






Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

Universidad Autónoma de Barcelona

Facultad de Medicina

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, y Medicina Preventiva y Salud Pública

Programa de Metodología de la Investigación Médica y Salud Pública

«Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica»

TESIS DOCTORAL

Marcelo S. Chaves Morelli

Director: Dr. Gerard Urrútia Cuchí

Tutor: Dr. Xavier Bonfill Cosp

Junio de 2021

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

Universidad Autónoma de Barcelona

Facultad de Medicina

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, y Medicina Preventiva y Salud Pública

Programa de Metodología de la Investigación Médica y Salud Pública

«Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica»

Marcelo S. Chaves Morelli

Junio de 2021

Memoria de Tesis por compendio de publicaciones presentada por Marcelo S. Chaves Morelli para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad Autónoma de Barcelona y realizada bajo la dirección del Dr. Gerard Urrútia Cuchí; siendo tutor el Dr. Xavier Bonfill Cosp

Agradecimientos

A Silvina, mi querida esposa, con quién compartimos la vida y formamos una hermosa familia con cinco hijos, que se casaron con personas tan bellas como ellos y nos regalaron la alegría de diez preciosos nietos

A mi madre –*entrañable abuela*- por su ejemplo de temple, sencillez y tenacidad

A mis maestros en la Clínica Médica, Dres. Juan E. Duhart y Fernando Adaro, por haberme mostrado la importancia de la dedicación, la necesidad del estudio y el respeto al paciente

Al Dr. Adolfo Rubinstein y todo su equipo de la Escuela de Salud Pública de la UBA y del Instituto de Efectividad Clínica de Buenos Aires, por adentrarme en el difícil y desafiante mundo de la epidemiología y la estadística

A todos los co-autores de las publicaciones de la presente tesis, sin cuya colaboración y participación, las mismas no se hubieran concretado. En particular, al equipo del Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de Santa Fe – Argentina; dirigido por el Dr. Guillermo García Efrón, por el principal e imprescindible aporte realizado.

A los Dres. Xavier Bonfill y Gerard Urrútia por haberme recibido con afecto y generosidad, cuando llegué como becario de revisiones sistemáticas hace más de 10 años, y haberme alentado con entusiasmo cuando volví años más tarde con el proyecto de la tesis en diseños cuasi-experimentales; en el que me han guiado y dirigido, permitiéndome llevar la nave a buen puerto. Muchas gracias!

ÍNDICE

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1. La inferencia causal	11
2.1.1. La causa y los modelos de causalidad	12
2.1.2. El efecto y el modelo contrafactual	15
2.1.3. La relación causa-efecto	17
2.2. Diseños apropiados para evaluar causalidad	18
2.2.1. Los estudios o ensayos experimentales randomizados	19
2.2.2. Los estudios cuasi-experimentales	20
2.2.2.1. Tipos de diseño cuasi-experimentales	21
2.3. Utilidad y aplicaciones de los diseños cuasi-experimentales	27
2.4. Calidad de los estudios cuasi-experimentales. Riesgo de sesgos	29
2.4.1. Los supuestos	30
2.4.2. El riesgo de sesgo y los dominios	32
2.4.3. El reporte de los cuasi-experimentales. Problemas y directrices	34
2.5. Justificación de la tesis por compendio de publicaciones	35
3. OBJETIVOS	38
3.1. Generales	38
3.2. Específicos	38
4. MÉTODOS	39
4.1. Estudio #1. Presentación de 'Métodos' en castellano	39
4.2. Estudio #2. Presentación de 'Métodos' en castellano	40
4.3. Estudio #3. Presentación de 'Métodos' en castellano	44
5. RESULTADOS	47
5.1. Publicación #1. Presentación de 'Resultados' en castellano	48
5.2. Publicación #2. Presentación de 'Resultados' en castellano	50
5.3. Publicación #3. Presentación de 'Resultados' en castellano	52

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

5.4. Textos completos de las publicaciones en versión original	55
5.4.1. Publicación #1. Chaves MS, Franco D, Nanni JC, Basaldúa ML, Boleas M, Aphalo G, Feltes Silva P, Elgadban MC, Emery F, Gamarra S, Garcia-Effron G, Bantar C. Control of an outbreak of postoperative bone mucormycosis: An intervention study of contiguous cohorts. <i>Am J Infect Control</i> 2016; 44: 1715-7.	55
5.4.2. Publicación #2: Gamarra S, Chaves MS, Cabeza MS, Macedo C, Leonardelli F, Franco D, Boleas M, Garcia-Effron G. Mucormycosis outbreak due to <i>Rhizopus microsporus</i> after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction surgery evaluated by RAPD and MALDI-TOF Mass spectrometry. <i>J Micol Med</i> 2018; 28: 617-22.	58
5.4.3. Publicación #3: Chaves MS, Leonardelli F, Franco DM, Ríos PG, Colli GM, Gutiérrez AR, Ferri M, Elgadban MC, Basaldúa ML, Boleas M, Feltes-Silva P, Bantar C, Gamarra S, García-Effrón G. Control of an outbreak of post-transplant cutaneous mucormycosis by removing the vehicle: An intervention study of contiguous cohorts. <i>Am J Infect Control</i> 2020; 48: 791-4.	64
6. DISCUSIÓN	68
6.1. Discusión específica derivada de las publicaciones	68
6.1.1. Publicación #1. Presentación de 'Discusión' en castellano	68
6.1.2. Publicación #2. Presentación de 'Discusión' en castellano	69
6.1.3. Publicación #3. Presentación de 'Discusión' en castellano	71
6.2. Discusión general sobre inferencias y cuasi-experimentales	72
6.2.1. Validez de las inferencias causales con cuasi-experimentales	72
6.2.2. Utilidad y limitaciones de las inferencias causales obtenidas	77
6.2.3. Dificultades para publicar estudios primarios y de revisión	85
7. CONCLUSIONES	88
7.1. Para la práctica	88
7.2. Para el desarrollo de la disciplina y la investigación	88
8. BIBLIOGRAFÍA	90

1. RESUMEN

Español

INTRODUCCIÓN. Para valorar su utilidad en la realización de inferencias causales válidas en la práctica médica, la presente tesis, presenta tres estudios. Dos son cuasi-experimentales (ECE/DCE) que no utilizan la aleatorización para asignar la intervención y uno de validación de resultados. El fundamento matemático de la inferencia es el modelo contrafáctico.

MÉTODOS. Se realizaron dos estudios antes-después de cohortes contiguas, para evaluar la causa de dos brotes de mucormicosis post-quirúrgica; uno óseo, post-reparación de ligamento cruzado (RALCA); otro cutáneo, post-trasplante renal (TR). Los grupos que estudiaron los brotes, plantearon que se deberían a vehículos contaminados. Para interrumpir la transmisión; (i) en RALCA, los implantes *solo* podían provenir verificados de Farmacia; y el instrumental, *solo* de nuestra Central de Esterilización (CE); ii) en TR, las fajas para sostener los apósitos estériles, *solo* podían provenir estériles de nuestra CE. Se realizó un estudio de validación de los resultados genéticos obtenidos para verificar la relación entre los aislados de los pacientes, el ambiente y los presuntos vehículos, utilizando distintas técnicas genéticas y proteómicas.

RESULTADOS. Estudio # 1) Durante el brote post-RALCA (7 meses) se infectaron 3/32 pacientes (9,4%) y durante la post-intervención (22 meses) 0/148, con un riesgo relativo (RR) de 0, $p=0,0002$. El estudio genético-micológico, mostró que los tres casos post-RALCA, tenían un agrupamiento muy estrecho y separado de las muestras ambientales, de una mucormicosis post-TR y de controles no relacionados. **Estudio # 2)** La validación genética y proteómica, mostró iguales resultados que los estudios primarios. **Estudio # 3)** Durante el brote post-TR (10 meses), se infectaron 4/16 pacientes (25%) y durante la post-intervención (30 meses) 0/49, con un RR de 0, $p=0,003$. El estudio genético-micológico mostró un sub-agrupamiento muy estrecho de los primeros tres casos (separado de la cepa control y de un caso óseo); en otro agrupamiento, la cepa aislada del caso-4, mostraba un ancestro común con la cepa aislada de una faja nueva, igual a las usadas durante el brote.

DISCUSIÓN. Tanto en el **Estudio #1**, como en el **#3**, las intervenciones resultaron *efectivas*: la frecuencia de casos post-intervención fue 0, con un RR de cero. En ambas: (i) la intervención precedió al efecto, (ii) hubo una fuerte asociación causa-efecto, (iii) el efecto luego de la intervención fue de tipo 'determinístico', ya que el resultado cayó a cero y se mantuvo sostenidamente, haciendo *improbable* las explicaciones alternativas. Al realizarse en instituciones con recambio cíclico de participantes (*misma* institución) y sin que medien cambios operativos, el

contexto sería *invariante* (excepto la intervención); y al incorporar a *todos* los que reciben la práctica (RALCA o TR) durante el brote y la post-intervención, el diseño de cohortes contiguas otorga robustez a la inferencia. Además: -las intervenciones utilizadas son normativas *exógenas* que se aplicaron *independientemente* del (riesgo de tener el) resultado de interés (*todos* la recibieron), por tanto, el investigador no seleccionó la muestra, ni asignó la intervención; -se midieron las variables relevantes de ambas cohortes, las que mostraron aceptable cuasi-comparabilidad; y -el estudio genético, apoyó la hipótesis de un vehículo contaminado como fuente común extra-hospitalaria. El **Estudio #2**, de validación de la metodología genética, mostró muy buena consistencia con los resultados obtenidos por los estudios primarios.

Conclusiones

1. Los hallazgos de ambos ECE, y la investigación de validación genética y proteómica de los aislados micológicos, sostienen la hipótesis que los brotes presentados de mucormicosis, cutánea post-TR y ósea post-RALCA, estarían causadas por vehículos contaminados: implantes en RALCA; vendas (que se comercializan no-estériles) en TR.
2. La aplicación de DCE robustos, cumpliendo las condiciones de diseño y los supuestos requeridos, pueden arrojar inferencias causales válidas de utilidad en la práctica.
3. El cumplimiento de las condiciones y los supuestos, debe complementarse con un adecuado análisis de datos y de evaluación de riesgos de sesgo.
4. Para propiciar la aplicación de DCE, deberían generarse grupos cooperativos (incluyendo áreas de Epidemiología y Departamentos Médicos). Las materias y cursos de formación sobre DCE, deberían integrarse a los programas de epidemiología de grado y de posgrado en ciencias de la salud.

Català

INTRODUCCIÓ. Amb la finalitat d'avaluar la seva utilitat en la realització de inferències causals vàlides a la pràctica mèdica, la present tesi presenta tres estudis. Dos són estudis quasi-experimentals (EQE/DCE) que no utilitzen l' aleatorització per assignar la intervenció i un de validació de resultats. El fonament matemàtic de la inferència és el model contrafàctic.

MÈTODES. Es van dur a terme dos estudis del tipus abans-després de cohortes contigües, per avaluar la causa de dos brots de mucormicosis post-quirúrgica; un ossi, post-reparació de lligament creuat (RALCA); l'altre cutani, post-trasplantament renal (TR). Els grups que van estudiar els brots, varen

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

plantejar que se devien a vehicles contaminats. Per tal d'interrompre la transmissió; (i) en RALCA, els implants *només* podien provenir verificats de Farmàcia; i l'instrumental *només* de la nostra Central d'Esterilització (CE); ii) en TR, les faixes per a sostenir els apòsits estèrils, *només* podien provenir estèrils de la nostra CE. Es va dur a terme un estudi de validació dels resultats genètics obtinguts per verificar la relació entre els aïllats dels pacients, l'ambient i els presumptes vehicles, utilitzant diverses tècniques genètiques i proteòmiques.

RESULTATS. Estudi #1) Durant el brot post-RALCA (7 mesos) es varen infectar 3/32 pacients (9,4%) i durant la post-intervenció (22 mesos) 0/148, amb un risc relatiu (RR) de 0, $p=0,0002$. L'estudi genètic-micològic va mostrar que els tres casos post-RALCA tenien un agrupament molt estret i separat de les mostres ambientals, d'una mucormicosi post-TR i de controls no-relacionats. **Estudi #2)** La validació genètica i proteòmica va mostrar iguals resultats que els estudis primaris. **Estudi #3)** Durant el brot post-TR (10 mesos), es varen infectar 4/16 pacients (25%) i durant la post-intervenció (30 mesos) 0/49, amb un RR de 0, $p=0,003$. L'estudi genètic-micològic va mostrar un sub-agrupament molt estret dels primers tres casos (separat de la soca control i d'un cas ossi); en un altre agrupament, la soca aïllada del cas-4 mostrava un ancestre comú amb la soca aïllada d'una faixa nova, igual a les utilitzades durant el brot.

DISCUSIÓ. Tant a l'**Estudi #1**, com en el **#3**, les intervencions varen resultar *efectives*: la freqüència de casos post-intervenció va ser de 0, amb un RR de zero. En ambdues: (i) la intervenció va precedir l'efecte, (ii) va haver una forta associació causa-efecte, (iii) l'efecte després de la intervenció va ser de tipus 'determinístic', ja que el resultat va caure a zero i es va mantenir de manera sostinguda, fent *improbables* les explicacions alternatives. Al realitzar-se en institucions amb recanvi cíclic de participants (*mateixa* institució) i sense que interfereixin canvis operatius, el context seria *invariant* (excepte la intervenció); i a l'incorporar a *tots* els que reben la pràctica (RALCA o TR) durant el brot i la post-intervenció, el disseny de cohorts contigües confereix robustesa a la inferència. A demés: - les intervencions utilitzades són normatives *exògenes* que es varen aplicar *independentment* del (risc de tenir el) resultat d'interès (*tots* la varen rebre), per tant, l'investigador no va seleccionar la mostra, ni va assignar la intervenció; -es varen mesurar les variables rellevants d'ambdues cohorts, les quals varen mostrar una acceptable quasi-comparabilitat; i -l'estudi genètic va recolzar la hipòtesi d'un vehicle contaminat com a font comú extra-hospitalària. L'**Estudi #2**, de validació de la metodologia genètica, va mostrar molt bona consistència amb els resultats obtinguts pels estudis primaris.

Conclusions

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

1. Les troballes d'ambdós EQE, i la investigació de validació genètica i proteòmica dels aïllats micològics, sostenen la hipòtesi que els brots presentats de mucormicosis, cutània post-TR i òssia post-RALCA, estarien causades per vehicles contaminats: implants en RALCA; benes (que es comercialitzen no-estèrils) en TR.
2. L'aplicació de DCE robustos, complint les condicions de disseny i els supòsits requerits, poden recolzar inferències causals vàlides d'utilitat a la pràctica.
3. El compliment de les condicions i els supòsits ha de complementar-se amb una adequada anàlisi de les dades i d'una avaluació del risc de biaix.
4. Per propiciar l'aplicació de DCE, s'hauria de generar grups cooperatius (incloent les àrees d'Epidemiologia i Departaments Mèdics). Les matèries i cursos de formació sobre DCE, haurien d'integrar-se als programes d'epidemiologia de grau i de postgrau en ciències de la salut.

English

INTRODUCTION. To assess its usefulness in making valid causal inferences in medical practice, this thesis presents three studies. Two are quasi-experimental (Q-ES /Q-ED) that do not use randomization for the allocation of the intervention and one for validation of results. The mathematical rationale of inference is the counterfactual model.

METHODS. Two contiguous cohort before-after studies were conducted to assess the cause of two postoperative outbreaks of mucormycosis, one osseous, post anterior cruciate ligament repair (ACLR), another cutaneous, post kidney transplantation (KT). The groups that studied the outbreaks argued that they were due to contaminated vehicles. To interrupt the transmission; (i) in ACLR, implants could *only* come verified from Pharmacy; and the instruments, *only* from our Central Sterile Department (CSD); ii) in KT, the girdles to hold the sterile dressings could *only* come sterile from our CSD. A validation study of the genetic results was carried out to verify the relationship between the isolates from the patients, the environment and the presumed vehicles.

RESULTS. Study #1. During the post-ACLR outbreak (7 months) 3/32 (9.4%) patients were infected and during the post-intervention period (22 months) 0/148, with a relative risk (RR) of 0, $p = 0.0002$. The mycological genetic study showed that the three post-ACLR cases had clustered very close and were separated from the environmental, post-KT and from unrelated control samples. **Study #2.** The genetic and proteomic validation showed the same results as the primary studies. **Study #3.** During the post-KT outbreak (10 months), 4/16 (25%) patients were infected and during the post-

intervention (30 months) 0/49, with a RR of 0, $p = 0.003$. The mycological study showed a very narrow (sub) clustering of the first three cases (separated from the control strains and one bone case); in another cluster, the strain isolated from case-4 showed a common ancestor with the strain isolated from a new girdle, the same type as those used during the outbreak.

DISCUSSION. In both **Study # 1** and **# 3**, the interventions were *effective*: the frequency of post-intervention cases was 0, with a RR of zero. That is to say: (i) the intervention preceded the effect, (ii) there is a strong cause-effect association, (iii) the effect after the intervention was of a 'deterministic' type, since the result fell to zero and remained steadily, making alternative explanations unlikely. In turn, when carried out in institutions with *cyclical turnover* of participants and incorporating *all* those who receive the practice (ACLR or KT) during the outbreak and post-intervention periods, the design of contiguous cohorts provides robustness to the inference. In addition, the interventions used are *exogenous* regulations, which were applied regardless of the (risk of having the) outcome of interest: all received it. Furthermore: -the context would be invariant, since the studies had been carried out in the same institution and without operational changes (except the intervention), -the researcher did not select the sample, nor did he assign the intervention, -the relevant variables of both cohorts were measured and showed acceptable quasi-comparability, -the genetic study, supported the hypothesis of a contaminated vehicle as a common extra-hospital source. In **Study # 2**, the validation of genetic methodology showed very strong consistency.

Conclusions

1. The findings of both Q-ES, as well as genetic and proteomic investigation of the fungus, support the hypothesis that mucormycosis, cutaneous post-KT and osseous post-ACLR, would be caused by contaminated vehicles: implants in ACLR and contaminated bandages (marketed non-sterile) in KT.
2. The application of robust Q-ED, fulfilling design conditions and required assumptions, can yield valid causal inferences of utility in practice.
3. Compliance with conditions and assumptions (of Q-ED) must be complemented with an adequate data analysis and assessment of risks of bias.
4. To promote the application of Q-ED, cooperative groups including areas of Epidemiology and Medical Departments should be created. Training subjects and courses on Q-ED should be integrated into undergraduate and graduate epidemiology programs in health sciences.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. La inferencia causal

La **inferencia causal** (epidemiológica) resulta de un proceso *inductivo*¹ por el cual se procura determinar (*concluir*) si la **estimación de riesgo** denota **causalidad**. Es decir, **si el factor de riesgo o la exposición bajo investigación** es en realidad una **causa** del **evento** o **desenlace** que estamos evaluando. A esos fines, se deberá observar un proceso sistemático, explícito y fundado en un marco teórico que permita establecer (plausible o probabilísticamente) si la relación entre dos condiciones (generalmente una intervención o exposición y un evento de salud-enfermedad) es causal. Si el diseño que hemos utilizado para evaluar (*medir*) la relación entre la presunta causa y el subsiguiente efecto ha sido adecuado, al igual que su ejecución y su posterior análisis, podremos decir que el estudio y sus resultados serían (tentativamente) válidos. Siendo los resultados válidos, podremos expresar (*inferir*) que el factor de riesgo evaluado, tiene una relación causal con el evento observado.

La **epidemiología**, por su parte, es la disciplina científica de la salud pública que se ha desarrollado teniendo como objetos de estudio la frecuencia y distribución de los eventos de salud y enfermedad (epidemiología descriptiva), así como de los determinantes –de esa frecuencia y distribución— en las poblaciones y su aplicación al control de problemas de salud (epidemiología analítica).⁽¹⁾ Nuestro trabajo procura, inicialmente, abordar los fundamentos teóricos y metodológicos que sustentan la identificación de **relaciones causales** en epidemiología y analizar los modelos de **inferencia causal**, con especial énfasis en el **modelo contrafactual**. Luego, se revisarán distintos diseños de la epidemiología analítica, adecuados para *testear* hipótesis de inferencia causal, focalizándonos en los **diseños cuasi-experimentales** (DCE) que son el objeto del mismo.

La manera como conceptualizamos las causas y los procesos como definimos causalidad son importantes en epidemiología no sólo porque constituyen un marco de referencia para proponer soluciones de diseño y análisis a preguntas del proceso de salud-enfermedad, sino también porque a partir de estudios de causalidad se toman (o se deberían tomar) *decisiones* en salud pública (y también en salud hospitalaria). Para introducirnos al complejo tema de la

¹ Forma de razonamiento que consiste en establecer una conclusión general a partir de la observación de hechos o casos particulares (en este caso, '*muestrales*')

inferencia causal, abordaremos sucesivamente los conceptos de causa, efecto y relaciones causa-efecto. Luego, trataremos aspectos destacados de los distintos diseños comparativos que podemos utilizar para testear hipótesis causales.

2.1.1. La causa y los modelos de causalidad

La causa

Es importante señalar que el concepto de *causa* ha dado lugar a grandes controversias en la filosofía y también en la epidemiología. De acuerdo con McMahon y Pugh ⁽²⁾ se puede decir que existe una relación causal entre dos eventos cuando se observa un cambio en la frecuencia o características de uno *luego* de la alteración del otro. Bunge y Susser ^(3,4) conciben un determinante como un factor que afecta o cambia un desenlace, y Bunge identifica la causa como el agente activo del cambio.

De acuerdo con Rothman ⁽⁵⁾ una *causa* se define como un hecho (*hoc*), condición o característica *antecedente* que si está *presente* cambia la *probabilidad* de ocurrencia (posterior a la exposición: *post hoc*) **de un evento** (ej. enfermedad) en un momento (tiempo) y lugar (contexto) determinados, mientras las otras condiciones permanecen fijas. Esto último se conoce como *ceteris paribus* (“*mientras todo lo demás se mantiene igual*”) y se considera necesario en la inferencia causal (se lograría una situación óptima en un modelo contrafáctico ideal [que no existe en el mundo real]). *Post hoc* es un concepto muy relevante en la relación causa-efecto y se conoce como “relación temporal”. La relación temporal entre la causa (previa) y el efecto (posterior) es una condición aceptada como *sine qua non* en la relación causal (necesaria), pero **no** suficiente. Estando presente el componente *ceteris paribus*, la relación temporal toma más relevancia.

En la misma línea se ha expresado que “Una *causa* es lo que hace que cualquier otra cosa, ya sea una idea simple, sustancia o modo, comience a ser; y un *efecto*, es el que tuvo su inicio a partir de alguna otra cosa”.

Los modelos de causalidad

Determinista (también denominada de Galileo-Newton). Ha tenido muchos defensores en la Física. En el mismo, la causa debería ser:

- Necesaria: siempre que existe el efecto, **debe** estar presente la causa
- Suficiente: siempre que existe la causa, **está** presente el efecto
- Necesaria y suficiente: **no existe** una *sin* la presencia de la otra
- Cumple con los criterios de especificidad de causa (C): C es la única causa de E; y con la

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

especificidad de efecto (E): E es el único efecto de C

Probabilístico: **muchos** factores son usualmente requeridos para que un efecto ocurra. Además, raramente conocemos a todos ellos, ni tampoco cómo se relacionan o interactúan entre sí o con los otros.

Un ejemplo de causalidad probabilística es la que Mackie ⁽⁶⁾ denominó ‘condición INUS’: se trata de considerar a los factores (‘de riesgo’) como una parte *insuficiente* y *no-redundante* de una condición (causal) *innecesaria* (unnecessary) pero *suficiente* para que se produzca el efecto. Tomemos el conocido ejemplo del fósforo encendido que comienza un incendio forestal. El fósforo encendido –al igual que el rayo o las cenizas mal apagadas– son partes *insuficientes* para iniciar el fuego, dado que *necesitan* de otros componentes esenciales para lograrlo (hojas secas, tiempo seco, viento, etc.). El fósforo encendido forma parte de una condición causal *innecesario* para iniciar un incendio, ya que también otras (condiciones causales) pueden iniciarlo incorporando otros componentes (un rayo, cenizas mal apagadas, un mecanismo intencional, etc.). Finalmente, se considera al fósforo encendido como una parte *no-redundante*, ya que es necesario contar con un solo factor que aporte el fuego inicial. Como se puede apreciar en el ejemplo, aquí juegan múltiples partes o factores para que se produzca el efecto. Por todo ello, debemos decir que lo que aporta la condición **suficiente** es un **conjunto causal** y se producirá el efecto solo si las demás partes o condiciones de ese conjunto causal están presentes. ⁽⁷⁾ Por ello, en la causalidad de tipo probabilístico –*que es la que habitualmente se aplica en medicina*– la presencia de un factor ‘de riesgo’ aumenta la probabilidad de la ocurrencia de un evento, pero NO lo causa en forma directa y única; necesita la presencia de los otros factores o componentes.

Condiciones necesarias y suficientes en el modelo probabilístico

➤ **Los criterios de Bradford Hill** ⁽⁸⁾

Aunque luego discutidos y refutados, sus postulados –*respecto a los mecanismos causales en medicina*– se consideraron, en algún punto, originales desde el punto de vista conceptual. De alguna manera, estableció que muy difícilmente puedan aceptarse en medicina los principios del modelo determinista; por el contrario, postuló que, para poder atribuir razonablemente la ocurrencia de un evento a la acción de una causa precedente, deberían considerarse y analizarse la concurrencia de distintos ‘*criterios*’. En su presentación, ⁽⁸⁾ los enumeró de la siguiente manera:

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

1. La fuerza de la asociación estadística: se trata de averiguar si existe relación entre el supuesto factor causal y el efecto estudiado y cuál es su magnitud. Para ello se realizan estudios epidemiológicos (Ej.: de cohortes o de casos y controles) que indican la existencia de riesgo significativo y su magnitud (riesgo relativo o razón de momios).
2. Consistencia: consiste en conocer si la relación entre las dos variables en las que investigamos una posible relación causa-efecto ha sido confirmada por más de un estudio, en poblaciones, circunstancias y tiempos distintos, por autores diferentes.
3. Especificidad: es más fácil aceptar una relación causa-efecto, cuando para un efecto, *solo* se plantea una única etiología; que, cuando para un determinado efecto se han propuesto múltiples causas. En este caso, lo apropiado sería hablar de especificidad de la causa.
4. Temporalidad: se trata de asegurar que el factor de riesgo ha actuado **antes** que el supuesto efecto. Los diseños que NO valoran temporalidad impiden observar si la presunta causa estuvo presente con anterioridad al presunto efecto (equivale a la cronología de Simonin).
5. Relación dosis-respuesta: denominada “gradiente biológico”, la frecuencia de la enfermedad aumenta con la dosis o el nivel de exposición (equivale a la intensidad de Simonin). Sin embargo, hay casos en los que el gradiente biológico no se cumple (ej., en una reacción alérgica).
6. Plausibilidad biológica: el conocimiento existente debería permitir sostener razonablemente la causalidad propuesta. Esta característica viene limitada por los conocimientos científicos que se tengan al respecto al momento del estudio. Se trata de una limitación relevante que fue destacada por el propio Hill. ⁽⁸⁾
7. Coherencia: la interpretación de causas y efectos no puede entrar en contradicción con el comportamiento propio de la enfermedad o lesión. Este criterio combina aspectos de consistencia y plausibilidad biológica (corresponde a la evolución de Simonin).
8. Experimentación: es un criterio deseable de alta validez. Se trata de reproducir o modificar experimental o ‘*cuasi-experimentalmente*’ la asociación causa-efecto; pero incidiendo en la causa para alterar el efecto. ⁽⁷⁾
9. Analogía: se fundamenta en relaciones de causa-efecto establecidas, en función de las cuales, si un factor de riesgo produce un efecto a la salud, otro con características similares debería producir el mismo impacto sobre la salud.

➤ **La multicausalidad de Rothman** ⁽⁹⁾

Refuta la estructuración del modelo de Bradford Hill, ⁽⁸⁾ y también que la causalidad pueda explicarse (o sostenerse) por (el cumplimiento de) criterios. ⁽⁹⁾ Considera que la causalidad se debe a múltiples causas que define como *componentes* (o partes-componentes) de un **conjunto causal**; expresando que la condición de **suficiente** en este modelo es el **conjunto causal**. Lo único que acepta como *sine qua non* del modelo de Bradford Hill es la **relación temporal**; esto es, que la causa *debe* anteceder al efecto (*post hoc*).

Postula que deben estar presentes **todos** los componentes del conjunto causal (multicausalidad) para que se produzca el **efecto** (condición de multicausalidad **suficiente**). A su vez, acepta que distintos *componentes* de un conjunto causal pueden formar otros conjuntos causales del efecto en cuestión (o de otros efectos). Además, cuando un

componente *-siempre-* forma parte de distintos conjuntos causales de un mismo efecto, a ese componente lo acepta (y denomina) como *necesario*. Lógicamente, se relaciona con el concepto de “condición INUS” de Mackie. ⁽⁶⁾

Sostiene Rothman ⁽⁹⁾ que aceptar el modelo de multicausalidad y de conjunto causal suficiente, imponen la necesidad de reconocer que la causalidad requiere de distintas partes componentes que interactúan entre sí para que se produzca el efecto; y que la fuerza proporcional de cada una de ellas puede ser variable dependiendo de la presencia (prevalencia) de las otras partes componentes en un momento y tiempo determinados. Apoyándose en la particular relevancia de estos conceptos, postula que el sostén genuino de la inferencia causal en epidemiología es **la medición correcta de los resultados** (del *efecto*) obtenidos, por ejemplo, de un **diseño adecuado** para la hipótesis planteada. La inferencia será válida, luego de haber ‘medido’ y reportado la **valoración de los errores** ocurridos (durante la ejecución del trabajo y durante la propia medición) y de la **presencia (o ausencia) de explicaciones alternativas** a la condición causal en estudio. Refuta de este modo, que la inferencia causal pueda plantearse como un proceso ‘sencillo’ sostenido por un *check-list* que nos permita seguir una ‘hoja de ruta’ dictada por la observancia de *criterios causales* que, si se cumplen, la evidencia es válida, y si no se cumplen, no lo es.

Se dice que en este modelo de valoración de la relación causa-efecto (multicausal), la **unidad de análisis** es el **mecanismo causal** y no los individuos. Si se identifican los componentes de la condición causal *suficiente*, la supresión de uno o más de ellos disminuye/n el riesgo de ocurrencia del efecto, dado que las distintas partes componentes tendrían una interacción ‘biológica’ entre sí. ⁽⁹⁾ Finalmente, si se elimina al componente *necesario*, el efecto no se producirá.

2.1.2. El efecto y el modelo contrafactual (o contrafáctico)

El **modelo contrafactual** o de resultado potencial es un modelo inspirado en el razonamiento del filósofo David Hume (siglo XVIII), quién sostenía la necesidad que se den tres condiciones para poder realizar una inferencia causal:

1. La *contigüidad* entre la presunta causa y el efecto;
2. La *temporalidad precedente*; esto es que la presunta causa, siempre preceda al efecto; y,
3. La *conjunción constante*; esto es, que la causa debe estar presente, siempre que se observe el efecto (similar a lo que se definiría como causalidad necesaria).⁽¹⁰⁾

Consideraba Hume que la única condición *sine qua non* para poder atribuir un efecto causal es

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

que ese factor en cuestión antecediera el resultado; que la certeza total de causalidad es imposible; y, que se define un factor como una causa de un evento en tanto que si el factor no hubiera estado presente, el evento nunca hubiera existido.⁽¹⁰⁾ Un resultado *contrafactual* representa el resultado (potencial) de una situación que no ha ocurrido, y que es contraria a la situación real observada o de facto. El modelo contrafactual parte del razonamiento intuitivo sobre la definición de causa: un factor que al estar presente produce un efecto y que al estar ausente no lo produce.⁽¹¹⁾

Dado que (teóricamente) en este modelo, los efectos deberían ser realmente observados **en la misma persona** y al **mismo tiempo**, y bajo una sola condición (presencia o ausencia del factor en estudio), la situación contraria (a la observada) se convierte en una situación *potencial*, con un resultado *potencial no observado* que denominamos **contrafactual**.⁽¹²⁾ Todo ello implica, para el investigador que pretende demostrar algo utilizando este modelo, dos tareas centrales: (i) crear con diseños adecuados, ‘grupos control’ que resulten la mejor aproximación posible —*en términos de comparabilidad*— al ‘grupo intervención’; y, (ii) procurar conocer y comprender cómo y de qué manera ambos grupos difieren, para poder evaluar (e idealmente *descartar*) explicaciones alternativas a la causa de interés.⁽¹³⁾

El modelo contrafactual fue la idea central que motivó el desarrollo de experimentos aleatorizados y su inferencia estadística por parte de Ronald Fisher hacia 1920.⁽¹²⁾ Posteriormente, Rubin⁽¹³⁾ aplicó el modelo contrafactual de inferencia estadística a los estudios observacionales.

En nuestros días, se considera que una de las mejores maneras de comprender lo que es un **efecto** es a través de la aplicación de este modelo.⁽⁷⁾

En síntesis, algo contrafactual es algo exactamente contrario a un hecho (*factum*) real que hemos observado. En un experimento, observamos lo **ocurrido** en una población que **ha recibido** un **tratamiento** o una **exposición**; es lo *fáctico*. Lo *contrafactual* sería (poder) conocer lo **que habría ocurrido** en la **misma** población si **no hubiese recibido** simultáneamente el mismo tratamiento o exposición. Un **efecto** es la **diferencia** entre lo que ocurrió y lo que podría haber ocurrido.⁽⁷⁾

Expresado matemáticamente:^(11, 12)

1- El **resultado** Y se produce en el sujeto i luego de aplicar la intervención a , de una manera distinta (presencia, magnitud o frecuencia), que cuando al sujeto i se le aplica (en realidad, ‘*si se le hubiera aplicado*’) la intervención 0 (NO intervención).

Resultado del experimento en el sujeto i : $Y_i^{a=1} \neq Y_i^{a=0}$

2- El **efecto** de a (o la magnitud del mismo), es la diferencia entre los dos resultados.

Efecto del experimento en el sujeto i : $Y_i^{a=1} - Y_i^{a=0}$

2.1.3. La relación causa efecto

John Stuart Mill (filósofo del siglo XIX), sostuvo que *establecer* una relación causa-efecto (*inferencia* causal) depende de tres factores principales: (i) la **causa debe preceder** al efecto; (ii) la **causa** y el **efecto** *deben estar relacionados* (hoy diríamos mostrar *asociación* en el análisis estadístico); (iii) **otras explicaciones** al efecto observado (distintas a la relación causa-efecto bajo estudio) han sido eliminadas (descartadas); o no han sido halladas en las *mediciones* efectuadas, o en el análisis formal. Para evaluar y sostener que el tercer factor se cumple (el más difícil de demostrar), propone tres métodos o criterios: (a) la *concordancia*: el efecto estará presente cuando la causa esté presente (sería similar a lo que hoy se define como causa *necesaria*); (b) la *diferencia*: el efecto estará ausente cuando la causa está ausente; (c) la *variación concomitante*: implica que se observan las dos relaciones (o criterios) anteriores [(a) y (b)]. La presencia de ésta última hace que la inferencia causal sea más fuerte, ya que permitiría descartar otras interpretaciones de la covarianza entre la causa y el efecto. ⁽¹⁰⁾

Los criterios (o factores) principales de Mill están completamente presentes en un experimento (y también en un *cuasi*-experimento) cuando: (i) manipulamos una causa presunta y *luego* observamos el resultado; (ii) evaluamos si la variación de la causa presunta se *relaciona* con una variación del efecto; y (iii) utilizamos diferentes métodos para reducir la plausibilidad de explicaciones causales (del efecto observado) *alternativas* a la relación causa-efecto bajo estudio. A los fines de la consecución y/o evaluación de éste último criterio, se usan tanto elementos de *diseño* (ensayos aleatorizados, variables instrumentales, regresión discontinua, etc.), como de medios auxiliares que nos permiten *medir* en forma directa si otras causas que no hemos podido excluir han estado operativas.

