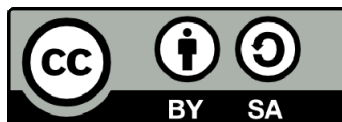




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Diagnóstico de la causa de muerte y caracterización de infecciones fatales en muestras post mortem en países de baja renta

Juan Carlos Hurtado Negreiros



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartiqual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartiqual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**



**DIAGNÓSTICO DE LA CAUSA DE MUERTE Y  
CARACTERIZACIÓN DE INFECCIONES FATALES EN  
MUESTRAS POST MORTEM EN PAÍSES DE BAJA  
RENTA**

**Memoria de tesis doctoral presentada por Juan Carlos Hurtado  
Negreiros para optar al grado de doctor por la Universidad de  
Barcelona**



**DIAGNÓSTICO DE LA CAUSA DE MUERTE Y  
CARACTERIZACIÓN DE INFECCIONES FATALES EN  
MUESTRAS POST MORTEM EN PAÍSES DE BAJA RENTA**

**Memoria de tesis doctoral presentada por Juan Carlos Hurtado  
Negreiros para optar al grado de doctor por la Universidad de  
Barcelona**

**Dirigida por:**

Miguel Julián Martínez Yoldi

Jaume Ordi Majà

**Tutoreada por**

Miguel Julián Martínez Yoldi

Departament de Fonaments Clínics

Universitat de Barcelona – Hospital Clínic de Barcelona – Institut de

Salut Global de Barcelona

**Programa de Doctorado de Medicina e Investigación Traslacional.**

**Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universitat de**

**Barcelona**

Barcelona, 20 de septiembre de 2024



## Agradecimientos

Al Dr. Miguel J. Martínez, por aceptar ser mi director y tutor de tesis, por haber confiado en mí, por las lecciones que me brindó, por apostar en que terminaría este viaje, por la incansable insistencia en que siga adelante, por toda la ayuda que recibí más allá de lo que podía esperar.

Al Dr. Jaume Ordi, por acceder a ser mi director de tesis, por acompañarme en este camino, por transmitirme sus irreductibles ganas de continuar, por su invaluable ayuda cuando sentía que todo era cuesta arriba, por estar ahí siempre.

A mis compañeros de oficina, poyata y peripecias, Mireia Navarro e Isaac Casas. A Mireia, por su profesionalidad, por su enorme interés por seguir aprendiendo siempre, por su inestimable ayuda y apoyo, por compartir largas horas de café pensando en el proyecto y en todo lo que se nos ocurriera. A Isaac, por todos los momentos compartidos, por su esfuerzo a lo largo de estos años, por los cafés y birras donde Fe.

A todo el equipo de investigadores y compañeros de ISGlobal. A los Dres. Quique Bassat y Dra. Clara Menéndez, por permitirme colaborar en el campo de la investigación de las causas de muerte. A Ariadna Sanz y Vima Delgado, por su esfuerzo y constancia, además de su cercanía. A las Dras. Paola Castillo y Natalia Rakislova, por compartir su calidad profesional y soporte en todo en cuanto la anatomía patológica se refiere. A Llorenç Quitó, por su enorme aporte en el campo del manejo de datos y estadística, por su amable atención cada vez que acudí buscando consejo estadístico. A Jessica Navero, por colaborar en diversos temas además de llevar adelante distintas obligaciones.

A todas mis compañeras y compañeras del Servicio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona. Al Dr. Jordi Vila, por brindarme un espacio dentro del laboratorio. A la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Marcos, por su apoyo incondicional. A la Dra. Mar Mosquera por toda la

ayuda que me brindó y brinda cada vez que se lo requiero, por los “peris”. Al Dr. Josep Costa, por su infinita paciencia cuando compartía conmigo sus amplios conocimientos sobre hepatitis virales. Al Dr. Jordi Bosch, por tener siempre un momento para escucharme sobre cosas de la tesis y por ser un magnífico tutor de residentes (porque, siempre nos quedará la microbiología). Al Dr. Julià González, por compartir su vasto conocimiento sobre micobacterias, por dejarme saber sobre sus anécdotas, por su gentileza, por el tiempo que siempre me brindó. A mis compañeras, antiguas “resis” pequeñas, hoy grandes microbiólogas, Dras. Andrea Vergara y Elisa Rubio, por su compañía, por compartir momentos de sube y baja a lo largo de la residencia y el doctorado. A la Dra. Andrea Aira, por enseñarme que existen personas con infinitas ganas de aprender. A Dras. Míriam Álvarez y M<sup>a</sup> Eugenia Valls y los Dres. Francesc Marco, Manel Almela y Jorge Puig, por todos los conocimientos que compartieron conmigo.

A la Dra. Carla Carrilho y todo su equipo en Maputo, Mozambique y al Dr. Luiz Ferreira y todo su equipo en Manaus, Brasil, por el esfuerzo y dedicación puesta para llevar adelante los proyectos en los cuales hemos trabajado.

A mi familia, por su apoyo total. A Nelly, mi mamá, por transmitirme el amor a lo que se hace, por su cariño. A Idilio, mi padre, por su ejemplo, por mostrarme el camino del esfuerzo. A mis hermanos, José Luis y Jessica Lisset, por su afecto y su certeza de lo que hago servirá a la comunidad.

A los pacientes y en especial a sus familiares, quienes aceptaron que incluyéramos a sus seres queridos en el estudio, sin su enorme capacidad de desprendimiento, este trabajo no hubiera sido posible.

Y a todos aquellos, familia, amigos, compañeras, compañeros, que me han acompañado a lo largo de estos años y me han ayudado a llegar hasta aquí.

# Índice



<b>Abreviaturas y acrónimos</b>	17
<b>Glosario</b>	21
<b>Artículos que componen la tesis</b>	25
<b>Resumen</b>	33
<b>Introducción</b>	39
Antecedentes históricos de la autopsia para identificación de la causa de muerte	41
¿Por qué tenemos que contar las muertes?	53
Muertes en niños menores de 5 años	54
Muertes maternas	56
Muertes en países de baja y mediana renta	58
Herramientas para la identificación de las causas de muerte: ventajas y limitaciones	59
Certificados de defunción	59
Historias o registros clínicos	70
Autopsia verbal	74
Autopsia completa	81
Autopsia mínimamente invasiva	86
Aspectos relacionados con la identificación de la causa de muerte por infecciones: revisión de algunas infecciones y características relevantes.	89
Tuberculosis	89
Criptococosis	99
La microbiología <i>post mortem</i> y el intervalo <i>post mortem</i>	111
<b>Hipótesis</b>	121
<b>Objetivos</b>	125
<b>Material, métodos y resultados</b>	129
Artículo 1	131

Artículo 2	149
Artículo 3	161
Artículo 4	173
Artículo 5	187
Artículo 6	195
<b>Discusión</b>	201
<b>Conclusiones</b>	223
<b>Referencias</b>	227

## **Abreviaturas y acrónimos**



ABRC *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenem

AC Autopsia Completa

ADN Ácido desoxirribonucleico

AMI Autopsia Mínimamente Invasiva

AV Autopsia Verbal

AVCC Autopsia verbal codificada por computadora

AVCM Autopsia verbal certificada por un médico

CADMIA *Validation of the Minimally Invasive Autopsy Tool for Cause of Death Investigation in Developing Countries*

CdM Causa de muerte

CD4 Linfocitos tipo CD4+

CIMSP Consorcio de Investigación de Métricas de Salud de la Población

CISM *Centro de Investigação em Saúde de Manhiça*

CMI Concentración mínima inhibitoria

CrAg *Cryptococcus antigen*

HCB Hospital Clínic de Barcelona

HCM Hospital Central de Maputo

IC Intervalo de confianza

IPM Intervalo *Post mortem*

ISC Información sobre síntomas y causas

LCR Líquido Cefalorraquídeo

MC Meningitis criptocócica

MDR Multirresistente

MTB *Mycobacterium tuberculosis*

NDM-1 New Delhi metalo-b-lactamasa 1

ODS Objetivos de Desarrollo Sostenible

OMS Organización Mundial de la Salud

ONU Organización de las Naciones Unidas

PAR Países de alta renta

PBR Países de baja renta

PMBR Países de baja y mediana renta

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

PMR Países de mediana renta

PVVS Personas que viven con VIH/SIDA

SIDA Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SNC Sistema Nervioso Central

SVD Sitios de Vigilancia Demográfica

TAR Terapia Antirretroviral

TB Tuberculosis

TB MDR Tuberculosis Multirresistente

TMM Tasa de mortalidad materna

VIH Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VPN Valor Predictivo Negativo

VPP Valor Predictivo Positivo

## **Glosario**



Traslocación bacteriana: consiste en el paso de microorganismo (y sus productos) desde la luz intestinal, a sitios extraintestinales, como los ganglios linfáticos mesentéricos, la sangre, el líquido ascítico o el páncreas. Puede suceder de forma fisiológica sin alteraciones y también en contextos patológicos, mediada por lesión de la mucosa intestinal, inflamación, isquemia, alteración de la inmunidad o sobrecrecimiento del microbioma intestinal.

Intervalo *post mortem*: en microbiología *post mortem* es el tiempo transcurrido entre la muerte y la toma de muestras, ya sea a través de una autopsia completa o de la autopsia mínimamente invasiva. En el contexto forense se define como el tiempo transcurrido entre la muerte y el hallazgo del cadáver.

Microbiología forense: se define como la disciplina que aplica métodos científicos al análisis de evidencia microbiológica en casos penales y civiles con fines investigativos. Este campo de estudio se basa en técnicas clásicas de microbiología, como cultivos e identificación bioquímica, pero también incorpora ensayos de biología molecular, genética y filogenética. Además, los principios forenses, la recopilación de pruebas, la cadena de custodia y las presentaciones en los tribunales son fundamentales.

Microbiología *post mortem*: constituye una parte importante del proceso de la autopsia, se encarga de la investigación *post mortem* que ayuda a establecer el rol en la causa de la muerte de la infección cuando está presente, o es sospechada, antes del fallecimiento.

Microbioma: es la comunidad de microorganismos (como los hongos, bacterias y virus) que existen en un entorno en particular. En los seres humanos, el término se utiliza con frecuencia para describir los microorganismos que viven en o sobre una zona particular del cuerpo, como la piel o el tracto gastrointestinal.

Microbioma epinecrótico: término que se utiliza para referirnos a las comunidades microbianas que habitan en las superficies externas de un cadáver.

Tanatobioma: término que se utiliza para referirnos a las comunidades microbianas que habitan en los órganos internos de un cadáver.



## **Artículos que componen la tesis**



Tesis en formato de compendio de publicaciones. La tesis consta de 6 objetivos y 6 artículos.

## Artículo 1

**AUTORES:** Castillo P\*, Hurtado JC\*, Martínez MJ, Jordao D, Lovane L, Ismail MR, Carrilho C, Lorenzoni C, Fernandes F, Mocumbi S, Jaze ZO, Mabota F, Cossa A, Mandomando I, Cisteró P, Mayor A, Navarro M, Casas I, Vila J, Maixenchs M, Munguambe K, Sanz A, Quintó L, Macete E, Alonso P, Bassat Q, Ordi J, Menéndez C.

\*Ambos autores han contribuido de idéntica manera al trabajo y ambos deben ser considerados como primer autor del mismo.

**TÍTULO:** Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in maternal deaths in Mozambique: An observational study.

