA (tabla 3).

Tabla 3. Resumen cualitativo de los artículos seleccionados.

Ref	Título revista	Título del estudio	Autor	País/ año	Muestra utilizada	Gen/secuencia blanco de interés	Instrumento utilizado
(1)	European journal of clinical microbiology e infectious diseases	Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay.	Buitrago. M y col	España 2006	Suero	Región ITS1	LightCycler 2.0 System (Roche)
(2)	Clinical microbiology and infection	Molecular detection and identification of <i>Candida</i> and <i>Aspergillus spp.</i> from clinical samples using real-time PCR	Klingspor L y col	Suecia 2006	Sangre total	18S rRNA	The real-time PCR LightCycler System.
(3)	Clinical infectious disease	Evaluación de una técnica de PCR cuantitativa para el diagnóstico clínico de la histoplasmosis importada	Buitrago. M y col	España 2007;	Sangre, M.O; S.R	ITS del ADN ribosómico	LightCycler 2.0 (Roche Applied Science),
(4)	Journal of clinical Microbiology	Development of novel real time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important <i>Aspergillus</i> and <i>Candida</i> species in clinical specimens.	Schabereit er-y col	Austria 2007	Sangre total , LBA y LCR	Región ITS2	LightCycler instrument (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
(5)	Clinical infectious disease	A Prospective Clinical Trial of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Diagnosis of Candidemia in Nonneutropenic, Critically Ill Adults	McMullan R y col	Irlanda del Norte 2008	Suero	18S rRNA	Light-Cycler (Idaho Technologies Bio/gene®)
(6)	Diagnostic Microbiology and Infectious Disease	Detection and identification of <i>Candida spp.</i> in human serum by LightCycler® real-time polymerase chain reaction	Dunyach, C ycol	Francia 2008	Sangre total, suero	ITS1, ITS2 de las subunidades 18S y 28S	LightCycler® FastStart DNA master SYBR green kit (Roche, Meylan, France®)
(7)	Diagnostic Microbiology and Infectious Disease	Detection of <i>Histoplasma capsulatum</i> DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction.	Simon. S y col	Guayana Francesa 2010	LBA, biopsia de hígado, sangre total, M.O, LCR	Región ITS1, 5.8S rRNA, ITS2	7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).
(8)	Archives of Iranian medicine	Assessment of A Real-time PCR Method to Detect Human Non-Cryptococcal Fungal Meningitis.	Badiee P.y col	Irán 2011	Suero y LCR	18S rRNA	Gene Amp 7500 sequence detection system (Applied Biosystems).
(9)	Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology	Detection of <i>Candida</i> and <i>Aspergillus</i> species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis	Sugita.S y col	Japón 2011	Humor acuoso y vítreo	18S rRNA	the Amplitaq Gold and the Real-Time PCR 7300 system (Applied Biosystems, or Light Cycler 480 II (Roche, Switzerland).
(10)	Journal of clinical Microbiology	Detection of <i>Blastomyces dermatitidis</i> and <i>Histoplasma capsulatum</i> from Culture Isolates and Clinical Specimens by Use of Real-Time PCR	Babady. N y col	EEUU 2011	LBA, fluido pleural, tejido, lavado pulmonar, sangre, M.O.	Gen GAPDH de <i>H. capsulatum</i>	Light-Cycler 2.0 (Roche Applied Sciences).

Convenciones: LCR Líquido cefalorraquídeo; LBA: Lavado broncoalveolar; M.O: médula ósea; S.R: secreciones respiratoria

Análisis Cuantitativo: Metanálisis:

Análisis individual de la validez diagnóstica en los estudios seleccionados:

1. Detection of imported Histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay (1) (Buitrago M y col, 2006).

La técnica qPCR diseñada en este estudio fue capaz de detectar específicamente DNA de *H. capsulatum*, en 7 de 10 muestras de suero provenientes de 4 pacientes con histoplasmosis probada, el cálculo de la especificidad se realizó con 15 muestras de individuos sanos y 10 de pacientes con aspergilosis; sin embargo, para el cálculo de la sensibilidad y especificidad clínica de esta revisión solo las primeras 25 fueron tenidas en cuenta. La sensibilidad analítica fue de 5 fg de DNA por μ l de muestra.

La sensibilidad clínica fue de 70% (7/10) y la especificidad fue de 100% (15/15) (Tabla 4). Cabe resaltar que solo uno de los cuatro pacientes presentó anticuerpos detectables por inmunodifusión (banda M) contra *H. capsulatum*.

2. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR (2) (Klingspor L y col, 2006).

Los autores analizaron 1.650 muestras de 379 pacientes con sospecha de infección fúngica, y de pacientes para los que la confirmación de la infección fúngica antes, durante y después del tratamiento era necesaria; 114 muestras provenientes de 74 pacientes fueron positivas con la técnica qPCR, de estas 86 correspondían a varias especies de *Candida* y 28 a *Aspergillus* spp. La sensibilidad analítica fue de 2 UFC/mL.

Esta revisión, tuvo en cuenta para el cálculo de sensibilidad 48 muestras de las 86 que fueron detectadas con la técnica molecular, debido a que

fueron confirmadas con cultivo y provenían de sitios estériles (sangre, lavado broncoalveolar, líquido cefalorraquídeo y bilis).

La sensibilidad clínica fue de 100% (39/39); las 9 restantes fueron negativas por el método de referencia (5 muestras de sangre, 2 de lavado broncoalveolar, 1 líquido cefalorraquídeo, 1 muestra de bilis). La especificidad no fue calculada debido a que no se evidenció muestras negativas confirmadas por cultivo que hubieran sido detectadas por la técnica molecular (tabla 4). Este estudio no fue incluido en el cálculo de la especificidad global debido a la ausencia de datos.

3. Evaluación de una técnica de PCR cuantitativa para el diagnóstico clínico de la histoplasmosis importada (3) (Buitrago A y col, 2007)

Los autores analizaron 22 muestras clínicas procedentes de 14 pacientes diagnosticados con histoplasmosis probada y 30 muestras control, procedentes de enfermos con otras micosis, de pacientes con neutropenia febril y de voluntarios sanos.

El diagnóstico de la histoplasmosis se realizó por medio de cultivo, histología y detección de anticuerpos; 4 pacientes que fueron diagnosticados con esta última técnica no fueron tenidos en cuenta para el cálculo de la sensibilidad en esta revisión, por lo que se excluyeron las 4 muestras provistas por estos participantes, además se realizó dicho análisis en 2 muestras provenientes de sitios no estériles por lo que tampoco fueron tenidas en cuenta. Al final quedaron 16 muestras de pacientes con EFI probada y 10 muestras de voluntarios sanos que aportaron los datos necesarios para ser los cálculos reportados en esta revisión.

La sensibilidad analítica fue de 1 fg de ADN fúngico por μ l de muestra.

La técnica molecular detectó DNA de *H. capsulatum* en 14 de 16 muestras respiratorias, médula ósea y suero. El 100% de las muestras respiratorias y de los aspirados de médula ósea fueron positivos, pero sólo el 70% de los sueros.

La técnica qPCR fue positiva en suero de 3 enfermos por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en los que la detección de anticuerpos por inmunodifusión fue negativa.