Por todo ello, los estudios experimentales (y también los *cuasi*-experimentales) resultan muy adecuados para estudiar las relaciones causales. Otros diseños distintos no abordan de manera tan ajustada (como lo hacen los experimentales y los *cuasi*- experimentales) las características de la relación causa-efecto. Por ejemplo, en los estudios de correlación, resulta *imposible* conocer cuál de las dos variables en estudio ocurrió primero, violentado así el primero de los factores causales de Mill. La adecuada comprensión de los mecanismos de la

relación causal que nos ocupa, y cómo se definen sus principales términos, es decir, la causa y el efecto, permitirán a los autores una crítica (o un diseño) racional de los estudios que pretenden probar relaciones causales. ⁽¹²⁾

2.2. Diseños apropiados para evaluar causalidad

Si quisiéramos seguir o cumplir las reglas o principios principales de Mill para poder efectuar inferencias causales, llegaríamos en forma necesaria a lo que se conoce como diseños experimentales; y también *-en su caso-* a los cuasi-experimentales. Comparten estos diseños componentes fundamentales: (i) una intervención (exposición o tratamiento); (ii) una medida de resultado; (iii) una unidad de experimentación (unidad de asignación); y, (iv) una comparación (ej. un grupo control), que nos permite mensurar el cambio o la diferencia de resultado con respecto al grupo intervención; y, es ese cambio (o falta de cambio) comparativo el que nos permitiría hacer una inferencia causal. ⁽¹⁰⁾ Los cuatro componentes están presentes en las fórmulas presentadas en la pág. 17, que definen matemáticamente el modelo contrafactual. ^(11, 12)

Distintos términos se han utilizado a través de la historia para definir y clasificar un experimento. Modernamente, se acepta como característica condicionante *-para definir la existencia de un experimento-* que el investigador **controle** el tratamiento o intervención; y así se ha expresado textualmente: (i) “en un experimento, el investigador controla la aplicación del tratamiento”; o también: (ii) “una o más variables independientes son manipuladas para observar sus efectos en una o más variables dependientes”. ⁽⁷⁾ No obstante, se siguen aceptando algunos subtipos que no cumplen acabadamente con este *sine qua non*. En el presente trabajo, utilizaremos la siguiente terminología: ⁽⁷⁾

- *Experimento*: un estudio en el cual una intervención es *deliberadamente* introducida para observar sus efectos
- *Experimento randomizado*: estudio en el cual las unidades **son asignadas** a recibir el tratamiento (intervención) o la condición alternativa (ej. no-intervención) por un **proceso aleatorio**, tales como tirar una moneda al aire, o utilizar una tabla de números aleatorios.
- *Estudio cuasi-experimental*: experimento en el cual las unidades **son asignadas** a recibir el tratamiento o la condición alternativa por un **proceso no-aleatorio**.
- *Experimento natural*: la causa habitualmente no puede ser manipulada; ya que el estudio contrasta un evento de ocurrencia natural, un cambio dispuesto por una ley o normativa; contra una condición comparable. Al no cumplirse con la condición que “el investigador controla la intervención”, no se trata de un experimento verdadero. Actualmente, se los clasifica dentro de los *cuasi-experimentales* más robustos o confiables.

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

- *Estudio de correlación*: tampoco corresponde considerarlo un experimento verdadero, al no haber manipulación de la intervención por parte del investigador. Se lo considera sinónimo de estudio observacional o no-experimental, en el cual el investigador se limita a observar la magnitud o tamaño de la relación así como la dirección de la relación existente entre dos variables

2.2.1. Los estudios experimentales randomizados

Son el diseño más aceptado para excluir explicaciones alternativas (amenazas) al *efecto* de un tratamiento (o *causa*).⁽¹⁰⁾ El **paso inicial** que lo caracteriza es la conformación de grupos (intervención y control) mediante la **asignación aleatoria** del tratamiento a las unidades experimentales, normalmente en forma secreta para el investigador; lográndose así **grupos comparables o equivalentes** -a excepción de la intervención- que permitirían realizar una **inferencia causal** sólida o robusta.⁽¹⁰⁾

Esta **asignación aleatoria** del tratamiento (y no-tratamiento) a los participantes, permitiría que la eventual distribución de explicaciones alternativas al efecto de interés (ej., confundidores, tanto conocidos como no-conocidos para el investigador) se distribuyan proporcionalmente de forma similar en ambos grupos, manteniendo la **comparabilidad**. Esta comparabilidad que otorga la randomización es la **fortaleza** del diseño, ya que permitiría que la diferencia de resultados entre los grupos (control e intervención) sea atribuida (con un aceptable grado de confianza) a la intervención.⁽¹⁴⁾

Sin embargo, distintas intervenciones no resultan factibles de randomización: por ejemplo, aleatorizar pacientes individuales a distintos tratamientos de agua en una misma unidad de diálisis; ya que, en general, hay un solo sistema de tratamiento de agua por unidad de diálisis. En *el terreno*, distintos aspectos prácticos, éticos, políticos, económicos, culturales, etc., pueden oponerse o impedir la asignación aleatoria de un tratamiento.⁽¹³⁾ Estas dificultades para aleatorizar pacientes individuales o grupos de pacientes, han llevado a que se exprese que resulta más difícil (poder) aleatorizar personas que elementos, o pacientes en la práctica médica (el mundo real), que en el contexto *controlado* y *normalizado* de una investigación experimental (ensayo aleatorizado).⁽¹⁰⁾

Además -como todo diseño epidemiológico- los **ensayos controlados y aleatorizados** (ECA) no están libres de **debilidades o error** en sus estimaciones del efecto;^(9, 15, 16) aun asumiendo que la etapa de asignación (proceso de aleatorización) hubiera sido correctamente realizada (lo cual no es sencillo).^(15, 16) Destacan entre ellas: -las **desviaciones de las intervenciones** asignadas (sea porque los profesionales de un grupo muestran más empeño, o aplican co-intervenciones no incluidas; sea porque los pacientes se convencen que el otro grupo

evoluciona 'mejor' y subrepticia o abiertamente utilizan la intervención no-asignada [algunos autores describen este sesgo como de contaminación]); -la **pérdida de datos** (sea porque a lo largo del seguimiento se pierden datos de la recolección; o, porque directamente se pierden pacientes del seguimiento [esto se conoce como sesgo de desgaste]); -el **error sistemático en la medición** de los resultados (sea porque el evaluador de resultados está advertido de la asignación, sea porque los grupos utilizan distintos *instrumentos* para medir el resultado (escalas, equipos, marcas comerciales de ensayos con distinta sensibilidad, etc. [sesgo de observación]); -el **reporte selectivo de datos** (es algo relativamente frecuente, que generalmente está relacionado a los resultados obtenidos y le quita validez al trabajo [sesgo de reporte selectivo]).⁽¹⁶⁾

2.2.2. Los estudios cuasi-experimentales

Por su parte, cuando no es posible realizar ensayos randomizados, el uso de diseños **cuasi-experimentales** (DCE/ECE) puede ser una vía eficiente para efectuar inferencias causales, en la medida que podamos excluir explicaciones alternativas al *efecto* del tratamiento; en particular, cuando las mismas resulten poco plausibles².^(10, 17) Esta poca *plausibilidad* de explicaciones alternativas en un DCE puede venir dada por la observancia de dos supuestos:

1. Una (o más) **teoría/s aceptada/s**, que permita/n al investigador, tanto sostener el *efecto* del tratamiento observado, cuanto descartar las explicaciones alternativas (amenazas); y/o,
2. Las **amenazas** se han hecho **explícitas**, han sido correctamente **medidas** durante el estudio; y, se ha demostrado en el análisis estadístico que **no han estado operativas**.

De aquí entonces, que al utilizar estos diseños en que los pacientes o los grupos de pacientes (*clusters*) resultan **asignados** a recibir el tratamiento o la intervención por un **proceso no-aleatorio**, el investigador (o el equipo investigador) estaría obligado a sostener el estudio (y su diseño) con un sólido *background* teórico (biológico, fisiopatológico y metodológico)^(9, 10, 13-20); y a hacer explícitos los eventuales riesgos de explicaciones alternativas que presenta su hipótesis y demostrar que no están operativos.^(10, 15-17) Además de observar estos dos supuestos, el investigador podría mejorar la posibilidad de realizar una inferencia causal razonable utilizando **DCE** menos propensos a presentar explicaciones alternativas al efecto de interés; esto es, más **robustos** (ej.: cohortes contiguas, series temporales interrumpidas,

² Se considera a algo teóricamente **plausible** cuando es razonable que ocurra (o que no ocurra), teniendo presente el nivel del conocimiento actual sobre el particular.

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

estudios antes-después controlados, etc.), aplicados en **poblaciones específicas** (ej.: pacientes renales en hemodiálisis), y en el mismo **contexto** (ej.: un Servicio de un Hospital).⁽¹⁹⁾ Incluso, la capacidad de excluir explicaciones alternativas puede mejorarse combinando diseños longitudinales (series temporales interrumpidas) con diseños transversales (ej.: antes-después controlados).⁽¹⁰⁾

Recientemente, la relevancia, validez y utilidad de los diseños cuasi-experimentales han sido revisadas en un Simposio realizado en la Escuela de Salud Pública de la Universidad de Harvard; lo que originó un número dedicado del *Journal of Clinical Epidemiology*.⁽¹⁹⁾ En el Editorial del citado volumen, se comenta que *-a lo largo de trece artículos-* los autores subrayan distintos aspectos de los DCE, destacando en particular la importancia de observar dos *supuestos* adicionales a los ya destacados:⁽¹⁹⁾

3. Que la determinación de la asignación a los grupos intervención y no-intervención sea “exógena”; esto es, **independiente** del *outcome* de interés.
4. Que esa **independencia** aplique tanto a los **confundidores conocidos** y ‘*observables*’ (que pueden ser medidos) en el estudio, como a los **desconocidos** y ‘*no-observables*’ (que no pueden ser medidos).

2.2.2.1. Tipos de diseño cuasi-experimentales

A través del tiempo, distintos autores se han ocupado de estos diseños y los han clasificado de una manera bastante similar. Sin duda, quienes han sido pioneros en la disciplina de los DCE, han sido Cook y Campbell.⁽²⁰⁾ Ellos hicieron una primera recopilación de sus trabajos en 1979; y una segunda en 2002, en la que se suma Shadish⁽²¹⁾ como co-director de la obra. En estos dos trabajos que bien podríamos considerar pilares de la disciplina (aunque ciertamente hubo publicaciones previas), los autores citados clasifican los DCE en dos grandes grupos:

1. Los diseños con grupos control ‘*no-equivalentes*’;⁽¹⁷⁾ así denominados para hacer explícito que los integrantes de ambos grupos (control y experimentación), al haber sido **seleccionados** por un método de **asignación no-aleatorio**, no son comparables ‘por diseño’ (como sí ocurriría en los ensayos randomizados). Esta situación, genera una debilidad de ‘origen’ que impone a los autores hacer explícitas las diferencias observables y procurar demostrar que todas las eventuales explicaciones alternativas a la intervención de interés se han estudiado y no han estado (o sí han estado) operativas. Tal vez el más conspicuo y paradigmático de este grupo sea el conocido como ‘diseño antes-después controlado’ (CBA); al que más técnicamente, Cook y Campbell⁽¹⁷⁾ denominan ‘diseños con grupo control no-tratado, con pre y posttest’. Las valoraciones (mediciones) pre y posttest de ambos grupos (intervención y control) resultan

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

particularmente relevantes para conocer tanto las variables de importancia [*outcomes*] y los eventuales confundidores en los **participantes** del estudio, como el **contexto**, es decir, el Servicio (guardia, quirófano, planta, etc.) y los prestadores (equipo asistencial). Las mediciones se realizan antes de la intervención (línea de base, pretest u O1) y al terminar el estudio (posttest u O2). Entre los diseños con pre y posttest destacan también: los con remoción del tratamiento; los con remoción y repetición del tratamiento; los de cohortes en instituciones con renovación cíclica de sus participantes (también denominado de cohortes contiguas); a los que en su versión de 2002, ⁽²¹⁾ los denominan ‘diseño pareado mediante cohortes (contiguas) de control’; y finalmente, los diseños de regresión discontinua.

2. Las series temporales interrumpidas (ITS). ⁽¹⁸⁾ Una ‘serie temporal’ (de una variable), se produce cuando tenemos múltiples observaciones (mediciones) de esa variable repetidas a lo largo del tiempo. ⁽¹⁸⁾ Las observaciones pueden ser en las **mismas unidades** (experimentales o de investigación): por ejemplo, cuando hacemos observaciones repetidas en los mismos individuos; o, cuando las observaciones las realizamos en **unidades distintas**, pero **similares** (por ejemplo, cuando a todos los alumnos de los terceros grados de un colegio, se le realizan las evaluaciones trimestrales, todos los años). La *interrupción* de la serie se produce cuando las unidades en cuestión (o bajo estudio) reciben una **intervención** que podría tener impacto en la variable que constituye la serie temporal. La serie va a sufrir una *interrupción* (en su tendencia gráfica temporal) si la intervención tuvo un efecto o impacto. Para poder evaluar ese impacto, el investigador tiene que definir y reportar explícitamente: la **intervención** que va a realizar; el **punto temporal** (fecha) en que la va a realizar; y si tiene elementos teóricos para sostenerlo, cuál estima que va a ser la **forma gráfica** de la interrupción: si *brusca* (efecto denominado ‘determinista’) o *difusa* (efecto ‘probabilístico’). ⁽¹⁸⁾

Años más tarde, el Grupo de la **Colaboración Cochrane** que se ocupa de la evaluación de la ‘Organización y Práctica Efectiva del Cuidado’ (médico); denominado por su sigla en inglés, el **EPOC Group**, ^(15, 22, 23) se enfocó particularmente en dos DCE, a los que consideró adecuados para evaluar las intervenciones complejas que se aplican en los servicios médicos (por ej.: mejoras de efectividad prestacional en quirófano, en guardia externa, en control de infecciones, etc.); luego (en el Ítem 2.3 ‘Utilidad y Aplicaciones de los DCE’) volveremos sobre el concepto de intervenciones complejas. Estos dos diseños son, el antes-después controlado (CBA) y la serie temporal interrumpida (ITS). Sobre ambos, el Grupo escribió conceptos de diseño y de evaluación de calidad (en particular, criterios para la evaluación de riesgos de sesgo). ^(15, 22, 23)

Recientemente, la precitada reunión de Boston ^(19, 24) se ocupó de la taxonomía de los DCE;

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

tomando definiciones de la clasificación clásica de Cook y Campbell ^(17, 18) como: la ITS, los diseños de regresión discontinua y el CBA; al cual también denominan diseño de diferencia en diferencias (DID), subrayando que *-para realizar el análisis comparativo entre grupos-* resultaría conveniente estimar primero la diferencia entre la primera y segunda observación *dentro* de cada grupo y, luego, estimar o calcular la diferencia *entre* ambos grupos (el grupo EPOC, define este enfoque como perteneciente al *análisis* del estudio y lo refiere como *change-score* ⁽²²⁾). A estos diseños clásicos, agregan el diseño de variables instrumentales. ^(21, 24) Las eventuales diferencias y similitudes de las clasificaciones citadas pueden verse en la Tabla 1.

Tabla 1. Propuesta de taxonomía armonizada de los diseños cuasi-experimentales

Tipos de diseño	Cook, Campbell y Shadish ^(17,18,21)	Grupo EPOC ⁽¹⁵⁾	Reeves BC <i>et al</i> ⁽²⁴⁾	Taxonomía armonizada*
Antes-después controlado	Grupo control no-equivalente con pre y posttest	Antes-después controlado (CBA)	Antes-después controlado (CBA) Diferencia en diferencias (DID) con/ sin efectos fijos (FE)†	Antes-después controlado (CBA)
	Diseño 'de cohortes contiguas**; o, 'pareado mediante cohortes (contiguas) de control'		Estudio de cohortes con control histórico (HCS)	Cohortes contiguas**
	Diseño de regresión discontinua		Diseño de regresión discontinua	Diseño de regresión discontinua
	Diseño de variables instrumentales		Diseño de variables instrumentales	Diseño de variables instrumentales
Serie Temporal Interrumpida	Serie Temporal Interrumpida (ITS) simple	Serie Temporal Interrumpida (ITS) simple	Serie Temporal Interrumpida (ITS) simple	Serie Temporal Interrumpida (ITS) simple
	Serie Temporal Interrumpida (ITS) controlada	Serie Temporal Interrumpida (ITS) controlada	Serie Temporal Interrumpida (ITS) controlada	Serie Temporal Interrumpida (ITS) controlada

* Propuesta en el presente trabajo

**En instituciones con recambio cíclico de sus participantes

† El concepto de *efectos fijos* aplica a cualquier situación en la que las observaciones con diferentes estados de tratamiento estén incluidas (*nested*) dentro de un nivel mayor (ej.: misma entidad, familia o individuos). ⁽²⁵⁾

Procurando ilustrar tipos principales de DCE, incluiremos algunas figuras de trabajos que hemos comunicado o publicado. La **Figura 1**, incluye dos gráficos (1A y 1B) de *líneas de tendencia* en un CBA. Muestran la respuesta a la *intervención* (uso de tratamiento de agua intensivo (IWT) [doble ósmosis inversa en línea] para disminuir drásticamente el contenido de aluminio en los líquidos

de diálisis) sobre la carga de aluminio en el hueso de pacientes en hemodiálisis crónica, evaluada con biopsias óseas. Se valoraron dos *outcomes*: (i) la presencia de “enfermedad ósea relacionada al aluminio” (**ARBD**), de acuerdo al porcentaje de tinción con ácido Solucromo de azurina (ASA); y (ii), la presencia de “enfermedad ósea adinámica” (**ABD**), de acuerdo (entre otras variables) al recambio óseo³.

Figura 1

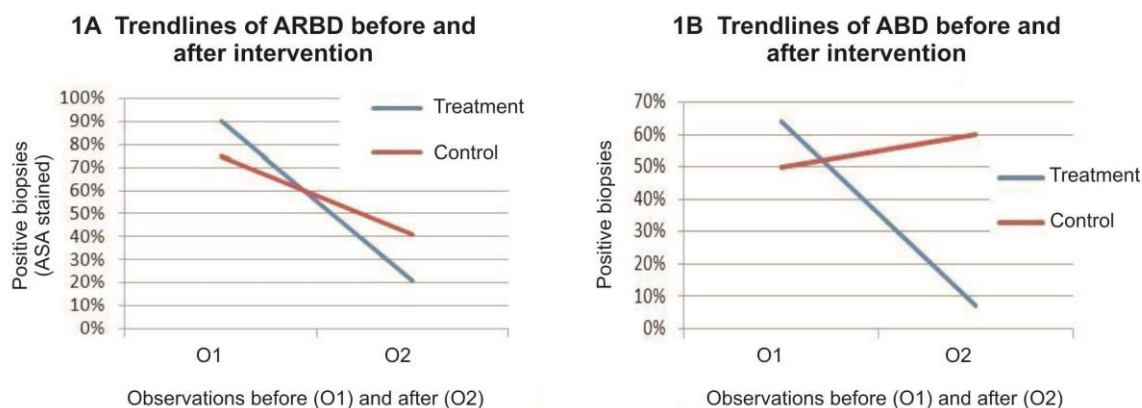


Fig. 1A. Líneas de tendencia del % de biopsias ARBD ASA (+) en el GT (IWT) vs en el GC (SWT), entre la O1 (1994-95) y la O2 (2000-03). Patrón cruzado. ⁽¹⁷⁾ El análisis por *change-score*, ⁽²²⁾ mostró una MD de -35% (IC 95% -69, -1) p = 0,04.

Fig. 1B. Líneas de tendencia del % de biopsias ABD (+) en el GT (IWT) vs en el GC (SWT), entre la O1 (1994-95) y la O2 (2000-03). Patrón cruzado. ⁽¹⁷⁾ El análisis por *change-score*, ⁽²²⁾ mostró una MD de -66% (IC 95% -99, -38) p < 0,00001.

El grupo intervención (GT), se integró con pacientes de una unidad de diálisis que *cambió* el tratamiento de agua estándar con ósmosis simple (**SWT**) por **IWT**. Los pacientes del GT, se evaluaron *antes* de la intervención, incluyendo laboratorio y biopsias óseas, siendo ésta la medición basal (pretest) u observación 1 (O1), observando que el tiempo promedio en diálisis era de 6,4 años. Luego de 6 años *recibiendo* la intervención (**IWT**), un grupo similar de pacientes de esta unidad de diálisis se evaluó de la *misma* manera que en la O1; siendo esta evaluación, para el GT, la observación 2 (O2). El grupo control (GC), se integró con pacientes de otras unidades de diálisis que (al igual que los del GT) recibieron hemodiálisis con **SWT** *hasta* el tiempo en que se efectuó la O1 (realizada de igual manera que en el GT), observando que el tiempo promedio en diálisis fue de 4,6 años. Luego de la de la O1, estas unidades de diálisis *continuaron* utilizando **SWT**. Trascurridos 5 años, se realizó (de igual manera) la O2 en el GC. Ahora, si observamos las figuras 1A y 1B, apreciaremos que las líneas de tendencia sintetizan

³ Chaves MS, Barreto FC, Barreto DV, Jorgetti V. El tratamiento de agua intensivo y la intoxicación aluminica de bajo grado en hemodiálisis crónica. Un estudio antes-después controlado. Presentado en el XVI Congreso SLANH. Cartagena de Indias, del 18 al 22 de Abril de 2012. Trabajo libre TLJ-002. Presentación oral.

gráficamente, la respuesta *–antes y después del tratamiento–* que mostró el GT, comparada con la que mostró el GC, respecto de los outcomes evaluados: la frecuencia de **ARBD** y de **ABD** en las biopsias óseas.

La **Figura 2**, muestra un modo de *notación* (utilización de símbolos), propio de los estudios CBA, ⁽¹⁷⁾ que describe el diseño de la **Publicación #1** de la presente tesis por compendio de publicaciones. Para ver los detalles del estudio, el lector puede dirigirse a las secciones correspondientes a la **Pub #1**, en los capítulos sobre ‘Métodos’ ‘Resultados’ y ‘Discusión’. Se trata de un diseño de **cohortes contiguas** en instituciones con recambio cíclico de sus participantes. ⁽¹⁷⁾ En este caso, en el Servicio de Traumatología de un hospital, ocurrió un brote de mucormicosis ósea post-cirugía de reconstrucción artroscópica de ligamento cruzado anterior (RALCA), que se extendió por 7 meses, comprometiendo a tres (3) pacientes, sobre un *total* de treinta y dos (32) intervenidos en el período. Luego de la evaluación epidemiológica, se decidió una intervención, que se puso en práctica. Se hizo un seguimiento de evaluación del resultado de la intervención *–posterior a su implementación–* durante un período de tiempo tres veces superior al período del brote (21 meses), que incorporó a *todos* los pacientes que recibieron RALCA durante el período de seguimiento (n: 148). Pretendidamente, la Figura 2 sintetiza gráficamente todos los componentes necesarios para *describir* el estudio y su diseño. ⁽¹⁷⁾ El gráfico de la Figura 2 no está incluido en la publicación.

Figura 2

Cohortes contiguas antes y después de la intervención

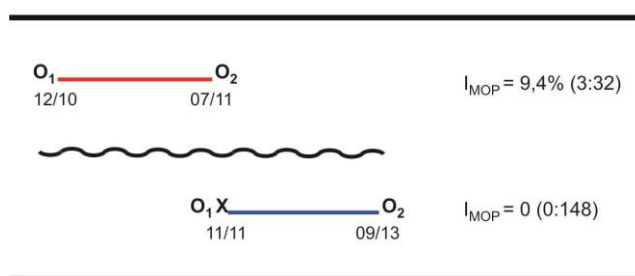


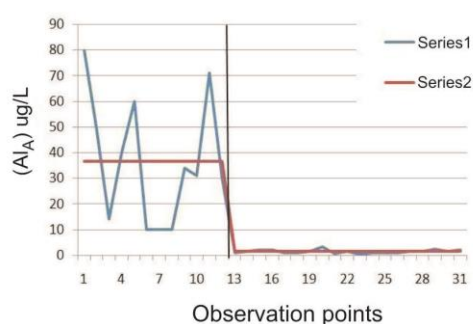
Fig.2. La línea roja representa el período de observación de la cohorte pre-intervención (G. control) y tiene subinscriptas las fechas de inicio y fin del período. La línea azul, representa lo mismo para la cohorte post-intervención (G. intervención). O_1 y O_2 al comienzo y al final de la línea roja, significan la observación *basal* y la de fin de período del GC. En la línea azul, O_1 y O_2 significan lo mismo, pero como es el GT, se denominan *pretest* y *posttest*. La X denota la intervención y se ubica al momento de su realización, en este caso, *antes* que sean expuestos los pacientes de la cohorte post-intervención. La línea ondulada que separa los dos grupos comparados, significa que los mismos son cohortes. I_{MOP} significa la incidencia de mucormicosis ósea post-quirúrgica en cada grupo (GT vs GC).

La **Figura 3**, incluye dos gráficos de ITS (3A y 3B). Muestran la respuesta a la *intervención* (uso de tratamiento de agua intensivo (IWT) [doble ósmosis inversa en línea]), realizada en un estudio,

para disminuir drásticamente el contenido de aluminio en el agua y los líquidos de diálisis. Se valoraron como *outcomes*, la concentración de aluminio en el agua producto $[Al_A]$ del equipo de doble ósmosis en línea y, la obtenida luego de mezclar éste agua producto con los concentrados salinos para obtener el dializado (o líquido de diálisis) $[Al_D]$. El estudio utilizó un DCE combinado, con un componente longitudinal (las ITS) y uno transversal, aportado por dos cohortes contiguas, una previa y otra posterior a la intervención, en la misma institución (en este caso, la misma unidad de diálisis)⁴. Los DCE combinados, están recomendados para mejorar la validez, en distintos capítulos del libro de Cook y Campbell.⁽²⁰⁾

Figura 3

3A ITS: Water aluminium concentrations (Al_A)



3B ITS: Dialysate aluminium concentrations (Al_D)

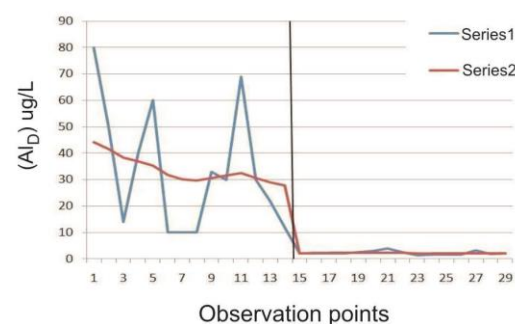


Figura 3A. Cambio en la concentración de aluminio en el agua $[Al_A]$, expresada en $\mu\text{g/L}$, al cambiar un tratamiento de agua estándar (ósmosis simple) por uno intensivo (doble ósmosis en línea). **Serie 1:** datos reales (medidos); **Serie 2:** niveles estimados utilizando un modelo de espacio de estados (SSM, Harvey 1989). La serie duró 14 años (1987 a 2000) y presentó 31 puntos de datos (t), interrumpidos con la intervención al momento 13 (t=13, 1991).

Se apreció un nivel medio pre-intervención (t = 1 a 12) de $[Al_A] = 36,67 \mu\text{g/L}$, que descendió *bruscamente*, al t=13, a un nivel medio de $1,48 \mu\text{g/L}$. Esto se puede expresar como $\ln t_{t=13} = -35,19 \mu\text{g/L}$ (P = 0.0000). Durante el período post-intervención (1991 a 2000; t = 13 a 31), la $[Al_A]$ se *mantuvo estable* en un nivel medio de $1,48 \mu\text{g/L}$.

Figure 3B. Cambio en la concentración de aluminio en el dializado $[Al_D]$, en $\mu\text{g/L}$, al cambiar el tratamiento de agua estándar (ósmosis simple) por uno intensivo (doble ósmosis en serie) al momento 13 (t=13); y, un concentrado salino convencional por uno farmacéutico (cointervención) al momento 15 (t=15). **Serie 1:** datos reales (medidos); **Serie 2:** niveles estimados con el modelo de espacio de estados (SSM, Harvey 1989). La serie duró 14 años (1987 a 2000) y presentó 29 puntos de datos (t), interrumpidos con la cointervención al momento 15 (t=15, 1992).

Se apreció un nivel medio pre-cointervención (t = 1 a 14) de $[Al_D] = 27,92 \mu\text{g/L}$, que descendió *bruscamente*, al t=15, a un nivel medio de $2,19 \mu\text{g/L}$. Esto se puede expresar como $\ln t_{t=15} = -25,73$ (P = 0.003). Durante el período post-cointervención (1992 a 2000; t = 15 a 29), la $[Al_D]$ *permaneció estable* en un nivel medio de $2,2 \mu\text{g/L}$.

Las **Figuras 3A y 3B**, muestran todos los componentes de una ITS descriptos al comienzo de este título ('Tipos de DCE', pág. 21). Ambas ITS, están constituidas (respectivamente) por múltiples mediciones de una variable repetidas a lo largo del tiempo.⁽¹⁸⁾ En un caso, la $[Al_A]$ a la salida del equipo de ósmosis; en el otro, la $[Al_D]$ a la salida del equipo de preparación de dializado; ambas

⁴ Chaves MS, Colli GF, Gubspun L, *et al.* Intensive water treatment for preventing low-grade aluminum intoxication in chronic hemodialysis. An interrupted time series with contiguous cohorts. VI Congress of the International Society for Hemodialysis. Buenos Aires, September 11-14, 2013. *Hemodial Int* 2014; 18: 270-358 (Abstract N° 286). <https://doi.org/10.1111/hdi.12107>

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

expresadas en $\mu\text{g/L}$. Las mediciones se realizaron en las **mismas unidades de investigación**: (i) la planta de tratamiento de agua (equipo de ósmosis); (ii) el equipo de preparación de dializado. La *interrupción* de la serie se produjo cuando las unidades (de investigación) bajo estudio recibieron una **intervención** que impactó en la variable que constituía (en cada caso) la serie temporal. Las **intervenciones** estuvieron claramente definidas: en el caso de la planta de agua, se cambió de una ósmosis simple (SWT) a una doble ósmosis inversa en línea (IWT); en el equipo de preparación de dializado, se cambió la alimentación (el agua pasó de ser de SWT a ser de IWT; y los concentrados salinos, de convencionales a calidad farmacéutica [USP]). El **punto temporal**, fue (en un caso) la fecha en que se puso en marcha la doble ósmosis; y (en el otro) la fecha en que se agregaron los concentrados salinos farmacéuticos. La **forma gráfica** de las interrupciones se anticipó (en cada serie) como de efecto ‘determinista’ (es decir, *brusco* al momento de la intervención). Al momento de la intervención, se observa en ambos gráficos, una *interrupción brusca* en su tendencia temporal y, como hecho muy relevante, ambas ITS muestran un componente adicional del resultado; el efecto obtenido al momento de la intervención, fue *sostenido* a lo largo del tiempo.⁽¹⁸⁾

Hasta aquí, hemos ejemplificado gráficamente tres de los más importantes DCE (CBA, cohortes contiguas e ITS). Atento a la multiplicidad de DCE se podrían mostrar más ejemplos que ilustren sobre distintos DCE; pero, observando la Tabla 1, apreciamos que de los ‘cinco grandes’ (*‘big fives’*),⁽¹⁹⁾ quedarían por ejemplificar los diseños que utilizan variables instrumentales (VI) y regresión discontinua (RD). Ocurre que, lo que define (particularmente) si se trata de VI o RD - *además de otros supuestos particulares*- es el modo de asignación de los grupos, pero la morfología gráfica de los diseños (la mayoría de las veces) será de cohortes (contiguas o no) o CBA.⁽²⁴⁾

2.3. Utilidad y aplicaciones de los cuasi-experimentales

Clásicamente (en los últimos 60 años), se ha sostenido que el principal campo de acción de los DCE involucra a toda aquella área del conocimiento que requiera realizar una inferencia causal y esté impedida de realizar un ensayo randomizado; sea por razones prácticas, éticas, políticas, económicas, culturales, religiosas, etc.^(14, 26, 27) La particular relevancia del tema es que un área que demanda inferencias causales y encuentra dificultades o impedimentos para aleatorizar es (ni más ni menos) que lo que se ha venido a definir como el “mundo real”. En nuestro caso “la práctica médica”; o, al decir de Cook y Campbell, “*the field settings*”.^(20, 26, 27)

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

No solo el contexto, o los problemas prácticos y éticos que enmarcan la práctica médica diaria dificultan (claramente) o a veces impiden aleatorizar, sino que, al mismo tiempo, las ‘intervenciones’ que (comúnmente) se necesitan evaluar en la práctica son ‘procedimientos’ (esto es: *intervenciones complejas*).^(28, 29) Cuando pretendemos en una Guardia de Emergencias (u otro Servicio) mejorar la efectividad prestacional sobre una patología prevalente y grave, como eventos coronarios, cerebrovasculares o abdómenes agudos, etc., la intervención abarcará, no solo al personal de salud de la Guardia (administrativos, médicos, enfermeros, camilleros y mucamas del Servicio), sino también al de los Servicios relacionados (laboratorio de análisis, imágenes, etc.). Definimos entonces a las **intervenciones complejas**⁵, como aquellas constituidas por varias partes (o Servicios asistenciales) interconectados. En el mundo real, este tipo de intervenciones habitualmente no son factibles de aleatorizar.⁽²⁸⁾

Hasta aquí hemos descrito la utilidad *clásica* que propició en la ‘práctica’ el uso de los DCE (tal vez poco en medicina, pero sí en psicología, educación, economía, agricultura, etc.): la dificultad o la imposibilidad de asignar las unidades de investigación en forma aleatoria, en situaciones donde se requiere hacer inferencias causales.

Recientemente (en los últimos 20 años), el uso y las aplicaciones de los DCE en la práctica médica (y también en otras áreas del conocimiento) dieron un vuelco; y, se asiste a una curva de crecimiento (en sus usos y aplicaciones) que aún no ha llegado al ‘pico’ (ni a su óptimo). Probablemente, un aspecto central de este impulso haya sido que los ‘avances’ en la medicina y en los cuidados de la salud imponen a la sociedad el desafío de un **costo creciente** en los presupuestos destinados a financiar tecnologías o intervenciones respaldadas por ECAs. La pregunta que surge es: ¿la *eficacia* demostrada en un ECA, representa *-en la práctica-* mejoras **reales** en la salud individual o poblacional? Ante ello, los estados, las sociedades y los tomadores de decisión, demandan o requieren evidencia que pondere adecuadamente esos ‘avances’ en el mundo real. En concreto, están solicitando que se informe *efectividad*⁶. Es decir, están pretendiendo conocer la magnitud e impacto de esas pretendidas mejoras en el contexto de la práctica médica. Es aquí *-cuando hay que evaluar efectividad-* que surgen conflictos e inconvenientes con los ECA; dado que:

- Resulta muy difícil (a veces imposible) utilizarlos para evaluar la *efectividad* de una nueva

⁵ Se las llama así, para diferenciarlas de las **intervenciones simples**, que son más características de las investigaciones farmacológicas; en las que (por ejemplo), un grupo recibe una droga y el otro no.

⁶ Efectividad: efecto o impacto *real* obtenido en la práctica (‘mundo real’), con el uso de determinada tecnología o intervención, que ha resultado eficaz en un ECA (*eficacia*).

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

tecnología o intervención en la práctica médica diaria;

- En los pocos casos que en el mundo real puede ejecutarse un ECA, su *aplicabilidad* (validez externa) puede resultar débil, dado que normalmente necesitan *adaptaciones* (a veces importantes) del contexto normal de un Servicio médico, destinadas a asegurar la aleatorización, la asignación secreta, el ciego (o doble ciego), la adherencia, el no abandono, etc.
- Aun logrando estas condiciones 'ideales', los resultados obtenidos requerirían pasar la prueba de un estudio con un DCE para conocer más adecuadamente su *aplicabilidad* en la práctica diaria en distintos contextos. ⁽¹⁹⁾

En modo alguno, esta posición moderna que procura redefinir los roles de los ECA y de los DCE, plantea una opción entre unos y otros, sino más bien una complementariedad razonable, en el camino a recorrer desde el laboratorio hasta la práctica médica diaria. Así lo describen autores que consideran que los ECA representan el 'primer traslado' (*first translation*) de los nuevos desarrollos, desde el laboratorio al '**mundo ideal**' de un ECA; siendo el 'segundo traslado' de esa nueva tecnología, desde un ECA al '**mundo real**' evaluado con un DCE. ⁽³⁰⁾

Con este nuevo enfoque, se proponen los siguientes usos y aplicaciones para los DCE: ⁽³¹⁾

- Como la *segunda* mejor opción para realizar inferencias causales, cuando los ECA no son posibles de realizar, dado que (por ejemplo):
 - Hay restricciones éticas, políticas o prácticas que impiden la asignación aleatoria a grupos intervención y control
 - Hay restricciones de financiamiento
 - Hay restricciones de tiempo
- Sin embargo, las ventajas potenciales de los DCE sobre los ECA, podrían *-en determinadas situaciones-* transformar los DCE en la *primera* opción para estudios de causalidad. Las más relevantes, serían:
 - Que la evidencia causal generada por DCE tienen mayor **validez externa** que la proporcionada por un ECA, dado que (los DCE) alteran o distorsionan mucho menos el 'contexto' de la práctica médica diaria (mundo real), que los cambios que imponen los ECA para su ejecución (mundo ideal).
 - Que los DCE evitan los *riesgos* a la **validez interna** que se pueden observar en los ECA no-ciegos; como cambios en los comportamientos de los participantes que no están satisfechos con la asignación recibida (rivalidad compensatoria, desmoralización resentida).
 - Que la observancia de los nuevos *supuestos* requeridos para los DCE de mayor calidad o más robustos, ⁽¹⁹⁾ otorgan mucha fuerza a la **validez interna** de los mismos.