**REVISTA, VOLUMEN (NÚMERO): PÁGINAS, FECHA DE PUBLICACIÓN:** PLOS **Medicine**, 14(11): 15. November 8, 2017

**DOI:** 10.1371/journal.pmed.1002431

**FACTOR DE IMPACTO:** 11.675

**CUARTIL (JCR):** Q1 (Medicine General and Internal)

## Artículo 2

**AUTORES:** Hurtado JC, Quintó L, Castillo P, Carrilho C, Fernandes F, Jordao D, Lovane L, Navarro M, Casas I, Bene R, Nhampossa T, Santos Ritchie P, Bandeira S, Sambo C, Chicamba V, Mocumbi S, Jaze Z, Mabota F, Ismail MR, Lorenzoni C, Guisseve A, Rakislova N, Marimon L, Castrejon N, Sanz A, Cossa A, Mandomando I, Munguambe K, Maixenchs M, Muñoz-Almagro C, Macete E, Alonso P, Vila J, Bassat Q, Menéndez C, Martínez MJ, Ordi J.

**TÍTULO:** Postmortem Interval and Diagnostic Performance of the Autopsy Methods.

**REVISTA, VOLUMEN (NÚMERO): PÁGINAS, FECHA DE PUBLICACIÓN:** *Scientific Reports*, 8 (1):16112. Published 2018 Oct 31.

**DOI:** 10.1038/s41598-018-34436-1

**FACTOR DE IMPACTO:** 4.011

**CUARTIL (JCR):** Q1 (Multidisciplinary Sciences)

## Artículo 3

**AUTORES:** Hurtado JC, Castillo P, Fernandes F, Navarro M, Lovane L, Casas I, Quintó L, Marco F, Jordao D, Ismail MR, Lorenzoni C, Martinez-Palhares AE, Ferreira L, Lacerda M, Monteiro W, Sanz A, Letang E, Marimon L, Jesri S, Cossa A, Mandomando I, Vila J, Bassat Q, Ordi J, Menéndez C, Carrilho C, Martínez MJ.

**TÍTULO:** Mortality due to *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in low-income settings; an autopsy study.

**REVISTA, VOLUMEN (NÚMERO): PÁGINAS, FECHA DE PUBLICACIÓN:** *Scientific Reports*, 9 (1):7493. Published 2019 May 16.

**DOI:** 10.1038/s41598-019-43941-w

**FACTOR DE IMPACTO:** 3,998

**CUARTIL:** Journal Citation Reports (JCR): Q1 (Multidisciplinary Sciences)

## Artículo 4

**AUTORES:** García-Basteiro AL\*, Hurtado JC\*, Castillo P, Fernandes F, Navarro M, Lovane L, Casas I, Quintó L, Jordao D, Ismail MR, Lorenzoni C, Carrilho C, Sanz A, Rakislova N, Mira A, Alvarez-Martínez MJ, Cossa A, Cobelens F, Mandomando I, Vila J, Bassat Q, Menendez C, Ordi J, Martínez MJ.

\*Ambos autores han contribuido de idéntica manera al trabajo y ambos deben ser considerados como primer autor de este.

**TÍTULO:** Unmasking the hidden tuberculosis mortality burden in a large postmortem study in Maputo Central Hospital, Mozambique.

**REVISTA, VOLUMEN (NÚMERO): PÁGINAS, FECHA DE PUBLICACIÓN:** *European Respiratory Journal*, 54 (3):1900312. Published 2019 Oct 1.

**DOI:** 10.1183/13993003.00312-2019

**FACTOR DE IMPACTO:** 12.339

**CUARTIL (JCR):** Q1 (Respiratory System)

## Artículo 5

**AUTORES:** García-Basteiro AL\*, Hurtado JC\*, Castillo P, Fernandes F, Navarro M, Lovane L, Casas I, Quintó L, Jordao D, Ismail MR, Lorenzoni C, Carrilho C, Sanz A, Rakislova N, Mira A, Alvarez-Martínez MJ, Cossa A, Cobelens F, Mandomando I, Vila J, Bassat Q, Menendez C, Ordi J, Martínez MJ.

\*Ambos autores han contribuido de idéntica manera al trabajo y ambos deben ser considerados como primer autor de este.

**TÍTULO:** Performance of the Xpert MTB/RIF Ultra assay for determining cause of death by tuberculosis in tissue samples obtained by minimally invasive autopsies.

**REVISTA, VOLUMEN (NÚMERO): PÁGINAS, FECHA DE PUBLICACIÓN:** Chest. 2020; S0012-3692(20)31876-6.

**DOI:** 10.1016/j.chest.2020.06.071

**FACTOR DE IMPACTO:** 9.410

**CUARTIL (JCR):** Q1 (Respiratory system)

## Artículo 6

**AUTORES:** Hurtado JC, Carrilho C, Mandomando I, Martínez MJ on behalf of the CaDMIA bacterial study group

**TÍTULO:** Fatal multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia in Maputo, Mozambique. A case report.

**REVISTA, VOLUMEN (NÚMERO): PÁGINAS, FECHA DE PUBLICACIÓN:**  
**Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 37(7):485-487. Agosto–  
Septiembre 2019

**DOI:** doi:10.1016/j.eimc.2018.06.016

**FACTOR DE IMPACTO:** 1.654

**CUARTIL (JCR):** Q4 (Microbiology)

## Resumen



## **TÍTULO: Diagnóstico de la Causa de Muerte y Caracterización de Infecciones Fatales en Muestras *Post mortem* en Países de Baja Renta**

### **INTRODUCCIÓN**

La ausencia de datos confiables sobre las causas de muerte se ha señalado como un factor limitante para reducir la mortalidad en el mundo. Entendemos que para poder desarrollar un planteamiento y discutir sobre políticas de salud es necesario tener información sobre la magnitud (cuántas personas fallecen y por qué) de los problemas que atañen a este campo. Sin esta información, no es posible implementar una adecuada planificación y asignación de los recursos con los que se cuenta. Además, la falta de información sobre las causas de muerte afecta de forma desigual a las personas en el mundo. Algunos de los grupos en los cuales se hace patente esta desigualdad son los niños menores de 5 años, las mujeres gestantes y las personas que viven en países de baja y mediana renta.

Desde el 2015, un equipo interdisciplinar del Instituto de Salud Global de Barcelona estudia los métodos para generar pruebas más definitivas sobre las causas de la mortalidad. Se puso a prueba una técnica potencialmente poderosa, en la cual se realizó muestreo de tejido a través de la autopsia mínimamente invasiva, para obtener información de alta calidad sobre las causas de la mortalidad.

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La hipótesis general de esta tesis es que la autopsia mínimamente invasiva puede proporcionar una información precisa y valiosa para las muertes de causa infecciosa en países de renta baja y mediana.

Las hipótesis específicas del proyecto son: la autopsia mínimamente invasiva permitirá obtener datos de calidad sobre las causas de muerte materna, es posible tomar muestras autópsicas más allá de 24 horas *post mortem* sin una alteración importante en

los resultados microbiológicos, la autopsia mínimamente invasiva y el análisis detallado de los datos autópsicos permiten determinar y caracterizar la mortalidad por *Cryptococcus spp* y la autopsia mínimamente invasiva y el análisis detallado de los datos autópsicos permiten determinar y caracterizar la mortalidad por tuberculosis.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La validez de la autopsia mínimamente invasiva se evaluó comparando con los resultados de la autopsia completa. Para realizar la autopsia mínimamente invasiva, se utilizaron agujas de biopsia para la toma de muestras *post mortem* de órganos clave, como tejido de cerebro, pulmones, corazón, hígado, bazo, riñones y médula ósea (además de útero, en caso de mujeres en edad fértil) y de fluidos (sangre y líquido cefalorraquídeo), para ser analizados mediante técnicas de patología, microbiología y otras pruebas para establecer la causa de la muerte sin una autopsia completa.

## RESULTADOS PRINCIPALES

Las enfermedades infecciosas no obstétricas (22/32, 69%) y hemorragia obstétrica (13/24, 54%) fueron las causas de muerte más comunes entre las condiciones obstétricas indirectas y directas, respectivamente. La autopsia mínimamente invasiva identificó una causa de muerte en el 86% de las mujeres ( $\kappa = 0,48$ , IC del 95%: 0,31-0,66).

Se comparó el impacto del incremento de los intervalos *post mortem* (IPM) en los resultados de las pruebas microbiológicas en 282 casos. El aumento del IPM se asoció con un aumento en el número de bacterias identificadas (tasa: 1.014 por hora;  $p = 0.0228$ ). Se debió principalmente al aumento del número de enterobacterias y cepas del género *Pseudomonas*.

Entre los 284 casos incluidos, se diagnosticaron 17 infecciones criptocócicas mortales. La mortalidad entre pacientes con VIH (16/163) fue del 10% incluidas cuatro muertes

maternas. Un tercio de los casos correspondió a *Cryptococcus gattii* (tipos moleculares VGI y VGIV, cepas B $\alpha$  y C $\alpha$ ) y el resto correspondió a *Cryptococcus neoformans var. grubii* (todas las cepas VNI y A $\alpha$ ). El nivel de sospecha clínica pre mortem fue bajo (7/17). El 41% falleció dentro de las primeras 72 h de ingreso.

Se realizaron la autopsia mínimamente invasiva y la autopsia diagnóstica completa en 282 pacientes fallecidos. Identificamos *Acinetobacter baumannii* en 5 casos con el método de autopsia mínimamente invasiva y 3 casos con el método de autopsia diagnóstica completa (concordancia en 3 casos). Se recuperaron las cinco cepas y se realizaron pruebas de susceptibilidad para cada una. La resistencia a múltiples fármacos se detectó solo en una cepa.

Se realizaron autopsias completas en 223 defunciones en Mozambique. La tuberculosis (TB) fue identificada como la causa de muerte en 31 pacientes. El diagnóstico clínico principal para detectar la TB como causa de muerte tuvo sensibilidad de 19,4% y especificidad de 97,4% comparados con autopsia diagnóstica completa. Se encontró TB concomitante en 31 casos adicionales. Xpert Ultra ayudó a identificar 15 casos de TB concomitante. En 18 pacientes, se identificó ADN de *Mycobacterium tuberculosis* mediante TB-PCR y Xpert Ultra en ausencia de lesiones histológicas de TB.

Se evaluó el rendimiento de la prueba Xpert Ultra en muestra obtenidas mediante autopsia mínimamente invasiva para detectar causa de muerte por tuberculosis. Se incluyeron 117 casos. La mayor especificidad en un solo tejido se obtuvo en pulmón (0,98) Para la combinación de órganos, el rendimiento más alto se observó para la combinación de pulmón/cerebro (sensibilidad 0,85 y valor predictivo negativo de 0,95)

## CONCLUSIONES

La concordancia global entre la autopsia mínimamente invasiva sin información clínica y la autopsia completa para el diagnóstico de la causa de muertes maternas fue moderada. La coincidencia diagnóstica fue mayor para las causas de muerte no

obstétricas que para las obstétricas. En este último grupo de patologías, la autopsia mínimamente invasiva presenta notables limitaciones cuando la evaluación se realiza a ciegas, sin información clínica. La autopsia mínimamente invasiva tiene potencial para convertirse en una herramienta útil para determinar las causas de muerte materna en países de baja renta. La autopsia mínimamente invasiva realizada con posterioridad a las primeras 24 tras el fallecimiento sigue proporcionando información útil que permite alcanzar el diagnóstico en la mayoría de los casos. No obstante, la detección de algunos microorganismos como de la familia *Enterobacteriaceae* y del género *Pseudomonas* en estas autopsias debe hacerse con cautela. Las muestras obtenidas durante la autopsia mínimamente invasiva permiten realizar un estudio detallado de los agentes infecciosos y caracterizar mejor así las infecciones fatales.