La sensibilidad y especificidad clínica fue de 87,5% (14/16) 100%(10/10) respectivamente (tabla 4).

Si se tiene en cuenta los pacientes que fueron diagnosticados utilizando como método de referencia la detección de anticuerpos de *Histoplasma capsulatum*, la sensibilidad clínica disminuye a 77,3%.

4. Development of novel real time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens (4) (Schabereiter C y col, 2007).

Se analizaron por medio de cultivo y qPCR 31 muestras clínicas (lavado broncoalveolar, secreción bronquial y traqueal, bolas fúngicas y sangre) provenientes de pacientes con sospecha de infección fúngica; de éstas solo se tuvo en cuenta 25 muestras que provenían de cavidades estériles.

La sensibilidad analítica fue de 5 a 10 UFC por mL de sangre, 10 UFC por 200 uL de líquido cefalorraquídeo ó 0,02 gramos de tejido.

La sensibilidad y especificidad clínica fue de 53,8% (7/13) y 16,7% (2/12) respectivamente.

Se consideró concordancia en los aciertos cuando las dos técnicas detectaron el mismo microorganismo en la muestra analizada.

5. A Prospective Clinical Trial of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Diagnosis of Candidemia in Nonneutropenic, Critically Ill Adults (5) (McMullan R y col, 2008).

Este ensayo se condujo en dos etapas, en la primera se evaluó la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos analizando 515 muestras de 145 participantes con sospecha de enfermedad fúngica invasora, así como pacientes negativos. En la segunda, se calcularon los mismos índices en solo 12 muestras de 12 participantes con candidemia probada.

La sensibilidad y especificidad clínica de la técnica molecular en la primera etapa fue de 90,9%(20/22) y 100% (491/491) respectivamente

(tabla 4). El dato de sensibilidad disminuyó a 75% (9/12) en la segunda etapa.

6. Detection and identification of *Candida spp.* in human serum by LightCycler® real-time polymerase chain reaction (6) (Dunyach, C y col 2008).

En este ensayo el hemocultivo dividió la población (n=23) en dos grupos. El grupo con candidemia probada (n=13) y el de infección probable (n=10), de los que se obtuvo 58 muestras, además, 10 muestras de suero de individuos sanos. Para el cálculo de sensibilidad y especificidad de esta revisión se escogieron 32 muestras provenientes del grupo probado, 3 muestras fueron excluidas porque no fueron identificadas con el cultivo ni con la técnica molecular.

Se utilizaron dos juegos de cebadores L18 e ITS en el desarrollo del proceso.

La sensibilidad y especificidad clínica teniendo en cuenta los casos probados, sospechosos y los controles negativos fue de 72,7% (8/11) y 88,9% (48/54) respectivamente, utilizando los cebadores ITS; con L18 fue de 87,5% (7/8) y 80,7% (46/57) respectivamente.

En los pacientes con candidemia probada, la sensibilidad fue igual a la del proceso donde se utilizaron los cebadores ITS, pero la especificidad aumento a 95,2% (20/21) (tabla 4)

Con los cebadores L18 la sensibilidad fue de 90,9% (10/11) y la especificidad de 76,2 (16/21).

La sensibilidad analítica con los cebadores ITS y L18 fue 100 fg de DNA/PCR (10 UFC) and 10 fg de DNA /PCR (1 UFC), respectivamente.

7. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction (7) (Simon. S y Col, 2010).

En este estudio se cultivaron 348 muestras provenientes de pacientes con sospecha de micosis sistémicas. De las cuales 71 fueron positivas para *Histoplasma capsulatum var capsulatum* y 277 fueron negativas para este hongo. De las 71 muestras positivas, 5 presentaron inhibidores en la qPCR, y de las negativas 2; en consecuencia para los cálculos de

sensibilidad clínica se utilizaron 66 muestras y para la especificidad 275. Estos dos índices fueron de 95,5% (63/66) y 96,6 (264/275) (tabla 4). La sensibilidad analítica fue de 10 fg de DNA de *H. capsulatum* por microlitro, lo que corresponde a 50 fg de DNA por ensayo.

8. Assessment of A Real-time PCR Method to Detect Human Non-Cryptococcal Fungal Meningitis (8) (Badiee. P y Col, 2011).

Los autores utilizaron 20 muestras (LCR 10 y suero 10) de 10 pacientes con factores de riesgo y sospecha de meningitis ocasionada por hongos y 20 muestras de pacientes sin factores de riesgo para la infección. De estas solo dos muestras de líquido cefalorraquídeo fueron positivas para *C albicans* en el cultivo.

La sensibilidad y especificidad clínica utilizando dichos datos fue de 100% (2/2) y 81,6% (31/38) respectivamente (tabla 4). La sensibilidad analítica fue de 10 copias por ensayo.

9. Detection of *Candida and Aspergillus* species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis (9) (Sugita, S y col, 2011).

Los autores utilizaron un total de 40 muestras (humor acuoso 20 y humor vítreo 20) obtenidas de pacientes que no tenían ningún tipo de inflamación ocular, 46 de pacientes con endoftalmitis/uveítis idiopática y 7 positivas para *Candida albicans* detectadas por qPCR (cultivo positivo 2, cultivo negativo 5)

La sensibilidad clínica y especificidad clínica teniendo en cuenta toda la población estudiada es de 100% (2/2) y 94,5% (86/91), y cuando solo se tiene en cuenta la EFI probada la sensibilidad se mantiene y la especificidad disminuye a 88,9% (40/45) (tabla4).

10. Detection of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum* from Culture Isolates and Clinical Specimens by Use of Real-Time PCR (10) (Babady N y col 2011).

Un total de 797 muestras clínicas recolectadas durante un periodo de doce meses de pacientes con sospecha de infección fúngica fueron evaluadas por cultivo y qPCR. La sensibilidad y especificidad clínica de este ensayo para *H. capsulatum* fue de 73% (11/15) y 100% (782/782), respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de las variables: sensibilidad, especificidad y valores predictivos de los estudios seleccionados.