2.4. Calidad de los cuasi-experimentales. Riesgo de sesgos

En los últimos años se han ajustado los conceptos sobre la *calidad* de un estudio; y también,

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

de su *evaluación*. Para los DCE en particular, se han generado criterios o condiciones que deberían observarse a los fines de lograr la mejor aproximación posible a la realidad; es decir, ser válidos. A estos criterios o condiciones se los denomina *supuestos*. Están directamente vinculados a la calidad, a los riesgos de sesgos y a la validez interna de un DCE. Si bien fueron planteados décadas atrás, ⁽³²⁾ ahora se han formalizado en trabajos y consensos que los han hechos explícitos. ^(17, 19, 32-34) Se trata de condiciones generales y particulares que deberían cumplir los DCE. ^(17, 19, 32, 34) El concepto es homologable al de los *supuestos* (condiciones) que deben cumplir los modelos matemáticos o estadísticos para que los usemos adecuadamente y sus resultados sean válidos; como (por ej.) ocurre con la regresión lineal simple, cuyos supuestos son: independencia, homocedasticidad y normalidad de los residuos. ⁽³⁵⁾

Por otro lado, el concepto de la evaluación de calidad se ha cambiado por el de la evaluación del riesgo de sesgos. ^(16, 33, 36) A esos fines, se han desarrollado herramientas que evalúan los ‘dominios’ con capacidad de generar riesgos de sesgo en distintas fases o etapas de un estudio experimental o cuasi-experimental, procurando, así, una evaluación lo más técnica posible de la **validez interna** de un estudio. ^(15, 16, 32-34, 36)

2.4.1. Los supuestos

Sobre los **supuestos generales**, ya nos hemos referidos al inicio del capítulo de los DCE (ítem 2.2.2.); son los siguientes:

1. Que una (o más) teoría/s aceptada/s permita/n al investigador, tanto sostener el efecto del tratamiento observado, cuanto descartar las explicaciones alternativas (amenazas); y/o,
2. Que las amenazas se hayan hecho explícitas, hayan sido correctamente medidas durante el estudio; y, se haya demostrado en el análisis estadístico que no han estado operativas.
3. Que la determinación de la asignación a los grupos intervención y no-intervención sea “exógena”; esto es, *independiente* del *outcome* de interés.
4. Que esa independencia aplique tanto a los confundidores ‘observables’ (que pueden ser medidos) en el estudio, como a los ‘no-observables’ (que no pueden ser medidos)

Los *dos primeros*, han sido requeridos para los DCE en los últimos 60 años. ⁽¹⁷⁾ Debemos destacar que, aunque los autores adhirieran completamente a los mismos, las inferencias derivadas de estos ECE, mantienen la debilidad de ‘origen’ de la no-aleatorización en la asignación de la intervención. Ello permite a los críticos, revisores o lectores, sostener que esas inferencias –al provenir de ensayos que *por diseño* no han equilibrado [*en los grupos comparados*] los confundidores u otras **amenazas no conocidas**- no tienen la robustez de las que provienen de comparaciones que cumplen con el *ceteris paribus* o la **intercambiabilidad** de los grupos. Por lo tanto, hay autores que definen a estas inferencias como de mayor o

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

menor *plausibilidad*.⁽³⁶⁾ Por su parte, los *dos segundos*, son requisitos incorporados recientemente (en las últimas dos décadas) para definir los DCE más robustos; de tal manera que *-si cumplen con los mismos-* se ha propuesto considerarlos '*como si fueran randomizados*'.

⁽¹⁹⁾ Este cambio tan relevante de la ponderación de la calidad de la evidencia que pueden producir uno u otro de los DCE (según cumplan o no con estos últimos supuestos), viene dado porque la calidad de la evidencia de los ECA está atribuida al modo de asignación (aleatoria), que cuando también es secreta, asegura una selección no-sesgada de los grupos, dado que es *independiente* de la voluntad del investigador, del paciente y de los confundidores conocidos y no-conocidos que presenten los participantes. De todo ello, resulta el concepto de *intercambiabilidad* de los grupos, que sería lo que permitiría atribuir la diferencia de resultado entre los grupos a la intervención.⁽³⁶⁾

Respecto de los **supuestos particulares**;⁽³⁴⁾ a los cuales los autores (y revisores) deberían observar en cada caso, los sintetizamos en la Tabla 2.

Tabla 2. Diseños cuasi-experimentales. Supuestos particulares para cada diseño

Diseños	Supuestos
Variables instrumentales (VI)	<p>Condición relevante: los <i>instrumentos</i> deben explicar una variación suficiente en la variable explicativa endógena (<i>correlación fuerte</i>).</p> <p>Restricción de exclusión: los <i>instrumentos</i> deben afectar causalmente el resultado <i>solo</i> a través de la variable explicativa endógena. Además, deben no estar correlacionados con otras variables conocidas (o no conocidas) que afecten el resultado (<i>outcome</i>). En términos de estudios de <i>regresión</i>, significa que el instrumento no correlaciona con término 'error' (ϵ) de la ecuación (<i>exogenidad</i>).</p> <p>Monotonicidad: todas las personas afectadas por un determinado <i>instrumento</i> se ven afectadas (por el mismo) de la misma forma.</p>
Regresión discontinua (RD)	<p>Supuesto de continuidad: los <i>outcomes</i> potenciales <i>deben ser continuos</i> en el umbral de asignación y la relación con la intervención no debe confundirse en ese nivel.</p> <p>Variable de asignación (Z): debe ser continua y mensurable. Debe definirse explícitamente el valor umbral de Z.</p> <p>Regla de decisión (de la asignación): deben conocerse explícitamente. Es decir, debe expresarse si el tratamiento se asigna por encima o por debajo del valor umbral de Z.</p>
Serie temporal interrumpida (ITS)	<p>ITS sería un caso particular de RD; donde: (i) la variable de asignación (Z) es el tiempo calendario; y (ii) el umbral es el punto en el tiempo calendario en el que se implementó la intervención.</p> <p>Supuesto de continuidad: los resultados (<i>outcomes</i>) potenciales deben ser <i>continuos</i> en el umbral (de Z) y la relación con la intervención no debe confundirse en ese nivel.</p>

Antes-después controlado (CBA)	Supuesto de tendencia paralela (o contrafactual): en ausencia de tratamiento, el cambio promedio en el resultado de interés para el grupo tratado habría igualado el cambio promedio en este resultado para el grupo no tratado.
Diferencia en Diferencias (DID)	Supuesto de constancia en las diferencias: se asume que en ausencia de tratamiento, las diferencias observadas entre los grupos de tratamiento y de control (en el período pre-tratamiento) son las mismas a lo largo del tiempo.

El lector interesado que desee profundizar los conceptos sintetizados en la Tabla 2, puede recurrir a la cita referida en el presente trabajo. ⁽³⁴⁾ Por nuestra parte, volveremos sobre el particular en la Discusión, cuando los supuestos apliquen a los trabajos que forman parte del compendio de publicaciones.

2.4.2. El riesgo de sesgo y los dominios

Como decíamos en la introducción al presente capítulo (ítem 2.4.), el concepto de evaluación de la calidad se ha cambiado por el de evaluación del riesgo de sesgos. ^(16, 33) A los fines de normalizar esta evaluación, se han conceptualizado las *etapas* en el desarrollo de un estudio, en las que pueden producirse situaciones que generen riesgo de sesgo (o confundidores, o modificadores de efecto, o cualquier amenaza de explicación alternativa a la intervención en estudio); ellas son: (i) la etapa pre-intervención; (ii) la del momento de asignar la intervención; y, (iii) la etapa post-intervención. A su vez, en cada etapa se han definido *dominios* (áreas o tipo) de riesgo de sesgo que son más operativos en cada una de ellas. ⁽³³⁾ Finalmente, se han desarrollado herramientas para la evaluación de riesgos de sesgos relacionados a cada dominio. ^(15, 32, 33, 36) Hemos procurado sintetizar estos aspectos en la Tabla 3.

Tabla 3. Evaluación de riesgo de sesgos en los diseños cuasi-experimentales

Etapas	Dominios ⁽³³⁾	Criterios ⁽¹⁵⁾	Amenazas ⁽³²⁾	Dominios en DCE evaluables 'como aleatorizados' ⁽³⁶⁾
Pre-intervención	Confundidores (Sesgo de asignación; <i>case-mix</i> , etc.)	¿La asignación fue aleatoria y secreta? ¿Se efectuó el <i>pre-test</i> de los <i>outcomes</i> y variables principales? ¿El contexto y los prestadores fueron similares?	Regresión estadística Maduración	¿La asignación, fue 'exógena': independiente del resultado de interés y de los confundidores observables y no-observables?
	Sesgo de selección	S. de 'reclutamiento' por el prestador	Sesgo de selección	Validez del diseño
Al momento de la asignación	Error al clasificar la asignación			Cumplimiento del modo de asignación *

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

Post-intervención	S. por desvío, cambio, diferencia o incumplimiento	S. por contaminación de los grupos	Historia. Rivalidad. Desmoralización	S. por desvío, cambio, diferencia o incumplimiento
	S. por pérdida de datos (de visitas, seguimiento, etc.)	S. por pérdida de datos	Desgaste. Mortalidad	S. por pérdida de datos (de visitas, seguimiento, etc.) [†]
	S. de observación (de medición, recuerdo, de detección, etc.)	S. de observación S. de detección (evaluador no-ciego)	Instrumentación. Testeo	S. de observación (de medición, recuerdo, de detección, etc.) [†]
	S. reporte selectivo	S. reporte selectivo		S. reporte selectivo [†]

* Los supuestos que deben cumplir, al momento de la asignación, los diseños denominados ‘como aleatorizados’ son distintos. ⁽³⁴⁾ Ver Tabla 2.

[†]Debe considerarse que cada uno de los diseños de esta columna tendría ‘preguntas guía’ y algunos aspectos de la evaluación propios de cada uno de ellos. ⁽³⁶⁾

En todos los casos (dominios, criterios, amenazas) la *distribución* de esos factores explicativos (alternativos) del efecto observado, debe ser lo suficientemente *distinta* entre los grupos comparados (intervención y control) para poder explicar un cambio en el valor observado del efecto atribuido al mismo. Es decir, el sesgo está presente y tiene capacidad para cambiar el resultado cuando se produce ‘*distribución diferencial*’ del mismo, entre los grupos. ⁽³³⁾ Además, siguiendo el concepto general de *confundidor*, ese factor explicativo distribuido sesgadamente, debe tener relación con la intervención (determinando la asignación, la contaminación, la pérdida de datos, la observación o el reporte selectivo) y el resultado (*outcome*) de interés.

(33, 36)

Para graficar los comentarios de las notas al pie de la Tabla 3, respecto a que cada diseño tiene particularidades en su evaluación, dedicamos un breve párrafo a las ITS. Además de las consideraciones de etapas y dominios que son comunes a todos los DCE (incluyendo al grupo de los denominados *creíbles* o ‘como si fueran aleatorizados’; ⁽³⁶⁾ al cual pertenecen las ITS), resultan destacables algunas características propias de este diseño: (i) La intervención debe estar claramente definida; (ii) el punto temporal en que se va a aplicar la intervención debe estar claramente definido; (iii) la tendencia secular (pre-intervención) debe estar definida y graficada (con un *mínimo* de tres determinaciones); (iv) la forma del efecto de la intervención debe estar pre-especificada (si es brusca [*determinista*]; o, lenta y progresiva [*probabilística*]) y fundamentada; (v) la variable de asignación debe ser ‘*exógena*’ (independiente del *outcome* de interés y de los confundidores observables y no-observables). Para profundizar más sobre la evaluación de los riesgos de sesgo, de éste y/u otros DCE de este grupo, el lector interesado puede revisar las referencias de este párrafo. ^(18, 23, 34, 36)

2.4.3. Reporte de los cuasi-experimentales. Problemas y directrices

Como hemos planteado, el principal campo de acción de los DCE es la investigación clínica en el ‘mundo real’.⁽¹⁹⁻²¹⁾ Pero (a su vez), la interacción de la ‘investigación médica’ con el ‘mundo real’ plantea grandes desafíos. Tal vez, entre los orígenes de estos desafíos, se encuentre el poco espacio que (en general) se brinda en los planes de estudio de medicina y en las residencias médicas (modo habitual de formación con el que se procura entrenar el recién egresado) a la *profundización* de conceptos básicos sobre epidemiología y estadística.^(34, 37)

Esa escasa formación en estas disciplinas básicas -aun cuando se está trabajando en muchas universidades para corregirla-⁽³⁷⁾ devienen en que los atisbos de ‘investigación’ en la práctica, adolecen muchas veces del sustento teórico necesario para plantear adecuadamente una pregunta de investigación; y también, para considerar los requerimientos que impone un diseño adecuado para responder la pregunta (sin considerar, los problemas de la implementación del estudio, la recolección correcta de los datos y el análisis adecuado de los mismos).^(34, 37) Bärnighausen y col,⁽³⁴⁾ dan un paso adelante al afirmar que los DCE y su utilidad en la inferencia causal “no son enseñados en las Escuelas de medicina ni de epidemiología, ni están incluidos en los libros de epidemiología”.

Por otro lado, el insumo básico para la investigación clínica en el ‘mundo real’ está allí, en la sala de clínica, en el servicio de cirugía, en los quirófanos, o en la guardia de emergencias, etc. De tal manera, que el camino *–para lograr generar investigación médica en la práctica–* necesita la irremplazable convergencia de estos dos mundos. La pregunta sería: ¿cómo hacerlo? Distintos grupos, motivados, con conocimiento y experiencia en el tema, se han parado en lo que parecería el final del camino; y, sin embargo, bien puede ser el principio; me estoy refiriendo al **reporte** de los trabajos de investigación clínica en el terreno, sean éstos de la complejidad que fueran.⁽³⁷⁻³⁹⁾ A estos fines (el reporte), han puesto condicionamientos, enmarcados en ‘guías’ o ‘estándares’ que ordenan el camino (*directrices*). Así lo expresan en la presentación del SQUIRE 2.0,⁽³⁷⁾ “enfaticamos que el reporte (de investigaciones en el terreno) tenga tres componentes explícitos y sistemáticos”:

1. El uso de **teorías** formales (o informales fundamentadas) para la planificación, implementación y evaluación de los trabajos de investigación en el terreno.
2. Una evaluación y reporte formal del **contexto** donde se desarrolla el estudio.
3. Un detalle específico sobre la **intervención** y **cómo** se va estudiar la misma.

Casi complementariamente con SQUIRE 2.0,⁽³⁷⁾ se publicó una guía para la descripción ordenada de intervenciones (complejas) en la práctica; con un modelo de planilla de reporte

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

que permitiera (adecuadamente completada) la repetición de la intervención en otro Servicio, a los fines de evaluar la consistencia de los resultados reportados. ⁽³⁸⁾ Finalmente, y con los mismos fines, un grupo de Servicios de control de infecciones hospitalarias propiciaron, hace poco más de una década, un estándar para el reporte de brotes y estudios de intervención en infecciones hospitalarias. ⁽³⁹⁾ Los esfuerzos y propuestas de estas tres publicaciones, procuran – *al igual que el presente trabajo de tesis*- acercar la investigación clínica formal a la práctica médica, a los fines de lograr mejoras objetivas en el conocimiento y en las prácticas asistenciales (con su natural correlato de mejoras en la efectividad, calidad y seguridad de las prestaciones). En este contexto, los DCE deberán cumplir un rol central.

2.5. Justificación de la tesis por compendio de artículos

Esta tesis, que se presenta con el formato de compendio de publicaciones, se basa fundamentalmente en tres trabajos de investigación. Dos son ECE, realizados en el '*mundo real*' - esto es, *en* la práctica médica habitual- y el tercero es un estudio de investigación básica destinado a la validación de los resultados genético-micológicos obtenidos en los dos cuasi-experimentales. Todos son estudios primarios que han sido publicadas en revistas internacionales indexadas. Los tres trabajos, se ocupan de la evaluación del efecto de intervenciones complejas (ciclos de mejora de prácticas o de procesos asistenciales) que involucran tanto cambios estructurales del/los Servicio/s en cuestión (planta física y/o recursos humanos), como de procedimientos (esto es, del modo en cómo se brinda determinada prestación). En los trabajos incorporados a la presente tesis, el foco estuvo centrado en la normalización (estandarización) de prestaciones asistenciales, poniendo el énfasis en la observancia de principios de calidad y seguridad. Se abordaron básicamente dos temas interrelacionados, el *control de infecciones hospitalarias* (hoy denominadas infecciones asociadas al cuidado de la salud) y la *mejora en la calidad y seguridad* de procesos asociados. Las tres publicaciones constituyen un verdadero *conjunto*, destinado a lograr los objetivos planteados, resultando útil, razonable y adecuado incorporarlas (o considerarlas) como el *corpo* del presente compendio.

El motivo de 'sostener' o conformar la presente tesis con este compendio, reconoce distintos aspectos que surgen del propio título del trabajo. En primer lugar, presentamos dos investigaciones clínicas llevadas adelante con DCE, y completamos el compendio con un estudio de investigación básica que resultó *necesario* para validar los hallazgos de las investigaciones

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

clínicas. Luego, valoramos, tanto en la discusión específica como en la discusión general, la utilidad y limitaciones de los ECE, incluidos en el compendio, para realizar inferencias causales.

En la **Introducción**, se ha subrayado la escasa realización de investigación clínica *comparativa* en el “mundo real” y las limitaciones que de esa escasez se derivan ^(34, 37-39) (ver ítems 2.3 y 2.4 más arriba). También se ha destacado que, probablemente, varios serían los principales motivos de esa escasez: (i) el afianzado concepto que ‘para hacer evaluaciones comparativas del efecto de una intervención, el diseño que ofrece resultados válidos y confiables es (*solo*) el ensayo clínico controlado y randomizado’ (ECA); (ii) el hecho que, habitualmente, en la *práctica médica diaria* (realizada en un consultorio, en una sala de clínica o de cirugía, de cuidados intensivos o de emergencias, etc.), no se den las condiciones para efectuar ECAs (por motivos éticos, operativos, económicos, políticos, etc.); (iii) el escaso conocimiento que en los contextos clínicos y de epidemiología clínica se tiene sobre los ECE/DCE, por los motivos claramente expresados recientemente por Bärnighausen y col ⁽³⁴⁾ (ver ítem 2.4.3. más arriba).

Por décadas se ha padecido esta suerte de ‘*encerrona*’ (o camino sin salida) que ha impedido, tanto la validación de la *efectividad* (en el ‘mundo real’) de una intervención demostrada como *eficaz* en un ECA (‘mundo ideal’), como el avance del conocimiento asentado sobre la sólida base de la investigación clínica en el terreno. Cook y Campbell, ⁽²⁰⁾ han dejado un legado notable sobre la forma de superar este *pseudo* ‘camino sin salida’. El título de su primer libro “*Quasi-Experimentation: Design & Analysis Issues for Field Settings*”, anticipaba la profundidad con la que iban a abordar el tema; así como, la probabilidad de contar con distintas vías para superar la comentada ‘*encerrona*’. ⁽²⁰⁾

El desafío del objetivo: mostrar la utilidad y limitaciones del uso *-en la práctica-* de DCE para realizar investigaciones clínicas que resulten adecuadas para realizar inferencias causales válidas, así como, la necesidad de ‘remontar la cuesta’ del preconcepto que *solo* los ECA permiten realizarlas; nos hizo considerar que un formato particularmente útil y adecuado para la tesis era el compendio. Es decir, presentar un conjunto de publicaciones, que *muestren* que se puede hacer investigación clínica en servicios asistenciales *reales* (en la presente tesis: traumatología, nefrología, cirugía, farmacia y la central de esterilización), utilizando DCE ‘robustos’, y obtener inferencia causales válidas.

Finalmente, como autor de la tesis, he participado activamente en la tarea de investigador clínico en las tres publicaciones y cómo metodólogo en los dos ECE (generando las propuestas del diseño y de la intervención, ^(17, 37-39) verificando el cumplimiento de los *supuestos* requeridos,

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

^(17, 34) y participando en la recolección y análisis de los datos; así como en la discusión y redacción de los textos). Además, como podrá verse en las publicaciones, en todas ellas el equipo de trabajo fue amplio (dado el número de servicios involucrados), resultando la coordinación de las tareas, un aspecto principal a cubrir como autor de la tesis.

3. OBJETIVOS

3.1. Generales

1. Considerar la validez de las inferencias causales obtenidas con diseños cuasi-experimentales, en el marco del cumplimiento de las condiciones del diseño, de los supuestos requeridos y de la valoración de los riesgos de sesgo.
2. Analizar la utilidad y limitaciones de las inferencias causales válidas obtenidas con el uso de los diseños cuasi-experimentales.
3. Reflexionar sobre las deficiencias en el proceso de evaluación de estudios desarrollados con esta metodología, tanto para su publicación primaria, como para su incorporación a revisiones sistemáticas y hacer algunas propuestas de mejora.

3.2. Específicos

Siendo una tesis por compendio de publicaciones, los objetivos específicos, son los propios de cada una de las publicaciones que la conforman:

1. Evaluar mediante un diseño antes-después de cohortes contiguas, si una intervención destinada a la verificación de calidad y seguridad de los implantes y del instrumental que se utilizan en una cirugía de reparación artroscópica de ligamentos cruzados (RALCA), resultaba efectiva en el control de un brote de mucormicosis ósea post-RALCA.
2. Evaluar y validar la relación de parentesco genético obtenido de cepas aisladas durante un brote de mucormicosis ósea post-reparación artroscópica de ligamentos cruzados, utilizando distintos cebadores (*primers*) para la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD); metodología proteómica (MALDI-TOF); y pruebas de sensibilidad anti-fúngica.
3. Evaluar mediante un diseño antes-después de cohortes contiguas, si una intervención destinada a verificar la higiene y esterilidad de las fajas que se utilizan para sostener los apósitos estériles de la curación de la herida quirúrgica de un trasplante renal (TR), en el post-operatorio inmediato, resultaba efectiva en el control de un brote de mucormicosis cutánea post-TR.

4. MÉTODOS

Al tratarse de una tesis por compendio de publicaciones, los métodos son los propios de los estudios que se desarrollaron y publicaron para conformar la misma. El plan de trabajo original incluía cuatro estudios; los que se completaron y enviaron a publicación. Tres de ellos se publicaron, por lo tanto, son los que constituyen la presente tesis.

El cuarto trabajo, si bien fue completado y enviado a publicación, aún no ha sido publicado, por lo que no se incluye en la presente tesis.

4.1. Estudio # 1

Título

El control de un brote de mucormicosis ósea postoperatoria⁷: Un estudio de intervención de cohortes contiguas.

Métodos

Realizamos un estudio antes-después de cohortes en nuestro hospital en Paraná, Argentina. Es un centro privado terciario de referencia, con 70 camas, donde se realizan más de 400 cirugías mensuales y unas 70-80 reparaciones artroscópicas de ligamento cruzado anterior (RALCA) anualmente. Se incluyeron *todos* los pacientes que se sometieron a RALCA durante el brote (cohorte pre-intervención) y durante un período 3 veces mayor, después del inicio de la intervención (cohorte post-intervención). **Diseño de cohortes contiguas.** ⁽¹⁷⁾ No hubo cambios en la sala de operaciones -durante los periodos pre y post-intervención- ni en el equipamiento y la distribución del mismo, los recursos humanos, o la técnica de RALCA. Durante el brote (y como era costumbre), un proveedor entregó los implantes y el instrumental en el quirófano, sin verificación previa. La intervención se implementó de la siguiente manera: RALCA se suspendió entre agosto y octubre de 2011; se capacitó a los miembros del personal, ⁽⁴⁰⁾ y se actualizaron las instalaciones en las áreas de verificación y limpieza de la farmacia y del Departamento Central de Servicios Estériles. A partir de noviembre de 2011, el quirófano recibió solo implantes esterilizados en fábrica, dispensados por la farmacia institucional, después de la verificación de los estándares de la Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica

⁷ Se definió como caso de mucormicosis ósea post-operatoria, a la ocurrencia de una osteomielitis por Mucorales, que apareciera rodeando el tornillo de fijación, dentro de los sesenta (60) días posteriores a una cirugía de reconstrucción artroscópica de ligamento cruzado anterior (RALCA)

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

de Argentina ⁽⁴⁰⁾ y todo el instrumental fue procesado en nuestro Departamento Central de Servicios Estériles. Se requirió esterilización por radiación para tornillos metálicos. En el postoperatorio, todos los pacientes fueron seguidos semanalmente y remitidos a infectología ante cualquier signo que sugiriera infección del sitio quirúrgico.

Para la investigación del brote, y establecer si la intervención logró su resolución, seguimos descripciones precedentes. ^(41, 42) La mucormicosis ósea postoperatoria (MOP) se definió como una infección del sitio quirúrgico que ocurría dentro de los 2 meses posteriores a RALCA y que se presentaba como una artritis dolorosa, que cumplía con todos los criterios de infección fúngica invasiva verificada. ⁽⁴³⁾ Los Mucormicetos recuperados durante el brote, incluyeron: 3 cepas de los casos de MOP-RALCA; 1 de una mucormicosis cutánea post-trasplante; 2 cepas, de 18 muestras ambientales que se tomaron (ambas obtenidas de los estantes de las farmacias); y 2 cepas de control de *Rhizopus microsporus* var *rhizopodiformis* (1 de Francia y 1 de Salta, Argentina). Todos fueron identificados mediante métodos fenotípicos y moleculares. ⁽⁴⁴⁾ La variabilidad intraespecie se estableció mediante la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) y el dendrograma obtenido por el método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA), utilizando el software PyElph versión 1.4. ⁽⁴⁵⁾

Se calculó la incidencia de MOP y el riesgo relativo (RR) con intervalos de confianza del 95%. Para evaluar la comparabilidad entre las cohortes, se utilizó la prueba t para las variables continuas y la prueba χ^2 para las variables dicotómicas. La contribución de los factores del huésped al desarrollo de MOP se evaluó mediante regresión multivariable, si se observaba un valor de $P < 0,2$ en el análisis univariado. Una $P < 0,05$ se consideró significativa. Se utilizó la versión 11.2 de Stata (Statacorp, College Station, TX).

4.2. Estudio # 2

Título

Brote de mucormicosis por *Rhizopus microsporus* tras cirugía artroscópica de reconstrucción del ligamento cruzado anterior evaluado por RAPD y espectrometría de masas MALDI-TOF.

Métodos

Cepas

En este trabajo se estudiaron nueve cepas de *R. microsporus*. Tres de ellos fueron aislados de tejido óseo necrótico obtenido de pacientes sometidos a RALCA durante un período de 7 meses (diciembre de 2010-julio de 2011). Durante el mismo lapso de tiempo, se obtuvo un cuarto

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

aislado clínico de una infección de herida quirúrgica sufrida por un receptor de trasplante renal y se aislaron dos más del entorno ambiental de la institución. Se tomaron 16 muestras ambientales superficiales y 2 aéreas, de las salas de cirugía y de los estantes de las farmacias en contacto con el material quirúrgico; y se cultivaron en agar extracto de malta con cloranfenicol en busca de Mucorales. El muestreo se realizó un día después de la segunda y tercera confirmación de las infecciones posquirúrgicas. Se recuperaron dos cepas de *R. microsporus* var *rhizopodiformis* (una en cada uno de los días de muestreo); ambas se aislaron de las superficies de los estantes de las farmacias donde se almacenaba material quirúrgico. Estas cepas se incluyeron en el estudio y se denominaron "Environment 1 y 2" (LMDM-168 y LMDM-167). Se incluyeron tres cepas adicionales, que se utilizaron como controles externos; *R. microsporus* CBS 536.80 y dos cepas clínicas aisladas en las ciudades de Buenos Aires y Salta (Argentina) en 2007 y 2014, respectivamente (LMDM-379 y LMDM-596). Utilizamos la cepa CBS 536.80 como control, ya que se utilizó como referencia en informes publicados anteriormente.^(46, 47) Además, se utilizaron cepas de *Mucor circinelloides*, *Lichtheimia corymbifera* y *Syncephalastrum racemosus* (una de cada una) como cepas de control para la identificación por PCR. La cepa de *L. corymbifera* también se usó como especie exógena para la tipificación de la cepa MALDI-TOF⁸.

Identificación de cepas

Las cepas fueron recibidas en el Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular (Universidad Nacional del Litoral-CONICET) para confirmación de Identificación y genotipificación. Los aislados se identificaron molecularmente mediante la secuenciación del gen de ARN 5.8S y las regiones adyacentes del espaciador interno transcrito 1 y 2 (ITS1 e ITS2)⁽⁴⁸⁾ y mediante un método rápido modificado de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de PCR (PCR-RFLP) diseñado para la identificación de los principales agentes etiológicos de la mucormicosis.⁽⁴⁷⁾ Este último procedimiento incluye un primer paso destinado a identificar los Mucorales a nivel de género mediante la amplificación del gen de la subunidad ribosómica 18S (cebadores en la Tabla 1) seguido de digestiones de restricción para la identificación de Mucorales a nivel de especie. Nuestra modificación consistió en reemplazar las enzimas de restricción BmgB1 y CspCl por ClaI y AseI (Promega-Biodynamics, Argentina). Después de estas digestiones, pudimos diferenciar *R. stolonifer* (un sitio de digestión ClaI), *R. microsporus* / *R. azigosporus* (un sitio AseI) y *R. oryzae* (sin sitios de restricción AseI ni ClaI). Las identificaciones de especies se basaron en tamaños de banda pronosticados en mapas de restricción de las secuencias publicadas con los siguientes

⁸ Del inglés: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

números de acceso: AF113440.1 (para *R. oryzae*), AF113438.1 (*R. microsporus* var. *Microsporus*), KM527234.1 (*R. microsporus* var. *rhizopodiformis*), AF157158.1 (*R. microsporus* var. *oligosporus*), FN182235.1 (*R. microsporus* var. *chinensis*), AF113441.1 (*R. stolonifer*) y AB250156.1 (*R. azigosporus*).

Datos clínicos y micología

Los tres pacientes se sometieron a RALCA después de lesiones relacionadas con el deporte (n = 2, ambos hombres) o accidentes de tráfico (n = 1 mujer) y mostraron características epidemiológicas similares (por ejemplo, individuos sanos de 20 a 30 años sin enfermedades y/o tratamientos que induzcan inmunosupresión; que no reportaron diabetes, consumo de drogas, etc.) (Tabla 2). Además, compartieron las mismas características clínicas después de la cirugía; incluyendo artritis dolorosa de la rodilla, cultivos de líquido sinovial negativos tanto para bacterias como para hongos, enrarecimiento óseo marcado en la resonancia magnética que rodea los tornillos de fijación tibial o femoral. Se realizaron cirugías de desbridamiento y se obtuvo material desvitalizado. El ADN total se obtuvo mediante un procedimiento a base de fenol con un pre-tratamiento con proteinasa K. ⁽⁴⁹⁾

Prueba de susceptibilidad antifúngica

Las pruebas se realizaron siguiendo el documento CLSI M38 3rd ed. ⁽⁵⁰⁾ Los medicamentos antimicóticos probados se compraron a Sigma-Aldrich como polvo estándar, e incluían: anfotericina B (AMB), voriconazol (VRC), posaconazol (PSC), itraconazol (ITC) y terbinafina (TRB). La evaluación de susceptibilidad al fármaco alilamina se realizó siguiendo el mismo documento a pesar de que no está incluido en él. Se disolvió TRB en DMSO y el intervalo de concentraciones ensayadas fue de 0,015 a 8 µg /ml. Dado que no hay rangos límite de MIC para las pruebas de microdilución para TRB, las placas producidas fueron controladas usando *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 y rangos de MIC de TRB obtenidos por nuestro grupo en un trabajo anterior. ⁽⁵¹⁾ Las cepas se clasificaron como sensibles o resistentes a un fármaco en particular utilizando las definiciones de valores de corte epidemiológicos. ⁽⁵²⁾

Tipificación molecular mediante huellas genéticas por PCR

Se utilizó amplificación por PCR para realizar las huellas genéticas (*fingerprinting*) de las cepas de *R. microsporus*. Se eligieron cebadores de huellas genéticas (cebadores aleatorios para ADN Polimórfico Amplificado Aleatoriamente [RAPD]) (Tabla 1) entre los utilizados y reportados previamente para tipificar *R. stolonifer*, *Aspergillus flavus*, dermatofitos y hongos

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

en general. ^(53, 54) En primer lugar, optimizamos las reacciones de PCR para cada uno de los cebadores con el fin de obtener el número máximo de bandas de PCR utilizando ADN de *R. microsporum* CBS 536.80. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Quanta Biotech Q-cycler II (Quanta Biotech, Reino Unido) que se programó para un paso inicial de 4 min a 94 °C seguido de 30 ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 50 °C (cuando se utilizó M13) o 30s a 35 °C (para GACA4 y OPC05) (con una tasa de temperatura de rampa de 1.5 °C por segundo), y 2 min a 72 °C; y luego, un ciclo final de 10 min a 72 °C. El volumen total de los productos de la PCR se resolvió mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa al 2% teñido con gel green (Genbiotech, Argentina) durante 5 h a 3 V/cm. Estos experimentos se repitieron tres veces en días diferentes y solo se analizaron patrones reproducibles con bandas intensas. Se incluyeron duplicados ciegos para asegurar que cada cepa en particular mostrara el mismo patrón de bandas. Después de la electroforesis, el análisis de conglomerados se realizó siguiendo el Documento CLSI MM11-A ⁽⁵⁵⁾ con el *software* PyElph versión 1.4 (<http://pyelph.sourceforge.net/>) utilizando el método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA). Para evitar la variabilidad entre geles, los parámetros del *software* se ajustaron para que una réplica de cada gel (*R. microsporus* CBS 536.80) se considerara idéntica (por el *software*) tras el análisis ciego de grupos.

Identificación y tipificación por espectrometría de masas usando MALDI-TOF

Preparación de la muestra

El micelio fúngico se obtuvo cultivando cepas de *R. microsporus* en caldo YPD (extracto de levadura al 1%, peptona bacteriológica al 2% y dextrosa al 2%) durante 16 horas a 35°C y 150 rpm. Las esteras miceliales se lavaron, centrifugaron y resuspendieron en etanol al 75% V / V. Después de un paso de agitación de 2 min, las muestras se centrifugaron (10000 rpm) y se descartó el sobrenadante. El sedimento resultante se trató con 50 ml de ácido fórmico (70% V / V) y 50 ml de acetonitrilo. Las muestras se sometieron a un último paso de agitación y centrifugación y se colocó 1 ml del sobrenadante en una placa MALDI-TOF MS. (bioMérieux). Las muestras se secaron al aire, se cubrieron con 1 ml de matriz de ácido a-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) (bioMérieux) y se secaron al aire nuevamente antes del análisis. Cada muestra se tomó por cuadruplicado para confirmar la reproducibilidad.

Análisis MALDI-TOF

El análisis se realizó en un sistema AXIMA Performance (Shimadzu-Jenck-Argentina). La

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

intensidad del láser, el rango de masa y los parámetros de generación de espectros finales se configuraron según lo propuesto por el fabricante y descrito para otras especies de hongos.

(56-58)

Análisis e identificación espectral

La identificación de cepas a nivel de especie se realizó mediante la comparación de las listas de picos de cepas individuales con la base de datos SARAMIS (paquete de software SARAMISTM - AnagnosTec, Alemania). Los criterios de aceptación se fijaron en un 90% de similitud en masa (de al menos 100 picos) con la especie SuperSpectra. Se creó un dendrograma de similitudes espectrales entre los aislados de *R. microsporus* utilizando el mismo paquete de *software* descrito anteriormente. ⁽⁵⁷⁾ Brevemente, la similitud entre especies se expresó como el número de señales de masa coincidentes entre espectros individuales, después de someter los datos a un algoritmo de agrupamiento aglomerativo de enlace único.