# Introducción



Para la realización de esta tesis, se planteó como objetivo general comparar la técnica de autopsia mínimamente invasiva (AMI) con la autopsia completa (AC), considerada como el estándar de referencia, para determinar la causa de muerte (CdM). Se evaluaron las ventajas y desventajas de la AMI como una alternativa viable y efectiva en la determinación de la CdM en regiones con bajos y medianos ingresos.

Es fundamental para los gobiernos de todos los países conocer el número de nacimientos y defunciones anuales, así como las principales causas de muerte. Esta información es esencial para el funcionamiento adecuado de los sistemas de salud y de organización en general.<sup>1</sup> Los registros civiles son la fuente de recopilación de esta información, proporcionando no solo el marco jurídico de cada individuo, reconocido en el artículo 6 de la Declaración Universal de los Derechos Humanos, sino también permitiendo a los países identificar los problemas sanitarios más apremiantes.<sup>1</sup> Sin embargo, se enfrentan a la realidad de la precariedad de los sistemas de información de salud y las estadísticas de mortalidad, situaciones ampliamente documentadas tanto en la literatura como en los informes de los países a la Organización Mundial de la Salud.<sup>2</sup>

En particular, en los países de bajos y medianos ingresos, los datos son aún más alarmantes. Es suficiente mencionar que la OMS recibe información sobre las causas de muerte en menos del 50% de los casos de los 194 países que deberían reportar dichos datos.<sup>3</sup>

## *1. Antecedentes históricos de la autopsia para identificación de la causa de muerte*

Como herramienta, la autopsia ha servido desde sus inicios para conocer el cuerpo humano en profundidad, ha permitido establecer las bases de diferentes disciplinas

relacionadas a la medicina como la Anatomía, la Fisiología o la Fisiopatología y es un elemento esclarecedor de gran utilidad a nivel judicial en las investigaciones de muertes de causa incierta o violenta.

Una pregunta de gran relevancia en el pensamiento médico actual es: ¿Por qué fallece una persona?<sup>4</sup> Esta interrogante suele estar acompañada por otra: ¿Fue la muerte provocada o se debió a una enfermedad natural? En caso de que haya sido a causa de una dolencia, surge la siguiente cuestión: ¿Cuál fue esa dolencia? Sin embargo, esta última pregunta nos conduce a otra reflexión: ¿Cómo podemos determinarla? Estas interrogantes, muy probablemente, tenían igual importancia hace algo más de cinco siglos, cuando la práctica y teoría médicas predominantes tenían escasa relación con el estado actual del arte de la medicina.<sup>4</sup> Sin embargo, las respuestas útiles a estas preguntas podrían provenir de una autopsia, aun cuando esta fuera realizada hace más de cinco siglos.<sup>4</sup>

Se atribuye a los científicos alejandrinos Herófilo (335-280 a.C.) y Erasístrato (304-250 a.C.) las primeras disecciones humanas, aproximadamente un siglo después de la muerte de Hipócrates. Lamentablemente, sus escritos se han perdido y conocemos su trabajo a través de otros autores.<sup>5</sup> La medicina que se logró desarrollar en la época de Herófilo y Erasístrato, a pesar de seguir una filosofía naturalista, no incorporó de inmediato la autopsia.<sup>4</sup> Los estudios anatómicos, particularmente en animales y en un grado mucho menor en el hombre, no estaba dirigida principalmente a la comprensión de la enfermedad. Como resultado, la anatomía jugó un papel pequeño en la teoría médica griega temprana; de esto se entiende porque los griegos explicaban la enfermedad en gran parte por los humores: la enfermedad era el resultado del desequilibrio en los fluidos observados e hipotéticos del cuerpo. Los componentes sólidos, el aspecto mismo al que asistía la disección, sólo tenían un pequeño papel. Por supuesto, en algunos aspectos de la enfermedad, especialmente en algunas condiciones quirúrgicas, las alteraciones anatómicas pueden ser tan llamativas que no

pueden ignorarse. Pero, en general, el estudio antiguo de la enfermedad no enfatizaba los órganos sólidos, la estructura anatómica ni los cambios en ellos. Hasta que las teorías de la enfermedad tomaron deliberadamente en cuenta el cambio estructural, la autopsia tuvo poco lugar en la medicina.<sup>4</sup> De hecho, después de Hipócrates transcurrieron casi mil ochocientos años antes de que la autopsia fuera utilizada para identificar las causas de la muerte.

Otra cultura que en la antigüedad también se interesó por acceder al interior de los cuerpos fue la egipcia, pero principalmente como parte de sus creencias religiosas. En Egipto el embalsamamiento se había practicado desde tiempos remotos. Los embalsamadores, que probablemente pertenecían a una clase social baja, movieron los órganos internos y debieron hacer observaciones sobre lo “normal” y lo “no normal”.<sup>4</sup> Aparentemente no comunicaron sus observaciones a los sacerdotes u otras personas de clase alta que pudieran practicar la medicina o escribir sobre descubrimientos científicos.<sup>6</sup> Sí se tiene noticia de que los antiguos egipcios poseían conocimientos de anatomía, como lo demuestran los papiros de Edwin Smith y de Ebers.<sup>6</sup>

En la antigua Roma, las autopsias no fueron practicadas debido a su prohibición. Galeno (130-200 d.C.) lamentó la escasez de oportunidades para realizar disecciones y resaltó la importancia de aprender sobre el cuerpo humano de cualquier fuente disponible.<sup>4</sup> Observó a hombres heridos, practicó disecciones de animales, especialmente de aquellos como simios (por su semejanza a los seres humanos), y mencionó haber examinado casualmente dos esqueletos, uno recuperado de una tumba por una inundación del río y otro de un ladrón sin enterrar, cuyos huesos habían sido limpiado por aves carroñeras.<sup>4</sup> Su trabajo, aunque en gran parte se ha perdido, fue importante para el reconocimiento de la anatomía, fisiología y patología como ciencias fundamentales de la medicina, sentando así las bases de la disciplina y permitiendo su unificación. Muchos de sus conceptos perduraron inamovibles hasta los tiempos de Paracelso en el siglo XVI.<sup>7</sup>

En cuanto al curso histórico de las autopsias en esta época, no está claro si se realizaron disecciones humanas durante el tiempo en el cual se desarrolló el Imperio Romano.<sup>5</sup> Sin embargo, el conocimiento anatómico siguió aumentando lentamente en el mundo antiguo, incluso durante los inicios de la Edad Media. A pesar de la prohibición eclesiástica de las autopsias, hubo un aumento en la comprensión de la enfermedad en ese período. Un ejemplo de este progreso en el pensamiento médico se encuentra en la obra del médico bizantino Aecio de Amida (siglo VI), autor de "*Tetrabiblion*" (Dieciséis libros de medicina), donde recopiló su propia experiencia y se basó en el conocimiento médico previo, incluidos los manuscritos de la Biblioteca de Alejandría.<sup>7</sup> Aecio busco correlacionar la causa de la enfermedad basándose en las autopsias, al mismo tiempo que trataba a los pacientes.<sup>5</sup> A pesar de todos estos esfuerzos por utilizar la autopsia como herramienta para determinar la CdM, su impacto fue residual en la teoría médica hasta finales de la Edad Media.

El primer escrito que describe la búsqueda de la causa de la muerte a través de la exploración de los órganos durante la autopsia es del año 1125. El monje e historiador británico Guillermo de Malmesbury (c. 1095/6-c. 1143) en su *Gesta Regum Anglorum* ("Hechos de los reyes ingleses"), narra que el rey noruego Lot Sigurd Jorsalfar (Sigurd I, el Cruzado) al pasar por Bizancio, en su retorno de la Tierra Santa en 1111, evidenció que muchos de sus hombres morían. Sigurd creyó que la causa de estas muertes se debió al vino que bebieron, por eso ordenó colocar el hígado de un cerdo dentro del vino sospechoso, luego mandó eviscerar a uno de sus seguidores muertos: el hígado tenía el mismo aspecto que el hígado del cerdo. Por lo tanto, pensó Sigurd: el vino es la causa de la muerte de sus hombres y debe ser diluido con agua antes de beberlo.<sup>5</sup>

Más de un siglo después de los eventos descritos por Guillermo de Malmesbury, se registró otro evento que relacionó los hallazgos en la autopsia con la causa de muerte. El fraile franciscano Fra Salimbene de Adam da Parma (1221-1288) mencionó en su Crónica que, durante el invierno de 1286, hubo una epidemia en las ciudades del norte

de Italia que afectó tanto a gallinas como a humanos.<sup>8</sup> Dejó registrado en su obra que en Cremona, un médico anónimo realizó las disecciones y encontró, en las gallinas y en un hombre muerto al mismo tiempo que estas, abscesos (apostema) sobre el corazón.<sup>8,9</sup>

En Bolonia, en los siglos XIII y XIV los magistrados pedían y aceptaban testimonios de disecciones.<sup>8,9</sup> Esto sucedió debido que en 1209 el papa Inocencio III (1198-1216) declaró que, en caso de muerte inexplicable, esta debía de ser investigada por un médico experimentado.<sup>5,8</sup> En el año 1302 la investigación de la muerte de Azzolino degli Onesti dejó la primera autopsia registrada. Dos médicos y tres cirujanos (otras referencias indican que fueron 2 cirujanos) determinaron que la causa de la muerte fue natural y no producida por envenenamiento.<sup>4,8,9</sup> Es el primer caso de una disección médico-judicial del que se tiene registro.<sup>8</sup>

Las autopsias aparentemente no estaban limitadas a la investigación médico legal. Katharine Park<sup>10</sup> sostiene que la iglesia, en el medioevo, en el norte de Italia, no prohibía las disecciones y que se incluían en las costumbres funerarias de preservación. Pone como ejemplos disecciones o autopsias realizadas en monasterios, aunque las monjas que las realizaron buscaban en los cuerpos pruebas de santidad más que una explicación de la muerte.<sup>10</sup>

Las personas que realizaban las autopsias hasta ahora relatadas durante el medioevo sufrían de un problema importante, no había una descripción sistemática de lo “normal” con la cual comparar sus hallazgos. Más allá de lesiones claramente evidentes o de algunos tipos de envenenamientos, las personas que practicaban las autopsias no tenían una herramienta adecuada con que comparar sus observaciones.<sup>9</sup>

En Bolonia prosperaron las disecciones públicas autorizadas por la iglesia con el objeto de enseñar anatomía a los médicos y no solo con fines legales. De Bolonia surge el primer libro de anatomía humana, *Anathomia corporis humani*, escrito en el 1316, obra de Mondino de Luzzi (c. 1270-1326), se trata de un manual de disección y texto anatómico que se copiaba a mano; en 1478 se edita la primera edición impresa en

Padua, desde entonces se imprimieron más de 40 ediciones. Por 200 años fue el texto indiscutido. El problema era que Mondino encontraba en las disecciones lo que decía Galeno que se debía encontrar, no lo que él veía.<sup>9,11</sup> Además, ¿cómo reconocer lo anormal si no se conocía lo normal? La anatomía humana normal estaba todavía por venir. Y sobraba la fe.<sup>9</sup>

Las disecciones públicas se convierten en regulares en Italia, luego en el resto de Europa. Tenían un aire de espectáculo social más que evento académico y se llevaban a cabo durante la época de carnaval, por el frío, en instalaciones temporales que se edificaban para la ocasión. El primer anfiteatro permanente es el construido por Fabrizio d'Acquapendente (1537-1619) en Padua, que es de 1594. Después se construyeron en Leyden (1597), Londres (1636), Bolonia (1649), Uppsala (1672) y París (1780)<sup>9</sup>.