Re f.	Microorganismo	Título del estudio	Autor	Número de muestras	Sensibilidad (intervalo de confianza 95%)	Especificidad (intervalo de confianza 95%)	Valor predictivo positivo	Valor predictivo negativo
(1)	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Detection of imported <i>Histoplasmosis</i> in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay.	Buitrago. M y col	25	0,70 (0,348-0,933)	1,00 (0,782-1,00)	1,000	0,833
(2)	<i>Candida spp</i> <i>Aspergillus spp</i>	Molecular detection and identification of <i>Candida</i> and <i>Aspergillus</i> spp. from clinical samples using real-time PCR	Klinspor L y Col.	48	1,00 (0,937-1,000)	Dato no calculado	0,813	Dato no calculado
(3)	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Evaluación de una técnica de PCR cuantitativa para el diagnóstico clínico de la histoplasmosis importada	Buitrago, A y col	26	0,875 (0,617 -0,984)	1,000 (0,692-1,000)	1,000	0,833
(4)	<i>Candida Aspergillus</i>	Development of novel real time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important <i>Aspergillus</i> and <i>Candida</i> species in clinical specimens.	Schabereiter, C y Col	25	0,538 (0,251-0,808)	0,167 (0,021- 0,484)	0,412	0,250
(5)	<i>Candida spp.</i>	A Prospective Clinical Trial of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Diagnosis of Candidemia in Nonneutropenic, Critically Ill Adults	McMullan, R y col	503	0,917 (0,615 - 0,998)	1,000 (0,993 -1,000)	1,000	0,998
(6)	<i>Candida spp</i>	Detection and identification of <i>Candida spp.</i> in human serum by LightCycler® real-time polymerase chain reaction	Dunyach, C y col	32	0,727 (0,390- 0,940)	0,952 (0,762 - 0,999)	0,889	0,870
(7)	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Detection of <i>Histoplasma capsulatum</i> DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction.	Simon. S y Col	341	0,955 (0,873 - 0,991)	0,960 (0,930 – 0,980)	0,851	0,989
(8)	<i>Candida albicans.</i> <i>Aspergillus spp</i>	Assessment of A Real-time PCR Method to Detect Human Non-Cryptococcal Fungal Meningitis.	Badiee. P y Col	40	1,000 (0,158 - 1,000)	0,816 (0,657-0,923)	0,222	1,000
(9)	<i>Candida albicans</i>	Detection of <i>Candida</i> and <i>Aspergillus</i> species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis	Sugita, S y col	93	1,000 (0,158 - 1,000)	0,889 (0,759-0,963)	0,286	1,000
(10)	<i>Histoplasma Capsulatum</i>	Detection of <i>Blastomyces dermatitidis</i> and <i>Histoplasma capsulatum</i> from Culture Isolates and Clinical Specimens by Use of Real-Time PCR	Babady. N y col	797	0,733 (0,449 - 0,922)	1,000 (0,995 - 1,000)	1,000	0,995

Evaluación de la Validez del método qPCR en el diagnóstico de la Enfermedad fúngica invasora ocasionada por los hongos *Candida*, *Histoplasma*.

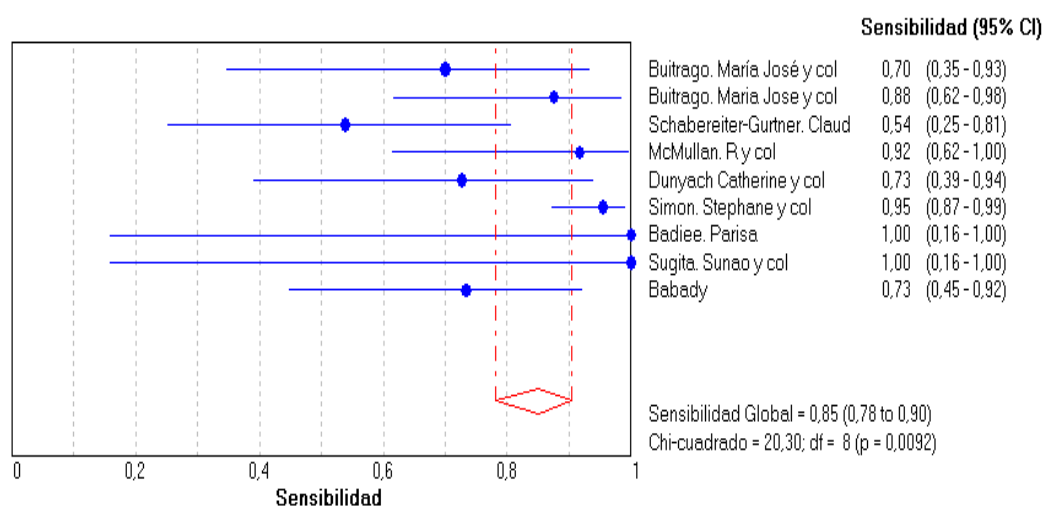
Sensibilidad clínica global:

La sensibilidad global del método qPCR fue de 0,85 IC (0,780 0,900); este valor corresponde a la probabilidad que tiene la técnica qPCR de arrojar un resultado positivo en presencia de la enfermedad fúngica invasora ocasionada por especies de *Candida e Histoplasma* (figura 1 A)

Especificidad clínica global:

La especificidad global fue de 0,980 IC (0,970 0,990), esto significa que el método q-PCR tiene una probabilidad de 0,97 de arrojar un resultado negativo dada la ausencia de la enfermedad fúngica invasora ocasionada por especies de *Candida e Histoplasma* (figura 1 B).

A.



B.

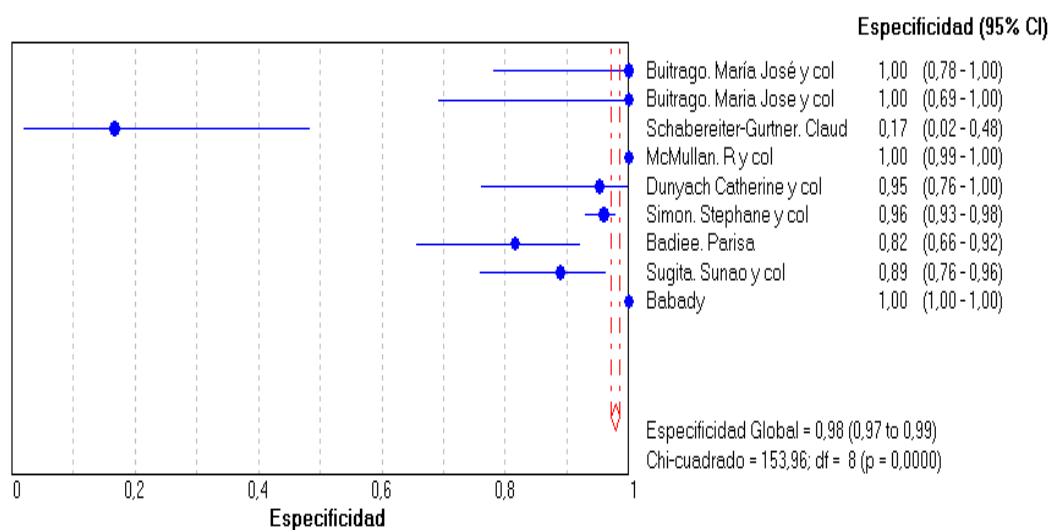


Figura 1: Sensibilidad, especificidad. Gráficos Forest plotted que representan la sensibilidad (A) y especificidad (B) de la prueba Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) en el diagnóstico de enfermedad fúngica invasora ocasionada por hongos de los géneros *Candida* e *Histoplasma* en humanos, mediante revisión sistemática y Metanálisis.

El punto central azul, determina la media y la línea transversal determina el intervalo de confianza (CI) del 95%. El extremo rojo inferior de la línea punteada que atraviesa todos los datos del estudio representa la suma de los promedios obtenidos y la línea punteada el intervalo de confianza de ese promedio.

Evaluación de la seguridad de la técnica qPCR en el diagnóstico de la EFI ocasionada por hongos *Candida* e *Histoplasma*.