4.3. Estudio # 3

Título

El control de un brote de mucormicosis cutánea post-trasplante mediante la remoción del vehículo: Un estudio de intervención de cohortes contiguas.

Métodos

Consideramos las guías SQUIRE 2.0 ⁽³⁷⁾ para el diseño de este estudio antes-después de cohortes. ⁽¹⁷⁾ El mismo fue realizado en nuestra institución en Paraná, Argentina; un centro privado, terciario de referencia, con 70 camas donde se realizan más de 400 cirugías mensuales y alrededor de 18-20 trasplantes de riñón (TR) al año. La integridad del informe y el riesgo de sesgo se evaluaron utilizando la lista de verificación recomendada en la declaración ORION ⁽³⁹⁾ y una herramienta desarrollada para estudios de intervención no aleatorios. ⁽³³⁾ El estudio fue revisado y aprobado por la junta de revisión institucional. Se incluyeron *todos* los pacientes que se sometieron a TR durante el brote (cohorte pre-intervención) y durante un período 3 veces mayor después del inicio de la intervención (cohorte post-intervención). **Diseño de cohortes contiguas.** ⁽¹⁷⁾ No hubo cambios en el diseño o en el equipamiento de la sala de operaciones, ni de los recursos humanos o la técnica de TR durante los períodos pre y post intervención. Durante el brote (como había sido la práctica habitual durante años), luego de la operación, la herida quirúrgica se cubrió con apósitos estériles; los que se protegieron y mantuvieron en su lugar con una faja elástica nueva no estéril. A partir de mayo de 2011, se puso en marcha la intervención;

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

un procedimiento sistemático desarrollado para controlar el brote (“cuidado seguro de heridas quirúrgicas”).^(38, 59) Brevemente, para proteger y mantener los apósitos estériles en su lugar, solo se utilizaron se utilizaron fajas estériles, elásticas o no elásticas, procesadas con autoclave en nuestro Departamento central de servicios estériles (DCSE). Para asegurar que estas fajas estériles fueran entregadas al quirófano (o, a la unidad renal u otros servicios relacionados) solo desde nuestro DCSE, se creó (y completó) un sello *ad hoc* (como etiqueta de trazabilidad). Para garantizar el cumplimiento del procedimiento, el personal de quirófano y de la unidad renal (y el personal de todos los servicios relacionados) fueron capacitados por miembros del Comité de Control de Infecciones. Después de la cirugía, todos los pacientes fueron seguidos diariamente (y luego semanalmente). Los casos que presentaron algún signo sugestivo de infección del sitio quirúrgico, se remitieron al Departamento de enfermedades infecciosas. Los miembros del Comité de Control de Infecciones evaluaron mensualmente la adherencia a la intervención. (Los detalles del procedimiento están disponibles a simple petición a los autores).

Investigación del brote

Para llevar adelante la investigación; y establecer si la intervención logró su resolución, seguimos descripciones precedentes.^(41, 42) La mucormicosis cutánea post-trasplante renal (PK-CM), se definió como una infección del sitio quirúrgico que se produjo dentro del primer mes del trasplante (o de la última re-operación con una herida quirúrgica sana); que se presenta como una herida quirúrgica dolorosa y necrosante, que cumple los criterios de enfermedad fúngica invasiva probada.⁽⁴³⁾ Durante la investigación, se identificaron 7 aislamientos de Mucorales: 4 cepas se aislaron de los casos de PK-CM; 1 cepa, se obtuvo muestreando por separado 2 vendajes elásticos nuevos no estériles, similares a los que hasta ese momento, se utilizaban habitualmente en el postoperatorio de KT (faja elástica, misma marca); y, se obtuvieron 2 aislamientos de 18 muestras ambientales (ambas de los estantes de la farmacia). Todas las cepas de Mucorales se aislaron en cultivos de tubos inclinados con agar Sabouraud, que se incubaron durante 10 días a 28 °C y 37 °C. Los cultivos ambientales (de superficie) se realizaron utilizando hisopos estériles. Las fajas elásticas se cultivaron cortando piezas de 1 x 1 cm y depositando estas porciones en los tubos de cultivo inclinados. Los aislados fueron luego sub-cultivados en tubos inclinados de agar dextrosa-papa, para identificarlos por métodos microscópicos, fisiológicos y moleculares.^(44, 47, 48) Se utilizaron dos cepas de *Rhizopus microsporus* como controles no relacionados epidemiológicamente: la cepa CBS536.80 (utilizada como una referencia en informes publicados anteriormente)^(46, 47) y un aislado clínico obtenido en nuestra institución a partir de una infección ósea.⁽⁶⁰⁾ Se utilizó una cepa de *Aspergillus fumigatus* LMDM-

31 como control externo para la amplificación aleatoria de estudios de ADN polimórfico.

Tipificación molecular mediante huellas genéticas de PCR. Estudio molecular del brote

Se utilizaron cebadores de huellas genéticas (cebadores aleatorios para *fingerprinting*) M13, GACA4 y OPC05 para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Q-Cycler II (Quanta Biotech, Surrey, Reino Unido) como se describió previamente.⁽⁶¹⁾ El volumen total de los productos de PCR se sembró en un gel de agarosa al 2% teñido con GelGreen[®] (Genbiotech, Buenos Aires, Argentina). Estos experimentos se repitieron 3 veces en días diferentes y se incluyeron duplicados ciegos. El análisis de conglomerados se realizó utilizando el método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA) siguiendo el Documento MM11-A del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio.⁽⁵⁵⁾ Se utilizó PyElph 1.4 (<http://pyelph.sourceforge.net/>) para el análisis.

Análisis estadístico de los datos

Se calculó la incidencia de PK-CM y el riesgo relativo (RR) con intervalos de confianza del 95%. Para evaluar la comparabilidad, usamos pruebas t para variables continuas y χ^2 , o la prueba exacta de Fisher (según corresponda), para variables dicotómicas. La contribución de los factores de riesgo del paciente al desarrollo de PK-CM, se evaluó mediante regresión multivariable cuando se observó una $P < 0,15$ en el análisis univariable de PK-CM. Se consideró significativo un valor de $P < 0,05$. Se utilizó Stata 11.2 (StataCorp; College Station, TX).

5. RESULTADOS

Publicaciones presentadas por esta tesis

Publicación # 1: Chaves MS, Franco D, Nanni JC, Basaldúa ML, Boleas M, Aphalo G, Feltes Silva P, Elgadban MC, Emery F, Gamarra S, Garcia-Effron G, Bantar C. Control of an outbreak of postoperative bone mucormycosis: An intervention study of contiguous cohorts. *Am J Infect Control* 2016; 44: 1715-7. ⁽⁶⁰⁾ AJIC impact factor: 2.3

Publicación # 2: Gamarra S, Chaves MS, Cabeza MS, Macedo C, Leonardelli F, Franco D, Boleas M, Garcia-Effron G. Mucormycosis outbreak due to *Rhizopus microsporus* after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction surgery evaluated by RAPD and MALDI-TOF Mass spectrometry. *J Micol Med* 2018; 28: 617-22. ⁽⁶¹⁾ JMM impact factor: 1.56

Publicación # 3: Chaves MS, Leonardelli F, Franco DM, Ríos PG, Colli GM, Gutiérrez AR, Ferri M, Elgadban MC, Basaldúa ML, Boleas M, Feltes-Silva P, Bantar C, Gamarra S, García-Effrón G. Control of an outbreak of post-transplant cutaneous mucormycosis by removing the vehicle: An intervention study of contiguous cohorts. *Am J Infect Control* 2020; 48: 791-4. ⁽⁶²⁾ AJIC impact factor: 2.3

5.1. Publicación # 1

Chaves MS, Franco D, Nanni JC, Basaldúa ML, Boleas M, Aphalo G, Feltes Silva P, Elgadban MC, Emery F, Gamarra S, Garcia-Effron G, Bantar C. Control of an outbreak of postoperative bone mucormycosis: An intervention study of contiguous cohorts. *Am J Infect Control* 2016; 44: 1715-7. ⁽⁶⁰⁾

Contexto y problema: nuestro Hospital en Paraná, Argentina, es un centro privado, terciario de referencia con 70 camas, donde se realizan más de 400 cirugías mensuales y 70-80 reparaciones artroscópicas de ligamento cruzado anterior (RALCA) anualmente. Entre diciembre de 2010 y julio de 2011, observamos un brote de 3 mucormicosis óseas post-RALCA. Se trató en todos los casos de una osteomielitis que iniciaba (y se restringía en principio) al hueso que rodeaba a uno de los tornillos de fijación (en ningún caso involucró el espacio articular, ni los tejidos blandos peri-articulares). Durante ese período de tiempo (7 meses), no hubo ningún otro caso de implantes traumatológicos de cualquier tipo (distinto a RALCA), realizados por los mismos equipos quirúrgicos, en los mismos quirófanos, que padeciera mucormicosis ósea post-implante. Cabe destacar, que la mucormicosis ósea post-RALCA, fue un brote que afectó a más de 40 pacientes, en más de 20 instituciones diferentes, en unas 12 provincias de Argentina; y, que se extendió (aproximadamente) desde el 2005 hasta el 2015.

Hipótesis: consideramos que el hongo podría haber sido transportado a la profundidad del hueso por un elemento contaminado *-no verificado adecuadamente en el período pre-operatorio-* de uso exclusivo en RALCA.

Objetivo # 1: testear la hipótesis con un **diseño comparativo** (de cohortes contiguas), generando una *intervención* que asegure la correcta verificación de todo el material quirúrgico que se utiliza en RALCA; incluyendo de manera particular, los implantes (tornillos de fijación) y el instrumental. Para detalles del diseño y la intervención, ver **Métodos**, de la Publicación # 1; o, la publicación completa en el **Anexo n° 1**

Resultados: El estudio incluyó a 180 pacientes. Las cohortes incluyeron a *todos* los pacientes que se habían sometido a RALCA entre diciembre de 2010 y julio de 2011 (cohorte pre-intervención) y entre noviembre de 2011 y septiembre de 2013 (cohorte post-intervención). Todos los pacientes de la cohorte post-intervención recibieron la intervención y completaron el seguimiento. Las características de ambas cohortes se encuentran en la Tabla 1.

Table 1

Pre- and postintervention cohorts

Variable	Pre-IC (n = 32)*	Post-IC (n = 148)*	P value
Observation period (mo)	7	22	–
Age (y)	32.2 ± 9.5	31.9 ± 8.7	.89
Male (%)	87.4	91.9	.43
Weight (kg)	82.5 ± 13.8	81.9 ± 13.1	.85
Net ACLR surgical time (min)	64 ± 18	68 ± 25	.49
Diabetes	0	0	–
Other causes of immunosuppression [†]	0	0	–
PBM cases	3	0	.0002

NOTE. Values are presented as mean ± standard deviation, %, or n.

ACLR, arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction; PBM, postoperative bone mucormycosis; Post-IC, postintervention cohort; Pre-IC, preintervention cohort.

*All patients underwent ACLR in the same institution and in the same operating rooms.

[†] HIV, malnutrition, oncologic disease, and other immunosuppressive treatment.

Por su parte, el *dendrograma* mostró que los aislamientos de los casos de mucormicosis ósea post-RALCA, estaban relacionados genéticamente; y, separados de los aislamientos de mucormicosis cutánea post-trasplante y del ambiente de la institución (Figura 1).

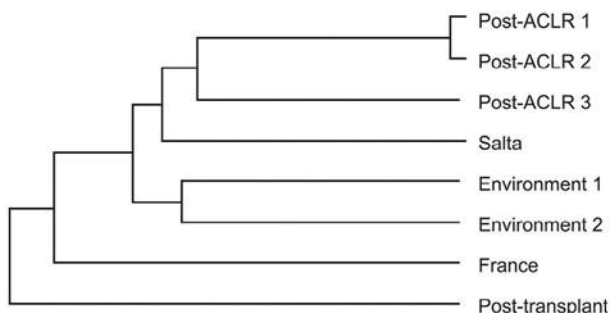


Figura 1. Dendrograma de aislados de *Rhizopus microsporus* var *rhizopodiformis*. Los aislamientos de los casos de mucormicosis ósea post-RALCA (Post-ACLR 1, 2 y 3) se agruparon en 2 grupos estrechamente relacionados; mientras que, los aislamientos ambientales (Environment 1 y 2) y el de la mucormicosis cutánea (Post-transplant), se agruparon en grupos totalmente diferentes. Cepas de control: Salta, de una mucormicosis rino-orbital en Salta (Argentina) y France, de una colección de cultivos franceses

Debido a que la frecuencia de mucormicosis ósea post-RALCA fue 9,4% (3 de 32) durante el brote; y, de cero (0 de 148) durante el período post-intervención, el RR fue 0, con un valor de P de 0,0002.

5.2. Publicación # 2

Gamarra S, Chaves MS, Cabeza MS, Macedo D, Leonardelli F, Franco D, Boleas M, Garcia-Effron G. Mucormycosis outbreak due to *Rhizopus microsporus* after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction surgery evaluated by RAPD and MALDI-TOF Mass spectrometry. *J Micol Med* 2018; 28: 617-22. ⁽⁶¹⁾

Contexto y problema: en nuestro Hospital, durante el período del brote reportado en la publicación #1 (Dic/2010 – Julio/2011), se realizaron un total de 32 reparaciones artroscópicas de ligamento cruzado anterior (RALCA) y se observaron tres (3) casos de mucormicosis ósea post-RALCA (incidencia del 9,4%). ⁽⁶⁰⁾ Los tres pacientes presentaron una osteomielitis post-operatoria que involucraba el hueso que rodeaba a uno de los tornillos de fijación (femoral o tibial). En cada caso, el hueso comprometido (rarefacto y necrótico) se reseco y envió al laboratorio, recuperándose *Rhizopus microsporus*. Además de estas tres cepas, se incluyeron en el estudio genético **otras tres cepas** de *R. microsporus* aisladas en el centro médico durante el mismo período de tiempo. ⁽⁶⁰⁾ Una de ellas, se aisló de una lesión cutánea de un paciente con trasplante de riñón, mientras que las otras dos cepas se aislaron de fuentes ambientales. Con esas seis (6) cepas y dos controles, se corrió un **dendrograma**, que mostró que los aislamientos de los casos de mucormicosis ósea post-RALCA (Post-ACLR 1, 2 y 3) se agruparon en 2 grupos estrechamente relacionados; mientras que, los casos ambientales (Environment 1 y 2) y el de la mucormicosis cutánea (Post-transplant), se agruparon en grupos totalmente diferentes. ⁽⁶¹⁾ Con base en los datos clínicos, epidemiológicos y genéticos, se concluyó que se trataba de un brote generado en una **fuentes común extra-hospitalaria**. Sin embargo, en distintos ámbitos académicos (Congresos, Sociedades Científicas) se argumentaba que el origen del brote de mucormicosis ósea post-quirúrgica en RALCA sería de **origen ambiental intra-hospitalaria**.

Dada la controversia, y teniendo en cuenta la jerarquía de *gold standard* que han tomado los estudios genéticos en la valoración de distintos brotes; el equipo de micología de nuestro grupo de trabajo, propuso *validar* los hallazgos con una metodología distinta a la técnica RAPD⁹, utilizada para el estudio original.

Pregunta: ¿el uso de **metodologías distintas** para estudiar la relación genética de las cepas aisladas durante el brote, ⁽⁶⁰⁾ permitirá *validar* los resultados obtenidos con la técnica RAPD y sostener esos hallazgos?

Objetivo # 2: validar los resultados obtenidos en el estudio original, respecto a la relación

⁹ Del inglés, 'Random Amplification of Polymorphic DNA' technique

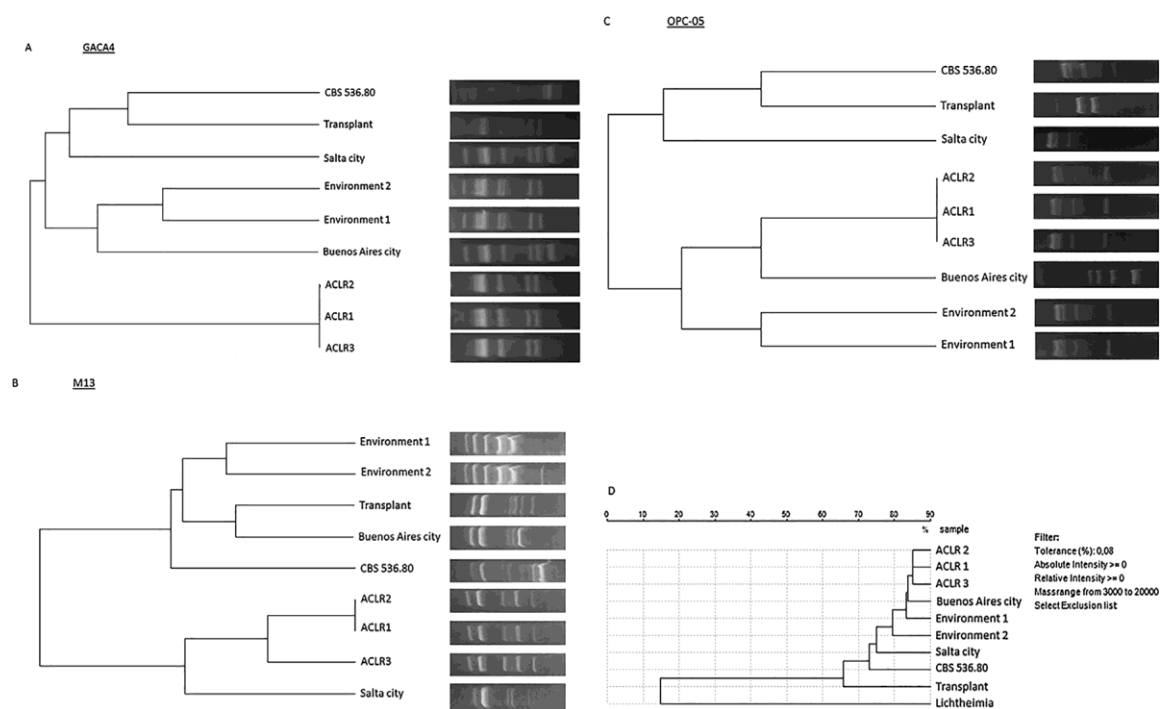
TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

genética de los aislados institucionales de *R. microsporus* obtenidos durante el brote. ⁽⁶⁰⁾ A esos fines, se corrieron dendrogramas con distintos *primers* (cebadores: GACA-4, OPC-05 y M-13); y, utilizando un método adicional y distinto a la técnica RAPD; en este caso, se utilizó la identificación y tipificación de cepas utilizando la técnica MALDI-TOF. ⁽⁶¹⁾ Adicionalmente, se efectuó un análisis de sensibilidad a distintas drogas antifúngicas (anfotericina B, voriconazole, posaconazole, itraconazole y terbinafina). ⁽⁶¹⁾ Para detalles, ver **Métodos** (Publicación #2) o el estudio completo en el **Anexo 2**.

Resultados:

Figura 1



Como puede apreciarse en la Figura 1, los **cuatro** dendrogramas (A, B, C y D) mostraron (sea por técnica de RAPD [con distintos *primers*: A, B y C] o MALDI-TOF [D]) que los aislamientos de los *casos* de mucormicosis ósea post-RALCA (ACLR 1, 2 y 3) estaban *fuertemente* relacionados desde el punto de vista genético y proteómico (en los dendrogramas A, C y D son idénticos); y a su vez, claramente *separados* de los aislamientos de mucormicosis cutánea post-trasplante (Transplant) y del ambiente de la institución (Environment 1 y 2).

Por su parte, en el estudio de sensibilidad a las drogas antifúngicas, las cepas aisladas de los tres casos de mucormicosis ósea post-RALCA mostraron *exactamente* el mismo patrón de MIC (concentración inhibitoria mínima).

5.3. Publicación # 3

Chaves MS, Leonardelli F, Franco DM, Ríos PG, Colli GM, Gutiérrez AR, Ferri M, Elgadban MC, Basaldúa ML, Boleas M, Feltes-Silva P, Bantar C, Gamarra S, García-Effrón G. Control of post-transplant cutaneous mucormycosis by removing the vehicle: An intervention study of contiguous cohorts. *Am J Infect Control* 2020; 48: 791-4. ⁽⁶²⁾

Contexto y problema: La mucormicosis cutánea post-trasplante renal (PK-CM) puede ser una complicación local o devastadora (incluso fatal). En nuestro Hospital en Paraná, Argentina, que es un centro privado, terciario de referencia con 70 camas, se realizan más de 400 cirugías mensuales y unos veinte (20) trasplantes renales (KT) anualmente. Entre junio de 2010 y abril de 2011, se produjo un brote de cuatro (4) casos de mucormicosis cutánea post-trasplante renal (PK-CM); y dos de los pacientes murieron. ⁽⁶²⁾ Durante el período de brote (10 meses), no hubo ningún otro caso de mucormicosis cutánea post-quirúrgica en nuestro Hospital.

Hipótesis: Después de una investigación epidemiológica inicial, la hipótesis fue que el hongo podría haber sido transportado a la herida cutánea por un vehículo *-un vendaje elástico no-estéril-* que era utilizado de manera regular para fijar la curación de la herida quirúrgica, en el post-operatorio inmediato.

Objetivo # 3: testear la hipótesis con un diseño comparativo (de cohortes contiguas), generando una *intervención* que asegure la correcta higiene y esterilización por autoclave de las fajas (elásticas o no-elásticas) que se utilizan para fijar la curación de la herida quirúrgica en el post-operatorio inmediato de trasplante renal. Para detalles del diseño y la intervención, ver en **Métodos**, Publicación #3; o, ver la publicación completa en el **Anexo n° 3**.

Resultados: El estudio incluyó a 65 pacientes. Las cohortes incluyeron a *todos* los pacientes que se habían sometido a KT entre junio de 2010 y abril de 2011 (cohorte pre-intervención) y entre mayo de 2011 y octubre de 2013 (cohorte post-intervención). Todos los pacientes de la cohorte post-intervención recibieron la intervención y completaron el seguimiento. Las características de ambas cohortes se encuentran en la Tabla 1.

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

Table 1

Pre and post-intervention cohorts

Variable	Pre-IC (N = 16)*	Post-IC (N = 49)*	P Value
Observation period (mo)	10	30	-
Age \pm SD (y)	50,2 (16)	51,3 (15)	0,8
Male, % (n)	43,8 (7)	59,2 (29)	0,28
Weight \pm SD (kg)	63,3 (16)	69,7 (17)	0,18
Hemodialysis vintage \pm SD (mo)	55,6 (41)	47,8 (37)	0,47
Net surgical time \pm SD (min)	139,1 (32)	150,1 (30)	0,21
Cadaveric-donor KT, % (n)	87,5 (14)	71,4 (35)	0,32 [¶]
Immunosuppression scheme 1, % (n) †	56,2 (9)	55,1 (27)	0,94
Delayed graft function, % (n) \pm	75 (12)	63,3 (31)	0,55 [¶]
Reoperation, % (n)	25 (4)	18,4 (9)	0,72 [¶]
Rejection, % (n)	6,3 (1)	12,3 (6)	0,67 [¶]
Diabetes, % (n)	0 (0)	8,2 (4)	0,57 [¶]
Other causes of immunosuppression, % (n) §	6,3 (1)	2,1 (1)	0,44 [¶]
PK-CM cases, % (n)	25 (4)	0 (0)	0,003 [¶]

IC: intervention cohort; KT: kidney transplant; PK-CM: Post kidney-transplant cutaneous mucormycosis

*All underwent kidney transplant by the same surgical team, in the same institution and in the same operating rooms.

†The basal immunosuppression (scheme 0), included solumedrol®, mycophenolate and tacrolimus. When anti-thymoglobulin induction was added to basal scheme, it became scheme 1.

\pm Use of dialysis within 7 d of the transplant.

§ HIV, malnutrition, other immunosuppressive treatment.

¶ Fisher's exact test.

Por su parte, los 3 *primers* (cebadores) utilizados, coincidieron en agrupar las cepas de *R microsporus* en 2 grupos diferentes, separando los aislamientos de los primeros 3 pacientes con trasplante de riñón, de las cepas ambientales y del vendaje elástico (Figura 1). En el primer grupo, fueron evidentes 2 subgrupos. Uno incluyó los primeros 3 casos de PK-CM, que se consideraron fuertemente relacionados genéticamente por el dendrograma (método de grupos de pares no ponderados con media aritmética [UPGMA]). El segundo grupo incluyó las 2 cepas ambientales (genéticamente relacionadas); y, el cuarto caso de PK-CM y la cepa aislada del vendaje nuevo (sin uso), que compartían un ancestro común. (Figura 1).

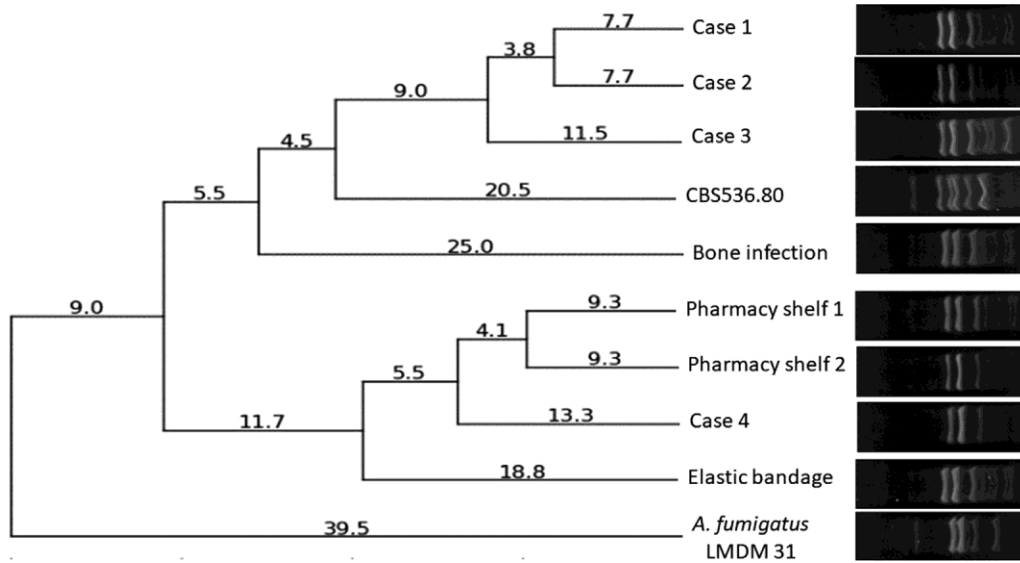


Figura 1. Dendrograma obtenido mediante el método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA), utilizado para las 9 cepas de *Rhizopus microsporus* estudiadas durante el período de brote y la de *Aspergillus fumigatus* LMDM-31 (grupo externo). **Case 1-4**, son las cepas clínicas aisladas de las 4 mucormicosis cutáneas post- trasplante renal. **CBS536.80**, es la cepa de referencia utilizada en informes publicados anteriormente. **Bone infection**, representa la cepa aislada de una mucormicosis ósea (caso no asociado con el brote). **Pharmacy shelf 1 y 2**, son cepas ambientales aisladas de muestreos superficiales en estantes de la farmacia. **Elastic bandage**, es la cepa aislada de un vendaje elástico nuevo, no-estéril, similar al utilizado en el post-operatorio de trasplante de riñón (tipo faja, misma marca) durante el período de brote. Los perfiles de banda que se muestran son los obtenidos mediante el uso del cebador GACA4. Los números representan el grado de divergencia entre los perfiles de banda.

La frecuencia de PK-CM fue del 25% durante el brote (4/16) y de 0 durante el período posterior a la intervención (0/49); con lo que, el RR fue 0, mostrando una $p = 0,003$ (prueba exacta de Fisher). La intervención pudo haber eliminado el vehículo de *R. microsporus* y el brote cesó.

5.4. Textos completos de las publicaciones

5.4.1. Publicación #1

American Journal of Infection Control 44 (2016) 1715-7



Contents lists available at ScienceDirect

American Journal of Infection Control

journal homepage: www.ajicjournal.org

Brief Report

Control of an outbreak of postoperative bone mucormycosis: An intervention study of contiguous cohorts



Marcelo S. Chaves MD, MSc ^{a,*}, Diego Franco MD ^b, Juan C. Nanni MD ^c,
 María L. Basaldúa MD ^d, Mariana Boleas BSc ^{b,e}, Germán Aphalo BPharm ^f,
 Patricia Feltes Silva RN ^g, María C. Elgadban RN ^c, Felipa Emery RN ^c,
 Soledad Gamarra PhD ^{h,i}, Guillermo García-Effron PhD ^{h,i}, Carlos Bantar MD ^b

^a Quality Improvement Area, Sanatorio La Entrerriana, Paraná, Entre Ríos, Argentina

^b Committee for Control of Nosocomial Infection, Paraná, Entre Ríos, Argentina

^c Department of Surgery, Sanatorio La Entrerriana, Paraná, Entre Ríos, Argentina

^d Department of Pathology, Sanatorio La Entrerriana, Paraná, Entre Ríos, Argentina

^e Department of Microbiology, Sanatorio La Entrerriana, Paraná, Entre Ríos, Argentina

^f Department of Pharmacy, Sanatorio La Entrerriana, Paraná, Entre Ríos, Argentina

^g Department of Centralized Sterile Services, Sanatorio La Entrerriana, Paraná, Entre Ríos, Argentina

^h Mycology and Molecular Diagnosis Laboratory, Cátedra de Parasitología y Micología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Santa Fe, Santa Fe, Argentina

ⁱ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Santa Fe, Santa Fe, Argentina

Key Words:

Surgical site infection
 Anterior cruciate ligament
 Traceability
 Quality standards

An outbreak of postoperative bone mucormycosis following arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction in a tertiary referral center in Paraná, Argentina, could have been transmitted through an arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction-exclusive contaminated item. The outbreak was controlled after changing from a system of direct delivery of implants and instruments to the operating room without proper verification, to a controlled and centralized process; specifically, the institution's pharmacy verified the quality and traceability of implants, and instruments were processed only by the institution's central sterile services department.

© 2016 Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Postoperative bone mucormycosis (PBM) following arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction (ACLR) is a devastating complication.^{1,2} Since 2005, Argentina has experienced an outbreak of approximately 40 ACLR-PBM cases in 11 provinces with no reported hypotheses regarding transmission mode.³ Up to 2015, the Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA) reported 19 referred cases. All were single-bone ACLR-PBM in healthy individuals with extensive bone loss.⁴

Between December 2010 and July 2011, our institution experienced an outbreak of 3 ACLR-PBM cases sharing all HIBA features.⁴ Meanwhile, no patient receiving implants for other orthopedic injuries in the same operating rooms, by the same surgical teams, developed PBM. The screws used in ACLR procedures were submitted to the Argentina National Administration of Food, Drug, and Medical Technology, which ruled that in 2 of the 3 cases the screws presented traceability problems precluding recognition of their origin.⁵ We hypothesized that the fungus could have been conveyed to bone depth by an unverified ACLR-exclusive contaminated item.³ This was tested using a comparative design.

METHODS

We conducted a before–after cohort study⁶ at our clinic in Paraná, Argentina, which is a private, tertiary referral center with 70 beds where more than 400 surgeries are performed monthly and 70–80 ACLRs are performed annually. All patients who underwent ACLR during the outbreak (preintervention cohort) and for a period 3 times

* Address correspondence to Marcelo S. Chaves, MD, MSc, Darwin 1265, Paraná 3100, ER, Argentina.

E-mail address: mchaves@gammanet.com.ar (M.S. Chaves).

This study was supported by S.L.E., Paraná, Entre Ríos, Argentina. GGE received grant support from the Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, Buenos Aires, Argentina (No. PICT 2013-1571).

This work is part of a doctoral degree thesis submitted by MSC to the Methodology of Biomedical Research and Public Health Programme, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Conflicts of interest: None to report.

as long after the intervention began (postintervention cohort) were included (contiguous cohorts).⁶ There were no changes in operating room layout, human resources, or ACLR technique throughout the pre- and postintervention periods.

During the outbreak, implants and instruments were delivered (as usual) by a supplier to the operating room without prior verification. The intervention was implemented as follows: ACLR was discontinued between August and October 2011, and staff members were trained⁷ and facilities were updated in verification and cleaning areas of the pharmacy and Central Sterile Services Department. After November 2011, the operating room received only factory-sterilized implants dispensed by the pharmacy after verification of Argentina National Administration of Food, Drug, and Medical Technology standards⁷ and all instruments were processed at our Central Sterile Services Department. Radiation sterilization was required for metal screws. Postoperatively, all patients were followed weekly, and referred to infectology upon any sign suggesting surgical site infection.

We investigated the outbreak and whether the intervention resolved it, as described previously.^{8,9} PBM was defined as surgical site infection occurring within 2 months after ACLR, presenting as painful arthritis, and meeting all criteria for verified invasive fungal infection.¹⁰ Mucormycetes recovered during the outbreak included 3 strains from ACLR-PBM cases 1 from a posttransplant skin mucormycosis 2 of 18 environmental samples (from pharmacy shelves), and 2 *Rhizopus microsporus* var *rhizopodiformis* control strains (1 from France and 1 from Salta, Argentina) identified using phenotypic and molecular methods.¹¹ The intraspecies variability was established using the Random Amplification of Polymorphic DNA technique and the dendrogram UPGMA using PyElph version 1.4 software.¹²

The PBM incidence and relative risk (RR) with 95% confidence intervals were calculated. To evaluate comparability, *t* test for continuous and χ^2 test for dichotomous variables were used. The contribution of host factors to PBM development was evaluated by multivariate regression if a *P* value < .2 was observed in univariate analysis. *P* < .05 was considered significant. Stata version 11.2 (StataCorp, College Station, TX) was used.

RESULTS

The study included 180 patients. The cohorts comprised all patients who had undergone ACLR between December 2010 and July 2011 (preintervention) and between November 2011 and September 2013 (postintervention). All postintervention cohort patients received intervention and follow-up. The cohort characteristics are in Table 1.

Table 1
Pre- and postintervention cohorts

Variable	Pre-IC (n = 32) [†]	Post-IC (n = 148) [‡]	<i>P</i> value
Observation period (mo)	7	22	–
Age (y)	32.2 ± 9.5	31.9 ± 8.7	.89
Male (%)	87.4	91.9	.43
Weight (kg)	82.5 ± 13.8	81.9 ± 13.1	.85
Net ACLR surgical time (min)	64 ± 18	68 ± 25	.49
Diabetes	0	0	–
Other causes of immunosuppression [§]	0	0	–
PBM cases	3	0	.0002

NOTE. Values are presented as mean ± standard deviation, %, or n.
ACLR, arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction; PBM, postoperative bone mucormycosis; Post-IC, postintervention cohort; Pre-IC, preintervention cohort.
[†]All patients underwent ACLR in the same institution and in the same operating rooms.
[‡]HIV, malnutrition, oncologic disease, and other immunosuppressive treatment.

The 3 outbreak-associated cases (2 tibial and 1 femoral) presented with painful arthritis, without soft tissue infection, 15 ± 5 days postoperatively. Whereas arthrocentesis fluids were negative for microorganisms, magnetic resonance imaging showed bone rarefaction surrounding only 1 of the screws.

Mucormycetes grew only from necrotic bone, where they were also (histopathologically) observed. The 6 mucormycetes isolates in our institution were identified as *R microsporus* var *rhizopodiformis*. The dendrogram showed that isolates from ACLR-PBM cases were genetically related, and separate from isolates of posttransplant skin mucormycosis and the institution's environment (Fig 1).

PBM outbreak investigation showed that cases occurred only in patients who underwent ACLR in our operating room during 7 months and a single-bone mucormycosis that never invaded soft tissue or joint space, suggesting a shared vehicle. Surgeon interviews revealed that screws have the potential to seed a single bone without contacting soft tissue or joint space, cases occurred while exposed to noncontrolled ACLR materials and not to verified materials, *Rhizopus* isolates from cases were genetically related (Fig 1), and the intervention might have eliminated the *Rhizopus* vehicle and the outbreak ceased.

Because PBM frequency was 9.4% (3 out of 32) during the outbreak, and zero (0 out of 148) during postintervention, the RR was 0, with a *P* value of .0002.