Uno de los primeros pasos para la descripción de lo “normal” lo dio Antonio Benivieni (1443–1502), nació en el seno en una antigua y noble familia florentina, estudió en las universidades de Pisa y Siena. Escribió muchos manuscritos médicos y no médicos, pero su trabajo más famoso fue *De Abditis Nonnullis ac Mirandis Morborum et Sanationum Causis* (De algunas causas oscuras y admirables de enfermedades y curaciones), publicado en 1507, cinco años después de su muerte. Su hermano, el poeta Gerónimo Benivieni, descubrió el manuscrito y lo publicó. Antonio hizo una recopilación de 160 casos a lo largo de 32 años, aunque la publicación original solo mostraba 111 casos seleccionados por Giovanni Rosati, filósofo y médico amigo de Gerónimo, que le ayudó con la tarea de revisar el manuscrito. Los 49 casos restantes fueron ubicados por Francesco Puccinotti y publicados en 1855. De los 111 casos publicados, 16 van acompañados de un informe de “autopsia”. Estos casos determinan la trascendencia de la obra, siendo el primer libro que considera las autopsias en la búsqueda de las causas de las enfermedades<sup>5</sup>. Los registros son sucintos: “Mi tocayo, Antonio Bruno, retenía el alimento que había ingerido por un corto tiempo y después lo vomitaba sin haberlo digerido. Fue tratado cuidadosamente con toda clase de remedios para curar los

problemas gástricos, pero como ninguno le sirvió para nada, adelgazó por falta de nutrición hasta quedarse en pura piel y huesos; finalmente le llegó la muerte. El cadáver se abrió por razones de interés público. Se encontró que la apertura de su estómago se había cerrado y que se había endurecido hasta la parte más inferior, resultando en que nada podía pasar por ahí a los órganos siguientes, lo que hizo inevitable la muerte”<sup>9</sup>

El siguiente gran paso lo hizo Andrea Vesalio (1514-1564), profesor de anatomía y cirugía en Padua desde 1537, médico de Carlos V y Felipe II; él es quien se atreve a corregir los errores de la anatomía de Galeno. Con sus propias observaciones escribe, ilustra y publica en 1543 (36 años después de la publicación de Benivieni) el revolucionario *De humani corporis fabrica* (Sobre la estructura del cuerpo humano)<sup>9</sup>. A lo largo del siglo XVI, las autopsias se aceptaron de manera más amplia. La autopsia realizada en 1556 al fundador de la orden de los jesuitas, Ignacio de Loyola, proporciona una idea de la aceptación de las autopsias por parte de la Iglesia. Realdo Colombo, profesor de anatomía en Roma fue quien realizó la autopsia. En su libro *De re Anatomica*, publicado en 1559, escribió que le “extrajo piedras de la vena porta”<sup>9</sup>.

Otro hito en el uso de las autopsias como fuente de indagación de la causa de la muerte fue puesto por Théophile Bonet (1620-1689) con su obra *Sepulchretum: sive anatomia practica ex cadaveribus morbo denatis* (Sepulcros o la anatomía practicada en cadáveres de muertos por enfermedad), publicado en 1679 en Ginebra.<sup>9</sup> El título completo tiene la siguiente adición: *Proponens historias et observations omnium humani corporis effectuum, ipsorumq(ue), causas reconditas relevans* (Una explicación de las historias y observaciones de todas las enfermedades que afectan el cuerpo humano y revelando sus causas ocultas). El libro fue realmente notable y provocador en una época en que la teoría humoral de Galeno todavía dominaba el pensamiento médico.<sup>5</sup> Este manuscrito reúne los relatos de 2806 autopsias realizadas en los 200 años que preceden a las autopsias que realizó, con comentarios y referencias a las enfermedades padecidas por los pacientes a quienes se les practicó el procedimiento.<sup>9</sup> El verdadero

mérito del trabajo de Bonet es el redescubrimiento y publicación de las obras olvidadas de otros. La riqueza del material recopilado y la organización en secciones basadas en síntomas no había sido visto antes. Un punto débil es la falta de correlación organizada entre anormalidades y enfermedad, déficit que estaba asociado con el momento del desarrollo del pensamiento médico que era demasiado temprano para una conclusión lógica en última instancia. Algo que sería subsanado en otra monumental publicación.

La gigante obra de Bonet fue seguida por la de Giovanni Battista Morgagni (1682-1771) quien, en 1761, cuando tiene 79 años, publica en Venecia, *De Sedibus et Causis Morborum per Anatomen Indagatis* (El sitio y las causas de las enfermedades por la indagación anatómica). El legado de Morgagni se basa en que “sostiene que las enfermedades se deben a lesiones en los órganos y que a ellas se deben los signos y los síntomas, es el método anátomo-clínico”<sup>9</sup>. En su obra, Morgagni describe, comenta, clasifica e indiza 641 autopsias donde además de las que llevó a cabo, están las realizadas por Malpighi, Valsalva y otros médicos. El manuscrito contiene cuatro índices que correlacionan signos y síntomas con lesiones y viceversa, causas de la enfermedad, edad y oficio. Morgagni admite que sus observaciones son pocas, comparadas con las del *Sepulchretum*, la obra de Bonet, pero que cualquiera puede agregar las suyas en el esqueleto de sus índices.<sup>9</sup> La publicación de este trabajo provocó la obsolescencia inmediata de prácticamente todos los manuscritos anteriores sobre anatomía mórbida.<sup>5</sup> Además, la obra rompió definitivamente con la teoría humoral de Galeno y la sustituyó por el concepto de “anatomía patológica” como base de las manifestaciones de la enfermedad.<sup>5</sup> Sin embargo, Morgagni no introdujo nuevos métodos, ni hizo grandes descubrimientos, ni revolucionó la medicina.<sup>5</sup> Pero, podemos afirmar que Morgagni fue el punto culminante de una tradición descriptiva que había progresado constantemente desde el siglo XVI, representando el comienzo de la medicina y la patología modernas. Es mérito de Morgagni que, a partir de ese momento, hubo una aceptación creciente y, finalmente, general, de que las enfermedades eran procesos basados en órganos.<sup>5</sup>

La Revolución Francesa terminó con el Golpe de Estado del 18 de Brumario (9 de noviembre de 1799), estableciendo el Consulado de Napoleón. Sin embargo, en el campo de la medicina, el siglo XIX empezó con una revolución de otro tipo.<sup>12</sup> Marie Francois Xavier Bichat, nacido en 1771, año de la muerte de Morgagni, vivió durante la Revolución Francesa y se formó como médico militar.<sup>12</sup> Bichat sometió los tejidos a la acción de diversas condiciones químicas y físicas, como ebullición, congelación, putrefacción, desecación, etc. De esta forma, pero sin recurrir al microscopio, pudo catalogar 23 sistemas constituidos por 21 tejidos diferentes, convirtiéndose en el padre de la histología.<sup>13</sup> En su libro *Traité des membranes en général*<sup>13</sup>, afirmó: “Todos los animales son un conjunto de diferentes órganos. Estos a su vez se componen de muchas texturas de muchos tipos. Así como la química tiene sus cuerpos simples, la anatomía tiene sus tejidos simples que forman órganos”. El formidable trabajo de Bichat revolucionó la medicina: “...debemos considerar la enfermedad no desde el punto de vista de los órganos compuestos sino desde el punto de vista de sus diferentes texturas, que casi siempre se atacan por separado”.<sup>13</sup> Las enfermedades ya no eran simplemente anomalías basadas en órganos, sino que se podían rastrear a un origen basado en un concepto más amplio y global que era el de los tejidos.<sup>5</sup> Bichat murió a la edad de 31 años, siendo postulada la meningitis tuberculosa como causa probable, aunque otras teorías apuntan a una infección contraída durante una autopsia.<sup>14</sup> Sus descubrimientos fueron continuados por Réne-Théophile-Hyacinthe Laennec, su famoso alumno, y por otro francés, Gabriel Andral (1797-1876), quien publicó en 1828 un libro titulado *Précis d'Anatomie Pathologique* dividido en dos volúmenes, el primero versaba sobre patología general y el segundo sobre patología especial.<sup>5</sup> La autopsia de los muertos, practicada con avidez por Bichat, ganó legitimidad como una herramienta definitiva para el diagnóstico de enfermedades en Francia.<sup>14</sup>

La idea de la correlación entre los hallazgos de la autopsia y los síntomas de la enfermedad la propuso Corvisart en la escuela de París.<sup>15</sup> La adhesión a estos métodos

científicos dio lugar a una especie de estudio autóptico de los vivos<sup>15</sup> a través de la invención del estetoscopio por parte de Laennec, alumno de Bichat y Corvisart<sup>15</sup>. La auscultación se convirtió en un modo aceptable de examinar a los pacientes que condujo a la evolución del examen físico o, como Foucault indicó, "la era de Bichat", caracterizada por la desaparición de la "medicina de los síntomas".<sup>16</sup> Matthew Baillie (1761–1823) publicó en 1793 *The Morbid Anatomy of Some of the Most Important Parts of the Human Body*, fruto de un trabajo simultáneo e independiente del que venían realizando sus pares franceses.<sup>5</sup> Este trabajo, Baillie registró las observaciones de miles de disecciones anatómicas, realizadas por John y William Hunter (sus tíos), y por él mismo.<sup>17</sup> Muchas de estas disecciones se realizaron buscando aclarar la causa de la enfermedad y la muerte de las personas fallecidas, convirtiéndose, de esta forma, en autopsias "médicas".<sup>5</sup> La obra se basa en el estudio de los órganos y también es un tratado sobre los cambios observados en la enfermedad y las posibles causas de la enfermedad, con correlaciones clínicas entre hallazgos de la autopsia y el paciente fallecido.<sup>5</sup>

Hacia la primera década del siglo XVIII, se había establecido una base sólida para un papel nuevo y definitivo de la autopsia en la patología. La comprensión de los patrones de enfermedad en diferentes órganos había aumentado, y se vislumbraba la aparición de un nuevo concepto de tejido que trascendía los órganos macroscópicos de los anatomistas o incluso las minuciosas disecciones de los sistemas vasculares y linfáticos. En cierto sentido, el siguiente paso ya se había dado, pero de manera tentativa y sin percatarse plenamente de su potencial, es decir, el uso del microscopio. Morgagni prestó escasa o nula atención al microscopio y Bichat formuló su concepto de tejidos, sin su uso.<sup>18</sup> Si bien John Hunter había experimentado brevemente con el microscopio, el texto de *The Morbid Anatomy* de Matthew Baillie, el cual correlacionaba los síntomas con los cambios patológicos, era esencialmente una patología macroscópica.<sup>19</sup> El

microscopio siguió siendo un juguete periférico durante 200 años, sin explotar su potencial.