Valor predictivo positivo: VPP

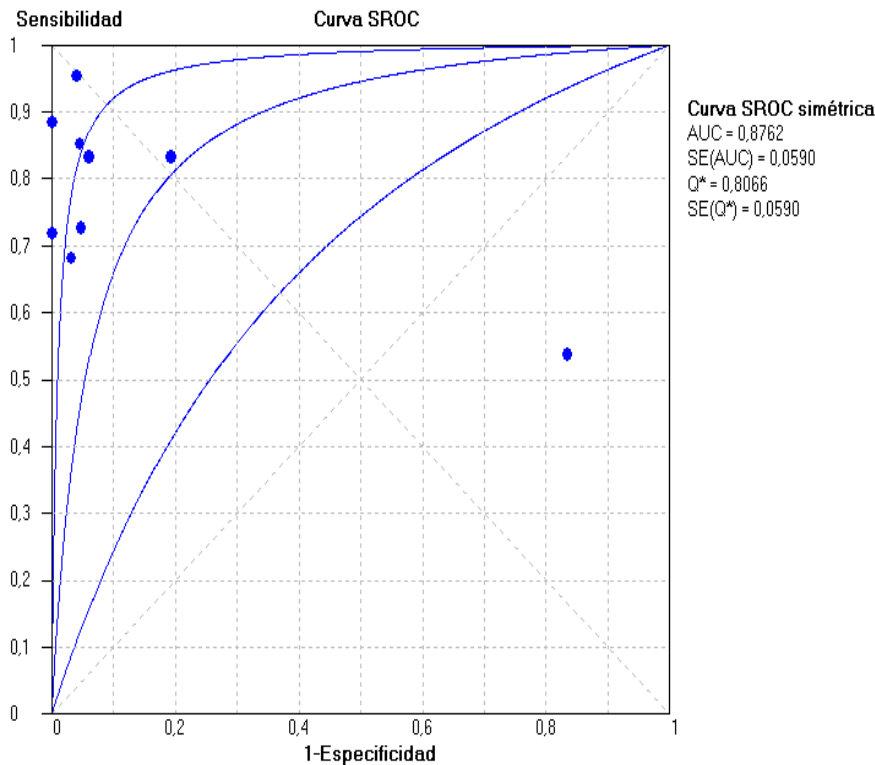
El VPP es la probabilidad de que un individuo tenga la enfermedad, dado que presenta un resultado positivo. En esta revisión el 60% (n=6/10) (tabla4) de los estudios tienen un VPP superior a 0,8 este valor indica la probabilidad de que un individuo tenga enfermedad fúngica invasora, causada por especies de *Candida*, *Histoplasma*, dado que tiene un resultado positivo con la qPCR.

Valor predictivo negativo: VPN

El VPN es la probabilidad de que el individuo no tenga la enfermedad, dado que presenta un resultado negativo, el 89% (n=8/9) (tabla 4) de los estudios

tienen un valor predictivo negativo superior a 0,8. Este valor indica la probabilidad que tiene un individuo no tenga la enfermedad dado que tiene un resultado negativo.

C. Sensibilidad y especificidad de los estudios seleccionados, mediante Curva SROC



Las curvas SROC son una representación gráfica de los diferentes estudios incluidos con su Sensibilidad (o tasa de verdaderos positivos) sobre el eje «y» y la 1-Especificidad (o tasa de falsos positivos) sobre el eje «x». Cada punto representa la tasa de verdaderos positivos/falsos positivos para un estudio dado. Los puntos a lo largo de la diagonal indican estudios que muestran pruebas diagnósticas no valorables (la tasa de verdaderos positivos igual a la de falsos positivos, y la prueba no fue capaz de discriminar entre enfermos y sanos).

Sin embargo, los puntos en la esquina superior izquierda indican estudios que muestran una exactitud diagnóstica más valorable (una tasa de verdaderos positivos que se aproxima a 1,0 y una tasa de falsos positivos que se aproxima a 0,0).

Se puede evidenciar que el 89% de los estudios presentan una tendencia a 1, (área bajo la curva AUC=0,8762).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El principal reto del diagnóstico micológico continuará siendo la identificación rápida y eficiente de un número cada vez mayor de hongos patógenos para el ser humano.

En la actualidad, un número importante de estudios demuestran la alta capacidad diagnóstica que tiene la qPCR para detectar hongos que causan Enfermedad fúngica invasora (EFI) en humanos como *Candida*, *Histoplasma*, *Aspergillus* así como en bacterias, virus y otros microorganismos de importancia clínica (135, 136), estos resultados muestran la utilidad de este método, como alternativa cuando por los métodos tradicionales, como en el caso del cultivo no se obtenga un diagnóstico oportuno, o cuando la carga del microorganismo en la muestra biológica no se pueda recuperar por el método tradicional, como en los casos de seguimiento donde el paciente éste tomando tratamiento contra la infección (137).

En este estudio se encontró que el método qPCR presenta una sensibilidad y especificidad global de 0,85 IC (0,78-0,90) y 0,98 IC (0,97-0,99) respectivamente; pero al comparar los datos de sensibilidad clínica con las reportadas por Buitrago y col ; Schabereiter y col (4); Dunyach y col (6) y Babady y col (10) se observa de forma generalizada disminución en este índice (tabla 4). Al examinar las posibles causas que afectan este valor se encontró que en los estudios de Buitrago y col (3) y Dunyach y col (6) el 43% (3/7) y el 100% (2/2) de las muestras de suero positivas por el método de referencia no lograron ser amplificadas con la técnica qPCR; en los 2 estudios restantes utilizaron diferentes tipos de muestras y no describen cuales fueron específicamente amplificadas con dicha técnica molecular por lo que no se puede relacionar si la causa de la baja sensibilidad sea la utilización de muestras de suero para detectar los microorganismos, en donde generalmente hay menor cantidad de DNA fúngico. Una situación que apoye que el tipo de muestra influye directamente en la sensibilidad de la muestra es la relacionada con el estudio de Buitrago y col en 2006, donde encontraron una sensibilidad de 77,3% en muestras respiratorias y aspirados medulares y en un estudio posterior realizado por ellos mismos, ésta disminuyó a 70% utilizando muestras

de suero en pacientes con histoplasmosis comprobada por cultivo. Debido al tamaño muestral de los dos estudios es necesario realizar más ensayos que apoyen lo encontrado por estos autores, específicamente en la detección de enfermedades invasoras ocasionadas por hongos.

Los datos de sensibilidad y especificidad clínica global de este estudio son similares a los reportados por otros autores utilizando este método para la detección hongos, bacterias y virus de importancia clínica (135, 136, 138). Sin embargo, este resultado de sensibilidad clínica varía cuando se analizan casos posibles o sospechosos de EFI. En esta revisión se encontró que la sensibilidad clínica calculada solo con los casos probados 0,85 IC (0,78-0,90) es menor que cuando se utilizan también los casos posibles o sospechosos, 0,93 (0,895 - 0,956). Este incremento podría explicarse porque en los casos sospechosos se utilizan muestras que no provienen de sitios estériles donde hay mayor probabilidad de encontrar los microorganismos de interés, ya sea por contaminación o por colonización.