DISCUSSION

The intervention effect observed (RR < 0.25) was very large,¹³ and consistent, because the challenge was 3-fold longer in time and 5-fold larger in number of patients (Table 1). Because cohort comparability was on average satisfactory (Table 1) and all patients undergoing ACLR during the outbreak and postintervention periods were included, the selection risk was low. Therefore, the quality of evidence might be moderate and the results reliable.¹³ In other words, the intervention might have eliminated the presumed vehicle and caused the outbreak to cease.⁹

The dendrogram shows that ACLR-PBM isolates could have a common reservoir outside the hospital (Fig 1). The surgeon interviews supported the theory that the culprit was the screws, because they are items with capacity to seed only 1 bone. Strengthening this are the facts that the screws used in 2 out of 3 cases had no genuine traceability, preventing knowing their origin,⁵ and *R microsporus* is thermophilic, so that low-temperature sterilization (eg, ethylene oxide if it does not have adequate penetration) could allow the

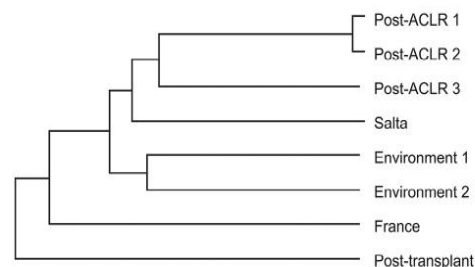


Fig 1. Dendrogram of *Rhizopus microsporus* var *rhizopodiformis* isolates. Isolates of arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction postoperative bone mucormycosis (ACLR-PBM) cases (Post-ACLR 1, 2, and 3) clustered into 2 closely related groups, whereas cases of environmental (Environment 1 and 2) and nonoutbreak-associated cutaneous mucormycosis (posttransplant) clustered in totally different groups. Control strains: Salta, from a rhino-orbital mucormycosis in Salta, Argentina, and France, from a French culture collection.

presence of spores in material.¹⁴ Screws used in 3 of the cases were sterilized with ethylene oxide.

Also supporting the hypothesis, all HIBA cases were single-bone mucormycosis,⁴ and in all clinics that reported PBM it only occurred post-ACLR. Although 1 report underscored that materials came from different companies, given the problems detected,⁹ traceability should be checked in each case.

Pharmacy delivery of factory-sterilized implants fulfilling Argentina National Administration of Food, Drug, and Medical Technology standards and our Central Sterile Services Department instrument processing were effective for PBM prevention in our institution. Additional studies are needed to determine how the screws could have become contaminated, and eventually, the common source.

References

- Burke W, Zych G. Fungal infection following replacement of the anterior cruciate ligament. A case report. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A:449-53.
- Wilkins RM, Hahn DB, Blum R. Bread mold osteomyelitis in the femur. *Orthopedics* 2009;32:362.
- Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. 2007 guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in healthcare settings. CDC; 2007 Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>. Accessed July 26, 2016.
- Carbó L, Astoul J, Sirio AN, Yacuzzi CH, Ayerza MA, Costa Paz M, et al. Mucormycosis osteomyelitis after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. In: Proceedings of the 2015 Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS). Las Vegas, NV: 2015.
- Disposición N° 0421/12. Administración nacional de medicamentos. Alimentos y Tecnología Médica website; 2012 Available from: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/enero_2012/Dispo_0421-12.pdf. Accessed July 26, 2016.
- Cook TD, Campbell DT. Quasi-experiments: nonequivalent control group designs. In: Cook TD, Campbell DT, editors. *Quasi-experimentation, design & analysis issues for field settings*. Boston: Houghton Mifflin Co; 1979:95-145.
- Recomendaciones para la compra segura de Productos Médicos. Administración nacional de medicamentos. Alimentos y Tecnología Médica website; Available from: <http://www.anmat.gov.ar/ProductosMedicos/ProductosMedicos.asp>. Accessed July 26, 2016.
- Reingold AL. Outbreak investigations—a perspective. *Emerg Infect Dis* 1998;4(January–March):21-7. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/4/1/98-0104_article. Accessed July 26, 2016; CDC website.
- Mortimer PP. Five postulates for resolving outbreaks of infectious disease. *J Med Microbiol* 2003;52:447-51.
- 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;46:1813-21.
- de Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. *Atlas of clinical fungi*, Vol. 1. 2nd ed. Utrecht, Utrecht: Centraal bureau voor Schimmelcultures; 2000.
- Pavel AB, Vasile CI. PyElph—a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics* 2012;13:9.
- Schünemann HJ, Oxman AD, Vist GE, Higgins JPT, Deeks JJ, Glasziou P, et al. on behalf of the Cochrane Applicability and Recommendations Methods Group. Interpreting results and drawing conclusions. In: Higgins JPT, Green S, editors. *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions*. The Cochrane Collaboration website; 2011 [Chapter 12] Available from: <http://handbook.cochrane.org/>. Accessed July 26, 2016.
- Hevia AI, Abrantes RA, Fernández J, Boleas M, Davel GO, Refojo N. *Mucormycosis por Rhizopus microsporus*. In: Program and abstracts of the 12th congress of the Argentine society of mycology (CAMIC 12); June 15-17. Abstract MCL1 P032. Posadas, Misiones; 2011.

5.4.2. Publicación #2

Journal de Mycologie Médicale 28 (2018) 617–622



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



Research Paper

Mucormycosis outbreak due to *Rhizopus microsporus* after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction surgery evaluated by RAPD and MALDI-TOF Mass spectrometry

S. Gamarra^a, M.S. Chaves^b, M.S. Cabeza^{a,c}, D. Macedo^c, F. Leonardelli^c, D. Franco^b, M. Boleas^b, G. Garcia-Effron^{a,c,*}

^aLaboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular (CONICET), Cátedra de Parasitología y Micología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria, Paraje el Pozo S/N, CP 3000 Santa Fe, Argentina

^bSanatorio La Entrerriana, Paraná, Entre Ríos, Argentina

^cConsejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), CCT, Santa Fe, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2018

Received in revised form 6 July 2018

Accepted 4 September 2018

Available online 22 September 2018

Keywords:

Rhizopus

Cruciate ligament

Mucormycosis

Outbreak

Fingerprinting

MALDI-TOF strain typing

Healthcare-associated mucormycosis

ABSTRACT

Background. – *Rhizopus microsporus* is one of the main causative agents of mucormycosis. These mycoses are mostly described as isolated cases involving uncontrolled diabetes mellitus or immunosuppressed patients. In this work we report a nosocomial outbreak of mucormycosis due to *R. microsporus* involving three young immunocompetent patients whom underwent arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction surgery in a seven-month time span.

Procedures. – During the outbreak period, a total of 32 surgeries of this type were performed in the clinic (mucormycosis prevalence of 9.375%). The three patients presented healthcare-associated Mucormycosis comprising the bone surrounding one of the fixation screws (femoral or tibial). In addition to these three strains, another three *R. microsporus* strains isolated in the medical center during the same period of time were included in the study. One of these fungi was isolated from a skin lesion of a kidney transplant patient while the other two strains were isolated from environmental sources. Classical, mass spectrometry-based (MALDI-TOFF) and molecular identification were performed. Genetic relatedness was established by Rep-PCR (RAPD variant) and by single-linkage cluster analysis mass spectra. Cluster analysis was performed by unweighed pair group method with arithmetic mean (UPGMA).

Main findings. – All the strains were identified as *R. microsporus* by the used phenotypic and genetic tools. Clinical strains fell into 2 different clusters separating the renal transplant recipient strain from the three strains isolated post ACLR surgery, which clustered together.

Conclusions. – The established genetic/mass spectra relatedness between the three post-surgery isolates suggests that these cases may be considered a healthcare-associated mucormycosis outbreak.

© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Rhizopus microsporus is one of the main causative agents of mucormycosis [1]. There were four known varieties of *R. microsporus* but only *R. microsporus* var. *microsporus* and *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* were reported as human

pathogens [1]. In 2014, the described varieties were reduced to synonyms based on the combination of mating test results and the analysis of different molecular, enzyme and protein markers [2]. Mucormycosis are mostly described as isolated cases involving uncontrolled diabetes mellitus or immunosuppressed patients [3] while nosocomial outbreaks are infrequently reported [4,5]. Here we describe a nosocomial outbreak of mucormycosis due to *R. microsporus* involving three patients whom underwent arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction (ACLR) surgery in a seven-month time span. We used a genetic and a proteomic approach to establish the isolates relatedness. Moreover, we confirmed the

* Corresponding author. Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular (CONICET), Cátedra de Parasitología y Micología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria, Paraje el Pozo S/N, CP 3000 Santa Fe, Argentina.
 E-mail address: ggarcia@unl.edu.ar (G. Garcia-Effron).

infection by a PCR technique capable to diagnose mucormycosis in biopsies identifying the etiological agent to a species level.

2. Material and methods

2.1. Strains

Nine *R. microsporus* strains were studied in this work. Three of them were isolated from necrotic bone tissue obtained from ACLR surgery patients during a 7-month period (December 2010–July 2011). During the same time span, a fourth clinical isolate was obtained from a surgical wound infection suffered by a renal transplant recipient and two more were isolated from the institution's environment. Surgery rooms' surfaces and pharmacy shelf surfaces in contact with the surgical material were sampled and cultured in malt extract agar with chloramphenicol searching for Mucorales. Fifteen air and surface samples were obtained a day after the second and third post-surgical infection confirmation. Two *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* strains were obtained (one in each of the sampling days). Both strains were isolated from pharmacy shelves surfaces where the fixation screws and all the equipment used in the ACLR surgeries were stored. These strains were included in the study and were named as LMDM-168 and LMDM-167. The remaining three strains were used as outgroup controls and included *R. microsporus* CBS 536.80 and two clinical strains (LMDM-379 and LMDM-596) isolated in Buenos Aires and Salta cities (Argentina) in 2007 and 2014, respectively. To the best of our knowledge, there is no *R. microsporus* type strain. However, we used the strain CBS 536.80 as control since it was used as reference in earlier published reports [6,7]. Moreover, *Mucor circinelloides*, *Lichtheimia corymbifera* and *Syncephalastrum racemosus* strains (one each) were used as control strains for PCR identification. The *L. corymbifera* strain was also used as outgroup species for MALDI-TOF strain typing.

2.2. Strain identification

Strains were received at the Micología y Diagnóstico Molecular Laboratory (Universidad Nacional del Litoral–CONICET) for identification confirmation and genotyping. Isolates were molecularly identified by sequencing of the 5.8S rRNA gene and adjacent internal transcribed spacer 1 and 2 regions (ITS1 and ITS2) [8] and by a faster modified PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method designed for the identification of the main etiological agents of Mucormycosis [7]. This last procedure includes a first step aimed to identify the Mucorales at genera level by 18S ribosomal subunit gene amplification (primers in Table 1) followed by restriction digestions for the identification of Mucorales at species level. Our modification consisted in replacing the restriction enzymes *BmgB1* and *CspCI* with *Clal* and *Asel* (Promega-Biodynamics, Argentina). After these digestions, we were able to differentiate *R. stolonifer* (one *Clal* digestion site), *R. microsporus*/*R. azigosporus* (one *Asel* site) and *R. oryzae* (no *Asel* nor *Clal* restriction sites). Species identifications were based on band sizes predicted on restriction maps of the sequences published under the following accession numbers: AF113440.1 (for *R. oryzae*), AF113438.1 (*R. microsporus* var. *microsporus*), KM527234.1 (*R. microsporus* var. *rhizopodiformis*), AF157158.1 (*R. microsporus* var. *oligosporus*), FN182235.1 (*R. microsporus* var. *chinensis*), AF113441.1 (*R. stolonifer*) and AB250156.1 (*R. azigosporus*).

2.3. Clinical data and Mycology

The three ACLR patients have no immunosuppressive diseases and/or treatment. These patient underwent ACLR surgeries after sport-related ($n = 2$, both male) or traffic accident ($n = 1$ female)

Table 1
Oligonucleotide primers used in this work.

Primer	Sequence (5'–3')	Purpose
M13 ^a	GAGGGTGGCGTTCT	Fingerprinting
(GACA) ⁴ ^b	GACAGACAGACAGACA	Fingerprinting
OPC-05 ^b	GATGACCCGC	Fingerprinting
Rpl1 ^{c,d}	TGATCTACGTGACAATTCT	Molecular diagnosis and Mucormycetes identification to genera
RmL1 ^{c,d}	TGATCTACGGAGCAACAA	Molecular diagnosis and Mucormycetes identification to genera
MucL1 ^{c,d}	TGATCTACGTGACATATTCT	Molecular diagnosis and Mucormycetes identification to genera
AbsL1 ^{c,d}	TGATCTACGGCATCAAT	Molecular diagnosis and Mucormycetes identification to genera
Mr1 ^{c,d}	AGTAGTTTGTCTTCGGKCAA	Molecular diagnosis and Mucormycetes identification to genera

^a (15).

^b (13).

^c Specific sense primers for *Rhizopus* spp. (Rpl1), *Rhizomucor* spp. (RmL1), *Mucor* spp. (MucL1) and *Lichtheimia* spp. (AbsL1) [7].

^d Degenerate antisense primer for Mucormycetes [7].

lesions and showed similar epidemiological characteristics (e.g. healthy individuals of 20–30 years-old with no immunosuppression treatment or condition nor reported drug consumption, diabetes, etc.) (Table 2). Additionally, patients showed the same clinical features after the surgery including painful arthritis of the knee, negative synovial fluid cultures both for bacteria and fungi, marked bone rarefaction at the MRI surrounding the tibial or the femoral fixation screws. Debridement surgeries were performed and devitalized material was obtained. Total DNA was obtained using a phenol-based procedure with a proteinase K pre-treatment [9].

2.4. Antifungal susceptibility testing

Antifungal susceptibility testing was performed following the CLSI document M38 3rd ed. [10]. The antifungal drugs tested were purchased from Sigma-Aldrich as standard powder and included: Amphotericin B (AMB), Voriconazole (VRC), Posaconazole (PSC), Itraconazole (ITC) and Terbinafine (TRB). The susceptibility evaluation to the allylamine drug was performed following the same document despite it is not included in it. TRB was dissolved in DMSO and the range of concentrations tested were 0.015 to 8 µg/ml. Since there is no MIC limit ranges for microdilution tests for TRB, the produced plates were controlled by using *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 and TRB MIC ranges obtained by our group in an earlier work [11]. Strains were classified as susceptible or resistant to a particular drug using the epidemiologic cut-off values definitions [12].

2.5. Molecular typing by PCR fingerprinting

PCR amplification was used to fingerprint the *R. microsporus* strains. Fingerprinting primers (random primers for Random Amplified Polymorphic DNA) (Table 1) were chosen from previously reported ones used to type *R. stolonifer*, *Aspergillus flavus*, dermatophytes and fungi in general [13,14]. Firstly, we optimized the PCR reactions for each of the primers in order to obtain the maximum number of PCR bands using *R. microsporum* CBS 536.80 DNA. Amplifications were performed in a Quanta Biotech Q-cycler II thermocycler (Quanta Biotech, UK) which was programmed for one initial step of 4 min at 94 °C followed by

Table 2
Clinical and demographic data of the ACLR patients.

Patient	Gender	Age (years)	Days after symptoms initiation	Affected bone
1	M	28	10	Tibia
2	F	21	12	Tibia
3	M	30	14	Femur

M: Male; F: Female.

30 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 50 °C (when M13 was used) or 30 s at 35 °C (for GACA₄ and OPC05) (with a ramping temperature rate of 1.5 °C per second), and 2 min at 72 °C and then a final cycle of 10 min at 72 °C. The total volume of the PCR products were resolved by electrophoresis using a 2% agarose gel stained with gel green (Genbiotech, Argentina) for 5 h at 3 V/cm. These experiments were repeated three times in different days and only reproducible patterns with intense bands were analyzed. Blinded duplicates were included to ensure that each particular strain showed the same band pattern. After the electrophoresis, cluster analysis was performed following the CLSI Document MM11-A [15] with the software PyElph version 1.4 (<http://pyelph.sourceforge.net/>) using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). To avoid intergel variability, the parameters of the software were tuned up so a replicate from each gel (*R. microsporus* CBS 536.80) were considered identical upon blinded cluster analysis by the software.

2.6. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry identification and typing

2.6.1. Sample preparation

Fungal mycelia was obtained by growing *R. microsporus* strains in YPD broth (Yeast extract 1%, Bacteriological peptone 2% and Dextrose 2%) for 16 h at 35 °C and 150 rpm. Mycelial mats were washed, centrifuged and resuspended in 75%V/V ethanol. After a 2 min vortexing step, samples were centrifuged (10000 rpm) and the supernatant was discarded. The resulting pellet was treated with 50 µl of Formic acid (70%V/V) and 50 µl of acetonitrile. The samples were subjected to a last vortexing and centrifugation step and 1 µl of the supernatant was spotted to a MALDI-TOF MS plate

(bioMérieux). The samples were air dried, overlaid with 1 µl of α-cyano-4-hydroxi-cinnamic acid matrix (CHCA) (bioMérieux) and air dried again before the analysis. Each sample was spotted in quadruplicate to confirm reproducibility.

2.6.2. MALDI-TOF analysis

The analysis was performed on an AXIMA Performance system (Shimadzu-Jenck – Argentina). The laser intensity, mass range and final spectra generation parameters were configured as proposed by manufacturer and described for other fungal species [16–18].

2.6.3. Spectral identification and analysis

Strain identification to species level was performed by comparison of the peak lists of individual strains with the SARAMIS database (SARAMISTM software package – AnagnosTec, Germany). Acceptance criteria was fixed at 90% mass similarity (out of at least 100 peaks) with species SuperSpectra. A dendrogram of spectral similarities between *R. microsporus* isolates were created using the same software package as described before [17]. Briefly, intraspecies similarity was expressed as the number of matching mass signals between individual spectra, after subjecting the data to a single link agglomerative clustering algorithm.

3. Results

3.1. Strains identification and molecular diagnosis of Mucormycosis

During a seven-month period, 32 ACLR surgeries were performed in the clinic and three presented post-surgery bone Mucormycosis (9.38% prevalence). In addition, necrotic tissue was received for molecular diagnostics. Biopsies were stained using Grocott gomori methenamine silver stain and non-septated hyphae were observed (Fig. 1). When cultured, fast-growing dark grey colonies with a colorless reverse were obtained. Unbranched sporangiophores measuring 500 to 1000 µm in length (predominantly 500–600 µm) and simple pigmented rhizoids originated opposing each other from stolons were seen at the microscope. Sporangiophores appeared in clusters mostly of three and terminate in unique rounded sporangium measuring 50 to

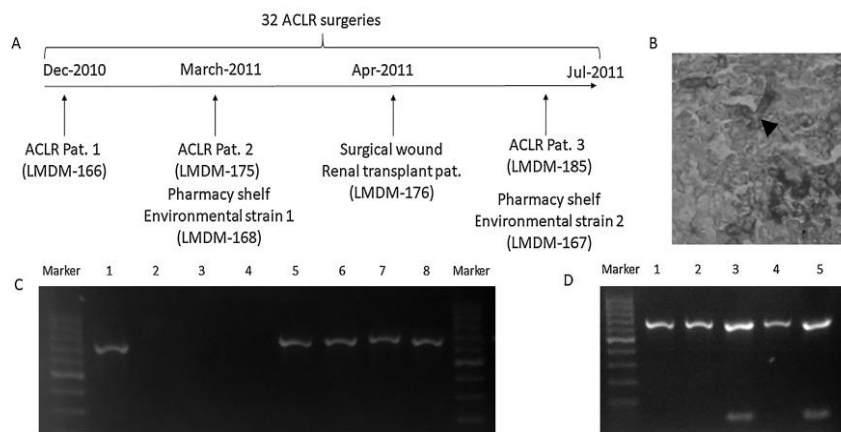


Fig. 1. A). Time course of the outbreak of mucormycosis due to *R. microsporus* in ACLR patients. B). *R. microsporus* in necrotic tissue section stained with GMS. Arrowhead shows the 90° angle branching. C). *Rhizopus* identification to genera level using the primers published by Machouart et al. [7] and DNAs from *Rhizopus oryzae* (lane 1), *Mucor circinelloides* (lane 2), *Syncephalastrum racemosus* (lane 3), *L. corymbifera* (lane 4), *R. microsporus* strains LMDM-166, LMDM-176 and LMDM-175 (lanes 5 to 7, respectively) necrotic bone biopsy sample (lane 8). D) *Rhizopus* species identification using PCR-RFLP (PCR with Rpl1 and MMR1 primers followed by AseI and ClaI digestions). *R. oryzae* - AseI digestion (Lane 1). *R. microsporus* LMDM-166 - ClaI and AseI digestion (lanes 2 and 3, respectively) and total DNA from the biopsy sample where LMDM-166 strain was isolated - ClaI and AseI digestion (Lanes 4 and 5, respectively)

80 µm. Columellae were elongated and well-defined apophyses were observed. Sporangiospores were subglobose and measured 5 µm in average. Turning to thermo-tolerance evaluation, the three isolates obtained from the necrotic tissue showed a radial growth of 42 mm after 5 days of incubation at 50 °C. Similarly, the other 6 studied isolates (including the CBS strain) showed colonies with a radial growth of 40 ± 4 mm. These phenotypic characteristics suggested the identification of the studied fungi as *R. microsporus* while the thermotolerance at 50 °C identify the isolates as belonging to the formerly know *rhizopodiformis* variety [19]. This identification to species level was molecularly confirmed by ITS sequencing and by PCR-RFLP [7,8]. All the isolates showed identical ITS sequence than the published under the GenBank accession number HM999971.1 corresponding to a *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* CBS 536.80 (used as control strain in this work). Moreover, the PCR-RFLP performed following the modified Machouart et al. protocol let us identify all the strains as *R. microsporus* since all the isolates showed two bands (753 and 77 bp) after *Asel* digestion while no *Clal* digestion was obtained (one 827 pb band) (Fig. 1). The same PCR-RFLP protocol was used for Mucormycosis diagnosis using necrotic tissue biopsy total DNA. All the studied samples showed positive PCR reaction only when Rlp1 and Mr1 primer pair were used (Fig. 1). After the *Asel* and *Clal* digestion, the same digestion pattern (one restriction site and none, respectively) were obtained confirming that the agent of the Mucormycosis was *R. microsporus* (Fig. 1).

3.2. Molecular typing

The tested primers (GACA4, M13 and OPC-05, Table 1) were able differentiate strains as different individuals (different genotypes). Genetic relatedness was established by dendrograms obtained by using UPGMA algorithm. Strains clustered into 6 genotype groups for all the tested primers. All the control strains have different genotypes and clustered into different groups. Environmental strains showed low relatedness while clinical strains fail into 2 different clusters, which clearly separate the isolates from the surgical wound of the renal transplant,

recipient and the three strains isolated post ACLR surgery. These last three strains were considered identical between each other when GACA4 and OPC05 primers were used while for fingerprinting with M13 two were identical and the third one was considered strongly related (Fig. 2). This third strain was isolated from the last patient infected in the 7-month period.

3.3. MALDI-TOF-based strain identification and typing

R. microsporus strains were subjected to MALDI-TOF analysis in quadruplicate. The identification at species level was in total agreement with the pheno and genotypic methods. Replicates always showed less than 5% difference in confidence levels of identifications. The SARAMIS software conventional algorithm was used to obtain the spectra-based dendrogram (Fig. 2D). Low mass similarity (lower than 20%) was obtained among *R. microsporus* clusters and the chosen out-group species (*L. corymbifera*). When mass spectra profiles within the *R. microsporus* cluster were analyzed, strains were arranged into seven subclusters with average mass similarities values between 65 to > 85%. The three *R. microsporus* strains used as epidemiologically non-related controls (Buenos Aires and Salta city isolates and CBS536.80) were clearly separated in different clusters. On the other hand, the three post ACLR strains clustered together while the two environmental and transplant strains showed low mass similarities with the ACLR strain (especially this last one with similarity lower than 70%) despite that all six strains were isolated in the clinic.

3.4. Antifungal susceptibility testing and fungal osteomyelitis treatment

The most active antifungal drugs against the nine *R. microsporus* strains tested were TRB and ITC followed by PSC and AMB (Geometric means 0.14, 0.18, 0.54 and 0.63 µg/ml, respectively). There were no important differences in MIC values between environmental, clinical and control strains and all the strains were

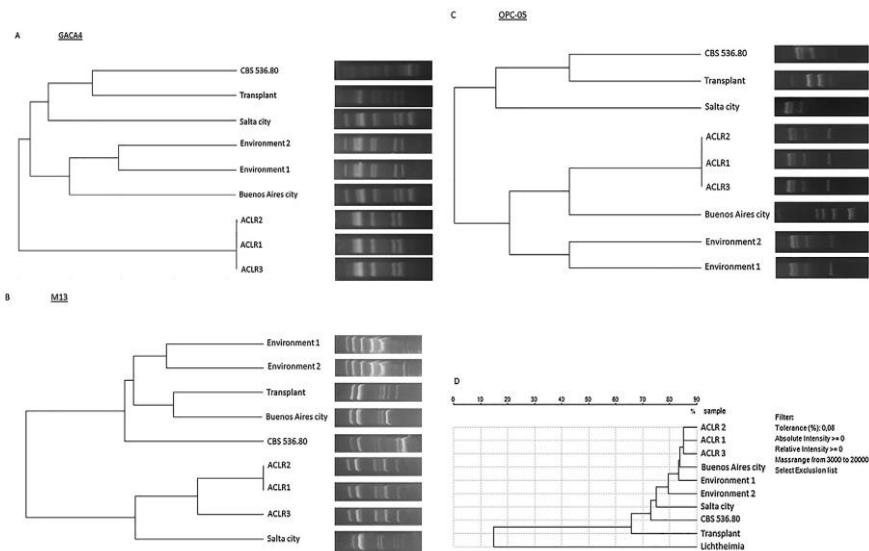


Fig. 2. UPGMA algorithm derived dendrograms of the 9 *R. microsporus* strains studied using GACA4 (A), M13 (B) and OPC-05 (C) primers. Band profiles are presented (D). Dendrogram obtained from single-linkage cluster analysis mass spectra (obtained by MALDI-TOF analysis) of the nine *R. microsporus* strains and the *L. corymbifera* used as out-group strain. Percentage of mass similarity was used as distance measurement units

Table 3
Susceptibility testing results of the *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* strains studied.

Strain	Origen/Isolation site	MIC (mg/L) ^a			
		AMB	PSC	ITC	TRB
LMDM-166	ACLR 1 ^b	0.50	0.50	0.50	0.12
LMDM-175	ACLR 2 ^b	0.50	0.50	0.50	0.12
LMDM-185	ACLR 3 ^b	0.50	0.50	0.50	0.12
LMDM-165	Surgical wound ^c	1.00	0.25	0.25	0.06
LMDM-168	Environment 1 ^d	1.00	1.00	0.12	0.12
LMDM-167	Environment 2 ^e	1.00	0.25	0.12	0.25
LMDM-158	CBS 536.80 ^f	0.50	0.50	0.50	0.25
LMDM-379	Buenos Aires ^f	0.50	1.00	0.25	0.25
LMDM-596	Salta ^f	0.50	1.00	0.25	0.12
GM (Range)	0.63 (0.5–1.0)	0.54 (0.25–1.00)	0.18 (0.12–0.5)	0.14 (0.06–0.25)	

^a Geometric means (GM) of at least 3 repetitions performed on different days. AMB: amphotericin B; PSC: posaconazole; ITC: itraconazole and TRB: terbinafine.

^b ACLR: anterior cruciate ligament reconstruction. Strains isolated from necrotic bone tissue after arthroscopic knee ligament surgery.

^c Isolated from the surgical wound of a renal transplant recipient during the 7-month time span of the outbreak.

^d Isolated from institution's operation room after the second ACLR surgery-related mucormycosis.

^e Isolated from institution's pharmacy shelf after the third ACLR surgery-related mucormycosis.

^f Epidemiologically non-related strains used as control.

classified as susceptible to AMB, PSC and ITC by using the epidemiologic cut-off values definitions [12]. The three strains isolated from ACLR surgery patients showed the same exact MIC pattern (Table 3). The three post-ACRL osteomyelitis patients receives the same treatment including: bone debridement with massive bone resection (10–12 cm) followed by intravenous antifungal treatment with 1 mg/kg/day AMB deoxicholate for six weeks (two patients were rotated after a week of treatment to liposomal AMB after renal toxicity). Knee reconstruction was done with an allograft-prosthesis composite using amphotericin B loaded bone cement beads [20]. All patients showed no signs of clinical infection as for April 2018.

4. Discussion

We are reporting three cases of bone healthcare-associated mucormycosis due to *R. microsporus* arisen after ACLR surgery in non-immunosuppressed individuals. The genetic and proteomic relatedness between the three isolated molds allow us to suggest that these three cases may be considered a mucormycosis outbreak. The epidemiological, genetic, proteomic and microbiological data presented here are almost unique if we consider that (i) ACLR is a common orthopedic procedure with low infection rates, (ii) fungal infections post-ACLR surgeries are almost nonexistent [20–22], (iii) immunosuppression is a risk factor observed in a high percentage of the mucormycosis cases [3] and (iv) healthcare-associated mucormycosis outbreaks due to *R. microsporus* are rare events [4,5,20,23].

Few authors have described typing methodologies for *Rhizopus* spp. [4,14]. Most of the previously reported outbreaks due to Mucorales were considered as such by identifying the strains to specie or variety level [5,14,23] or establishing partial genetic relatedness [4]. In this work we use 3 fingerprinting primers (random primers for Random Amplified Polymorphic DNA) to assess the genetic relatedness of the *R. microsporus* strains isolated in the clinic after ACLR surgeries. Our results, as any fingerprinting data, have limitations [24]. In order to reduce them, we use a set of completely unrelated isolates (knowing that they have no epidemiological relationship whatsoever) to test the method capacity to cluster them separately [24]. Moreover, we combined the data generated by three primers in order to increase the discriminatory power of the technique. However, no indexes (e.g. Simpson's index) were obtained since a small control population was studied [24]. To confirm our results and circumvent the described limitations we use a proteomic based typing (MALDI-

TOF). The obtained results were in agreement with the fingerprinting analysis demonstrating that MALDI-TOF could be a rapid and accurate alternative tool for typing. There is scant data about the applicability of MALDI-TOF as a tool for intraspecies typing in fungal outbreak situations [25,26]. The few examples in the literature include a *C. parapsilosis* outbreak and the evaluation of the typing capability of this technique in *Trichosphyton rubrum*, *C. auris* and other *Candida* spp. in strain collections [16–18]. To the best of our knowledge, this is the first report showing the potential utility of MALDI-TOF to typify *Rhizopus* spp.

The epidemiological importance of our finding is reinforced by the fact that in a recent systematic review of post-ACLR infections, only 7 fungal infections were reported, 6 of which were due to *R. microsporus* [22]. Notoriously, all the six *R. microsporus* infections included in Stucken et al. review [22], were reported in an Argentinian hospital that received patient derived from other national centers [27]. Moreover, the named Argentinian hospital reported other nine cases of post-ACLR surgeries infections due to *R. microsporus* not included in the cited review [28,29]. What was more disturbing was the fact that in 2011, more than 30 *R. microsporus* post-ACRL osteomyelitis cases occurring in 10 different Argentinian provinces were presented at the meeting of the Argentinian Society for Mycology [29,30]. All the Argentinian cases share the same clinical characteristics with our patients including the occurrence in immunocompetent patients; only one of the bones (tibia or femur) was affected showing bone rarefaction surrounding one of the fixation screws [27,29,30]. The genetic relatedness of these Argentinian *R. microsporus* strains was not established and the discovery of a common source of infection was never achieved. Thus, this is the first study regarding the relatedness of the Argentinian *R. microsporus* isolated from post-ACLR surgeries.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

Acknowledgments

This study was supported in part by Sanatorio La Entrerriana and by Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT) grant [PICT 2013–1571] to G.G.E. C.D., D.M. and F.L. have a fellowship from CONICET. M.C. is a PhD candidate at the Methodology of Biomedical Research and Public Health programme, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. *Mucor*

circinelloides, *Lichtheimia corymbifera* and *Syncephalastrum race-mosus* used as control strains were kindly provided by Dr. Gustavo Giusiano.

References

- [1] Petrikkos G, Skiada A, Lortholary O, Roilides E, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin Infect Dis* 2012;54:S23-34. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir866> [pii:cir866].
- [2] Dolatabadi S, Walther G, Gerrits van den Ende AHG, de Hoog GS. Diversity and delimitation for *Rhizopus microsporus*. *Fungal Divers* 2014;64:145-64. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-013-0229-6>.
- [3] Ibrahim AS, Spellberg B, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Pathogenesis of mucormycosis. *Clin Infect Dis* 2012;54:S16-22. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir865> [pii:cir865].
- [4] Cheng VC, Chan JF, Ngan AH, To KK, Leung SY, Tsoi HW, et al. Outbreak of intestinal infection due to *Rhizopus microsporus*. *J Clin Microbiol* 2009;47:2834-43. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00908-09> [pii:JCM.00908-09].
- [5] Cheng VC, Chen JH, Wong SC, Leung SS, So SY, Lung DC, et al. Hospital outbreak of pulmonary and cutaneous zygomycosis due to contaminated linen items from substandard laundry. *Clin Infect Dis* 2016;62:714-21. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/civ1006> [pii:civ1006].
- [6] Abe A, Asano K, Sone T. A molecular phylogeny-based taxonomy of the genus *Rhizopus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010;74:1325-31. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.90718> [pii:JST.JSTAGE/bbb/90718].
- [7] Machouart M, Larche J, Burton K, Collomb J, Maurer P, Cintrat A, et al. Genetic identification of the main opportunistic Mucorales by PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 2006;44:805-10. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.3.805-810.2006> [pii:44/3/805].
- [8] Walther G, Pawlowska J, Alastruey-Izquierdo A, Wrzosek M, Rodriguez-Tudela JL, Dolatabadi S, et al. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. *Persoonia* 2013;30:11-47. <http://dx.doi.org/10.3767/003158513X665070>.
- [9] Tang CM, Cohen J, Holden DW. An *Aspergillus fumigatus* alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity. *Mol Microbiol* 1992;6:1663-71.
- [10] Clinical, Laboratory Standards, Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, 3rd ed, 2017 [CLSI standard M38].
- [11] Gamarra S, Morano S, Dudiuk C, Mancilla E, Nardin ME, de Los Angeles ME, et al. Epidemiology and antifungal susceptibilities of yeasts causing vulvovaginitis in a teaching hospital. *Mycopathologia* 2014;178:251-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-014-9780-2>.
- [12] Espinel-Ingroff A, Chakrabarti A, Chowdhary A, Cordoba S, Dannaoui E, Dufresne P, et al. Multicenter evaluation of MIC distributions for epidemiologic cutoff value definition to detect amphotericin B, posaconazole, and itraconazole resistance among the most clinically relevant species of Mucorales. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:1745-50. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.04435-14> [pii:AAC.04435-14].
- [13] CBS Fungal Biodiversity Centre. Fingerprinting: random amplified polymorphic DNA (with M13); 2016.
- [14] Vagvolgyi C, Heinrich H, Acs K, Papp T. Genetic variability in the species *Rhizopus stolonifer*, assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004;86:181-8. <http://dx.doi.org/10.1023/B:ANTO.0000036123.48215.fc> [5267776 [pii]].
- [15] Clinical and Laboratory Standards Institute. Molecular methods for bacterial strain typing, approved guideline. CLSI document MM11-A. 28, 2007;p. 28.
- [16] Dhieb C, Normand AC, L'Ollivier C, Gautier M, Vranckx K, El ED, et al. Comparison of MALDI-TOF mass spectra with microsatellite length polymorphisms in *Candida albicans*. *J Mass Spectrom* 2015;50:371-7. <http://dx.doi.org/10.1002/jms.3538>.
- [17] Pereira L, Dias N, Santos C, Lima N. The use of MALDI-TOF/MS as an alternative tool for *Trichophyton rubrum* identification and typing. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2014;32:11-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.01.009> [S0213-005X(13)00014-1 [pii]].
- [18] Pulcrano G, Rossetto E, Iula VD, Panellis D, Rossano F, Catania MR. MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate *Candida parapsilosis* transmission in neonatal intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:2919-28. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-012-1642-6>.
- [19] Schipper M, Staplers J. A revision of the genus *Rhizopus*. II. The *Rhizopus microsporus* group. *Stud Mycol* 1984;25:20-34.
- [20] Arockiaraj J, Balaji G, Ashok A, Kokil G. Amphotericin B cement beads: a good adjunctive treatment for musculoskeletal mucormycosis. *Indian J Orthop* 2012;46:369-72. <http://dx.doi.org/10.4103/0019-5413.96370> [JOrtho-46-369 [pii]].
- [21] Kim SJ, Postigo R, Koo S, Kim JH. Infection after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. *Orthopedics* 2014;37:477-84. <http://dx.doi.org/10.3928/01477447-20140626-06>.
- [22] Stucken C, Garras DN, Shaner JL, Cohen SB. Infections in anterior cruciate ligament reconstruction. *Sports Health* 2013;5:553-7. <http://dx.doi.org/10.1177/1941738113489099> [10.1177_1941738113489099 [pii]].
- [23] Maravi-Poma E, Rodriguez-Tudela JL, de Jalon JG, Manrique-Laralde A, Torroba L, Urtasun J, et al. Outbreak of gastric mucormycosis associated with the use of wooden tongue depressors in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2004;30:724-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-003-2132-1>.
- [24] Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:332-70.
- [25] Bader O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics* 2013;13:788-99. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201200468>.
- [26] Posteraro B, De CE, Vella A, Sanguinetti M. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Rev Proteomics* 2013;10:151-64. <http://dx.doi.org/10.1586/epr.13.8>.
- [27] Muscolo DL, Carbo L, Aponte-Tinao LA, Ayerza MA, Makino A. Massive bone loss from fungal infection after anterior cruciate ligament arthroscopic reconstruction. *Clin Orthop Relat Res* 2009;467:2420-5. <http://dx.doi.org/10.1007/s11999-009-0714-0>.
- [28] Clara L, Almada G, Salazar E, Sánchez M, Carbó L, Carcan L, et al. Mucormycosis en cirugía de ligamento cruzado anterior; 2011 [Comité de Control de Infecciones. Hospital Italiano de Buenos Aires].
- [29] Makino A, Carbó L, Muscolo L, Ayerza M, Costa Paz M, Astoul Bonorino J, et al. Osteomielitis micótica luego de la reconstrucción del LCA. *Rev Argent Artroscopia* 2008;15:41-5.
- [30] Hevia AI, Abrantes RA, Fernandez J, Boleas M, Davel GO, Refojo N. Mucormycosis por *Rhizopus microsporus*. In: Program and abstracts of the 12th congress of the Argentine Society For Mycology (CAMIC 12); 2011 [Argentine Society For Mycology].