Todo eso estaba a punto de cambiar en el siglo XIX, y es aquí donde la contribución de Johannes Müller (1801–1858), que trabajaba en Berlín, fue tan vital que hizo posible todo lo que siguió. De hecho, se puede argumentar que Müller fue la fuente de la que surgieron tanto la histología como la patología celular.<sup>18</sup> Sin duda, fue uno de los primeros en utilizar el microscopio para el análisis de tejidos. Ya en 1830, había realizado amplios estudios de diferentes tejidos, que dieron como resultado un libro *Ueber den feinern Bau und die Formen der krankhaften Geschwülste* (Sobre la estructura más fina y la forma de los tumores mórbidos), que apareció en 1838.<sup>18</sup> En este mismo año, Theodor Schwann (1810-1882), alumno de Müller, señaló por primera vez el crecimiento celular como el principio básico de la vida animal, una tesis que estableció para siempre el carácter celular de todo crecimiento.<sup>18</sup>

La patología, en general, y la autopsia, en particular, estaban esperando a la persona adecuada para combinar los puntos de vista de Morgagni sobre la enfermedad y los conceptos de Bichat sobre los tejidos en un enfoque integrado, incorporando no solo la correlación clínica y la observación macroscópica, sino también el examen microscópico de los tejidos normales y tejidos enfermos. Este hombre fue el patólogo Carl von Rokitansky (1804–1878), uno de los hombres extraordinarios en la historia de la anatomía patológica.<sup>20</sup> Influenciado de joven por los grandes patólogos franceses y por el anatomista/embriólogo Johann Friedrich Meckel (1781–1833)<sup>20</sup>, Rokitansky fue el primero en observar los cambios patológicos en los órganos humanos siguiendo un proceso sistemático.<sup>20</sup> Correlacionó cuidadosamente la morfología con los síntomas clínicos y con la patogenia de la enfermedad. Su método de autopsia preservó la cohesión anatómica y fisiológica. La inspección durante la autopsia incluyó cada parte del cuerpo en cada caso examinado, un enfoque que Virchow también promovería más tarde. Cada cuerpo fue acompañado de la historia clínica para llegar a una correcta

correlación clinicopatológica.<sup>21</sup> Fue el primero en llevar las observaciones de Morgagni a un nivel superior. El trabajo de Rokitansky lo convirtió en el mejor patólogo descriptivo de su época y llevó a Rudolf Virchow (1821-1902) a atribuirle el título de "Linné de la anatomía patológica", a pesar de que la microscopía no jugó un papel importante en la vida de Rokitansky.<sup>20,21</sup> No obstante, el trabajo pionero de Rokitansky estableció la autopsia como el método principal para investigar los mecanismos de la enfermedad y, al mismo tiempo, sentó las bases para el surgimiento de la patología como una especialidad reconocida.<sup>21</sup>

En los años siguientes, se prestó mayor atención a los detalles de las técnicas de autopsia y a la estandarización de los procedimientos. Cuando Virchow fue designado para ayudar al prosector en la Charité en 1844, encontró una falta de procedimientos organizados en la morgue.<sup>5,22</sup> Solo unas pocas autopsias eran realizadas por el propio fiscal y solo por pedido especial. La mayoría de los casos fueron realizados por auxiliares quirúrgicos con poca o ninguna formación técnica previa, por lo que "era una cuestión de dificultad hacer algún descubrimiento".<sup>5</sup> Esto motivó a Virchow a publicar un folleto sobre técnicas de autopsia en 1876, el que posteriormente se utilizó de forma amplia.<sup>5,22</sup> La necesidad de estandarización no fue una observación aislada, en otros países también se llevaron a cabo esfuerzos por sistematizar los procesos autópsicos; así se puede observar en EE. UU. la publicación en 1872 de *A Handbook of Post mortem Examination and Morbid Anatomy* (más tarde reescrito y ampliado en *A Handbook of Pathological Anatomy and Histology* en 1885) por Francis Delafield (1841–1915).<sup>5</sup>

Desde la primera mitad del siglo XIX hasta bien entrado el siglo XX, las autopsias fueron fundamentales para el progreso médico, y también se llevaron a cabo por otros motivos; un ejemplo es la fundación de *La Société d'Autopsie Mutuelle* en París en 1876.<sup>5,23</sup> Esta sociedad fue creada por miembros (ateos) de la Sociedad de Antropología con el objetivo de demostrar que las almas no existían, permitiendo, después de la muerte, realizar autopsias entre ellos.<sup>5,23</sup>

Desde aproximadamente 1970, ha habido un profundo declive en las tasas de autopsias, principalmente debido a la falta de interés de los clínicos.<sup>5</sup> Muchos de ellos consideran que los modernos análisis bioquímicos, moleculares y radiológicos proporcionan suficiente información, por lo que consideran que la autopsia no agrega mucho a lo que ya se sabe. Sin embargo, estudios publicados contradicen esta idea, demostrando que la autopsia revela enfermedades significativas desconocidas para los médicos antes de la muerte en un rango del 25% al 39.3% de los pacientes<sup>24-27</sup>, estas tasas se han observado en diversos estudios realizados en diferentes países, tanto de alta como mediana renta. Incluso en áreas altamente especializadas y con los suficientes recursos, como son las Unidades de Cuidado Intensivo de un país de alta renta,<sup>28</sup> se pueden hallar importantes porcentajes de discrepancias (errores tipo Goldman I, es decir, errores con implicancia en la sobrevida<sup>29</sup>) de hasta el 7.5%.<sup>28</sup> A pesar de las pruebas a favor de su uso, el declive de la autopsia médica, como una herramienta útil para la investigación de la enfermedad y la muerte, continúa.<sup>5</sup>

## *2. ¿Por qué tenemos que contar las muertes?*

Alrededor de la mitad de las personas en el mundo, la mayoría de ellas habitantes de países de baja y mediana renta, además de nacer y vivir sin ningún registro oficial de su existencia, mueren sin que conste información sobre su muerte.<sup>30</sup> La ausencia de datos confiables sobre las causas de muerte (CdM) se ha señalado como un factor limitante para reducir la mortalidad en el mundo<sup>31</sup>, pero también es un ejemplo de uno de los fracasos que presenta nuestra sociedad, a una escala global.<sup>32</sup>

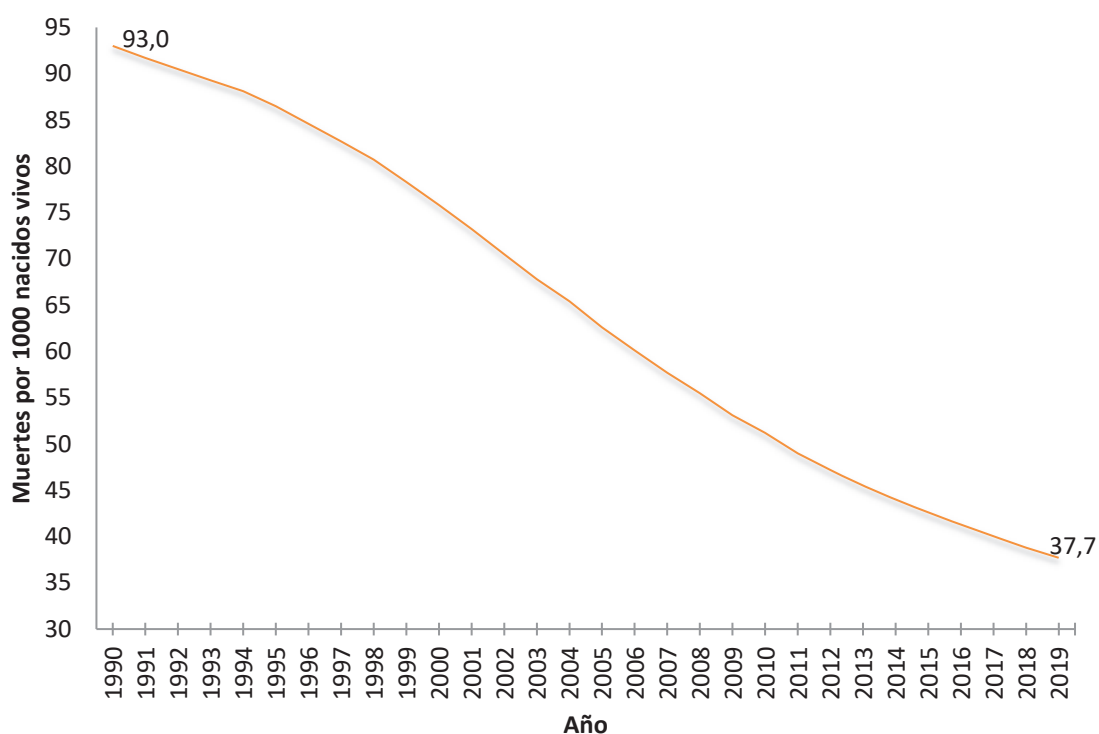
Entonces, ¿por qué tenemos que contar las muertes? Para poder desarrollar un planteamiento y discutir sobre políticas de salud es necesario tener información sobre la magnitud (cuántas personas fallecen y por qué) de los problemas que atañen a este campo<sup>33</sup>, sin esta información, no es posible implementar una adecuada planificación y

asignación de los recursos con los que se cuenta, muy valiosos y ya de por sí escasos. Además, la falta de información sobre las CdM afecta de forma desigual a las personas en el mundo. Algunos de los grupos en los cuales se hace patente esta desigualdad son los niños menores de 5 años, las mujeres gestantes y las personas que viven en países de baja y mediana renta.

### *2.1. Muertes en niños menores de 5 años*

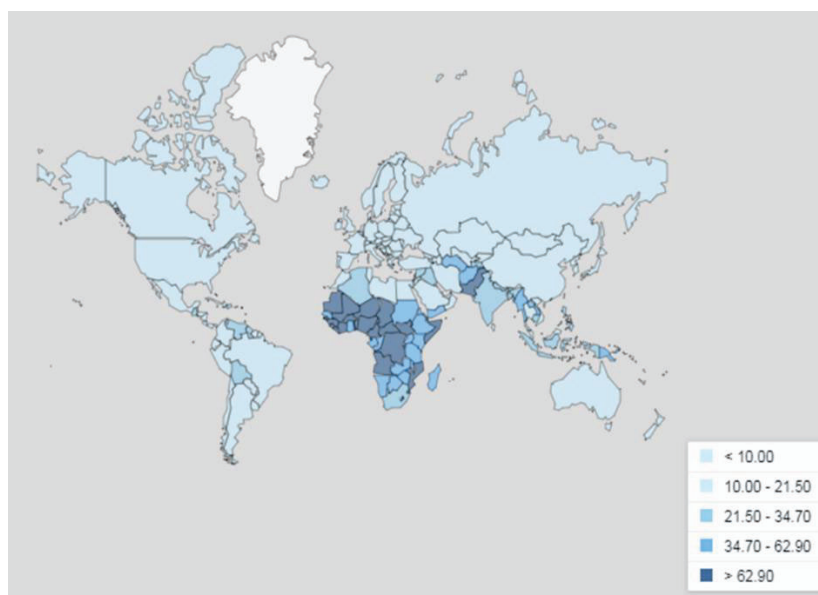
A nivel mundial se ha conseguido un progreso notable en la supervivencia infantil en las últimas tres décadas. Como consecuencia de este avance, actualmente millones de niños tienen mejores posibilidades de supervivencia que en 1990. Un indicador importante es la tasa de mortalidad infantil, es decir, la cantidad de muertes por cada 1.000 nacimientos vivos. Además, éste es un indicador relevante para entender la salud general de una población, ya que muchos factores que contribuyen a las muertes infantiles también afectan a la salud del resto de personas que viven en la misma comunidad.<sup>34</sup> En el 2019 uno de cada 27 niños murió antes de cumplir los cinco años, en comparación con 1 de cada 11 en 1990. Adicionalmente, la reducción de las tasas interanuales de mortalidad infantil se ha acelerado en el período 2000-2019 en comparación con el periodo de 1990-1999 (ver Gráfico N° 1).<sup>35</sup>