La especificidad en general fue muy bien valorada, 0,980 IC (0,970 0,990), este valor es similar al reportado por Musher y col. utilizando q-PCR para el diagnóstico de aspergillosis invasora en lavado broncoalveolar, donde la sensibilidad de la prueba es de 1,00 con un intervalo de confianza de 95% entre 0,93 y 1,0 (139).

Esto demuestra la buena calidad del diseño de los cebadores que se utilizaron en cada uno de los estudios, incluso en el estudio de Dunyach y col (6) donde se utilizaron dos pares de cebadores diferentes (ITS y L18) presentando mejor rendimiento el primero. Solo el estudio de Schabereiter y col (4) presentó una especificidad de 0,17 donde se utilizaron varias especies de *Candida* y *Aspergillus*, en este caso se debe verificar el diseño y la afinidad de los cebadores por la secuencia de interés en las especies de hongos utilizadas.

La relación de sensibilidad frente a la especificidad que permite corroborar el valor diagnóstico de la prueba evaluada, se puede evidenciar que el 89% de los estudios presentan una tendencia a 1, (área bajo la curva AUC=0,8762). Este valor. Además permite tomar decisiones frente a la metodología que se utilizó

en cada estudio, por lo que podemos inferir que el estudio de Schabereiter y col (4), no debe utilizarse como modelo para el diagnóstico de infección fúngica invasora.

En este estudio, más del 50% de los estudios poseen valores predictivos positivos y negativos superiores a 0,8 lo que indica que con la técnica molecular qPCR se puede predecir en un 80% la probabilidad de que los individuos sean diagnosticados correctamente según su condición.

La información presentada en esta revisión permite establecer la validez y seguridad de la técnica molecular qPCR en el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora ocasionada por los hongos *Candida* e *Histoplasma*; sin embargo, no es suficiente porque solo describe el valor diagnóstico de la prueba y los aspectos de fiabilidad del método de medición se muestran de forma parcial con el cálculo de la sensibilidad y especificidad analítica. En este orden de ideas, es necesario estandarizar aspectos importantes como la selección de la secuencia blanco, la utilización de cebadores específicos, el método de extracción del material genético, la(s) plataforma(s) donde se realiza la medición, la necesidad o no de purificar las muestras de interés, la selección de las secuencias blanco, las concentraciones óptimas a evaluar en el proceso de medición, los tiempos y temperaturas de incubación, la concentración y pH de tampones, MgCl₂, dNTP, entre otros. La caracterización de dichos parámetros de control es crucial para la identificación de los puntos críticos que deben controlarse correctamente en el ensayo así como la inclusión de un sistema de garantía y control de la calidad.

Apoyados en la información reportada en la literatura científica relacionada con la validez diagnóstica de las pruebas moleculares, la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología (SEIMC), realizó una actualización de las recomendaciones sobre el diagnóstico de EFI donde expone los grados de evidencia empleados para realizar las técnicas diagnósticas de esta entidad; según este consenso las pruebas de detección de ácidos nucleicos para el diagnóstico de Candidiasis invasora, se encuentran dentro de la categoría B-II que corresponden a técnicas de utilidad moderada, que hace recomendar su uso en algunas ocasiones, con evidencia obtenida de ≥ 1 estudio de casos y

controles o de cohorte realizado en un solo centro, de múltiples series o de resultados de series no controladas. En el caso de la Histoplasmosis se definió la categoría B-III, que corresponde a técnicas de utilidad moderada, evidencia obtenida de opiniones de expertos, basadas en experiencias clínicas o estudios descriptivos; y para *Cryptococcosis*, aún no se ha resuelto la categoría en que deben quedar las técnicas de ácido nucleico para detectar este microorganismo (28).

Es importante resaltar que en este estudio no se encontraron referencias que cumplieran los criterios de inclusión y que describieran como causante de EFI especies de *Cryptococcus*, por lo que las conclusiones descritas aplican solo a los estudios que incluyeron a los hongos *Candida* e *Histoplasma*.

En conclusión, el método de detección de hongos agentes causantes de EFI, debe ser aquel que sea capaz de detectar el microorganismo en fases tempranas de la enfermedad, para que se reduzca la alta mortalidad en los pacientes inmunocomprometidos y en particular los neutropénicos. Los valores predictivos en este caso juegan un papel muy importante; en este estudio la qPCR presentó valores superiores a 0,80 utilizando casos probados, por lo que no se puede inferir a los casos que define la EORTC/MSG, como probables y posibles.

El diagnóstico molecular combinado con otros marcadores moleculares como el manano, el β -1,3-D-glucano, la detección de anticuerpos antimicelio y la antigenuria en los casos de histoplasmosis podrían fortalecer el diagnóstico oportuno de la enfermedad fúngica invasora causada por los hongos *Candida* e *Histoplasma* y apoyar el seguimiento del tratamiento instaurado, mientras el paciente tenga un alto riesgo de tener la micosis.

REFERENCIAS

1. Buitrago MJ, Berenguer J, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;25(10):665-8.
2. Klingspor L, Jalal S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(8):745-53.
3. Buitrago MJ, Gómez-López A, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. [Assessment of a quantitative PCR method for clinical diagnosis of imported histoplasmosis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25(1):16-22.
4. Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML, Hirschl AM, Willinger B. Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2007;45(3):906-14.
5. McMullan RM, L.Coyle, P V.Hedderwick, S.McCloskey, B.O'Neill, H J.Patterson, C C.Thompson, G.Webb, C H.Hay, R J. A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults. *Clinical infectious diseases.* 2008. p. 890-6.
6. Dunyach CB, Sébastien, Phelipeau C, Drakulovski P, Reynes J, Mallié M. Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler® real-time polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 263-271. 2008. 2008.
7. Simon S, Veron V, Boukhari R, Blanchet D, Aznar C. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;66(3):268-73.
8. Badiée P. Assessment of a real-time PCR method to detect human non-cryptococcal fungal meningitis. In: Alborzi A, editor. 2011. p. 381-4.
9. Sugita S, Kamoi K, Ogawa M, Watanabe K, Shimizu N, Mochizuki M. Detection of *Candida* and *Aspergillus* species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011.
10. Babady NE, Buckwalter SP, Hall L, Le Febre KM, Binnicker MJ, Wengenack NL. Detection of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum* from culture isolates and clinical specimens by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3204-8.
11. 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.
12. Martins-Nishikawa M, Trilles L, Symoens F, Swinne D, Nolard N. Prevalence of *Candida dubliniensis* in the BCCM/IHEM Biomedical Fungi/Yeasts culture collection (isolates before 1990). *Med Mycol.* 2002;40(4):443-5.
13. Satpute MG, Telang NV, Litake GM, Niphadkar KB, Joshi SG. Prevalence of cryptococcal meningitis at a tertiary care centre in Western India (1996-2005). *J Med Microbiol.* 2006;55(Pt 9):1301-2.
14. Taneja J, Bhargava A, Loomba P, Dogra V, Thakur A, Mishra B. Cryptococcal granulomas in an immunocompromised HIV-negative patient. *Indian J Pathol Microbiol.* 2008;51(4):553-5.
15. Salavert M, Carrasco R, Roig P, Nieto A, Cervelló A, Navarro V. [Meningitis caused by *Candida albicans* in a male patient infected by HIV and failure of treatment with amphotericin B]. *Neurologia.* 1991;6(8):295-8.
16. Dismukes WE. Cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *J Infect Dis.* 1988;157(4):624-8.
17. Khanna N, Chandramuki A, Desai A, Ravi V. Cryptococcal infections of the central nervous system: an analysis of predisposing factors, laboratory findings and outcome in

patients from South India with special reference to HIV infection. *J Med Microbiol.* 1996;45(5):376-9.