5.4.3. Publicación #3

American Journal of Infection Control 48 (2020) 791–794



Contents lists available at ScienceDirect

American Journal of Infection Control

journal homepage: www.ajicjournal.org

Major Article

Control of an outbreak of post-transplant cutaneous mucormycosis by removing the vehicle: An intervention study of contiguous cohorts



Marcelo S. Chaves MD, MSc^{a,*}, Florencia Leonardelli BSc^{b,c}, Diego M. Franco MD^d, Pablo G. Ríos MD^d, Gustavo M. Colli MD^e, Alicia R. Gutiérrez MD^e, Melina Ferri MD^e, María C. Elgadban RN^f, María L. Basaldúa MD^g, Mariana Boleas BSc^{d,h}, Patricia Feltes-Silva RNⁱ, Carlos Bantar MD^d, Soledad Gamarra PhD^b, Guillermo García-Effrón PhD^{b,c}

^a Quality Improvement Area, Sanatorio La Entrerriana, Paraná, Entre Ríos, Argentina^b Mycology and Molecular Diagnosis Laboratory, Cátedra de Parasitología y Micología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Santa Fe, Santa Fe Province, Argentina^c Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Santa Fe, Santa Fe Province, Argentina^d Committee for Control of Nosocomial Infection, Sanatorio La Entrerriana, Paraná, Entre Ríos, Argentina^e Department of Nephrology, Sanatorio La Entrerriana, Paraná, Entre Ríos, Argentina^f Department of Surgery, Sanatorio La Entrerriana, Paraná, Entre Ríos, Argentina^g Department of Pathology, Sanatorio La Entrerriana, Paraná, Entre Ríos, Argentina^h Department of Microbiology, Sanatorio La Entrerriana, Paraná, Entre Ríos, Argentinaⁱ Central Sterile Services, Sanatorio La Entrerriana, Paraná, Entre Ríos, Argentina

Key Words:

Surgical site infection
Kidney transplant
Elastic bandages
Autoclaving sterilization

Background: An outbreak of post-kidney transplant cutaneous mucormycosis (PK-CM), a severe and even fatal complication in immunocompromised patients, occurred in our institution. The objective of this study was to compare the usual fixation of sterile wound dressings with non-sterile elastic bandages and fixation with sterile bandages processed at our centralized sterile services department with regard to PK-CM prevention.

Methods: We conducted a before-and-after trial in a private tertiary care hospital. The pre-intervention cohort (n = 16) included all patients who had undergone kidney transplant (KT) during the outbreak (June 2010–April 2011), and the post-intervention cohort (n = 49) included all patients who had undergone KT between May 2011 and October 2013. From May 2011, only bandages sterilized by the centralized sterile services department were used to fix wound dressings of KT patients.

Results: Differences in age (50.2 years vs 51.3 years), sex (43.8% male vs 59.2% female), weight (63.3 kg vs 69.7 kg), hemodialysis vintage (55.6 months vs 47.8 months), and other risk factors were not observed between the pre- and post-intervention cohorts, respectively. PK-CM incidence dropped from 25% in the pre-intervention cohort (4/16) to 0% in the post-intervention cohort (0/49). Relative risk was 0 (P = .003).

Conclusions: With regard to KT patients and sterile wound dressing fixation with non-sterile bandages versus the use of autoclaved bandages, fixation with autoclaved bandages proved to be effective for cutaneous mucormycosis outbreak control and prevention in our institution.

© 2019 Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

*Address correspondence to Marcelo S. Chaves, MD, Quality Improvement Area, Sanatorio La Entrerriana, Darwin 1265 (3100), Paraná, Entre Ríos, Argentina.

E-mail address: mchaves@gammanet.com.ar (M.S. Chaves).

Conflicts of interest: None to report.

Financial support: This study was supported by Sanatorio La Entrerriana, Argentina. G.G.-E. received grant support from the Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, Argentina (PICT 2013-1571). F.L. was awarded a PhD fellowship by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. This work is part of a doctoral degree thesis submitted by M.S.C. to the Methodology of Biomedical Research and Public Health Programme, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.10.024>

0196-6553/© 2019 Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

BACKGROUND

Mucorales are environmental molds responsible for mucormycosis, a severe and even fatal complication that occurs mainly in immunocompromised patients. Although the major route of infections has been the inhalation of spores from environmental sources, cutaneous exposure has also been reported as a relevant mode of transmission.¹ A variety of wound dressings and contaminated bandages have been implicated in documented cases and small hospital outbreaks of

cutaneous mucormycosis.^{2–4} Furthermore, 2 recently reported mucormycosis outbreaks were associated with contaminated hospital linens.^{5,6} Cutaneous mucormycosis presentation may vary from localized to gangrenous and invasive forms, which are more severe in immunocompromised patients.^{1–7}

Post-kidney transplant cutaneous mucormycosis (PK-CM) may be a local or overwhelming (even fatal) complication.^{8,9} Between June 2010 and April 2011, an outbreak of 4 PK-CM cases occurred in our institution, and 2 of the patients died. After an initial epidemiological investigation,¹⁰ the hypothesis was that the fungus could have been conveyed to the cutaneous wound by a vehicle¹¹ (a contaminated elasticized bandage), and this hypothesis was tested with a comparative design.^{10,12}

METHODS

We considered SQUIRE 2.0 guidelines¹³ in the design of this before-and-after cohort study¹² conducted at our institution in Paraná, Argentina, a private, tertiary referral center with 70 beds where more than 400 surgeries are performed monthly and about 18–20 kidney transplants (KTs) annually. The completeness of the report and the risk of bias were assessed using the checklist recommended in the ORION statement¹⁴ and a tool developed for non-randomized studies of intervention.¹⁵ The study was reviewed and approved by the institutional review board. All patients who underwent KT during the outbreak (pre-intervention cohort) and for a period 3 times as long after intervention began (post-intervention cohort) were included (contiguous cohorts¹²). There were no changes in operating room (OR) layout, human resources, or KT technique throughout the pre- and post-intervention periods. During the outbreak (as had been the usual practice for years), the surgical wound at the end of the operation was covered with sterile dressings, which were additionally protected and held in place using a new non-sterile elastic girdle.

Beginning in May 2011, a systematic procedure developed to control the outbreak (“safe surgical wound care”) was put into place.^{16,17} Briefly, to protect and hold the sterile dressings in place, only elastic or non-elastic sterile girdles, autoclaved at our central sterile services department (CSSD), were used. To ensure that these sterile girdles were delivered to the OR (or to the renal unit or other related services) only from our CSSD, an ad hoc stamp (ie, traceability label) was created and filled in. To ensure compliance with the procedure, the OR and renal unit staff (and staff of all related wards) were trained by members of the Infection Control Committee. All patients were followed daily (and then weekly) after surgery. Cases suggesting any sign of surgical site infection were referred to the infectious diseases department. Intervention adherence was assessed monthly by Infection Control Committee members. (Procedure details are available upon request from the authors.)

Outbreak investigation

We investigated the outbreak and whether or not the intervention resolved it as previously described.^{10,18} PK-CM was defined as surgical site infection occurring within 1 month of KT (or the last reoperation with a healthy surgical wound), presenting as a necrotizing and painful surgical wound, fulfilling the criteria for proven invasive fungal illness.¹⁹ During investigation, 7 Mucorales isolates were identified: 4 strains were isolated from PK-CM cases; 1 strain was obtained by separately sampling 2 new, non-sterile elastic bandages, similar to those regularly used in KT postoperative period (girdle type, same brand); and 2 isolates were obtained from 18 environmental samples (both from pharmacy shelves). All of the Mucorales strains were isolated using Sabouraud agar slants that were incubated for 10 days at 28°C and 37°C. The environmental (surface) cultures were performed by using sterile swabs. The elastic girdles were cultured by cutting

1 × 1-cm pieces and depositing these portions on the slants. The isolates were then subcultured in potato dextrose agar slants to identify them by microscopic, physiological, and molecular methods.^{20–22} Two *Rhizopus microsporus* strains were used as non-epidemiologically related controls: the CBS536.80 strain (used as a reference in earlier published reports^{21,23}) and a clinical isolate obtained in our institution from a bone infection.²⁴ *Aspergillus fumigatus* LMDM-31 strain was used as the outgroup control for random amplification of polymorphic DNA studies.

Molecular typing by polymerase chain reaction fingerprinting (molecular outbreak study)

Fingerprinting primers (random primers) M13, GACA4, and OPC05 were used for random amplification of polymorphic DNA. Amplifications were performed in a Q-Cycler II thermal cycler (Quanta Biotech, Surrey, UK) as described previously.²⁵ The total volume of the polymerase chain reaction products was seeded in a 2% agarose gel stained with GelGreen® (Genbiotech, Buenos Aires, Argentina). These experiments were repeated 3 times on different days, and blinded duplicates were included. Cluster analysis was performed using the unweighted pair group method with arithmetic mean following Clinical and Laboratory Standards Institute Document MM11-A.²⁶ PyElph 1.4 (<http://pyelph.sourceforge.net/>) was used for analysis.

Statistics and data analysis

The PK-CM incidence and relative risk (RR) with 95% confidence intervals were calculated. To evaluate comparability, we used *t*-tests for continuous variables and χ^2 or Fisher's exact test (as appropriate) for dichotomous variables. The contribution of risk factors to the development of PK-CM was evaluated by multivariate regression when $P < .15$ was observed in univariate analysis. A $P < .05$ was considered significant. Stata 11.2 (StataCorp; College Station, TX) was used.

RESULTS

The study included 65 patients. The cohorts included all of the patients who had undergone KT between June 2010 and April 2011 (pre-intervention) and between May 2011 and October 2013 (post-intervention). All of the patients in the post-intervention cohort received the intervention and completed the follow-up. The characteristics of the cohorts are shown in Table 1.

The 4 outbreak-associated cases presented necrotizing and painful surgical wounds 12 ± 3 days after KT. Mucorales strains isolated from PK-CM cases grew only from necrotic tissue, where they were also observed histopathologically (ribbon-like hyphae with 90° angle division). The 7 Mucorales strains isolated in our institution were phenotypically and genetically (internal transcribed spacer sequencing) identified as *R microsporus*.

The 3 primers utilized coincided clustering the *R microsporus* strains in 2 different clusters, separating the isolates of the first 3 kidney transplant patients from the environmental/bandage strains (Fig 1). In the first cluster, 2 subclusters were evident. One included the first 3 PK-CM cases, which were considered strongly genetically related by the dendrogram (unweighted pair group method with arithmetic mean algorithm). The second cluster included the 2 environmental strains (genetically related); the fourth PK-CM case and the strain isolated from the new, unused bandage shared a common ancestor.

The PK-CM outbreak investigation showed that (1) during a 10-month period, the cutaneous mucormycosis cases occurred only in KT patients whose sterile wound dressings were fixed with a non-sterile elastic girdle; (2) all cases presented 12 ± 3 days

Table 1
Pre and post-intervention cohorts

Variable	Pre-IC (N = 16)*	Post-IC (N = 49)*	P value
Observation period (mo)	10	30	—
Age ± SD (y)	50.2 ± 16	51.3 ± 15	.8
Male, % (n)	43.8 (7)	59.2 (29)	.28
Weight ± SD (kg)	63.3 ± 16	69.7 ± 17	.18
Hemodialysis vintage ± SD (mo)	55.6 ± 41	47.8 ± 37	.47
Net surgical time ± SD (min)	139.1 ± 32	150.1 ± 30	.21
Cadaveric-donor KT, % (n)	87.5 (14)	71.4 (35)	.32†
Immunosuppression scheme 1, † % (n)	56.2 (9)	55.1 (27)	.94
Delayed graft function, ‡ % (n)	75.0 (12)	63.3 (31)	.55†
Reoperation, % (n)	25.0 (4)	18.4 (9)	.72†
Rejection, % (n)	6.3 (1)	12.3 (6)	.67†
Diabetes, % (n)	0 (0)	8.2 (4)	.57†
Other causes of immunosuppression, ‡ % (n)	6.3 (1)	2.1 (1)	.44†
PK-CM cases, % (n)	25.0 (4)	0 (0)	.003†

IC, intervention cohort; KT, kidney transplant; PK-CM, post kidney-transplant cutaneous mucormycosis.

*All underwent kidney transplant by the same surgical team, in the same institution, and in the same operating room.

†The basal immunosuppression (scheme 0) included Solu-Medrol®, mycophenolate, and tacrolimus. When anti-thymoglobulin induction was added to the basal scheme, it became scheme 1.

‡Use of dialysis within 7 d of the transplant.

§HIV, malnutrition, and other immunosuppressive treatment.

¶Fisher's exact test.

postoperatively as necrotic and painful surgical wounds that fulfilled all the criteria of proven invasive fungal infection, suggesting a shared vehicle and the same portal of entry; (3) cases occurred while exposed to a non-sterile elastic girdle and not while exposed to a sterile (elastic or non-elastic) bandage; and (4) *R microsporus* was isolated in all cases from wound necrotic tissue, and it was also recovered from 1 girdle-type elastic bandage sampled (new, non-sterile) the same as those used in the KT postoperative period. Genetically, whereas the first 3 outbreak-associated cases were caused by strongly related strains, the fourth case and the strain isolated from the bandage shared a common ancestor (Fig 1). The intervention

might have eliminated the vehicle of *R microsporus*, and the outbreak ceased. As the PK-CM frequency was 25% (4/16) during the outbreak and 0 (0/49) during the post-intervention period, the RR was 0, showing a $P = .003$ (Fisher's exact test).

DISCUSSION

The intervention effect observed (RR < 0.25) was very large²⁷ and consistent, as the challenge was 3 times longer in time and greater in number of patients (Table 1). Because the comparability of the cohorts was, on average, satisfactory (Table 1) and all KT patients during the outbreak and post-intervention period were included and completed the follow-up, the selection risk would be low.¹⁵ No risk of bias due to selective reporting of outcomes was observed, nor was it observed in the care provided to both cohorts (see Table 1) or in the assessment method of primary outcome (PK-CM), which is standardized.¹⁹ Therefore, the quality of evidence might be moderate and the results reliable.²⁷ In other words, the intervention might have eliminated the presumed vehicle, and the outbreak ceased.¹⁸

The outbreak investigation¹⁰ and the intervention study¹² showed satisfactory fulfillment of the 5 recommended postulates to resolve outbreaks,¹⁸ strongly supporting the hypothesis. Mortimer¹⁸ observed that “the most convincing evidence that the true cause of an outbreak has been found” occurs “when the source (or the route of spread) of the implicated micro-organism is eliminated (and) the outbreak ceases.” By replacing the non-sterile elastic girdles that covered the sterile dressings with girdles washed and sterilized by autoclave (which eliminates the fungus viability), the intervention should have eliminated the vehicle and controlled the outbreak. The clustering of *R microsporus* strains isolated from the first 3 outbreak-associated cases (suggesting a common source) and the isolation of *R microsporus* in 1 of the 2 new girdles sampled (same type and brand as those used during the outbreak), which shared a common ancestor with the isolates of the fourth case (Fig 1), provide additional plausibility to the proposed mode of transmission, consistent with previous reports.²⁻⁶

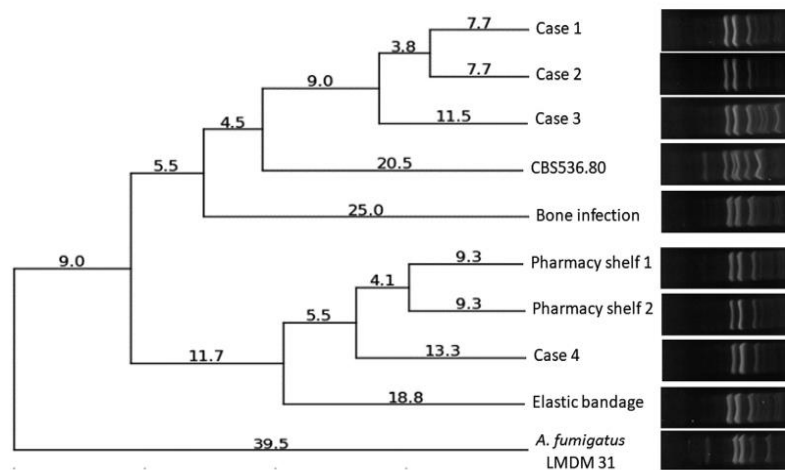


Fig 1. Dendrogram obtained using the unweighted pair group method with arithmetic mean algorithm for the 9 *Rhizopus microsporus* strains studied during the outbreak period and the *Aspergillus fumigatus* LMDM-31 (outgroup). Cases 1–4 are the clinical strains isolated from the 4 cutaneous mucormycosis post-kidney transplant. CBS536.80 is the reference strain used earlier in published reports. Bone infection represents the strain isolated from a bone mucormycosis (a case not associated with the outbreak). Pharmacy shelf 1 and Pharmacy shelf 2 are the environmental strains isolated from superficial sampling in the pharmacy. Elastic bandage is the strain isolated from a new non-sterile elastic bandage, similar to that used in kidney transplant (girdle type, same brand). The band profiles shown are the ones obtained by using GACA4 primer. Numbers represent the degree of divergence among band profiles.

Elastic (and non-elastic) bandages and hospital linens contaminated by *Mucormycetes* have been reported as vehicles of hospital cutaneous mucormycosis outbreaks.²⁻⁶ Additionally, it has been established that the susceptibility and severity of cutaneous mucormycosis depend on the host's immune status.¹⁻⁷ Our patients were receiving immunosuppression for transplantation of solid organs.

CONCLUSIONS

This work, through an intervention study (utilizing contiguous cohorts¹²), shows the potential role of vehicles in PK-CM. Elastic bandages used to cover sterile surgical dressings are usually distributed non-sterile because they are not produced to cover wounds; therefore, surgical teams performing KT—in order to try to prevent the occurrence of PK-CM—should ensure that these bandages have been previously washed and sterilized by autoclaving. Other susceptible populations could benefit from this concept.^{4,5} Additional studies, with appropriate designs, could further strengthen the findings of this study, that cutaneous mucormycosis is a preventable disease insofar as the mode of transmission (eg, non-sterile bandages or linens) of fungus to susceptible populations can be interrupted or eliminated.

References

- Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:236-301.
- Patterson JE, Barden GE, Bia FJ. Hospital-acquired gangrenous mucormycosis. *Yale J Biol Med* 1986;59:453-9.
- Keys TF, Haldorson AM, Rhodes KH, Roberts G. Nosocomial outbreak of *Rhizopus* infections associated with Elastoplast wound dressings—Minnesota. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1978;27:33-4.
- Fréalte E, Rocchi S, Bacus M, Bachelet H, Pasquesoone L, Tavernier B, et al. Real-time polymerase chain reaction detection of *Lichtheimia* species in bandages associated with cutaneous mucormycosis in burn patients. *J Hosp Infect* 2018;99:68-74.
- Duffy J, Harris J, Gade L, Schulster L, Newhouse E, O'Connell H, et al. Mucormycosis outbreak associated with hospital linens. *Pediatr Infect Dis J* 2014;33:472-6.
- Cheng VCC, Chen JHK, Wong SCY, Leung SSM, So SYC, Lung DC, et al. Hospital outbreak of pulmonary and cutaneous zygomycosis due to contaminated linen items from substandard laundry. *Clin Infect Dis* 2015;62:714-21.
- Nain PS, Matta H, Singh K, Chhina D, Trehan M, Batta N. Post-operative abdominal wall mucormycosis—a case series. *Indian J Surg* 2015;77:253-6.
- Davoudi S, Manshadi SAD, Salehi MR, Yazdi F, Khazravi M, Fazli JT. Fatal cutaneous mucormycosis after kidney transplant. *Exp Clin Transplant* 2015;13:82-5.
- Zhao L, Wang CX, Zhang L, Tu XA, Wang W, Chen Y, et al. Mucormycosis extending from the surgical wound to the transplanted kidney: case report and literature review. *Exp Clin Transplant* 2012;10:403-5.
- Reingold AL. Outbreak investigations - a perspective. *Emerg Infect Dis* 1998;4:21-7.
- Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. Guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in healthcare settings. *Am J Infect Control* 2007;35(10, Suppl 2):S65-164.
- Cook TD, Campbell DT. Quasi-experiments: nonequivalent control group designs. editors. In: Cook TD, Campbell DT, editors. *Quasi-experimentation: design & analysis issues for field settings*. Boston (MA): Houghton Mifflin; 1979. p. 95-146.
- Ogrinc G, Davies L, Goodman D, Batalden P, Davidoff F, Stevens D. Standards for Quality Improvement Reporting Excellence (SQUIRE 2.0) publication guidelines. *BMJ Qual Saf* 2016;25:986-92.
- Stone SP, Cooper BS, Kibbler CC, Cookson BD, Roberts JA, Medley GF, et al. The ORION statement: guidelines for transparent reporting of outbreak reports and intervention studies of nosocomial infection. *Lancet Infect Dis* 2007;7:282-8.
- Sterne JAC, Hernán MA, Reeves BC, Savović J, Berkman ND, Viswanathan M, et al. ROBINS-I: a tool for assessing risk of bias in non-randomised studies of interventions. *BMJ* 2016;1-7.
- Hoffmann TC, Glasziou PP, Boutron I, Milne R, Perera R, Moher D, et al. Better reporting of interventions: template for intervention description and replication (TIDieR) checklist and guide. *BMJ* 2014;348:1-12.
- Institute of Environmental Science & Research. Guidelines for the investigation and control of disease outbreak. Available from: <https://surv.esr.cri.nz/episurv/Manuals/GuidelinesForInvestigatingCommDiseaseObs>. Accessed November 15, 2019.
- Mortimer PP. Five postulates for resolving outbreaks of infectious disease. *J Med Microbiol* 2003;52:447-51.
- 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). *Clin Infect Dis* 2008;46:1813-21.
- de Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. editors. 2nd ed. Washington (DC): American Society for Microbiology; 2001.
- Machouart M, Larche J, Burton K, Collob J, Maurer P, Cintrat A, et al. Genetic identification of the main opportunistic Mucorales by PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 2006;44:805-10.
- Walther G, Pawlowska J, Wrzosek M, Dolatabadi S, Chakrabarti A, de Hoog GS. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. *Persoonia* 2013;30:11-47.
- Abe A, Asano K, Sone T. A molecular phylogeny-based taxonomy of the genus *Rhizopus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010;74:1325-31.
- Chaves MS, Franco D, Nanni JC, Basaldúa ML, Boleas M, Aphalo G, et al. Control of an outbreak of postoperative bone mucormycosis: an intervention study of contiguous cohorts. *Am J Infect Control* 2016;44:1715-7.
- Gamarra S, Chaves MS, Cabeza MS, Macedo D, Leonardelli F, Franco D. Mucormycosis outbreak due to *Rhizopus microsporus* after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction surgery evaluated by RAPD and MALDI-TOF mass spectrometry. *J Mycol Med* 2018;28:617-22.
- CLSI. Molecular methods for bacterial strain typing: approved guideline. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. p. 11-24.
- Schünemann HJ, Oxman AD, Vist GE, Higgins JPT, Deeks JJ, Glasziou P, et al. Interpreting results and drawing conclusions. editors. In: Higgins JPT, Green S, editors. *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions*, 5th ed. New York (NY): John Wiley & Sons; 2011.

6. DISCUSIÓN

6.1. Discusión específica derivada de las publicaciones

6.1.1. Publicación #1

Título: Control de un brote de mucormicosis ósea postoperatoria: Un estudio de intervención de cohortes contiguas. ⁽⁶⁰⁾

El efecto observado de la intervención fue muy grande ($RR < 0,2$) ⁽⁶³⁾ y consistente, porque el desafío (para la cohorte post-intervención) fue 3 veces más extenso en el tiempo y 5 veces más grande en el número de pacientes (ver Tabla 1 de la Pub #1 en **Resultados**). Debido a que la comparabilidad de las cohortes fue en promedio satisfactoria (ver Tabla 1 de la Pub #1 en **Resultados**), y se incluyeron *todos* los pacientes sometidos a RALCA durante el brote y durante el período post-intervención, el riesgo de sesgo de selección y el de explicaciones alternativas sería bajo. ⁽¹⁷⁾ Por lo tanto, la calidad de la evidencia podría ser moderada y los resultados confiables. ⁽⁶³⁾ En otras palabras, la intervención podría haber eliminado el supuesto vehículo (que implantó el hongo en el hueso) y provocado el cese del brote. ⁽⁴²⁾

El dendrograma mostró que las cepas de *Rhizopus microsporus* obtenidos de las osteomielitis post-operatorias de los pacientes sometidos a RALCA podrían tener un reservorio común fuera del hospital, ya que “los aislamientos de los casos (Post ACLR 1, 2 y 3) se agruparon en 2 grupos *estrechamente* relacionados, mientras que los aislamientos ambientales (Environment 1 y 2) y el de la mucormicosis cutánea (Post-transplant) se agruparon en grupos *totalmente* diferentes” (ver Figura 1 de la Pub #1 en **Resultados**). Las entrevistas con el equipo quirúrgico respaldaron el probable rol de los tornillos (como vehículos del hongo), porque tienen la capacidad de sembrar un solo hueso durante la cirugía¹⁰. Refuerzan esto, distintos aspectos relevantes: (i) una auditoría formal de la ANMAT¹¹ mostró que los tornillos utilizados en 2 de los 3 casos no tenían trazabilidad genuina, impidiendo conocer su origen; ⁽⁶⁴⁾ (ii) *R microsporus* es termofílico, por lo que la esterilización a baja temperatura (ej., óxido de etileno; si no tiene la penetración adecuada) podría permitir la presencia de esporas en el material; ⁽⁶⁵⁾ (iii) los tornillos utilizados

¹⁰ Se acepta (en general) que una cirugía de RALCA tiene 7 pasos, hasta que se reemplaza el ligamento roto, por un injerto que pasando por dentro de la articulación se fija en sus extremos con un tornillo (u otro elemento de fijación) en la tibia y en el fémur. En los primeros 6 pasos, se contactan: el espacio articular, los tejidos blandos peri-articulares y ambos huesos. Solo en el paso final de fijación, se contacta en forma directa y exclusiva un solo hueso (fémur o tibia). En todos los casos, se trató de osteomielitis de uno solo de los huesos, que rodeaban el tornillo de fijación. Nunca hubo compromiso micótico inicial del otro hueso, de la articulación, o de los tejidos blandos.

¹¹ Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica de Argentina.

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

en los tres (3) casos fueron esterilizados con óxido de etileno; (iv) para verificar la calidad, los tornillos utilizados en los casos fueron remitidos al Laboratorio de Metalografía y Materiales de la Universidad Tecnológica (UTN), quienes informaron que “las cabezas Allen presentaban (en su interior) defectos de mecanizado o terminado, observándose rebabas y dobleces” que podrían permitir “que se aloje aceite de mecanizado, el cual, si estuviera contaminado, no podría ser limpiado, afectando la capacidad esterilizante del óxido de etileno” (reporte no incluido en nuestra publicación).⁽⁶⁶⁾

Apoyando la hipótesis (del tornillo contaminado -de uso exclusivo en RALCA- como vehículo), *todos* los casos reportados por el Hospital Italiano de Buenos Aires fueron mucormicosis de un solo hueso que compartían las características clínicas de nuestros pacientes (infección restringida al hueso, sin comprometer partes blandas ni el espacio articular).^(67, 68) Por otro lado, en *todos* los hospitales y clínicas que informaron mucormicosis ósea post-quirúrgica durante el período del brote a nivel nacional (2005-2015), que abarcó a unas 12 provincias, el evento *solo* ocurrió post-RALCA. Si bien un informe destacó que los materiales procedían de diferentes empresas,⁽⁶⁷⁾ dados los graves problemas de trazabilidad detectados por ANMAT,⁽⁶⁴⁾ se debería verificar *formalmente* la trazabilidad en cada caso.

En resumen, la *intervención* implementada, esto es, la *entrega en la farmacia* de implantes esterilizados en fábrica a los fines de *verificar* la trazabilidad y el cumplimiento de los estándares ANMAT, y el *procesamiento* de todo el instrumental en el Departamento Central de Servicios Estériles, resultó efectiva para la *prevención* de la osteomielitis post-RALCA en nuestra institución. Se necesitan estudios adicionales para procurar precisar cómo los tornillos podrían haberse contaminado y, finalmente, la fuente común.

6.1.2. Publicación #2

Título: Brote de mucormicosis por *Rhizopus microsporus* tras cirugía artroscópica de reconstrucción del ligamento cruzado anterior evaluada por RAPD y espectrometría de masas MALDI-TOF.⁽⁶¹⁾

Se estudiaron los tres casos de mucormicosis ósea debido a *R. microsporus* que se presentaron después de cirugía de RALCA en individuos no-inmunosuprimidos.⁽⁶⁰⁾ La relación de parentesco (genético) de las seis (6) cepas de *R. microsporus* aisladas en la clínica durante el brote de mucormicosis ósea post-RALCA fue *evaluada* y *validada* por metodologías genética y proteómica. Como cualquier reporte de huellas genéticas (*fingerprinting*), nuestros resultados tienen limitaciones.⁽⁶⁹⁾ Con el fin de reducirlas, utilizamos un conjunto de aislamientos

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

completamente no-relacionados representados por tres (3) controles externos; sabiendo que no tienen relación epidemiológica alguna, para probar la capacidad del método de agruparlos por separado. ⁽⁶⁹⁾ Además, se utilizaron 3 cebadores de huellas genéticas (cebadores aleatorios para ADN Polimórfico Amplificado al Azar [RAPD]) y combinamos los datos generados por los mismos (*primers*) para aumentar el poder discriminatorio de la técnica¹².

Para *validar* nuestros resultados y eludir las limitaciones descritas, utilizamos adicionalmente, una tipificación basada en proteómica (MALDI-TOF). Los resultados obtenidos por MALDI-TOF coincidieron *-fueron consistentes-* con el análisis de las huellas genéticas (*fingerprinting*) obtenidas por RAPD; mostrando (además) que MALDI-TOF, podría ser una herramienta alternativa rápida y precisa para la tipificación (ver **Resultados**. Pub #2, Figura 1). Hay pocos datos sobre la aplicabilidad de MALDI-TOF como herramienta para la tipificación intraespecífica en situaciones de brotes de hongos. ^(70, 71) Los pocos ejemplos en la literatura incluyen un brote de *C. parapsilosis* y la evaluación de la capacidad de tipificación de esta técnica en *Trichophyton rubrum*, *C. auris* y otras *Candida* spp. en colecciones de cepas. ^(56- 58) Desde nuestro conocimiento, este es el primer informe que muestra la utilidad potencial de MALDI-TOF para tipificar *Rhizopus*.

La estrecha (e incluso idéntica) relación genética y proteómica entre las tres cepas (de *R. Microsporus*) aisladas de los tres casos de osteomielitis post-RALCA observados en nuestra institución, ⁽⁶⁰⁾ y la clara *separación* de los aislados ambientales y del caso de mucormicosis cutánea (todos durante el período de brote), nos permiten considerar que estos tres casos pueden considerarse un brote de mucormicosis ósea post-RALCA (originado probablemente en una *f fuente común extra-hospitalaria*) ⁽⁷²⁾ (ver **Resultados**. Pub #2, Figura 1).

Los datos epidemiológicos (reportados previamente); ⁽⁶⁰⁾ así como, los genéticos, proteómicos y microbiológicos presentados aquí, son casi únicos, si consideramos que: (i) RALCA es un procedimiento ortopédico común con bajas tasas de infección; (ii) las infecciones fúngicas post-RALCA son casi inexistentes; ⁽⁷³⁻⁷⁵⁾ (iii) la inmunosupresión, que es un factor de riesgo establecido para mucormicosis, ⁽⁷⁶⁾ no se observa en el presenta brote; y, (iv) los brotes de mucormicosis asociados al cuidado de la salud, debidos a *R. microsporus* son eventos poco frecuentes. ^(73, 77-79)

La fuerte consistencia de los cuatro dendrogramas de la Figura 1 (ver **Resultados**, Pub #2);

¹² En total se utilizaron nueve (9) cepas de *Rhizopus microsporus* en el presente trabajo; 6 aisladas en la clínica durante el brote y 3 controles externos.

mostrando todos ellos, una repetitiva y clara separación de los agrupamientos, sostiene nuestra posición.

6.1.3. Publicación #3

Título: Control de un brote de mucormicosis cutánea post-trasplante mediante la remoción del vehículo: Un estudio de intervención de cohortes contiguas. ⁽⁶²⁾

El efecto observado de la intervención (RR <0,2) fue muy grande ⁽⁶³⁾ y consistente; ya que el desafío fue 3 veces mayor, tanto en el período de tiempo, como en el número de pacientes (ver **Resultados**. Pub #3, Tabla 1). Debido a que la comparabilidad de las cohortes fue, en promedio, satisfactoria (Tabla 1) y *todos* los pacientes con TR durante el brote y el período post-intervención fueron incluidos y completaron el seguimiento, el riesgo de selección sería bajo. ^(17, 33, 36) No se observó riesgo de sesgo debido a la notificación selectiva de los resultados, ni en la atención brindada a ambas cohortes (ver Tabla 1); ni en el método de evaluación del resultado primario (PK-CM), que está estandarizado. ^(17, 33, 43) Por lo tanto, la calidad de la evidencia podría ser moderada y los resultados confiables. ⁽⁶³⁾ En otras palabras, la intervención podría haber eliminado el presunto vehículo y el brote cesó. ⁽⁴²⁾

La investigación del brote ⁽⁴¹⁾ y el estudio de intervención ⁽¹⁷⁾ mostraron un cumplimiento satisfactorio de los 5 postulados recomendados para resolver los brotes, ⁽⁴²⁾ lo que respalda firmemente la hipótesis. Mortimer, ⁽⁴²⁾ observó que "la evidencia más convincente de que se ha encontrado la verdadera causa de un brote" ocurre "cuando la fuente (o el modo de transmisión) del microorganismo implicado se elimina (y) el brote cesa". Reemplazando las fajas elásticas no-estériles, que se utilizaban para fijar los apósitos estériles; por fajas lavadas y esterilizadas por autoclave (que *elimina* la viabilidad del hongo), la intervención pudo haber eliminado el vehículo y controlado el brote. La agrupación en el dendrograma, de cepas de *R. microsporus* aisladas de los primeros 3 casos del brote (lo que sugiere una *fuentes común*); y, el aislamiento de *R. microsporus* en 1 de las 2 fajas nuevas muestreadas (del mismo tipo y marca que las utilizadas durante el brote), el cual compartió un ancestro común con el aislamiento del cuarto caso (ver **Resultados**. Pub #3, Figura 1), brindan plausibilidad adicional al modo de transmisión propuesto, que es consistente con reportes previos; que han informado que los vendajes -elásticos (y no elásticos) y la ropa de cama de hospital- contaminados por Mucormicetos son *vehículos* de brotes de mucormicosis cutánea hospitalaria. ^(78, 80-83) Además, se ha establecido que la susceptibilidad y la gravedad de la mucormicosis cutánea dependen del estado inmunológico. ⁽⁷⁶⁾ Nuestros pacientes estaban recibiendo inmunosupresión para

trasplante de órganos sólidos.