A pesar del progreso mundial en la reducción de las tasas de mortalidad infantil durante las últimas décadas, éste es muy desigual en las distintas regiones que reportan a la OMS (ver Figura N° 1).<sup>36</sup> El África subsahariana y el sur de Asia contribuyeron con el 81% de 5,9 millones de muertes de menores de 5 años<sup>37</sup> y el 77% de los 2,6 millones de los óbitos fetales en todo el mundo en 2015.<sup>38</sup> Esto se repite en las estimaciones del 2019: de los 5,2 millones de muertes estimadas en niños menores de cinco años para ese año, más de la mitad de esas muertes ocurrieron en África subsahariana.<sup>39</sup>

**Gráfico N° 1.** Mortalidad infantil menores de 5 años (global). Periodo 1990-2019.

Tasa de mortalidad de niños menores de 5 años (por 1000 nacidos vivos). Tomado de: United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation (UN IGME) 2020.<sup>35</sup>

La identificación y análisis de las etiologías de la mortalidad infantil se ve obstaculizada por una serie de factores tales como una alta proporción de muertes infantiles en la comunidad, inadecuado acceso (o en no pocos casos, ausencia de acceso) a los servicios médicos, insuficientes recursos (materiales y humanos) para el diagnóstico de las enfermedades, patologías coexistentes (que son difíciles de distinguir con las herramientas disponibles), sistemas de registro vitales mal organizados o ausentes, y uso de métodos con validez y precisión insuficientes para la determinación de la CdM.<sup>31,40-44</sup> Por ello, los niños en regiones de bajo y mediano ingreso a menudo fallecen sin una identificación de la causa de la muerte. La escasez de datos de buena calidad sobre mortalidad infantil limita las capacidades de los países, en especial los de menos ingresos, para priorizar de manera óptima los escasos recursos destinados a reducir la mortalidad.<sup>45</sup>

**Figura 1.** Mortalidad infantil menores de 5 años (global) en el año 2019.

Fuente: <https://data.worldbank.org/indicador/SH.DYN.MORT?view=map>. Fecha de acceso 2 marzo de 2021. La figura ha sido modificada.<sup>36</sup>

## 2.2. Muertes maternas

La mortalidad materna se define como el número anual de muertes de mujeres por cualquier causa relacionada o agravada por el embarazo o su tratamiento (excluidas las causas accidentales o incidentales) durante el embarazo y el parto o dentro de los 42 días posteriores a la interrupción del embarazo, independientemente de la duración y el lugar del embarazo.<sup>46</sup> La mortalidad materna, al igual que la mortalidad infantil, ha mostrado una reducción a nivel global.<sup>47</sup> Entre el periodo de 2000 al 2017 se estima que la mortalidad materna se ha reducido en 38,4%<sup>48</sup>, pero continúa siendo, en palabras de la OMS, inaceptablemente elevada.<sup>47</sup> En 2017 se estimó la mortalidad materna en 295.000 muertes (intervalo de incertidumbre de 279.000 a 340.000), con una tasa de 211 muertes maternas por cada 100.000 nacidos vivos.<sup>48</sup> Esto representó de 764 a 932 muertes maternas cada día de 2017.<sup>48</sup>

La distribución de la mortalidad materna es desigual a nivel mundial. El 94% de las muertes maternas se concentraron en regiones de bajos recursos.<sup>47</sup> Si nos centramos en las muertes maternas estimadas para África subsahariana (196.000) y el sur de Asia (58.000) vemos que entre ambas regiones suman el 86% de todas las muertes maternas estimadas para 2017. La reducción para estas dos regiones ha sido dispar; mientras que el sur de Asia disminuyó en un 59,2% la tasa de mortalidad materna, en el África subsahariana solo se consiguió una reducción de 38,3% (esta región aportó las dos terceras partes de las muertes maternas en el mundo para el 2017).<sup>48</sup> Además, hay una clara brecha en el número de muertes maternas en los países de baja renta (PBR) en comparación con los países de alta renta (PAR). Para el 2017 se estimó que la tasa de mortalidad materna de los PBR fue de 462 por 100.000 nacidos vivos, mientras que para los PAR fue de 11 por 100.000 nacidos vivos.<sup>48</sup>

La elevada mortalidad materna en algunas regiones del mundo refleja las inequidades en el acceso a los servicios de salud. Diez países se encuentran con las tasas de mortalidad materna más elevadas: Sudán del Sur, Chad, Sierra Leona, Nigeria, República Centroafricana, Somalia, Mauritania, Guinea-Bissau, Liberia y Afganistán. Estos países también tienen en común la interrupción o pérdida de sus redes de servicios de salud como consecuencia de periodos de crisis o de inestabilidad social y política.<sup>48</sup>

Por otro lado, el número de gestantes que son asistidas durante el parto en los servicios de salud a nivel mundial se ha incrementado; en 1990 se estimó que el 58% de los partos fue institucionalizado<sup>49</sup>, mientras que para el periodo 2014-2019 la estimación fue de 81%.<sup>50</sup> Este incremento del parto institucionalizado no ha significado un incremento notable en el cuidado de las mujeres durante el parto o puerperio. En el África subsahariana, donde se estima que ocurren el 66% de las muertes maternas globales, el 60% de los nacimientos fueron asistidos por personal de salud en el periodo 2014-2019.<sup>50</sup>

Otro problema sumado al inadecuado manejo clínico durante el parto y puerperio<sup>51</sup> es el registro de la CdM, el cual tiene serias limitaciones debido a las frecuentes discrepancias entre la presunta CdM registrada y la real.<sup>52</sup> Esto ha llevado a afirmar que existe una necesidad urgente de estudios centrados en proporcionar un conocimiento preciso de las causas de muerte materna en las regiones de baja y mediana renta.<sup>53,54</sup>

### *2.3. Muertes en países de baja y mediana renta*

La OMS estima que solo alrededor de la mitad de las muertes en todo el mundo se registran con una causa confiable, y la mayoría de las muertes no registradas ocurren en África y Asia.<sup>55</sup> Una limitación para reducir la mortalidad a nivel mundial, en especial en los países de baja y mediana renta, es la poca confianza en la precisión de las estimaciones, en particular en las relacionadas con la CdM.<sup>56-61</sup> Esta falta de información precisa sobre la CdM en muchas regiones de bajos ingresos se explica en gran medida por el número significativo de muertes que ocurren fuera de los servicios de salud, como el hogar.<sup>58,60</sup> También hay que tener en cuenta los errores clínicos durante la atención y diagnóstico, que se han detectado en hospitales bien equipados, son más frecuentes en entornos con recursos limitados.<sup>62-64</sup> Además si una persona fallece en un establecimientos de salud con escasos recursos, existen importantes limitaciones tanto de personal calificado como de métodos de diagnóstico precisos para determinar la CdM; pero también al número muy limitado de autopsias diagnósticas realizadas en parte debido a la escasez masiva de patólogos capacitados.<sup>60</sup> De esta forma, la determinación de la CdM en regiones de bajos ingresos sigue dependiendo de estimaciones basadas en registros clínicos y otro método de amplio uso y respaldado por la OMS, denominado autopsia verbal (AV).

La AV consiste en una entrevista estructurada a los testigos de la muerte interpretados y codificados posteriormente por médicos o mediante métodos informáticos<sup>65</sup>, siendo el

enfoque más práctico y comúnmente utilizado para estimar la causa de muerte a nivel de población en entornos de bajos ingresos.<sup>65,66</sup> Se ha demostrado que el método proporciona resultados inconsistentes a lo largo del tiempo y el lugar.<sup>67</sup> Además, su precisión diagnóstica depende de la CdM, que es alta cuando la enfermedad tiene un conjunto de signos y síntomas característicos y bien definidos, pero mucho menor para condiciones con síntomas inespecíficos, en particular, malaria e infección respiratoria aguda en niños, o meningitis en niños. Esto da como resultado frecuentes clasificaciones erróneas de la CdM, que a su vez conduce a tasas de mortalidad por causas específicas inexactas.<sup>66</sup> Se han desarrollado métodos computarizados de interpretación del cuestionario de AV para superar algunas de las limitaciones de la técnica. Estos métodos se basan en algoritmos derivados de muertes con una CdM confirmada médicamente o en análisis probabilísticos<sup>68</sup>, sin embargo, ni la VA codificada por computadora ni las técnicas de VA certificadas por un médico se han validado frente a la autopsia diagnóstica completa, el verdadero estándar de oro para la determinación de la CdM.<sup>33</sup>

### *3. Herramientas para la identificación de las causas de muerte: ventajas y limitaciones*

#### *3.1. Certificados de defunción*

Los certificados de defunción forman parte de los registros civiles y estadísticas vitales (RCEV). La División de Estadística de las Naciones Unidas (UNSD, siglas en inglés de *United Nations Statistics Division*) define el registro civil como “el registro continuo, permanente, obligatorio y universal de la ocurrencia y características de los hechos vitales de la población, conforme a lo dispuesto por decreto o reglamento de

conformidad con los requisitos legales de cada país”.<sup>69</sup> Los hechos vitales comprenden el nacimiento vivo, la muerte, la muerte fetal, el matrimonio, el divorcio, la nulidad del matrimonio, la separación judicial del matrimonio, la adopción, la legitimación y el reconocimiento.<sup>69</sup> Por tanto, el registro civil es la mejor fuente de estadísticas vitales ya que constituye “la recopilación de estadísticas sobre hechos vitales en la vida de una persona, así como características relevantes de los hechos mismos y de la persona y las personas en cuestión”.<sup>69</sup> El enorme beneficio que nos puede proporcionar un los RCEV se ve contrapuesto con la realidad, los sistemas de RCEV siguen siendo débiles a nivel mundial, para el 2017 solo el 55% de los países habían reportado el 90% de las muertes sucedidas en su territorio<sup>70</sup>, y aunque esto ha mejorado (actualmente el porcentaje está en el 68%)<sup>71</sup>, aún hay una brecha muy grande, a esto se suma que existen países de baja y mediana renta que no tienen sistemas de RCEV en funcionamiento.<sup>49</sup>

El certificado de defunción es un documento importante para los RCEV<sup>69</sup> y en cierta forma pueden ser considerado como un constructo ambicioso y a la vez impersonal de la sociedad creada para lidiar con la muerte. La burocracia ha convertido estos certificados en una singular manera de llevar un registro de las defunciones. Aunque surgieron por un accidente histórico, han evolucionado para cumplir una función relevante en salud pública.<sup>72</sup> Sin embargo, incluso los médicos encargados de completarlos pueden cometer errores al ingresar los datos.<sup>73</sup> Pero también, en parte, es una forma de identificación personal, convirtiéndose, sin querer, en el más misterioso de los visados que se puedan estampar en algún pasaporte. Y, por otro lado, también son una pista. De las aproximadamente 56 millones de personas que morirán este año, cerca de un tercio obtendrá un certificado de defunción.<sup>1</sup> Esa cifra incluye todas las muertes en todas las naciones desarrolladas del planeta: mujer, hombre, niño, recién nacido y óbito fetal. Los otros dos tercios fallecerán en los lugares más pobres del mundo, lugares que carecen de las infraestructuras médica, personal entrenado y

andamiaje burocrático para la documentación del final de sus vidas.<sup>1,74</sup> Sin embargo, incluso con tantas personas de las cuales no se tiene constancia de su muerte, este número representa la difusión de una relevante idea, la cual es que la muerte debe ser contabilizada, y que al documentar cada fallecido y cada posible CdM podemos ayudar a salvar vidas, muchas vidas<sup>75</sup>, uno de los objetivos más relevantes de la salud pública.<sup>76</sup>