18. Natukunda E, Musiime V, Ssali F, Kizito H, Kityo C, Mugenyi P. A Case of Cryptococcal Lymphadenitis in an HIV-Infected Child. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011;27(4):373-6.

19. Flynn PM, Marina NM, Rivera GK, Hughes WT. *Candida tropicalis* infections in children with leukemia. *Leuk Lymphoma.* 1993;10(4-5):369-76.

20. Ribeiro PM, Querido SM, Back-Brito GN, Mota AJ, Koga-Ito CY, Jorge AO. Research on *Candida dubliniensis* in a Brazilian yeast collection obtained from cardiac transplant, tuberculosis, and HIV-positive patients, and evaluation of phenotypic tests using agar screening methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;71(1):81-6.

21. Badiee P, Kordbacheh P, Alborzi A, Zeini F, Mirhendy H, Mahmoody M. Fungal infections in solid organ recipients. *Exp Clin Transplant.* 2005;3(2):385-9.

22. Ahmed SH, Daef EA, Badary MS, Mahmoud MA, Abd-Elsayed AA. Nosocomial blood stream infection in intensive care units at Assiut University Hospitals (Upper Egypt) with special reference to extended spectrum beta-lactamase producing organisms. *BMC Res Notes.* 2009;2:76.

23. Ruiz-Diez B, Martinez V, Alvarez M, Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV. Molecular tracking of *Candida albicans* in a neonatal intensive care unit: long-term colonizations versus catheter-related infections. *J Clin Microbiol.* 1997;35(12):3032-6.

24. Moreira-Oliveira MS, Mikami Y, Miyaji M, Imai T, Schreiber AZ, Moretti ML. Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24(11):721-6.

25. Cerikçioğlu N, Ilki A, Bilgen H, Ozek E, Metin F, Kalaça S. The relationships between candidemia and candidal colonization and virulence factors of the colonizing strains in preterm infants. *Turk J Pediatr.* 2004;46(3):245-50.

26. Cao C, Bulmer G, Li J, Liang L, Lin Y, Xu Y, et al. Indigenous case of disseminated histoplasmosis from the *Penicillium marneffei* endemic area of China. *Mycopathologia.* 2010;170(1):47-50.

27. Zaragoza R PJ. Invasive fungal infections in critically ill patients: different therapeutic options and a uniform strategy. *Rev Iberoam Micol.* 2006;23:59-63.

28. Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García-Rodríguez J, et al. [Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) guidelines for the diagnosis of invasive fungal infections. 2010 update]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(1):39.e1-15.

29. Codina MG, de Cueto M, Vicente D, Echevarría JE, Prats G. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del sistema nervioso central. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2011;29(2):127-34.

30. Gavaldà J, Ruiz I. [Guidelines for the treatment of invasive fungal infection. Invasive fungal infection by *Candida* spp. Invasive Fungal Infection Study Group (MICOMED) and Infection in Transplantation Study Group (GESITRA) of the Spanish Society for Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003;21(9):498-508.

31. Anane S, Khalfallah F. [Biological diagnosis of systemic candidiasis: difficulties and future prospects]. *Pathol Biol (Paris).* 2007;55(5):262-72.

32. Hendolin PH, Paulin L, Koukila-Kähkölä P, Anttila VJ, Malmberg H, Richardson M, et al. Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *J Clin Microbiol.* 2000;38(11):4186-92.

33. Hidalgo JA, Alangaden GJ, Elliott D, Akins RA, Puklin J, Abrams G, et al. Fungal endophthalmitis diagnosis by detection of *Candida albicans* DNA in intraocular fluid by use of a species-specific polymerase chain reaction assay. *J Infect Dis.* 2000;181(3):1198-201.

34. Badiee P, Alborzi A, Joukar M. Molecular assay to detect nosocomial fungal infections in intensive care units. *Eur J Intern Med.* 2011;22(6):611-5.
35. White PL, Barton R, Guiver M, Linton CJ, Wilson S, Smith M, et al. A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis?: a United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections. *J Mol Diagn.* 2006;8(3):376-84.
36. Ellepola ANB MC. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Journal of microbiology (Seoul, Korea).* 2005 Feb;43 Spec No:65–84. 2005.
37. Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis.* 2002;34(1):7-14.
38. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):1735-45.
39. Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Guoin F, Sollet JP, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med.* 2009;37(5):1612-8.
40. Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 2002;50(4):243-60.
41. de Bedout C AJ, Vega R, Méndez M, Santiago AR, Pabón ML, et al. [Evaluation of *Candida* species' susceptibility to fluconazole with the disk diffusion method]. *Biomédica : revista del Instituto Nacional de Salud.* 2003 Mar;23(1):31–7. 2003.
42. JA C. Epidemiology of the *Candida* spp. in Colombia and susceptibility in woman. *Infectio.* 13(1):3–5.
43. Chen S, Slavin M, Nguyen Q, Marriott D, Playford EG, Ellis D, et al. Active surveillance for candidemia, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(10):1508-16.
44. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(11):685-702.
45. Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin Infect Dis.* 2009;48(3):265-73.
46. Ostrosky-Zeichner L, Pappas PG. Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Crit Care Med.* 2006;34(3):857-63.
47. Shokohi T, Hashemi Soteh MB, Pouri ZS, Hedayati MT, Mayahi S. Identification of *Candida* species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. *Indian J Med Microbiol.* 2010;28(2):147-51.
48. Wisplinghoff H, Seifert H, Tallent SM, Bischoff T, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in United States hospitals: epidemiology, clinical features and susceptibilities. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22(8):686-91.
49. Alonso-Valle H, Acha O, García-Palomo JD, Fariñas-Alvarez C, Fernández-Mazarrasa C, Fariñas MC. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003;22(4):254-7.
50. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, et al. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis.* 2003;37(5):634-43.
51. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20(3):485-506.