En resumen, a través de un estudio de intervención que utiliza cohortes contiguas, ⁽¹⁷⁾ se ha podido mostrar el papel del *vehículo*, ⁽⁷²⁾ como modo de transmisión de la mucormicosis cutánea en el post-trasplante renal (PK-CM). Los vendajes elásticos que se utilizan para cubrir los apósitos quirúrgicos estériles, se distribuyen normalmente sin esterilizar, porque no se fabrican para cubrir heridas; por lo tanto, los equipos quirúrgicos que realizan TR, a los fines de procurar prevenir la aparición de PK-CM, deberían **asegurar** (si utilizan este tipo de vendajes) que previamente hayan sido *lavados* y *esterilizados* en autoclave. Otras poblaciones susceptibles podrían beneficiarse de este concepto. ^(82, 83) Estudios adicionales, con diseños apropiados, podrían fortalecer o dar robustez a estos hallazgos, que posicionan a la mucormicosis cutánea, como una *enfermedad prevenible*, en la medida que se pueda interrumpir o eliminar el modo de transmisión de éste tipo de hongos (ej., vendajes o sábanas no estériles) a poblaciones susceptibles.

6.2. Discusión de los aspectos generales

Antes de adentrarnos en la discusión general, debemos recordar los principios de JS Mill ⁽¹⁰⁾ (ver **Introducción**, ítem 2.1.3), en el sentido que para realizar una inferencia causal *válida*: (i) la causa *debe* preceder al efecto; (ii) la causa y el efecto *deben* estar relacionados (asociados estadísticamente); (iii) otras explicaciones alternativas a la relación causa-efecto en estudio *deberían* haber sido eliminadas. La adherencia a estos tres criterios resulta inherente a cualquier diseño experimental (ECA) y también lo es en los DCE más robustos o confiables (“*the big-5 Q-ED*”). ⁽¹⁹⁾ En el siguiente título analizaremos esta adherencia explícitamente.

6.2.1. Validez de las inferencias causales obtenidas con el uso de los diseños cuasi-experimentales

Discutiremos la adhesión metodológica de cada uno de los trabajos

La **publicación #1** ⁽⁶⁰⁾ utiliza un DCE antes-después, denominado de cohortes contiguas. ⁽¹⁷⁾ Este diseño *comparativo* se aplica en instituciones con ‘recambio cíclico’ de sus participantes, como una escuela, en la que todos los años un nuevo grupo de estudiantes pasa (por ejemplo) a tercer grado. ⁽¹⁷⁾ Se *asume* que existiría *cuasi-comparabilidad* (en promedio) entre ambas cohortes (por caso) de los alumnos de 3er grado de 2017-18 y de 3er grado de 2018-19 del mismo Colegio; *principalmente* dada por el hecho que el investigador *no participa* en la selección de las

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

cohortes¹³ (tampoco participa en la *asignación* de la intervención). También es muy *relevante* que el contexto (la escuela, el plantel docente, no-docente, etc.) –a **excepción de la intervención**– se mantenga *invariante* mientras dura el estudio. ⁽¹⁷⁾ Que participen *todos* los integrantes de las cohortes brinda más robustez al diseño; al igual que medir (en los integrantes de ambas cohortes) *todas* las variables que se consideren de importancia para el *outcome* de interés. Ambos aspectos fortalecerían la cuasi-comparabilidad. ⁽¹⁷⁾ Luego, si aplicara a la 2da cohorte una intervención –*que no recibió la primera*– el cambio de resultado podría atribuirse a la intervención.

Este diseño de instituciones con ‘recambio cíclico’ aplica a hospitales, o a servicios hospitalarios. En el presente estudio, ⁽⁶⁰⁾ lo hemos aplicado al Servicio de Traumatología Artroscópica de nuestra Institución e incluimos *todos* los pacientes operados de RALCA durante el brote (7 meses, 32 pacientes), y durante un período de tiempo tres veces mayor *luego* de aplicada la intervención (22 meses; 148 pacientes), manteniendo *invariante* el contexto (recursos humanos, quirófanos, equipamiento, técnica quirúrgica, etc.).

Habiendo cumplido las condiciones del diseño, ⁽¹⁷⁾ podríamos revisar ahora si hemos observado los *supuestos* que aplican a los DCE (ver descripción en la **Introducción**; páginas 20,21 y 30-32).

El **primero** de ellos es contar con un *background* teórico suficiente para plantear –*plausiblemente*– la pregunta, la hipótesis, y la intervención propuesta; el **segundo**, conocer los eventuales confundidores de la relación evaluada; “hacerlos explícitos, medirlos y analizarlos” (ver **Resultados**. Pub #1, Tabla 1) proponiendo un diseño que permita testear la hipótesis y descartar explicaciones alternativas. ⁽¹⁷⁾ El requerimiento de una base conceptual y de recursos tan amplio y profundo, impone (e impuso) la conformación de un importante grupo interdisciplinario (ver grupo de trabajo [autores] en la Pub #1, pág. 54). ⁽⁶⁰⁾ Las referencias, incluidas en el presente trabajo de tesis, que incorporaron los supuestos **tercero** y **cuarto** (a los DCE más confiables o robustos, como lo es el utilizado en la Pub #1) se publicaron después de la realización de este estudio, ⁽³⁴⁾ por lo que serán discutidas con la Pub #3. Respecto a la valoración de los riesgos de sesgo, en **Métodos**, **Resultados** y en la **Discusión** del estudio, se consideró que: al *no participar* los investigadores en la selección de los participantes ni en la asignación de la intervención; al haberse incluido y participado *todos* los integrantes de ambas cohortes; al haber

¹³ En este ejemplo (como en *cualquier* caso) de **cohortes contiguas**, el Grupo Investigador que propone la intervención, *no participa* de la selección de los participantes (se incluye a *todos* los alumnos que pasan de grado); lo que ocurre por normas generales y del plan de educación vigente en escuela; *ni participa* en la asignación de la intervención, que ocurre por el inicio del año lectivo. Es decir la intervención se aplica en forma *independiente* de los investigadores, de los participantes y del resultado de interés.

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

completado el seguimiento y recibido la intervención *todos* los integrantes de la cohorte post-intervención; y, mostrando la Tabla 1 una aceptable cuasi-comparabilidad; el riesgo de sesgo (de selección, observación o explicaciones alternativas) sería bajo. ^(17, 33)

En resumen, luego de haber revisado el cumplimiento de los requerimientos del diseño, de los supuestos aplicables y valorados los riesgos de sesgo, ^(17, 33) podríamos concluir que los resultados obtenidos serían *válidos* y *-utilizando el modelo contrafáctico-* nos permitirían inferir que, utilizando la intervención aplicada en el presente estudio, no se repetirían *-en nuestra institución-* eventos de mucormicosis ósea post-RALCA (MOP_{RA}). Expresado matemáticamente:

$$MOP_{RA}^{a=1} \neq MOP_{RA}^{a=0}$$

En donde *RA* es un sujeto (*asumiendo* que se cumple con el supuesto SUTVA¹⁴, podemos aplicarlo a la población expuesta) ^(34, 36) que recibió una RALCA; y que, si recibe la intervención *a* (*a* = 1), su probabilidad de padecer MOP es diferente (\neq) a que si ese mismo sujeto (resultado potencial o contrafáctico) no recibiera la intervención *a* (*a* = 0). En el presente trabajo, se observa que la intervención (*a*=1) habría actuado sobre una variable explicativa (el vehículo) que mantendría una probable relación causal de tipo *determinista* con el resultado de interés, ya que post-intervención, la frecuencia del evento cayó a cero (0). Sabemos que en realidad no es así; ya que, como casi todas las relaciones causales en medicina, la evaluada en este estudio, seguramente es *probabilística*. Lo que ocurre, es que al tratarse de una enfermedad infecciosa específica (mucormicosis ósea post-RALCA por *Rhizopus microsporus*), tiene un **factor** (o condición) **necesario** (*R microsporus*); que al estar ausente porque el vehículo fue eliminado, el evento no se produce. Sin embargo, como en todas las mucormicosis, la sola presencia del hongo no alcanza para producir el evento clínico; se requiere de factores ambientales propicios y huéspedes susceptibles para que el evento ocurra (conjunto causal suficiente). ^(5, 9)

Respecto de la **publicación #2**, ⁽⁶¹⁾ corresponde hacer una breve consideración. El término validez (de un estudio o de un resultado), en epidemiología y en investigación básica, tienen (finalmente) un significado común; pero operativamente, aparentan cierta variación. En epidemiología, se considera que un estudio es válido si ha logrado la mejor aproximación a la verdad en los resultados obtenidos. ⁽³²⁾ En investigación, predomina (operativamente) el concepto que la validez tiene que ver con que si el instrumento está midiendo lo que pretende medir. ⁽⁸⁴⁾ Por su parte, en investigación básica, se agregan los conceptos de precisión (cuando el instrumento o el método reitera el resultado en las mismas condiciones), reproducibilidad (cuando otros

¹⁴ *Stable unit treatment value assumption*: El valor del resultado para cada unidad expuesta al tratamiento es el mismo, sin considerar el modo de asignación e independiente del tratamiento de las otras unidades.

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

investigadores logran reiterar el resultado), consistencia (cuando con metodologías distintas, que miden similares fenómenos, se alcanzan los mismos resultados) y, finalmente, exactitud (sería la capacidad de un instrumento de medir el valor real o verdadero).

Hacemos esta breve introducción porque la Pub #2 es un trabajo de investigación básica, y en el mismo, todos estos términos asociados a validez toman relevancia. El trabajo se ha realizado con la *necesaria e inestimable* participación del Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular, dependiente del CONICET, y de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL, Santa Fe, Argentina); atendiendo que resultaba *imprescindible* para la evaluación epidemiológica del brote de mucormicosis ósea que ocurrió en nuestra institución, desde fines de 2010 hasta mediados de 2011. Como bien destacan Reingold ⁽⁴¹⁾ y Mortimer ⁽⁴²⁾; desentrañar el camino del origen y la transmisión del germen en un brote “es dificultoso; siendo a veces necesario generar *múltiples* estudios e hipótesis intermedias, antes de conformar la hipótesis final y poder testearla”; ⁽⁴¹⁾ y que “los avances en estudios de huellas genéticas (*fingerprinting*) se han transformado en una de las *herramientas más importantes* para resolver brotes y representan la principal contribución que el laboratorio puede hacer en este campo”. ⁽⁴²⁾

Yendo al trabajo en cuestión, consideramos que es *válido* en cuanto que los instrumentos utilizados (RAPD y MALDI-TOF) para estudiar la relación genética y proteómica de las cepas de hongos son adecuados a esos fines, particularmente, en los años en que se realizaron los estudios. También podemos expresar que sus resultados son *precisos* y *consistentes*, tal como puede apreciarse en los **Resultados** de la Pub #2 (Figura 1). ⁽⁶¹⁾ En resumen, los resultados validan los hallazgos de relación genética que se aprecian en el dendrograma (Figura 1) de la Pub #1, sosteniendo la probabilidad que estamos ante un brote con **fuentes común extra-hospitalaria**. ^(60, 61)

La **Pub #3**, ⁽⁶²⁾ utiliza un DCE antes-después de cohortes contiguas, ⁽¹⁷⁾ por lo que todas las consideraciones sobre las condiciones del diseño realizadas en la *discusión* de la **validez** de la **Pub #1** (al igual que las notas al pie N 13 y N 14) comentadas en las págs. 71 y 73, aplican aquí y no las reiteraremos.

En el presente estudio, ⁽⁶²⁾ lo hemos aplicado al Servicio de Trasplante Renal de nuestra Institución e incluimos *todos* los pacientes trasplantados durante el brote (10 meses; 16 pacientes) y durante un período de tiempo tres veces mayor *luego* de aplicada la intervención (30 meses; 49 pacientes), manteniendo *invariante* el contexto (recursos humanos, quirófanos, equipamiento, técnica quirúrgica, etc.). Habiendo cumplido las condiciones del diseño y realizado

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

las mediciones de las características de ambas cohortes, (ver **Resultados**. Pub #3, Tabla 1) podríamos revisar ahora si hemos observado los *supuestos* que aplican a los DCE (ver descripción en la **Introducción**; páginas 20, 21 y 30-32).

El **primero** de ellos es contar con un *background* teórico suficiente para plantear *-plausiblemente-* la pregunta, la hipótesis, y la intervención propuesta. ⁽¹⁷⁾ Para atender los requerimientos de este supuesto se efectuaron búsquedas bibliográficas y se conformó un grupo interdisciplinario con integrantes que conocen y trabajan en los ítems involucrados (ver autores de la Pub #3, pág. 63); el **segundo**, conocer los eventuales confundidores de la relación evaluada, “hacerlos explícitos, medirlos y analizarlos” (ver **Resultados**. Pub #3, Tabla 1), proponiendo un diseño que permita testear la hipótesis y descartar explicaciones alternativas. ⁽¹⁷⁾ El **tercero**, es que la determinación de *asignación* de la intervención sea ‘*exógena*’ al modelo evaluado (que es la relación entre la variable explicativa propuesta y el *outcome* de interés). Esta *exogenidad* hace *-al método de asignación-* (que en este caso se comporta como una **variable instrumental**) completamente *independiente* del resultado de interés. ^(19, 34) El **cuarto** supuesto es que esa *independencia* aplique también a los confundidores conocidos (observables) y no conocidos (no-observables) de la relación causal en estudio¹⁵. ^(19, 34, 36)

Resulta particularmente interesante, a la luz de la reunión de Boston y sus publicaciones, ⁽¹⁹⁾ que el diseño de cohortes contiguas, al cual ya Cook y Campbell ⁽¹⁷⁾ clasificaban dentro de los más ‘robustos e interpretables’, puede presentar (y así ocurre en nuestras Publicaciones #1 y #3), componentes de ‘variables instrumentales’, ‘experimentos naturales’ y ‘efectos fijos’; ^(34, 36, 85) todo lo cual *incrementa* su validez y uso para efectuar inferencias causales (incluso probabilísticas). ^(36, 85) Respecto a la valoración de los riesgos de sesgo, ^(17, 33) en **Métodos**, **Resultados** y en la **Discusión** del estudio, se consideró que: al *no participar* los investigadores en la selección de los participantes, ni en la asignación de la intervención; ⁽³⁶⁾ al haberse incluido y participado *todos* los integrantes de ambas cohortes; que todos los integrantes de la cohorte post-intervención hayan *completado* el seguimiento y recibido la intervención; y, mostrando la Tabla 1 una aceptable *cuasi-comparabilidad*; el riesgo de sesgo (de selección, observación o explicaciones alternativas) sería bajo.

¹⁵ La determinación de la asignación (de la intervención) a la cohorte post-intervención, tanto en la Publicación #1, como en la Publicación #3; vino determinada por la **fecha de implementación de Normas de Calidad** de la institución, que operan como ‘**variables instrumentales**’. ⁽³⁴⁾ Esto, permite cumplir con los supuestos tercero y cuarto; al hacer que la asignación de la intervención sea ‘**exógena**’; es decir, *independiente* del *outcome* de interés y de las variables confundidoras. En términos de análisis de regresión, la exogenidad, implica que el *instrumento*, no correlaciona con el término error (ϵ) de la ecuación. ^(34, 36)

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

En resumen, luego de haber revisado el cumplimiento de los requerimientos del diseño y de los supuestos aplicables, y definido el riesgo de sesgo como bajo, podríamos concluir que los resultados obtenidos serían *válidos* y permitirían inferir -utilizando el modelo contrafáctico- que, utilizando la intervención propuesta en el presente estudio *-en nuestra institución-* no se repetirían eventos de mucormicosis cutánea post-trasplante renal (PK-CM). Expresado matemáticamente:

$$PK-CM_{TR}^{a=1} \neq PK-CM_{TR}^{a=0}$$

En donde, TR es un sujeto (en este caso podemos asumir que se trata de un grupo de sujetos) que recibió un trasplante renal; y que, si recibe la intervención a ($a = 1$), su probabilidad de padecer PK-CM es diferente (\neq) a que si ese mismo sujeto (resultado potencial o contrafáctico) no recibiera la intervención a ($a = 0$). En el presente trabajo, pareciera que la intervención hubiera actuado sobre una relación causal *determinista*, ya que el resultado fue que la frecuencia del evento post-intervención cae a cero (0). Pero no es así, como casi todas las relaciones causales en medicina, la evaluada en este estudio es *probabilística*. Lo que ocurre, es que se trata de una enfermedad infecciosa específica (mucormicosis cutánea por *Rhizopus microsporus*) y tiene un **factor** (o condición) **necesario** (*R. microsporus*), que al estar ausente porque el vehículo fue eliminado, el evento no se produce. Sin embargo, como en todas las mucormicosis, la sola presencia del hongo, no alcanza para producir el evento clínico; se requiere de factores ambientales propicios y huéspedes susceptibles para que el evento ocurra (conjunto causal suficiente).^(5,9)

6.2.2. Utilidad y limitaciones de inferencias causales válidas, obtenidas con cuasi-experimentales en la práctica médica

Antes de analizar estos aspectos, debemos precisar que, en general, en los DCE (como habitualmente evalúan *procesos* de mejoras en la práctica médica) interesa precisar cuántos de los enrolados iniciaron y cumplieron la intervención; es decir, evaluar el 'efecto por protocolo'.⁽³³⁾ De tal manera que, si bien la aplicabilidad de sus hallazgos al provenir de la práctica (*mundo real*) es mayor a la de un ECA, debe aclararse que, habitualmente, se reportan sus resultados como efectos *locales* en los *cumplidores* de la intervención (efectos denominados CACE o LATE¹⁶).⁽³⁴⁾ La aplicabilidad de los resultados se valida con la reproducibilidad de los efectos en otros Servicios u Hospitales.⁽³⁴⁾ En otras palabras, primero evaluaremos la utilidad *local* de los resultados y luego su probable *aplicabilidad*.

¹⁶ Por sus siglas en inglés; CACE: *complier average causal effect*; LATE: *local average treatment effect*

En nuestro hospital

Las **tres publicaciones incorporadas a la presente tesis** ⁽⁶⁰⁻⁶²⁾ destacan la relevante utilidad que pueden tener en el *‘mundo real’* los DCE. En este caso, (contexto local) en una institución privada de una provincia argentina, con 70 camas, en la que se realizan más de 400 cirugías al mes, de alta complejidad y de referencia para la región (se desarrollan todas las especialidades, prácticas diagnóstico-terapéuticas intervencionistas [cardiovasculares, neurológicas, renales, etc.], cirugía cardiovascular, neurocirugía y trasplante renal), ocurrieron en el plazo de un año dos brotes de mucormicosis, uno cutáneo en trasplantados renales (TR) y otro óseo, luego de RALCA.

Los desafíos eran concretos y perentorios: identificar las causas que producían los brotes y realizar las intervenciones necesarias para controlarlos.

Desde fines de 2010 hasta mediados de 2011 (problema 1), tuvimos 3 casos de mucormicosis óseas en huéspedes jóvenes (por lo demás sanos) inmunocompetentes que habían recibido RALCA. ⁽⁶⁰⁾ En realidad, pertenecían a una población más amplia (contexto general), de unos 40 casos, de jóvenes sanos (muchos deportistas) que padecieron mucormicosis ósea post-RALCA en nuestro país entre 2005 y 2015 (en unas 12 provincias argentinas). ⁽⁸⁶⁾

También en nuestra Institución, y en un período con cierto solapamiento (problema 2), que se extendió desde mediados de 2010, hasta comienzos de 2011; dentro de la población de trasplantados renales (huéspedes inmunosuprimidos y con mucha co-morbilidad), tuvimos 4 casos de mucormicosis cutánea post-trasplante, de los cuales dos fallecieron. ⁽⁶²⁾

Para atender los problemas comentados, consultamos a expertos del Comité de Control de Infecciones del Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA), que no solo es una de las Instituciones más importantes del país, sino que tenía experiencia específica en los dos cuadros. La mucormicosis ósea post-RALCA había comenzado a verse en Argentina en el 2005 y muchos casos habían sido derivados al HIBA (a la sazón, contaban con experiencia sobre unos 10 casos, de los cuales habían publicado una serie de 5); ⁽⁸⁷⁾ por otro lado, como centro de trasplantes de referencia, tienen una dilatada experiencia con infecciones en inmunosuprimidos, entre ellas, las formas convencionales de mucormicosis (rino-cerebral, pulmonar, cutánea, etc.). Luego de una evaluación inicial, y de algunos viajes de ellos a nuestra Institución y de nosotros al HIBA, se concluyó (utilizando los criterios básicos de epidemiología descriptiva de: *persona, tiempo y lugar*; y la definición de *caso*), ^(41, 42) que estábamos en presencia de dos brotes distintos. Uno, que involucraba a pacientes trasplantados renales, más añosos e inmunosuprimidos, que eran huéspedes esperables de mucormicosis y con una forma clínica descrita en esa población, que

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

es la mucormicosis cutánea. ⁽⁸⁸⁻⁹²⁾ El otro, involucraba a jóvenes, sanos (muchos deportistas), inmunocompetentes, que no resultaban pacientes esperables para mucormicosis y que presentaban una forma clínica sumamente infrecuente (solo reportada como *brote* en Argentina); ⁽⁹³⁾ se trataba de una osteomielitis que rodeaba el tornillo de fijación, involucraba *uno solo* de los huesos, respetando los tejidos blandos y el espacio articular. Este cuadro se repetía tanto en los casos del HIBA, como en los nuestros. ^(60, 67)

Conformamos en el Sanatorio dos grupos de trabajo, uno para los pacientes renales y otro para los casos post-RALCA. Incorporamos a todas las especialidades involucradas de nuestra Institución y a especialistas básicos: -al grupo de Micología de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL (investigadores de carrera del CONICET); y (en el grupo de RALCA), - a ingenieros de la Universidad Tecnológica (Laboratorio de Materiales y Metalografía) para las evaluaciones de los tornillos. En pocas semanas, luego de revisiones bibliográficas, una investigación epidemiológica exhaustiva, relevamientos ambientales, estudios micológicos y de los materiales utilizados en ambas cirugías, se concluyó en cuales eran las hipótesis más probables, decidiéndose las intervenciones y los diseños epidemiológicos para testear las mismas. Como aquí se presenta (**Pub #1 y Pub #3**), ^(60, 62) los diseños fueron cohortes contiguas, ⁽¹⁷⁾ y se incluyó como un componente ineludible (para procurar la identificación de la fuente o del modo de transmisión), ^(41, 42, 72) un estudio de investigación básica (de *validación* genética y proteómica de los *R. microsporus*), presentado como **Pub #2**. ⁽⁶¹⁾

El control de brotes de infecciones micóticas de extrema gravedad, el testeo de las hipótesis y nuevos conocimientos prácticos y útiles, resultaron parte del aporte *—en la práctica médica diaria—* de *inferencias causales válidas* obtenidas con el uso de DCE. Además, se produjeron cambios culturales importantes: a partir de los trabajos incluidos en la presente tesis, las cirugías traumatológicas *solo* se realizan con implantes que provienen de nuestra Farmacia, con una constancia de auditoría firmada; y con instrumental que proviene de nuestra Central de Esterilización con su correspondiente rótulo¹⁷. Por su parte, las curaciones post-quirúrgicas inmediatas de los trasplantes renales, *solo* se realizan con fajas lavadas y *autoclavadas* en la Central de Esterilización de la institución.

En pocas palabras, en los últimos diez años, no se han producido casos de mucormicosis en

¹⁷ En Argentina (y otros países de la región), los financiadores (Seguro de Salud), contratan los proveedores de implantes, que entregan el material requerido *directamente* en quirófano (*sin* la correspondiente auditoría farmacéutica institucional). Esta práctica *—que es común—* permite que ocasionalmente (como se aprecia en la Publicación #1) los implantes provistos **NO** sean de curso legal, generando riesgo a los pacientes. ⁽⁶⁴⁾

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

nuestra institución; y lo aprendido con el control de estos brotes se ha utilizado en la mejora del control de infecciones post-quirúrgicas comunes. Entendemos que la prueba del tiempo le da solidez a las *inferencias causales* realizadas en su momento, testeadas y validadas por DCE.

En el contexto asistencial externo a nuestra institución. Aplicabilidad

Como ya comentamos, en Argentina se observó un brote de unos 40 casos (reportados) de mucormicosis ósea post-RALCA entre 2005 y 2015. ⁽⁸⁶⁾ Durante esa década –*de manera por momentos ‘sonora’ y por momentos ‘sorda’*– el tema estuvo presente en la comunidad médica (particularmente entre artroscopistas e infectólogos), en los pacientes afectos de rotura ligamentaria, en los proveedores de materiales para RALCA y en los financiadores (en Argentina: Obras Sociales/ Seguros de Salud). Por nuestra parte, luego de controlar el brote institucional (reportado en la **Pub #1**), ⁽⁶⁰⁾ comunicamos los hallazgos del estudio en un Simposio que se realizó en Paraná, en Octubre de 2013, organizado por la Sociedad Argentina de Artroscopía y la Sociedad Entrerriana de Traumatología; ⁽⁹⁴⁾ y al año siguiente, en el Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología (SADI 2014). Desde esa época, se generaron dos vertientes sobre el tema; los que consideraban que ‘dadas las características *ubicuas* del hongo’, el paciente ‘lo contrae de alguna forma del ambiente’ del Hospital, particularmente ‘del área quirúrgica’; es decir, se trataría de una **infección de origen ambiental intra-hospitalaria**. ⁽⁸⁶⁾ Por el contrario, la otra vertiente (entre la que está nuestro grupo) sostiene que el hongo es *inoculado en forma directa* en la profundidad del hueso, por un elemento de uso exclusivo en RALCA, con capacidad para inocular un solo hueso, sin comprometer las partes blandas, ni el espacio articular. ⁽⁶⁰⁾ Nuestro grupo sostiene, además, que ese elemento es el tornillo de fijación, que juega el rol de *vehículo* que se ha contaminado en una **fuentes común extra-hospitalaria** (probablemente en el aceite de mecanizado), ^(66, 72) que luego es mal lavado y/o mal esterilizado y *distribuido* a todo el país. Recordemos que el brote involucró a instituciones separadas por distancias que superan los 500 e incluso los 1.000 Km, radicadas en no menos de 12 provincias. Nuestra posición (o hipótesis) se sostiene por los siguientes criterios, principiando por el sentido común, como recomiendan Cook y Campbell: ⁽¹⁷⁾

1. Cómo se explicaría que en **12 provincias argentinas**, en las *mismas* instituciones y quirófanos en las que ocurrieron casos de mucormicosis post-RALCA durante *diez años* (quirófanos y período en los que su vez, se realizaron *miles* de implantes distintos a RALCA [cadera, rodilla, osteosíntesis de todo tipo, etc.]), si el modo de transmisión fuera ‘de alguna manera desde el ambiente del quirófano’, ese evento (mucormicosis ósea post-implante) *solo* se viera post-RALCA (que son pacientes jóvenes, inmunocompetentes y por lo demás sanos) y no en diabéticos, inmunosuprimidos, oncológicos, etc., que son aquellos en los que se podría esperar que contraigan mucormicosis.

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

2. Si la fuente fuera la contaminación ambiental intra-hospitalaria (esporas en circuitos de aire acondicionado, en el polvo de algún equipo dentro del quirófano, etc.), cómo se explicaría que en todos los casos de RALCA reportados, el hongo infectó **un solo hueso**, rodeando el tornillo de fijación (respetando las partes blandas y el espacio articular).
3. Luego, tenemos evidencia técnico-legal: una inspección formal de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) demostró que dos de los tres tornillos tenían origen incierto (Rótulo falso), por lo que los calificó de ilegales.⁽⁶⁴⁾ Una evaluación técnica de la Universidad Tecnológica demostró que los tornillos de los tres casos tenían suficientes defectos de mecanizado como para retener aceite de mecanizado en 'rebabas' y 'dobleses', lo que impide un buen lavado, dificultando claramente la esterilización, en particular si es a baja temperatura (ej. óxido de etileno).^(65, 66)
4. Finalmente, la **Publicación #1**. Con un diseño cuasi-experimental formal y robusto (cohortes contiguas),⁽¹⁷⁾ aplicando una intervención efectiva que aseguró la llegada a quirófano de implantes (tornillos de fijación) originales, esterilizados en Fábrica (que cumplían Normas ANMAT), e instrumental lavado y esterilizado en nuestra Central de Esterilización, mostró que la frecuencia de mucormicosis cayó de 9,4% a 0 en forma brusca (efecto de tipo '*determinista*'), habiendo mantenido '*invariante*' el contexto.⁽⁶⁰⁾

La **Publicación #1**,⁽⁶⁰⁾ tuvo un destacable impacto en la literatura médica.^(62, 86, 95-98) Algunas citas son *técnicas*, como el caso de nuestra publicación #3,⁽⁶²⁾ que la cita porque toma aspectos metodológicos, operativos o analíticos. Otras, son *casuísticas*; es decir, publican sobre mucormicosis, y citan otros trabajos que publican sobre el mismo tema.⁽⁹⁸⁾ También, en el contexto de estudios epidemiológicos, citan el brote publicado por nosotros;⁽⁹⁵⁾ o, en un reporte de casos de una osteomielitis post-implante por gérmenes poco frecuentes, recomiendan estar advertidos sobre "la posibilidad de infección osteoarticular con organismos *atípicos* durante el posoperatorio (particularmente en las cirugías con implantes)" y nos citan por ese motivo.⁽⁹⁶⁾ Finalmente, algunas publicaciones hacen citas específicas, porque están trabajando en el mismo tema que nosotros; como es el caso de un estudio liderado por la Asociación Argentina de Artroscopía (AAA).⁽⁸⁶⁾ Si bien esta entidad defiende la hipótesis '**intra-nosocomial**', reconoce en este reporte la **validez** de la *clonalidad* de nuestros casos; aspecto que fue **ratificada** por ellos mismos, en un *análisis de tipificación de genoma total (WGST)*, realizado en el Laboratorio del CDC (USA).⁽⁹⁹⁾ Aunque reconocen la clonalidad de nuestros casos, ratifican su postura, sugiriendo que podría no indicar fuente común extra-hospitalaria; por lo que en este aspecto la controversia sigue vigente. Sin embargo, lo más relevante de esta publicación, es que *recomienda* (más allá de su posición) que debería "realizarse una segunda limpieza y una segunda esterilización del instrumental, en la institución"; y que, "solo deben utilizarse implantes de fijación que cumplan con normas de trazabilidad, controlar fecha de vencimiento de la esterilización y que el envase esté intacto".⁽⁸⁶⁾ Estas dos acciones son el **centro de nuestra intervención** con la que se controló

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

el brote en nuestro Hospital; ⁽⁶⁰⁾ pero ahora, además de nosotros, lo recomienda la AAA en una publicación con investigadores del CDC (USA). ⁽⁸⁶⁾ El cambio cultural sobre las condiciones que deben cumplir, tanto el instrumental como el implante en una cirugía de RALCA, ha comenzado a expandirse, al contar ahora con una recomendación formal, publicada por la Sociedad que nuclea a todos los artroscopistas de Argentina. ⁽⁸⁶⁾

Otra cita particularmente relevante fue en una **Guía para investigar brotes de Mucormicosis en el ámbito Hospitalario** del CDC (USA). ⁽⁹⁷⁾ Nos citan en distintas partes del trabajo; por ejemplo: “Los dispositivos médicos que no hayan sido suficientemente esterilizados, pueden estar contaminados con esporas. Un hospital puso fin a un brote de tres pacientes de mucormicosis ósea posoperatoria, después de mejorar la esterilización de los tornillos utilizados en la reconstrucción de ligamentos”. ⁽⁹⁷⁾ También, “Los análisis epidemiológicos, aunque no son necesarios en todas las investigaciones, pueden aumentar el peso de la evidencia sobre las exposiciones que aumentan el riesgo del paciente e informar las recomendaciones para la atención del paciente.” ⁽⁹⁷⁾ “Un estudio de cohortes, que evaluó el riesgo de mucormicosis ósea posoperatoria entre pacientes con cirugía reconstructiva de ligamentos, encontró tasas más bajas entre los que se sometieron a una cirugía realizada *después* de implementar una política de esterilización del dispositivo, que entre los que se sometieron al procedimiento *antes* del cambio.” ⁽⁹⁷⁾ Finaliza la discusión de este trabajo, destacándose que, “los esfuerzos continuos para comprender las fuentes del hongo que causa mucormicosis en la atención médica, ayudarán a prevenir infecciones futuras y protegerán a los pacientes vulnerables”. ⁽⁹⁷⁾ En resumen, las *recomendaciones* que surgen de nuestra **Publicación #1**, ⁽⁶⁰⁾ han mostrado *impacto* en instituciones líderes, tanto en nuestro país como a nivel internacional, lo que augura buenas posibilidades de aplicabilidad de las mismas. De hecho, en nuestro país, si se observa la serie temporal presentada en la publicación de la AAA, puede apreciarse que después de 2013 y de 2016, la curva cae progresivamente y hace tres años que no se reportan casos. ⁽⁸⁶⁾ Hoy en Argentina, los tornillos (o cualquier elemento de fijación) para RALCA, se distribuyen (en general) en envase individual, con rótulo por envase en el que constan todos los datos de calidad y seguridad del producto, incluyendo que está esterilizado en origen. Hasta el año 2011, como lo demostró ANMAT, esta no era la situación en Argentina. ⁽⁶⁴⁾

La **Publicación #2**, ⁽⁶¹⁾ también tuvo un impacto relevante. ^(62, 99-102, 104) Algunas citas son *técnicas*, porque toman aspectos metodológicos, operativos o analíticos. ^(62, 100) Otras, son *casuísticas*; por ejemplo, dos estudios epidemiológicos sobre mucormicosis. ^(101, 102) Uno de ellos resulta interesante, porque clasifica las formas clínicas de mucormicosis y la osteomielitis post-

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

operatoria, se ubica dentro de un **grupo poco frecuente** (o raro).⁽¹⁰²⁾ También se han hecho citas específicas de grupos que están trabajando en el mismo tema. Uno de ellos, es el trabajo del CDC,⁽⁹⁹⁾ al cual se refirió (trabajo conjunto) la AAA en su publicación.⁽⁸⁶⁾ En la ‘Discusión’, el CDC comienza expresando “la diversidad genómica (usando WGS¹⁸) entre los aislamientos del grupo argentino de infecciones por *R. microsporus* no es consistente con un brote de fuente puntual¹⁹”;⁽⁹⁹⁾ para aclarar, “sin embargo, nuestros datos *no descartan* la posibilidad de una *fuerza común* porque diferentes cepas o incluso especies pueden provenir de una *fuerza común*”.^(99, 103) Continúa: “sobre la base de brotes con datos epidemiológicos sólidos que implican una *fuerza común*, evaluados con WGS; los aislados que difieren en <10 SNP²⁰, se consideran casi idénticos y se originan en la misma fuente”.⁽⁹⁹⁾ Continúa: “un par de aislamientos (**B11529 y B11543**) fuera del *clado* (rama ‘familiar’) del grupo mayor, resultaron separados por 6 SNP y fueron recolectados de 2 pacientes de la misma institución, cuyas cirugías fueron separadas por 3 semanas. Este bajo número de SNP es característico de la transmisión directa o indirecta reciente desde una *fuerza común*” y aclara: “como la infección por *Rhizopus spp* **no es contagiosa** (persona/persona), la transmisión probablemente ocurrió a través de equipamiento contaminado o de la *misma* fuente ambiental”.⁽⁹⁹⁾

Los aislamientos **B11529 y B11543** de la publicación del CDC,⁽⁹⁹⁾ son dos de los 3 casos de mucormicosis post-RALCA de nuestro Hospital, que reportamos en la Fig.1 de la **Publicación #1** y en la Fig. 1 de la **Publicación #2** (Dendrogramas).^(60, 61) Más aún, en el mismo árbol filogenético que informa el CDC,⁽⁹⁹⁾ están los aislados **B11539 y B11552** (mucormicosis cutáneas de trasplantes renales) y **B11549** (superficie ambiental); pero **no** se trata de un reporte completo²¹. En resumen, la relación de parentesco reportada por el CDC en el árbol filogenético generado por metodología WGS⁽⁹⁹⁾ sobre las cepas de *R. Microsporus* aisladas de nuestro Hospital, resulta *consistente* con la reportada por nosotros y confirma la *validación* genética y proteómica realizada en nuestra **Publicación #2**;⁽⁶¹⁾ así:

1. En el dendrograma de la **Publicación #1**, se agrupan como idénticos (o muy cercanos) los aislados de los casos post-RALCA; y, completamente separados de los aislados ambientales y

¹⁸ Del inglés: Whole Genome Sequencing.