El antecedente del certificado de defunción moderno surgió a principios del siglo XVI en Inglaterra, bajo el registro conocido como *Bills of Mortality*<sup>77</sup>. Los *Bills* son mejor conocidos por su papel en la vida londinense del siglo XVII, en gran parte gracias a la obra de John Graunt, *Natural and Political Observations on the Bills of Mortality* (cinco ediciones, 1662-1676)<sup>77</sup> Se ha propuesto que este interés por contar los muertos provino de la gran mortandad provocada por la peste.<sup>78</sup> La segunda pandemia o Peste Negra (la primera se produjo en época de Justiniano, circa 541, y la tercera empezó en la región de Yunnan, China, alrededor de mediados del siglo XIX y que aún continúa<sup>79</sup>) llegó a Messina (Sicilia), probablemente desde Asia Central a través de barcos genoveses que transportaban ratas cargadas de pulgas en octubre de 1347 (otros opinan que fue a través de diversas vías comerciales terrestres y marítimas de la Ruta de la Seda medieval)<sup>79</sup>, lo que inició una ola de infecciones de peste que se extendió rápidamente por la mayor parte de Europa con una velocidad demoledora.<sup>80-82</sup> En 1352, un tercio o más de toda la población europea estaba muerta.<sup>79</sup> Con un gran porcentaje de la población restante infectada y el resto aterrorizada, la plaga convirtió la experiencia privada de la muerte en un asunto de extrema preocupación pública. Ante estos eventos, las sociedades europeas buscaron tomar medidas, Italia respondió aprobando las primeras leyes modernas de cuarentena, rastreando a los vivos.<sup>80,83</sup> Inglaterra tomó una ruta diferente y comenzó a rastrear a los muertos.<sup>84</sup> Los *Bills of Mortality* de Londres fueron precedidos por registros vitales comparables en Barcelona durante los siglos XV y XVI.<sup>85</sup> La alta mortalidad recurrente por la peste en ambas ciudades motivó el registro de defunciones. Graunt defendió, como veremos luego, los registros de Londres como

herramientas para que los magistrados pudieran evaluar el crecimiento poblacional de la ciudad en relación con el resto del país.<sup>78</sup> En Barcelona, las autoridades locales ordenaron un recuento exacto de las muertes por peste para evitar rumores exagerados sobre la magnitud de la desgracia de la ciudad.<sup>85</sup> Estos casos resaltan la importancia de los registros vitales para comprender y abordar las enfermedades y sus efectos en la población; de esta forma, los registros históricos proporcionan valiosa información sobre las epidemias y su impacto en las comunidades, lo que sigue siendo relevante para la salud pública en la actualidad.

Retornando a los *Bills of Mortality* de Londres, estos fueron copias manuscritas distribuidas solo a los niveles de administración pública superiores de la ciudad de Londres. Sin embargo, durante la epidemia de 1592, el impresor de la ciudad comenzó a producir copias semanales a gran escala de los informes de la plaga, colocándolos en áreas públicas de la ciudad.<sup>72,77</sup> Para conseguir esto, la *Company of Parish Clerks* (encargada de su publicación) tuvo que recolectar, compilar y difundir datos sobre mortalidad. La primera etapa, recopilación de datos, empezaba cuando alguien moría, se tocaba la campana de la iglesia parroquial y el sacristán (que tenía la responsabilidad de preparar la tumba) alertaba a los buscadores. Los buscadores no eran profesionales de la medicina: por lo general, eran parejas de mujeres mayores que recibían dinero de la parroquia y su trabajo era determinar la causa de la muerte.<sup>84,86</sup> Se puede criticar esta medida y hacer notar que es un punto débil, pero hay que tener en cuenta que (sea fuera o durante los años de la peste) no era factible haber contratado a médicos, boticarios o cirujanos para determinar las causas de la muerte en la escala requerida. Aun si hubiera sido posible, los datos recogidos sobre la CdM no habrían sido muy diferentes (no fue hasta 1761 con la publicación de la obra de Morgagni que se rompió definitivamente con la teoría humoral de Galeno y se sustituyó por el concepto de “anatomía patológica” como base de las manifestaciones de la enfermedad)<sup>5</sup> La segunda etapa era la compilación de los datos, la información debía de llegar desde los

buscadores hasta el *Parish Clerks' Company Hall*, esto se consiguió a través de las órdenes publicadas por la Corporación de Londres en 1625.<sup>78</sup> Las órdenes establecen que los buscadores deben “*by vertue of their oath, make true report to the Constable of that precinct...to the intent that true notice may bee given...to the Clarke of the Parish, and from him to the Clarke of the Parish Clarkes, that true certificate may be made*”<sup>84</sup>. Romper esta cadena de comunicación era castigada.<sup>84</sup> Un evento importante dentro de esta etapa fue minimizar los errores, esto se logró mediante la elaboración de formularios preimpresos para acelerar el proceso de recopilación de datos y disminuir la tasa de errores.<sup>84</sup> La tercera etapa implicaba un proceso de revisión e impresión para convertir múltiples informes parroquiales en una sola y concisa *Bills of Mortality*.<sup>86</sup> A partir de las 1640, se estableció que cada martes (18:00 horas) fuera la fecha límite para que se depositaran los reportes en un buzón especial en el *Company Hall*.<sup>78,84</sup> Los datos de los reportes se cotejaban y las *Bills* se imprimían los miércoles; las copias se entregaban al alcalde y regidores, y al rey y al consejo privado, el jueves por la mañana, un par de horas antes de que se pusieran a disposición del público en general.<sup>84</sup> Por último, la cuarta etapa consistía en la distribución, la cual asumió dos formas: entrega a suscriptores y venta única. En la calle, los *Bills* entraron en un mercado intensamente competitivo de vendedores ambulantes, muy propensos a la fricción.<sup>84</sup> Las actas de la *Company of Parish Clerks* dan parte de quejas y multas por las ventas callejeras, que al parecer fueron lucrativas.<sup>84</sup>

Así vieron la luz los *Bills of Mortality*: listas semanales de los muertos por peste, desglosadas por parroquia.<sup>78,84</sup> El *Bills of Mortality* más antiguo conocido es un solo documento manuscrito, que se cree que data de 1512, que establece que en la ciudad de Londres, entre el dieciséis y el veintitrés de noviembre, treinta y cuatro personas murieron de "la plaga" y treinta y dos de "enfermedades" no especificadas.<sup>84</sup> No apareció información sobre los muertos en las primeras listas, ni siquiera sus nombres. Y los propios *Bills of Mortality* aparecieron solo esporádicamente Su propósito previsto parece

haber sido ayudar a las personas sanas a mantenerse alejadas de las zonas más peligrosas (desde el punto de vista de sufrir contagio) de la ciudad.<sup>84</sup>

Visto así, en su forma original, los *Bills of Mortality* no eran un dispositivo particularmente poderoso o inspirado. Pero, cien años después de su introducción, dos modificaciones alteraron tanto la función de los *Bills of Mortality* como el futuro de la salud pública. Primero, en 1603, los *Bills of Mortality* comenzaron a aparecer semanalmente en lugar de por episodios, y lo hicieron de manera continua durante los siguientes doscientos treinta y tres años.<sup>77,84</sup> Segundo, en 1629, durante una pausa en la plaga, la corte del rey Jaime I ordenó a los secretarios parroquiales que añadan a la contabilidad las muertes por otras causas.<sup>87</sup> Vistos con perspectiva, el primer cambio convirtió las listas de mortalidad en uno de los conjuntos de datos más ricos de la historia. El segundo, los convirtió en un reporte pionero: un sistema ordenado por el estado para registrar por qué mueren las personas.

La costumbre de confeccionar listas numerando los fallecidos, así como las causas de sus muertes se trasladó a las colonias británicas en América. En 1632, la Asamblea General de Virginia aprobó una ley que requería que las parroquias llevaran un registro de bautizos, matrimonios y entierros; pero pocos años después, en 1639, la Colonia de la Bahía de Massachusetts aprobó una ley similar, incluyendo dos diferencias importantes: el registro sería realizado por un funcionario del gobierno en lugar del clero, además, se registraron nacimientos y defunciones, permitiendo un registro de infantes que morían antes de ser bautizados y feligreses enterrados sin un servicio formal.<sup>88</sup> Esta práctica demostró la importancia de la sanidad pública al exigir el registro de nacimientos y defunciones.

El certificado de defunción se convirtió en una herramienta de epidemiología con el avance del pensamiento científico y su uso como identificación personal por parte del estado. En el siglo XVIII, durante las revoluciones políticas, se hizo necesario registrar la vida y muerte de cada ciudadano, lo cual podría entenderse como la búsqueda de la

igualdad, pero también como un mecanismo de vigilancia estatal. Inicialmente, los registros eran numéricos y anónimos, pero evolucionaron hacia listas con nombres y apellidos, y finalmente a registros individuales. Aunque en aquel entonces, el número de las causas de muerte se expandió considerablemente, algunas de ellas parecían sorprendentes desde la perspectiva actual de la sanidad pública. Entre las causas de muerte se encontraban morir por intoxicación con lejía, por bancarrota, ser devorado por piojos, muertes repentinas y otras causas.<sup>78</sup> Hubo que esperar a fines del siglo XVIII e inicios del XIX para encontrar una revolución en la comprensión de la muerte; visto de esta forma la lista de causas de muerte anterior no parecería un comienzo del todo prometedor. Pero a mediados del siglo XVII, un mercero y miembro de la *Royal Society of London* llamado John Graunt se interesó por la cuestión de qué morimos.<sup>77,78,84,89</sup> Como muchos comerciantes exitosos, Graunt era un contable meticuloso y se dio cuenta de que podía usar los *Bills of Mortality* para calcular los números cuando las personas mueren.<sup>77,89</sup> Después de revisar veinte años de los *Bills*, Graunt compiló una lista de ochenta y una causas de muerte, que dividió en cuatro categorías principales: enfermedades crónicas, enfermedades epidémicas, condiciones que mataron a niños y lesiones (dolores externos).<sup>77,89</sup>

No fue hasta 1836 que se produjo un nuevo aporte en el sistema de reportes de muertes. El hombre que hizo este avance fue William Farr, quizás el sucesor más importante de Graunt, y uno de los fundadores de la epidemiología.<sup>89</sup> Es en 1836 que Inglaterra reemplazó los *Bills of Mortality* con lo que se convertiría en el prototipo global de un sistema moderno de registro de defunciones, y se creó la Oficina de Registro General para administrarlo. La oficina abrió en 1837 y Farr se convirtió en su primer director.<sup>89,90</sup> Farr es en gran manera, el padre de la actual Clasificación Internacional de Enfermedades. Gran parte de su trabajo en la Oficina del Registro General consistió en aprovechar y mejorar las clasificaciones de enfermedades preexistentes.<sup>89</sup> Gracias a esta labor el 1º Congreso Internacional de estadística reunido en Bruselas en 1853

reconoció la utilidad de una clasificación uniforme de las causas de defunción, de tal manera que encargó a los doctores W. Farr y M. D'Spiner que "prepararan una nomenclatura uniforme de causas de defunción aplicable a todos los países".<sup>89,90</sup>

La clasificación sobre la que trabajó Farr estaba originalmente estructurada en cinco grupos: enfermedades epidémicas, enfermedades constitucionales, enfermedades localizadas y subclasificadas por la localización anatómica, enfermedades del desarrollo y enfermedades que son consecuencia de un traumatismo. La clasificación resultante contenía ciento treinta y nueve formas de morir, desde "Muertes por accidente o violencia" hasta "Muertes por vejez". Aun hoy en día es fácil reconocer este tronco común en la estructura de la clasificación vigente.