52. Charles PE. Multifocal *Candida* species colonization as a trigger for early antifungal therapy in critically ill patients: what about other risk factors for fungal infection? *Crit Care Med*. 2006;34(3):913-4.
53. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*. 2005;4(4):633-8.
54. Slavin M, Fastenau J, Sukarom I, Mavros P, Crowley S, Gerth WC. Burden of hospitalization of patients with *Candida* and *Aspergillus* infections in Australia. *Int J Infect Dis*. 2004;8(2):111-20.
55. Eggimann P, Bille J, Marchetti O. Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU. *Ann Intensive Care*. 2011;1:37.
56. Laín A, Elguezabal N, Moragues MD, García-Ruiz JC, del Palacio A, Pontón J. Contribution of serum biomarkers to the diagnosis of invasive candidiasis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008;8(3):315-25.
57. Eggimann P, Pittet D. [Candidiasis among non-neutropenic patients: from colonization to infection]. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2001;20(4):382-8.
58. Ostrosky-Zeichner L. New approaches to the risk of *Candida* in the intensive care unit. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16(6):533-7.
59. Safdar A, Singhal S, Mehta J. Clinical significance of non-*Candida* fungal blood isolation in patients undergoing high-risk allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (1993-2001). *Cancer*. 2004;100(11):2456-61.
60. O'Shaughnessy EM, Shea YM, Witebsky FG. Laboratory diagnosis of invasive mycoses. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2003;17(1):135-58.
61. Llovo J, 14a.1–16. Diagnóstico microscópico de las micosis. En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio MC, editors. *Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica*. 2a ed. Bilbao: In: J. P, editor. 2007.
62. Mayayo Artal E. [Histopathological diagnosis of mycoses]. *Rev Iberoam Micol*. 2004;21(1):1-9.
63. Linares MJ, Solis F. Identificación de levaduras. En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio MC, editors. *Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica*. 2a ed. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología; 2007. p. 11.1-11.1.
64. Cuétara MS, Alhambra A, Del Palacio A. [Traditional microbiological diagnosis for invasive candidiasis in critical non-neutropenic patients]. *Rev Iberoam Micol*. 2006;23(1):4-7.
65. Sahand IH, Ortiz R, Pemán J, Moragues MD, Quindós G, Pontón J. [Rapid identification of *Candida dubliniensis* using the Bichro-Dubli test]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(9):576-8.
66. Pincus DH, Orenga S, Chatellier S. Yeast identification--past, present, and future methods. *Med Mycol*. 2007;45(2):97-121.
67. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1-->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis*. 2005;41(5):654-9.
68. Ellis M, Al-Ramadi B, Bernsen R, Kristensen J, Alizadeh H, Hedstrom U. Prospective evaluation of mannan and anti-mannan antibodies for diagnosis of invasive *Candida* infections in patients with neutropenic fever. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 5):606-15.
69. Verduyn Lunel FM, Donnelly JP, van der Lee HA, Blijlevens NM, Verweij PE. Circulating *Candida*-specific anti-mannan antibodies precede invasive candidiasis in patients undergoing myelo-ablative chemotherapy. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(4):380-6.
70. Moragues MD, Ortiz N, Iruetagoiena JR, García-Ruiz JC, Amutio E, Rojas A, et al. [Evaluation of a new commercial test (*Candida albicans* IFA IgG) for the serodiagnosis of invasive candidiasis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(2):83-8.
71. Obayashi T, Negishi K, Suzuki T, Funata N. Reappraisal of the serum (1-->3)-beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections--a study based on autopsy cases from 6 years. *Clin Infect Dis*. 2008;46(12):1864-70.

72. Laín A, Elguezabal N, Moragues MD, García-Ruiz JC, Del Palacio A, Pontón J. Contribution of serum biomarkers to the diagnosis of invasive candidiasis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2008;8:315-325.
73. Koo S, Bryar JM, Page JH, Baden LR, Marty FM. Diagnostic performance of the (1->3)-beta-D-glucan assay for invasive fungal disease. *Clin Infect Dis.* 2009;49(11):1650-9.
74. Maaroufi Y, De Bruyne JM, Duchateau V, Georgala A, Crokaert F. Early detection and identification of commonly encountered *Candida* species from simulated blood cultures by using a real-time PCR-based assay. *J Mol Diagn.* 2004;6(2):108-14.
75. Pryce TM, Kay ID, Palladino S, Heath CH. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;47(3):487-96.
76. Gupta V, Cobb RR, Brown L, Fleming L, Mukherjee N. A quantitative polymerase chain reaction assay for detecting and identifying fungal contamination in human allograft tissue. *Cell Tissue Bank.* 2008;9(2):75-82.
77. Kwon-Chung KJ BJ, Rhodes JC. Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1982 Jan;48(1):25-38. 1982.
78. Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res.* 2006;6(4):574-87.
79. Bicanic T HT. Cryptococcal meningitis. *British medical bulletin* [Internet]. 2004 Jan [cited 2011 Jun 22];72(5075):99-118. 2004.
80. McFadden DC, Casadevall A. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol.* 2001;39 Suppl 1:19-30.
81. Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol.* 2000;3(4):354-8.
82. Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun.* 2000;68(2):443-8.
83. Mirza SA, Phelan M, Rimland D, Graviss E, Hamill R, Brandt ME, et al. The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. *Clin Infect Dis.* 2003;36(6):789-94.
84. Metta HA, Corti ME, Negroni R, Helou S, Arechavala A, Soto I, et al. [Disseminated cryptococcosis in patients with AIDS. Clinical, microbiological, and immunological analysis of 51 patients]. *Rev Argent Microbiol.* 2002;34(3):117-23.
85. Mitchell DH, Sorrell TC, Allworth AM, Heath CH, McGregor AR, Papanoum K, et al. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. *Clin Infect Dis.* 1995;20(3):611-6.
86. Speed B, Dunt D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Dis.* 1995;21(1):28-34; discussion 5-6.
87. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(49):17258-63.
88. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, Group ICS. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(2):189-95.
89. Lizarazo J, Linares M, de Bedout C, Restrepo A, Agudelo CI, Castañeda E, et al. [Results of nine years of the clinical and epidemiological survey on cryptococcosis in Colombia, 1997-2005]. *Biomedica.* 2007;27(1):94-109.
90. Hotzel H, Kielstein P, Blaschke-Hellmessen R, Wendisch J, Bär W. Phenotypic and genotypic differentiation of several human and avian isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses.* 1998;41(9-10):389-96.
91. Kaufman L, Blumer S. Value and interpretation of serological tests for the diagnosis of cryptococcosis. *Appl Microbiol.* 1968;16(12):1907-12.