¹⁹ Para el CDC, ‘**brote de fuerza puntual**’ implica “que *todos* los casos se producen *dentro* de un período de incubación”; por lo que compartimos que para el brote de Argentina (duró 10 años) y de nuestra Institución (7 meses), solo aplicaría ser ‘**fuerza común**’. <https://www.cdc.gov/csels/dsepd/ss1978/lesson1/section11.html>

²⁰ Del inglés: Single-Nucleotide Polymorphism.

²¹ **Datos parciales:** en el estudio del CDC,⁽⁹⁹⁾ **no están** todos los aislados del país; ni de nuestra Institución. Aunque el trabajo de la AAA (que reporta los 40 casos),⁽⁸⁶⁾ pareciera enviar el total. “Quinto paso: todos los aislados se remitieron para el estudio genómico al CDC”. Al revisar en detalle, el CDC recibió 24 aislados. Sin embargo en su Tabla, solo hay 10 que corresponden a osteomielitis post-RALCA y en el árbol filogenético solo 9.⁽⁹⁹⁾ Es decir, aproximadamente un 20% del brote de osteomielitis post-RALCA de Argentina.

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

los de las mucormicosis cutáneas. ⁽⁶⁰⁾ Lo mismo se aprecia en el dendrograma de la **Publicación #2**. ⁽⁶¹⁾

2. En el dendrograma de la **Publicación #3**, se aprecia que el caso 4 (cutáneo post-TR, 2011), se agrupa completamente separado del caso post-RALCA (bone infection) y de los tres casos cutáneos del 2010. ⁽⁶²⁾

Finalmente, un grupo alemán, de relevante trayectoria en micología, también cita nuestra **Publicación #2** en varios aspectos. ⁽¹⁰⁴⁾ Por un lado, y respecto al mecanismo de ocurrencia de nuestro brote, acuerda que “los tornillos de fijación fueron muy sospechosos porque en los tres casos solo se vio afectada la fracción ósea que rodea a uno de los tornillos de fijación”; y que “hasta 2011, más de 30 casos similares habían ocurrido en diez provincias argentinas diferentes, destacando un probable problema general en la esterilidad de los dispositivos utilizados en esta cirugía”. ⁽¹⁰⁴⁾ También cita nuestro trabajo desde el punto de vista técnico, cuando expresa “las publicaciones sobre sub-tipificación en Mucorales son pocas. Sin embargo, *R. microsporus* fue tipificada con éxito por RAPD usando los cebadores oligonucleotídicos (GACA-4, M-13 y OPC-05) y MALDI-TOF”. ⁽¹⁰⁴⁾ También acuerda en algunos conceptos con el CDC, ⁽⁹⁹⁾ respecto que, “los brotes de Mucorales pueden ser causados por cepas únicas pero también por varias cepas de la misma especie o incluso por diferentes especies si la fuente es heterogénea”; y que “una parte húmeda de una pared puede provocar el crecimiento de varias cepas o especies y, por lo tanto, no se debe excluir un brote si las cepas detectadas no están relacionadas genéticamente”; y concluye, “las fuentes de los brotes de mucorales pueden ser heterogéneas y comprender varias cepas o incluso especies. Por lo tanto, la participación de diferentes cepas o especies **no excluye** un brote y **tampoco excluye** una *fuentes común*”. ⁽¹⁰⁴⁾

Respecto a la **Publicación #3**, ⁽⁶²⁾ si la medimos en términos de citas bibliográficas habría tenido poco impacto a la fecha; pero debemos considerar que es una publicación del año 2020 (además de ser muy reciente; el último año ha sido muy dominado por la pandemia). No obstante, (de alguna manera) la podemos valorar en sentido inverso. Párrafos más arriba, cuando iniciábamos el Título de *utilidad y limitaciones* de las inferencias causales válidas obtenidas con DCE (ítem 6.2.2.), destacábamos que la aplicabilidad de estas inferencias mejora con la consistencia y reproducibilidad de los hallazgos que las sustentan (es decir, observaciones consistentes realizadas por distintos grupos, Servicios u Hospitales).

En este caso (mucormicosis cutánea producida por un *vehículo* contaminado), mostramos el rol que habrían jugado en nuestro brote, las bandas elásticas no-estériles que se utilizaban para sostener apósitos estériles en el post-operatorio inmediato de TR. ⁽⁶²⁾ Virtualmente lo mismo

(respecto al rol del *vehículo* contaminado en mucormicosis cutánea), lo han comunicado tres grupos en los últimos años; ^(78, 82, 83) y dos de ellos, (jerarquizando el implante directo desde un *vehículo* contaminado) recomiendan *–al igual que nuestro trabajo–* el uso de **fajas y sábanas estériles**, para grupos de riesgo de mucormicosis cutánea (inmunosuprimidos, grandes quemados, etc.). ^(82,83)

6.2.3. Reflexiones sobre las dificultades en la evaluación de los estudios primarios y de las revisiones sistemáticas que utilizan diseños cuasi- experimentales

En los últimos veinte años he trabajado con ECE/DCE, y en los inicios de dicho período, (lógicamente) no sabía que se llamaban así y tampoco conocía todo lo escrito sobre ellos. ^(20, 21)

Hace poco más de doce años (2008), en oportunidad de estar haciendo una rotación en el Servicio de Epidemiología del Hospital Sant Pau de Barcelona, buscaba bibliografía para defender estudios que pretendía incorporar a una revisión sistemática (debían cumplir con los criterios de inclusión y con los criterios de calidad [*quality ítems*] incluidos en el protocolo). La búsqueda bibliográfica no había arrojado ECAs y los no-aleatorizados que parecían aplicar, no resultaba fácil defenderlos (o defender la evidencia que de ellos se desprendía) a la luz de los preceptos o conceptos *habituales*²². Ocurría que en nefrología, y particularmente en diálisis, en aquella época, había muy poca evidencia que proviniera de ensayos randomizados. En mi tema, que era “tratamiento de agua para diálisis”, los ECA eran *casí* de existencia imposible, por dos aspectos: (i) las unidades de diálisis de pacientes crónicos tienen, en general, **una sola planta** de tratamiento de agua por Servicio, de tal manera que resulta imposible *asignar* un paciente a un tipo de tratamiento de agua (a) y otro paciente a un tipo de tratamiento de agua (b); y, (ii) ya por entonces, se ‘sabía’ algo bastante lógico: que cuanto mejor la calidad del agua para diálisis, mejor la calidad del líquido de diálisis y mejor la evolución del paciente; de tal manera que **no resultaba ético** asignar pacientes a un tratamiento de agua (a) de mejor calidad; o a un tratamiento (b) de menor calidad.

Aquí aparecen solo dos, de todos los problemas que impiden aleatorizar la asignación de un tratamiento en la práctica médica (limitaciones prácticas o éticas); hay muchos más. Es muy difícil aleatorizar en una guardia de emergencias o en una sala de clínica médica. Resulta casi imposible cuando se va realizar un ciclo de mejoras en cualquier servicio de un hospital (porque son intervenciones complejas para *mejorar* la calidad o seguridad de una prestación).

²² Se trataba de pocos casos de diseños cuasi-experimentales; ya que eran estudios ‘antes-después controlados’ y ‘series temporales interrumpidas’.

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

En eso estaba en el 2008, cuando entre los trabajos de bibliografía que había solicitado, recibí una copia de un libro (creía cuando lo solicité que era un artículo), cuyo título (y la magnitud de la obra) eran impactantes: “Cuasi-experimentación: Problemas de diseño y de análisis en el terreno”.⁽²⁰⁾ Era el primer libro de Cook y Campbell, publicado en 1979. A poco que comencé a leerlo, observé que publicaban artículos sobre el tema desde la década del '50. En la medida que avanzaba en su lectura, apreciaba la utilidad que tenía para quien quisiera investigar e *inferir* ‘en el terreno’; en nuestro caso, en la ‘práctica médica’. Pero había un problema con el libro; resultaba de difícil lectura para un médico, por la falta de formación en epidemiología y en estadística (cuya base es la matemática). Como ya comentamos, recientemente, Bärnighausen y col.⁽³⁴⁾ han destacado que las *dificultades* en la comprensión y el uso de los DCE, se deben a que “estos contenidos **no se enseñan** en las escuelas de medicina, ni de epidemiología; **ni figuran** en los libros de epidemiología”. Este desconocimiento en la comunidad médica sobre los DCE trae aparejados dos problemas: (i) la muy baja producción de estudios primarios con DCE; (ii) las dificultades en las evaluaciones de revisiones sistemáticas que utilizan DCE; ya que existen preconceptos respecto al bajo riesgo de sesgo de los ECA y al alto riesgo de sesgo de los no-randomizados (entre los que están los ‘desconocidos’ DCE).

En las precitadas Jornadas de la Escuela de Salud Pública de Harvard de 2017 sobre cuasi-experimentales, se destacó la *necesidad* de generar y difundir fuertemente el conocimiento sobre DCE.⁽¹⁹⁾ Esto permitiría, tanto realizar estudios primarios con DCE, como evaluarlos adecuadamente para su inclusión en revisiones sistemáticas.⁽³⁴⁾ Plantean un plan de trabajo *formal* sumamente ambicioso, de 12 puntos, para poner los DCE ‘en carrera’ y transformarlos en la herramienta de epidemiología clínica que deberían ser.⁽¹⁹⁾ Entre los mismos destacan: incorporarlos a los planes de estudio de grado y de post-grado; generar guías tanto para la producción de estudios primarios, como para incluirlos en revisiones sistemáticas; desarrollo de herramientas para evaluar riesgos de sesgos; financiamiento específico a estos fines, etc.

Más allá de los trabajos iniciales de Cook y Campbell^(20, 21) y el relanzamiento de Boston,⁽¹⁹⁾ la situación actual sobre el tema de los DCE sigue siendo de falta de conocimiento, lo que mantiene la baja producción de estudios primarios con estos diseños; y las muy serias dificultades para incorporarlos a revisiones sistemáticas.

Hemos tenido la experiencia que cuando se los envía a publicación, los revisores tienen cierta tendencia a rechazarlos, argumentando que son estudios ‘chicos’ (por ej., comparados con los ECA de la industria farmacéutica) y ‘no-randomizados’; es habitual que reciban el rótulo de

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

‘evidencia’ de mala calidad, de la cual “no se puede obtener conclusiones y menos aún realizar una inferencia causal”. Tuvimos cierta dificultad para poder publicar estudios primarios y no hemos podido publicar una revisión sistemática (con protocolo aprobado). La respuesta de los revisores de las Revistas ante la presentación de la revisión sistemática han sido concretas: ‘pocos estudios, de baja calidad’; ‘no se pueden sacar conclusiones, ya que los estudios tendrían mucho riesgo de sesgo’. Debemos destacar que integran nuestro grupo revisor, uno de los titulares de un Centro Cochrane de Argentina por más de una década y una experta internacional en osteodistrofia renal (es uno de los *outcomes* primarios de la revisión); de tal manera que se cuenta en el grupo con un buen *background* metodológico, clínico y anatomo-patológico.

Como no fue aceptada para publicación, *no forma parte* de la presente tesis por compendio; solo hacemos el comentario en este capítulo de ‘Reflexiones sobre dificultades’, para ejemplificar los inconvenientes prácticos que pueden surgir al trabajar con DCE. Es nuestra idea, una vez concluido el presente proceso de tesis, ampliar el grupo revisor, incorporar nuevos conceptos recomendados en la reunión de Boston, ⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾ y luego de actualizar la búsqueda y los textos, enviarla nuevamente a publicación.

Queremos cerrar este capítulo de ‘Reflexiones sobre las dificultades’ destacando que si bien el camino a recorrer *-para incorporar los DCE a la epidemiología clínica habitual-* es arduo, resulta *necesario*, ya que abriría la puerta a la investigación clínica ‘en el terreno’ con un *impacto* de proporciones, permitiendo *validar* intervenciones de forma regular, generando evidencia de buena calidad, **mejorando el conocimiento y la efectividad clínica**. Por todo ello, consideramos que debemos aceptar el desafío planteado en las Jornadas de Boston y hacemos nuestra esa propuesta realizada en Escuela de Salud Pública de Harvard. ⁽¹⁹⁾

7. CONCLUSIONES

7.1. Para la práctica

1. Los hallazgos de los DCE, que con los de la publicación de investigación sobre genética y proteómica del hongo, integran conjuntamente la presente tesis por compendio, sostienen de manera robusta la hipótesis que la mucormicosis cutánea post-trasplante renal y la mucormicosis ósea post-reconstrucción artroscópica de ligamento cruzado (RALCA), se deberían a vehículos contaminados; sean implantes (tornillos de fijación en RALCA) o insumos (vendas contaminadas que se comercializan no-estériles en los casos cutáneos de TR); por lo que consideramos que los equipos médicos que asisten a estos pacientes, deberían:
 - a. En RALCA: asegurar que todo implante, debe provenir de la Farmacia institucional, con un documento de auditoría satisfactoria; y, todo el instrumental, debe provenir rotulado de la Central de Esterilización de la Institución.
 - b. En trasplante renal: verificar que la curación de la herida en el post-trasplante inmediato, en los casos que para la fijación de los apósitos estériles se desee utilizar fajas, las mismas deben ser estériles.
 - c. Considerar que, si bien la mucormicosis, se puede transmitir por vía aérea en algunas formas específicas, también lo hace por implante o inoculación directa. Estas últimas, serían *prevenibles* en el ámbito hospitalario.
2. La aplicación de DCE robustos, cumpliendo las condiciones de diseño y los supuestos requeridos, pueden arrojar inferencias causales válidas de mucha utilidad en la práctica clínica.
3. Lo anterior, debe complementarse con un adecuado plan de análisis de los datos y de evaluación de los riesgos de sesgo.

7.2. Para el desarrollo de la disciplina en la epidemiología y en la investigación clínica

Se propone:

1. La creación de grupos de trabajo interdisciplinarios en Hospitales Escuela, integrados por las áreas de Epidemiología y los Departamentos Médicos, para desarrollar la

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

disciplina de los estudios y los diseños cuasi-experimentales (DCE). A esos fines:

- a. Una vez integrados los grupos de trabajo interdisciplinarios, deberían conformarse grupos técnicos específicos, destinados a desarrollar la comprensión y el uso en la práctica médica de los denominados 'cinco grandes' DCE: (i) Variables instrumentales; (ii) Regresión discontinua; (iii) Series temporales interrumpidas; (iv) Antes-después controlados (incluyendo los denominados "diferencia en diferencias" o DID, con o sin 'efectos fijos'); y (v) Experimentos naturales.
2. El dictado de materias y cursos de formación sobre DCE, los que deberían incorporarse a los programas de epidemiología de grado y de posgrado en las escuelas de medicina y de epidemiología.
3. Fomentar el uso de los DCE en la práctica médica; tanto para la realización de estudios primarios, como para su incorporación a revisiones sistemáticas.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Hennekens CH, Buring JE. Design Strategies in Epidemiologic Research. In: Mayrent SL, ed. *Epidemiology in Medicine*. Boston: Little, Brown Co., 1987. Pp. 18-28.
2. McMahan B, Pugh T. Cap 2: Conceptos de causa. In: McMahan B, Pugh T, editors. *Métodos en Epidemiología*. México: Editorial La Prensa Medica Mexicana; 1975.
3. Bunge M. *Causality in modern science*. New York: Dover Publications, Inc.; 1979.
4. Susser M. What is a cause and how do we know one? A grammar for pragmatic epidemiology. *Am J Epidemiol* 1991; 133 (7): 635-48.
5. Rothman K, Greenland S, Poole C, Lash T. Chapter 2: Causation and causal inference. In: Rothman K, Greenland S, Lash T, eds. *Modern Epidemiology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
6. Mackie JL. *The cement of the universe: A study of causation*. Oxford: Oxford University Press; 1974.
7. Shadish WR, Cook TD, Campbell DT. Experiments and General Causal Inference. In: Shadish WR, Cook TD, Campbell DT, eds. *Experimental and Quasi-Experimental Designs for Generalized Causal Inference*. Boston: Houghton Mifflin Co., 2002. Pp. 1-31.
8. Hill BA. The Environment and Disease: Association or Causation? *Proc R Soc Med*. 1965; 58(5): 295–300.
9. Rothman KJ, Greenland S. Causation and Causal Inference in Epidemiology. *Am J Public Health* 2005; 95:S144– S150. doi:10.2105/AJPH.2004.059204
10. Cook TD, Campbell DT. Causal Inference and the Language of Experimentation. In: Cook TD, Campbell DT, eds. *Quasi-experimentation: Design & Analysis Issues for Field Settings*. Boston: Houghton Mifflin Co., 1979. Pp. 1- 36.
11. Rodríguez-Villamizar LA. Inferencia causal en epidemiología. *Rev Salud Pública* 2017; 19 (3): 409-15
12. Höfler M. Causal inference based on counterfactuals. *BMC Med Res Methodology* 2005; 5: 28.
13. Rubin D. Estimating causal effects of treatments in randomised and nonrandomised studies. *J Educ Psychol* 1974; 66:688-701.
14. Eccles M, Grimshaw J, Campbell M, et al. Research designs for studies evaluating the effectiveness of change and improvement strategies. *Qual Saf Health Care* 2003; 12: 47–52.
15. Effective Practice and Organisation of Care (EPOC). Suggested risk of bias criteria for EPOC reviews. EPOC Resources for review authors. Oslo: Norwegian Knowledge Centre for the Health Services 2015. Available at: <http://epoc.cochrane.org/epoc-specific-resources-review-authors>
16. Sterne JAC, Savovic J, Page MJ, et al. RoB 2 - A revised tool for assessing risk of bias in randomised trials 2019. *The BMJ*, 366, [I4898]. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmj.i4898>
17. Cook TD, Campbell DT. Quasi-Experiments: Nonequivalent control group designs. In: Cook TD, Campbell DT, eds. *Quasi-experimentation: Design & Analysis Issues for Field Settings*. Boston: Houghton Mifflin Co., 1979. Pp. 95-145.
18. Cook TD, Campbell DT. Quasi-Experiments: Interrupted Time Series Designs. In: Cook TD, Campbell DT, eds. *Quasi-experimentation: Design & Analysis Issues for Field Settings*. Boston: Houghton Mifflin Co., 1979. Pp. 207- 32.
19. Tugwell P, Knottnerus JA, McGowan J, Tricco A. Editorial. Big-5 Quasi-Experimental designs. *J Clin Epidemiol* 2017; 89: 1-3
20. Cook TD, Campbell DT. *Quasi-experimentation: Design & Analysis Issues for Field Settings*. Boston: Houghton Mifflin Co., 1979.
21. Shadish WR, Cook TD, Campbell DT. *Experimental and Quasi-Experimental Designs for Generalized Causal Inference*. Boston: Houghton Mifflin Co., 2002.
22. Effective Practice and Organisation of Care (EPOC). Methods Paper. Issues Related to Baseline Measures of Performance. EPOC Resources for review authors. 2001
23. Effective Practice and Organisation of Care (EPOC). Methods Paper. Including Interrupted Time Series (ITS) Designs in an EPOC Review. EPOC Resources for review authors. 1998
24. Reeves BC, Wells GA, Waddington H. Quasi-experimental study designs series paper 5: a checklist for classifying studies evaluating the effects on health interventions. A taxonomy without labels. *J Clin Epidemiol* 2017; 89: 30-42

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

25. Strumpf EC, Harper S, Kaufman JS. Fixed effects and difference-in-differences. In: Oakes JM, Kaufman JS, eds. *Methods in Social Epidemiology*, 2nd Edn. New Jersey: Wiley, 2017. Pp. 341-68.
26. Cook TD, Campbell DT. The conduct of randomized experiments. In: Cook TD, Campbell DT, eds. *Quasi-experimentation: Design & Analysis Issues for Field Settings*. Boston: Houghton Mifflin Co., 1979. Pp. 341-86.
27. Shadish WR, Cook TD, Campbell DT. Practical Problems 1: Ethics, Participants, Recruitment and Random Assignment. In: Shadish WR, Cook TD, Campbell DT, eds. *Experimental and Quasi-Experimental Designs for Generalized Causal Inference*. Boston: Houghton Mifflin Co., 2002. Pp. 279-311.
28. Campbell M, Fitzpatrick R, H Andrew et al. Framework for design and evaluation of complex interventions to improve health. *BMJ* 2000; 321: 694-6.
29. Craig P, Katikireddi SV, Leyland A, et al. Natural Experiments: An Overview of Methods, Approaches, and Contributions to Public Health Intervention Research. *Annu. Rev. Public Health* 2017. 38: 39-56
30. Bärnighausen T, Røttingen JA, Rockers P, et al. Quasi-experimental study designs series - paper 1: introduction: two historical lineages. *J Clin Epidemiol* 2017; 89: 1-8.
31. Bärnighausen T, Røttingen JA, Rockers P, et al. Quasi-experimental study designs series - paper 4: uses and value. *J Clin Epidemiol* 2017, doi:10.1016/j.jclinepi.2017.03.012
32. Cook TD, Campbell DT. Validity. In: Cook TD, Campbell DT, eds. *Quasi-experimentation: Design & Analysis Issues for Field Settings*. Boston: Houghton Mifflin Co., 1979. Pp. 37-94.
33. Sterne JAC, Hernán MA, Reeves AC, et al. ROBINS-I: a tool for assessing risk of bias in non-randomised studies of intervention. *The BMJ* 2016; 355: l4919. <https://doi.org/10.1136/bmj.l4919>
34. Bärnighausen T, Røttingen JA, Rockers P, et al. Quasi-experimental study designs series - paper 7: assessing the assumptions. *J Clin Epidemiol* 2017; 89: 53-66.
35. Carollo Limeres MC. Regresión Lineal Simple. Estadística. FBA I 2011-2012. Departamento de Estadística Operativa. USC. Available at: [Mat_50140116_Regr_simple_2011_12.pdf](#)
36. Waddington H, Aloe A, Becker B, et al. Quasi-Experimental designs-paper 6: Risk of Bias assessment in credible quasi-experimental studies. *J Clin Epidemiol* 2017; 89: 43-52
37. Ogrinc G, Davies L, Goodman D, et al. SQUIRE 2.0 (Standards for Quality Improvement Reporting Excellence) revised publication guidelines from a detailed consensus process. *BMJ Qual Saf* 2015; doi:10.1136/bmjqs-2015-004411
38. Hoffmann TC, Glasziou PP, Boutron I, et al. Better reporting of interventions: template for intervention description and replication (TIDieR) checklist and guide. *BMJ* 2014;348:g1687 doi:10.1136/bmj.g1687
39. Stone SP, Cooper BS, Kibbler CC, et al. The ORION statement: guidelines for transparent reporting of outbreak reports and intervention studies of nosocomial infection. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 282-88.
40. Recomendaciones para la compra segura de Productos Médicos. Administración nacional de medicamentos. Alimentos y Tecnología Médica. Available at: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/productos_medicos/recomendaciones_compraproductosmedicos.asp
41. Reingold AL. Outbreak investigations—a perspective. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(January-March): 21-7. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627658/>
42. Mortimer PP. Five postulates for resolving outbreaks of infectious disease. *J Med Microbiol* 2003; 52:447-51.
43. 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; 46:1813-21.
44. de Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi, Vol. 1. 2nd ed. Utrecht, Utrecht: Centraal bureau voor Schimmelcultures; 2000.
45. Pavel AB, Vasile CI. PyElph: a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics* 2012; 13: 9.
46. Abe A, Asano K, Sone T. A molecular phylogeny-based taxonomy of the genus *Rhizopus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74: 1325-31. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1271/bbb.90718>
47. Machouart M, Larche J, Burton K, Collomb J, Maurer P, Cintrat A, et al. Genetic identification of the main opportunistic Mucorales by PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 2006; 44:805-10 Available at: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.3.805-810>

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

48. Walther G, Pawlowska J, Alastruey-Izquierdo A, Wrzosek M, Rodríguez-Tudela JL, Dolatabadi S, et al. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. *Persoonia* 2013; 30:11–47. Available at: <http://dx.doi.org/10.3767/003158513X665070>
49. Tang CM, Cohen J, Holden DW. An *Aspergillus fumigatus* alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity. *Mol Microbiol* 1992; 6:1663–71.
50. Clinical, Laboratory Standards, Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, 3rd ed. 2017 [CLSI standard M38].
51. Gamarra S, Morano S, Dudiuk C, et al. Epidemiology and antifungal susceptibilities of yeasts causing vulvo- vaginitis in a teaching hospital. *Mycopathologia* 2014; 178:251–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-014-9780>
52. Espinel-Ingroff A, Chakrabarti A, Chowdhary A, et al. Multicenter evaluation of MIC distributions for epidemiologic cutoff value definition to detect amphotericin B, posaconazole, and itraconazole resistance among the most clinically relevant species of Mucorales. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:1745–50. Available at: <https://aac.asm.org/content/59/3/1745>
53. CBS Fungal Biodiversity Centre. Fingerprinting: random amplified polymorphic DNA (with M13); 2016.
54. Vagvolgyi C, Heinrich H, Acs K, Papp T. Genetic variability in the species *Rhizopus stolonifer*, assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004; 86:181–8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15280652/>
55. Clinical and Laboratory Standards Institute. Molecular methods for bacterial strain typing approved guideline. CLSI document MM11-A, 28. 2007; p. 28.
56. Dhieb C, Normand AC, L'Ollivier C, et al. Comparison of MALDI-TOF mass spectra with microsatellite length polymorphisms in *Candida albicans*. *J Mass Spectrom* 2015; 50:371–7. <http://dx.doi.org/10.1002/jms.3538>
57. Pereira L, Dias N, Santos C, Lima N. The use of MALDI-TOF ICMS as an alternative tool for *Trichophyton rubrum* identification and typing. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32:11–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.01.009>
58. Pulcrano G, Roscetto E, Iula VD, et al. MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate *Candida parapsilosis* transmission in neonatal intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:2919–28. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-012-1642-6>
59. Institute of Environmental Science & Research. Guidelines for the investigation and control of disease outbreak. Available at: <https://surv.esr.cri.nz/episurv/Manuals/GuidelinesForInvestigatingCommDiseaseOBs>
60. Chaves MS, Franco D, Nanni JC, et al. Control of an outbreak of postoperative bone mucormycosis: An intervention study of contiguous cohorts. *Am J Infect Control* 2016; 44:1715–7
61. Gamarra S, Chaves MS, Cabeza MS, et al. Mucormycosis outbreak due to *Rhizopus microsporus* after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction surgery evaluated by RAPD and MALDI-TOF mass spectrometry. *J Mycol Med* 2018; 28:617-22.
62. Chaves MS, Leonardelli F, Franco DM, et al. Control of post-transplant cutaneous mucormycosis by removing the vehicle: An intervention study of contiguous cohorts. *Am J Infect Control* 2020; 48: 791-4.
63. Schünemann HJ, Higgins JPT, Vist GE, Glasziou P, Akl EA, Skoetz N, Guyatt GH; on behalf of the Cochrane GRADEing Methods Group. Chapter 14 (14.2) Assessing the certainty or quality of a body of evidence. In: Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* version 6.1 (updated September 2020). Cochrane, 2020. Available at: www.training.cochrane.org/handbook
64. Administración nacional de medicamentos. Alimentos y Tecnología Médica. Disposición N° 0421/12. Available at: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/enero_2012/Dispo_0421-12.pdf
65. Hevia AI, Abrantes RA, Fernández J, Boleas M, Davel GO, Refojo N. Mucormycosis por *Rhizopus microsporus*. In: Program and abstracts of the 12th Congress of the Argentine Society of Mycology (CAMIC 12); June 15-17. Abstract MCLI P032. Posadas, Misiones; 2011.
66. Spector M, Peretti L, Romero G. Metalworking defects in surgery screws as a possible cause of post-surgical infections. *J Phys (CS)* 2016; 705. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/705/1/012013>
67. Clara L, Greco C, Salazar E, Sánchez M, Carbó L, Lizzi A. Mucormycosis en cirugía de ligamento cruzado anterior. XI Congreso Nacional de Epidemiología, Control de Infecciones y Seguridad del Paciente. ADECI. Mar del Plata, 21-23 de Septiembre de 2011. Argentina. Abstract No. 051.

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

68. Carbó L, Astoul J, Sirio AN, Yacuzzi CH, Ayerza MA, Costa Paz M, et al. Mucormycosis osteomyelitis after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. In: Proceedings of the 2015 Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS). Las Vegas, NV: 2015. Paper No. 658
69. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:332–70.
70. Bader O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics* 2013; 13:788–99. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201200468>
71. Posteraro B, De CE, Vella A, Sanguinetti M. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: fungi identification and beyond. *Expert Rev Proteomics* 2013; 10:151–64. <http://dx.doi.org/10.1586/epr.13.8>
72. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, et al. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. 2007 guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in healthcare settings. CDC; 2007. Available at: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>
73. Arockiaraj J, Balaji G, Ashok A, et al. Amphotericin B cement beads: a good adjunctive treatment for musculoskeletal mucormycosis. *Indian J Orthop* 2012; 46:369–72. <http://dx.doi.org/10.4103/0019-5413.96370>
74. Kim SJ, Postigo R, Koo S, Kim JH. Infection after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. *Orthopedics* 2014; 37:477–84. <http://dx.doi.org/10.3928/01477447-20140626-06>
75. Stucken C, Garras DN, Shaner JL, et al. Infections in anterior cruciate ligament reconstruction. *Sports Health* 2013; 5:553–7. <http://dx.doi.org/10.1177/1941738113489099>
76. Ibrahim AS, Spellberg B, Walsh TJ, et al. Pathogenesis of mucormycosis. *Clin Infect Dis* 2012; 54:S16–22. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir865>
77. Cheng VC, Chan JF, Ngan AH, et al. Outbreak of intestinal infection due to *Rhizopus microsporus*. *J Clin Microbiol* 2009; 47:2834–43. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00908-09>
78. Cheng VC, Chen JH, Wong SC, et al. Hospital outbreak of pulmonary and cutaneous Zygomycosis due to contaminated linen items from substandard laundry. *Clin Infect Dis* 2016; 62:714–21. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/civ1006>
79. Maravi-Poma E, Rodriguez-Tudela JL, de Jalon JG, et al. Outbreak of gastric mucormycosis associated with the use of wooden tongue depressors in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2004; 30:724–8. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-003-2132-1>
80. Patterson JE, Barden GE, Bia FJ. Hospital-acquired gangrenous mucormycosis. *Yale J Biol Med* 1986; 59:453-9.
81. Keys TF, Haldorson AM, Rhodes KH, Roberts G. Nosocomial outbreak of *Rhizopus* infections associated with Elastoplast wound dressings—Minnesota. *MMWR* 1978; 27:33-4.
82. Fréalle E, Rocchi S, Bacus M, et al. Real-time polymerase chain reaction detection of *Lichtheimia* species in bandages associated with cutaneous mucormycosis in burn patients. *J Hosp Infect* 2018; 99:68-74.
83. Duffy J, Harris J, Gade L, Schulster L, Newhouse E, O'Connell H, et al. Mucormycosis outbreak associated with hospital linens. *Pediatr Infect Dis J* 2014; 33:472-6.
84. Johnston BC, Patrick DL, Devji T, et al. Chapter 18: Patient-reported outcomes. In: Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* version 6.1 (updated September 2020). Cochrane, 2020. Available from www.training.cochrane.org/handbook.
85. Nass Kunstmann L, Merino JM. El experimento natural como un nuevo diseño cuasi-experimental en investigación social y en salud. *Ciencia y Enfermería* 2008; XIV (2): 9-12.
86. Dignani MC, Santander J, Refojo N, et al. Osteomielitis por Mucorales (OMM) Asociada a Artroscopía de Reparación de Ligamento Cruzado Anterior: Investigación Epidemiológica y Recomendaciones para su Prevención. *Artroscopía* 2018; 25 (3): 92-99.
87. Makino A, Carbó L, Muscolo L, et al. Osteomielitis micótica luego de la reconstrucción del LCA. *Rev Argent Artroscopía* 2008; 15: 41–5.
88. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:236-301.
89. Nain PS, Matta H, Singh K, et al. Post-operative abdominal wall mucormycosis—a case series. *Indian J Surg* 2015; 77:253-6.
90. Davuodi S, Manshadi SAD, Salehi MR, et al. Fatal cutaneous mucormycosis after kidney transplant. *Exp Clin Transplant* 2015; 13:82-5.

TESIS DOCTORAL

Los diseños cuasi-experimentales en la investigación clínica. Su utilidad y limitaciones para la inferencia causal en la práctica clínica

91. Zhao L, Wang CX, Zhang L, et al. Mucormycosis extending from the surgical wound to the transplanted kidney: case report and literature review. *Exp Clin Transplant* 2012; 10:403-5.
92. Serris A, Danion F, Fanny Lanternier F. Disease Entities in Mucormycosis. *J. Fungi* 2019; 5, 23; doi:10.3390/jof5010023
93. Taj-Aldeen SJ, Gamaletsou MN, Rammaert B, et al (for the International Osteoarticular Mycoses Consortium). *Medical Mycology* 2017, 55, 691–704. doi: 10.1093/mmy/myw136.
94. Nanni JC, Chaves MS, Cantarini M, D'Agostino S. Infecciones micóticas asociadas a la reparación artroscópica de ligamentos cruzados. Editorial. *Actualizaciones en SIDA e Infectología* (Publicación Oficial de SADI) 2014; 22: 3-4.
95. García-Hermoso D, Criscuolo A, Lee SC, et al. Outbreak of Invasive Wound Mucormycosis in a Burn Unit Due to Multiple Strains of *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* Resolved by Whole-Genome Sequencing. *mBio* 9:e00573-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00573-18>
96. Dehority W, Silva S, Muller M. Nosocomial Chronic Osteomyelitis of the Tibia in an Otherwise Healthy Adolescent: A Case Report. *J Orthop Case Rep* 2019; 9 (4): 71-75.
97. Hartnett KP, Jackson BR, Perkins KM, et al. A Guide to Investigating Suspected Outbreaks of Mucormycosis in Healthcare. *J. Fungi* 2019 (5) 69; doi:10.3390/jof5030069
98. Suo L, Dunna JJ. The Brief Case: Cutaneous Fungal Infection in a Pediatric Patient with Newly Diagnosed Acute Lymphocytic Leukemia. *J Clin Microbiol* 2020; 58:e00787-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00787-19>
99. Bowers JR, Monroy-Nieto J, Gade L, et al. *Rhizopus microsporus* Infections Associated with Surgical Procedures, Argentina, 2006–2014. *Emerging Infectious Diseases* 2020; 26 (5): 937-44. [www.cdc.gov/eid. https://doi.org/10.3201/eid2605.191045](https://doi.org/10.3201/eid2605.191045)
100. Taraskina AE, Pchelin IM, Ignatieva SM, et al. Molecular genetic methods for detection and species identification of fungal order Mucorales in accordance with the global guideline for the diagnosis and management of Mucormycosis. Literature Review. *Problemas de micología médica* 2020; V.22, No. 1 (Проблемы медицинской микологии, 2020, T.22, №1). Revista de origen ruso.
101. Valenzuela P, Legarraga P, Rabagliati R. Epidemiología de la enfermedad fúngica invasora por hongos filamentosos en el período 2005 a 2015, en un hospital universitario en Santiago, Chile. *Rev Chilena Infectol* 2019; 36 (6): 732-741.
102. Reid G, Lynch JP, Fishbein MC, et al. Mucormycosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2020; 41: 99–114.
103. Lockhart SR, Pham CD, Gade L, et al. Preliminary Laboratory Report of Fungal Infections Associated with Contaminated Methylprednisolone Injections. *JCM* 2013; 51 (8): 2654–2661.
104. Walther G, Wagner L, Kurzai O. Outbreaks of Mucorales and the Species Involved. *Mycopathologia* 2019. <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00403-1>
105. Glanville J, Eyers J, Jones AM, et al. Quasi-experimental study designs series-paper 8: identifying quasi-experimental studies to inform systematic reviews. *J Clin Epidemiol* 2017; 89:67-76.
106. Lavis JN, Bärnighausen T, El-Jardali F. Quasi-experimental study designs series - Paper 11: Supporting the production and use of health systems research syntheses that draw on quasi-experimental study designs. *J Clin Epidemiol* 2017; 89: 92-7.
107. Rockers PC, Tugwell P, Grimshaw J, et al. Quasi-experimental study designs series-paper 12: strengthening global capacity for evidence synthesis of quasi-experimental health systems research. *J Clin Epidemiol* 2017; 89: 98-105.