92. Cohen J. Comparison of the sensitivity of three methods for the rapid identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Pathol*. 1984;37(3):332-4.
93. Baughman RP, Rhodes JC, Dohn MN, Henderson H, Frame PT. Detection of cryptococcal antigen in bronchoalveolar lavage fluid: a prospective study of diagnostic utility. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145(5):1226-9.
94. Bottone EJ, Sindone M, Caraballo V. Value of assessing cryptococcal antigen in bronchoalveolar lavage and sputum specimens from patients with AIDS. *Mt Sinai J Med*. 1998;65(5-6):422-5.
95. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis*. 2010;50(3):291-322.
96. Zimmer BL, Roberts GD. Rapid selective urease test for presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*. 1979;10(3):380-1.
97. Bava AJ, Negroni R, Bianchi M. Cryptococcosis produced by a urease negative strain of *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol*. 1993;31(1):87-9.
98. Brizendine KD, Baddley JW, Pappas PG. Pulmonary cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011;32(6):727-34.
99. Temstet A, Roux P, Poirot JL, Ronin O, Dromer F. Evaluation of a monoclonal antibody-based latex agglutination test for diagnosis of cryptococcosis: comparison with two tests using polyclonal antibodies. *J Clin Microbiol*. 1992;30(10):2544-50.
100. Fekkar A, Brun S, D'Ussel M, Uzunov M, Cracco C, Dhédin N, et al. Serum cross-reactivity with *Aspergillus galactomannan* and cryptococcal antigen during fatal disseminated *Trichosporon dermatis* infection. *Clin Infect Dis*. 2009;49(9):1457-8.
101. Babady NE, Bestrom JE, Jespersen DJ, Jones MF, Beito EM, Binnicker MJ, et al. Evaluation of three commercial latex agglutination kits and a commercial enzyme immunoassay for the detection of cryptococcal antigen. *Med Mycol*. 2009;47(3):336-8.
102. Frank UK, Nishimura SL, Li NC, Sugai K, Yajko DM, Hadley WK, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of cryptococcal capsular polysaccharide antigen in serum and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*. 1993;31(1):97-101.
103. Baddley JW, Perfect JR, Oster RA, Larsen RA, Pankey GA, Henderson H, et al. Pulmonary cryptococcosis in patients without HIV infection: factors associated with disseminated disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(10):937-43.
104. Veron V, Simon S, Blanchet D, Aznar C. Real-time polymerase chain reaction detection of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in human samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;65(1):69-72.
105. Enache-Angoulvant A, Chandenier J, Symoens F, Lacube P, Bolognini J, Douchet C, et al. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. *J Clin Microbiol*. 2007;45(4):1261-5.
106. Diaz MR, Fell JW. Use of a suspension array for rapid identification of the varieties and genotypes of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):3662-72.
107. Paschoal RC, Hirata MH, Hirata RC, Melhem MeS, Dias AL, Paula CR. Neurocryptococcosis: diagnosis by PCR method. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004;46(4):203-7.
108. Wheat LJ, Kauffman CA. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2003;17(1):1-19, vii.
109. Wheat LJ. Histoplasmosis: a review for clinicians from non-endemic areas. *Mycoses*. 2006;49(4):274-82.
110. Goodwin RA SJ, Thurman GH, Thurman SS, Des Prez RM. Disseminated histoplasmosis: clinical and pathologic correlations. *Medicine*. 1980 Jan;59(1):1-33. 1980.
111. Lewden C SM, Cabié A, Couppié P, Boulard F, Bissuel F, et al. [Causes of death among HIV infected adults in French Guyana and the French West Indies in the era of highly active

- antiretroviral therapy (HAART)]. *Médecine et maladies infectieuses*. 2004 Jul;34(7):286–92. 2004.
112. Lai C-H HC-K, Chin C, Yang Y-T, Lin H-F, Lin H-H. Indigenous Case of Disseminated Histoplasmosis, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases*. 2007;13(1):127–9. 2007.
113. Benevides CF, Durães RO, Aquino B, Schiavon LeL, Narciso-Schiavon JL, Buzzoleti FaC. Bilateral adrenal histoplasmosis in an immunocompetent man. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(2):230-3.
114. Schestatsky P, Chedid MF, Amaral OB, Unis G, Oliveira FM, Severo LC. Isolated central nervous system histoplasmosis in immunocompetent hosts: a series of 11 cases. *Scand J Infect Dis*. 2006;38(1):43-8.
115. Control. CfD. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / 1992 Dec*;41(RR-17):1–19. 1993.
116. Wheat J, Sarosi G, McKinsey D, Hamill R, Bradsher R, Johnson P, et al. Practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis. *Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis*. 2000;30(4):688-95.
117. Wheat LJ, Conces D, Allen SD, Blue-Hnidy D, Loyd J. Pulmonary histoplasmosis syndromes: recognition, diagnosis, and management. *Semin Respir Crit Care Med*. 2004;25(2):129-44.
118. Wheat LJ. Improvements in diagnosis of histoplasmosis. *Expert Opin Biol Ther*. 2006;6(11):1207-21.
119. Wheat LJ, Garringer T, Brizendine E, Connolly P. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;43(1):29-37.
120. Wheat LJ. Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycoses in the immunocompromised host. *Transpl Infect Dis*. 2006;8(3):128-39.
121. Wheat J, Wheat H, Connolly P, Kleiman M, Supparatpinyo K, Nelson K, et al. Cross-reactivity in *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* antigen assays of urine samples from patients with endemic mycoses. *Clin Infect Dis*. 1997;24(6):1169-71.
122. Hage CA, Davis TE, Fuller D, Egan L, Witt JR, Wheat LJ, et al. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection in BAL fluid. *Chest*. 2010;137(3):623-8.
123. Swartzentruber S, Rhodes L, Kurkjian K, Zahn M, Brandt ME, Connolly P, et al. Diagnosis of acute pulmonary histoplasmosis by antigen detection. *Clin Infect Dis*. 2009;49(12):1878-82.
124. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nübling G, Robertson VJ, Knobloch J, et al. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol*. 2002;40(5):1644-7.
125. Maubon D, Simon S, Aznar C. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;58(4):441-4.
126. Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gomez C, Serra E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2003;41(4):1753-5.
127. Muñoz C, Gómez BL, Tobón A, Arango K, Restrepo A, Correa MM, et al. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(1):62-7.
128. Martagon-Villamil J, Shrestha N, Sholtis M, Isada CM, Hall GS, Bryne T, et al. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2003;41(3):1295-8.
129. Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1990;48(8):579-82.

130. Costa J. [Real-time PCR]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(5):299-304; quiz 5.
131. Bastos JA, Diniz CG, Bastos MG, Vilela EM, Silva VL, Chaoubah A, et al. Identification of periodontal pathogens and severity of periodontitis in patients with and without chronic kidney disease. *Arch Oral Biol*. 2011;56(8):804-11.
132. Devillé WL BF, Bouter LM, Montori VM, de Vet HC, van der Windt DA, Bezemer PD. Conducting systematic reviews of diagnostic studies: didactic guidelines. *BMC Med Res Methodol* 2002, 2:9.
133. Deeks JJ. Systematic reviews of evaluations of diagnostic and screening tests. In Egger M SG, Altman DG (eds). *Systematic Reviews in Health Care. Meta-analysis in context*. London: BMJ Books, 2001:248-282.
134. Pita Fernández, S. Pértegas Díaz, S. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo. A Coruña (España)- *Cad Aten Primaria* 2003; 10: 120-124.
135. Buitrago MJ MP, Puente S, Gomez-Lopez A, Arribi A, Zancoppe-Oliveira RM, et al. Utility of Real-time PCR for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA in the diagnosis of imported paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2009:1-4.
136. Nakamichi K, Kurane I, Saijo M. Evaluation of a quantitative real-time PCR assay for the detection of JC polyomavirus DNA in cerebrospinal fluid without nucleic acid extraction. *Jpn J Infect Dis*. 2011;64(3):211-6.
137. Lin MT, Lu HC, Chen WL. Improving efficacy of antifungal therapy by polymerase chain reaction-based strategy among febrile patients with neutropenia and cancer. *Clin Infect Dis*. 2001;33(10):1621-7.
138. Pornprasert S, Praparattanapan J, Khamwan C, Pawichai S, Pimsarn P, Samleerat T, et al. Development of TaqMan real-time polymerase chain reaction for the detection and identification of *Penicillium marneffe*. *Mycoses*. 2009;52(6):487-92.
139. Musher B, Fredricks D, Leisenring W, Balajee SA, Smith C, Marr KA. Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5517-22.