Si bien en la reunión de 1855 se confeccionó una lista ecléctica entre la presentada por Farr y la D'Spiner, en la revisión de esta clasificación en París en 1864 así como en las revisiones sucesivas de 1874, 1880 y 1886, se terminó imponiendo los principios de la clasificación de Farr.<sup>89,90</sup>

Sin embargo, el avance definitivo se produjo cuarenta años después, cuando la clasificación fue revisada por un comité encabezado por el estadístico y demógrafo francés Jacques Bertillon. Bertillon duplicó las categorías de la lista anterior de siete a catorce, amplió las causas de muerte de ciento treinta y nueve a ciento sesenta y una, y las organizó, como todavía lo hacemos hoy, por sistemas anatómicos: Enfermedades del sistema circulatorio, enfermedades del sistema respiratorio, etc. El resultado fue publicado en 1893, como Lista Internacional de Causas de Muerte.<sup>89,90</sup>

Ciento veinte años después, esa lista todavía está con nosotros. Hoy en día, es administrado por la Organización Mundial de la Salud y se conoce como Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas de Salud Relacionados o, más comúnmente, la CIE, que va por la versión 11.<sup>46</sup> La CIE todavía refleja la estructura original de Bertillon, pero se ha expandido prodigiosamente en el transcurso de once revisiones. Como sugiere su nuevo nombre, eso se debe en parte a que ahora incluye

entradas para enfermedades no mortales y mucho más. En conjunto, esas entradas del CIE se utilizan para codificar y estandarizar las causas de muerte en los certificados de defunción. A partir de la Segunda Guerra Mundial, la OMS cedió al deseo de los hospitales y las compañías de seguros de utilizar el CIE para fines de facturación; como resultado, ahora contiene entradas para cada interacción imaginable de atención médica. A modo de ejemplo, tenemos el código QE50.4 para codificar las desavenencias con los suegros, o el código MB23.F para cuando hallemos a alguien con aspecto personal extraño o peculiar.<sup>46</sup>

No obstante, el esclarecimiento de la causa de la muerte continúa presentando un desafío de magnitud considerable. Cuanto mayor es el esfuerzo por documentarla mediante certificados de defunción, más complejo y enigmático se torna dicho objetivo.

Un claro ejemplo del tamaño del desafío, comentado líneas arriba, se encuentra en la introducción de los datos en los certificados de defunción. Para completar un certificado de defunción es necesario revisar documentos que nos ayuden a terminar esta tarea. Las instituciones encargadas de vigilar el correcto “llenado” de los certificados de casi todos los países disponen de diversos manuales que contienen instrucciones oficiales sobre como completar un certificado de defunción. En EE. UU., por ejemplo, están disponibles el Manual del médico sobre certificación médica de defunción<sup>91</sup>, el Manual de directores de funerarias sobre registro de defunción y notificación de defunción fetal<sup>92</sup> y el Manual para examinadores médicos y forenses sobre registro de defunciones y notificación de defunciones fetales<sup>93</sup>, y esto es sin mencionar varias pautas complementarias. En el Reino Unido existe una Guía para médicos que completan los Certificados Médicos de Causa de Defunción.<sup>94</sup> En España se publicó en el 2011 la ley del Registro Civil, la cual se encuentra en vigor.<sup>95</sup> Con toda la información necesaria para completar un certificado de defunción, aparece la pregunta ¿por qué se deben de revisar estos documentos para completarlos? Una posible respuesta es que son difíciles de completar. En varios países, la tarea de hacerlo a menudo recae en residentes,

médicos y médicas en formación especializada, o en personal médico joven. Las dificultades surgen casi exclusivamente en la sección de CdM, que consta de solo cuatro líneas. En el primero, se indica a los médicos que ingresen la "causa inmediata" de la muerte, definida en el formulario como la "enfermedad o afección final que provocó la muerte". En la segunda línea, los médicos ingresan lo que causó la afección en la primera línea, y en la tercera línea ingresan lo que causó la condición en la segunda línea. La última línea está reservada para la "causa subyacente de la muerte"<sup>73,91</sup>: "la enfermedad o lesión que inició la cadena de eventos mórbidos que condujeron directa e inevitablemente a la muerte".<sup>91</sup> Es esta línea la que se convertirá en un código CIE y se identificará como la CdM.

Lamentablemente, los certificados de defunción no siempre reflejan escrupulosamente la verdad. Desde el principio, se han visto comprometidos tanto por los límites del conocimiento médico como por prácticas de informes poco fiables. En 1662, John Graunt se quejó de que la sífilis no se informó como CdM porque los investigadores médicos no la reconocieron "después de la niebla de una taza de cerveza y el soborno de una tarifa de dos lechadas".<sup>78</sup> La práctica de traficar con los certificados de defunción se ha desvanecido (aunque no ha desaparecido), pero persisten otros problemas de notificación. En 2010, investigadores del Centro Hospitalario St. Luke's-Roosevelt y la Universidad de Columbia encuestaron a quinientos veintiún médicos residentes de treinta y ocho programas de residencia en la ciudad de Nueva York.<sup>96</sup> Solo un tercio creía que los certificados de defunción eran precisos. Casi la mitad informó haber enumerado a sabiendas una CdM inexacta, y ese número aumentó a casi el sesenta por ciento entre los residentes con más experiencia. Aquellos que enumeran intencionalmente causas inexactas típicamente eligen las familiares, con el resultado de que las causas comunes de muerte parecen aún más comunes y las raras más raras. El *Framingham Heart Study* (Fox *et al.*)<sup>97</sup>, un estudio longitudinal en curso en Massachusetts encontró que los certificados de defunción exageran la enfermedad

coronaria como CdM hasta en un veinticuatro por ciento en la población general y en un porcentaje mucho mayor (76%) en personas mayores de 65 años.<sup>97,98</sup>

La pregunta que cae por su propio peso es ¿Por qué las personas encargadas de completar los certificados de defunción no consignan información fidedigna en estos formularios? Parte del problema es una formación inadecuada. En el estudio de Wexelman *et al.*<sup>96</sup> en Nueva York, únicamente dos de cada cinco participantes indicaron haber recibido alguna instrucción sobre la manera adecuada de completar un certificado de defunción, y solo uno de cada cinco había cursado el módulo de formación, supuestamente obligatorio, ofrecido por la ciudad. Sin embargo, cuando se les interrogó, también identificaron otros inconvenientes. En ocasiones, el sistema de registro de defunciones no validaba la causa que ellos consideraban correcta. En otras, un administrador hospitalario les contradecía. En algunas instancias, nunca habían tenido contacto con el paciente. Menos del tres por ciento reportó haber rectificado alguna vez un certificado de defunción en base a nueva información obtenida.

Los errores inducidos en los certificados de defunción, a raíz de una formación insuficiente o inapropiada y otros problemas sistémicos, son preocupantes. Estos errores sobredimensionan las causas predominantes de fallecimiento, ocultan las emergentes y alteran los datos empleados para destinar fondos a la investigación, educación, prevención y tratamiento de enfermedades. No obstante, las respuestas incorrectas o erróneas representan solo una fracción del problema. Un desafío aún más intrigante y arduo reside en determinar qué constituye una respuesta acertada.

Los certificados de defunción plantean un desafío: ¿hasta qué punto seguimos la cadena causal y cuántas cadenas investigamos? Con el aumento de la longevidad y condiciones como la inmunodepresión, las muertes multifactoriales podrían ser la norma. Pero las múltiples causas distorsionan las estadísticas de mortalidad, pues los certificados no están diseñados para registrar más de una causa principal. Finalmente,

nos enfocamos en las causas que nos parecen más relevantes y, a su vez, las causas identificadas definen nuestras preocupaciones.<sup>99</sup>

El cuestionamiento acerca de las limitaciones en la captura de causas de muerte en los certificados de defunción no es nuevo. En un estudio de 1993, ahora convertido en un clásico, Foege y McGinnis<sup>100</sup> señalaron que alrededor de la mitad de todas las muertes en EE. UU. en 1990 podían atribuirse a factores como tabaco, dieta, actividad física, alcohol, agentes microbianos y tóxicos, armas de fuego, comportamiento sexual, vehículos de motor y uso ilícito de drogas, causas que no suelen registrarse en los certificados de defunción. Estas omisiones son significativas, pues las condiciones que aparecen en los certificados suelen recibir la mayor parte de la atención médica y los fondos en los EE. UU. Por el contrario, las causas no mencionadas podrían ser inversiones más beneficiosas, ya que intervenir temprano en una cadena causal suele ser más efectivo y económico. Se podrían, en teoría, reconfigurar los certificados de defunción para reflejar eslabones más lejanos en la cadena causal, pero existen limitaciones. Los médicos que completan los certificados pueden no tener acceso a la información necesaria y añadir más campos a cualquier formulario trae consigo compensaciones. En resumen, más preguntas pueden resultar en respuestas menos precisas.

En los últimos dos siglos, la esperanza de vida mundial se ha más que duplicado, de veintiocho años a setenta y uno.<sup>101</sup> Los certificados de defunción no provocaron todo esto de forma unilateral, por supuesto. Pero proporcionan los datos necesarios para conocer y analizar estas cifras.

### *3.2. Historias o registros clínicos*

Como se ha explicado, los RCEV detallados y completos son importantes para informar eficazmente la planificación de la salud pública.<sup>102,103</sup> Muchos países se apoyan en los registros de defunciones hospitalarias para actualizar los RCEV.<sup>60</sup> De forma general,

existe una visión positiva hacia los médicos que atienden en los hospitales, asumiendo que tienen una comprensión diagnóstica integral de sus pacientes, y esto se reflejará en estadísticas de alta calidad de la CdM en el hospital y así como en el posterior llenado de los datos en los certificados de defunción.<sup>104,105</sup> Esto, lamentablemente, no es del todo cierto. El deficiente estado de los sistemas de información de salud y, en particular, de las estadísticas de mortalidad en muchos países está ampliamente documentado en la literatura y en los informes de los países a la OMS.<sup>104,106,107</sup> Lo paradójico es que los sistemas de salud dependen de una información confiable de las CdM para responder de forma efectiva a los retos epidemiológicos y para guiar la toma de decisiones<sup>108,109</sup>, información que van a buscar en sus RCEV deficientes. Cuando se examina la situación entre los países de baja y mediana renta, se revelan consistentemente debilidades sustanciales en la generación de estadísticas de CdM.<sup>103,110,111</sup> Rampatige *et al.*<sup>112</sup> en una editorial buscaron centrar la atención en el hecho de que incluso las estadísticas hospitalarias sobre la causa de la muerte no pueden asumirse como correctas, pero los gobiernos al parecer no tienen una misma apreciación de este hecho.

Las historias clínicas se han usado como fuente de datos para obtener información de la salud de las personas. Suena natural pensar que aquí hallaremos la información necesaria para completar un certificado de defunción. De hecho, los médicos en los hospitales la utilizan para realizar ese proceso. El curso habitual (refiriéndonos en forma genérica) empieza cuando el personal médico (que atendió al paciente o el equipo de guardia, que solo conoce muchas veces al paciente en sus horas finales) certifica la CdM y, a continuación, la notifica, utilizando las reglas y procedimientos de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE), actualmente en su versión 11 (CIE-11).<sup>46</sup> Aquí es donde se pueden observar los problemas en usar las historias clínicas como fuente para completar certificados de defunción. Si bien la mayoría de los países que poseen sistemas estadísticos para la CdM emplean ahora la clasificación CIE para codificar, no todos han implementado el certificado estándar internacional para reportar

la CdM, y esto puede impactar de forma negativa cuando se comparan las CdM entre diversas regiones. Adicionalmente, y de forma más frecuente de lo deseado, los médicos no reciben una formación adecuada en las prácticas estándar de certificación de muerte de la CIE. En consecuencia, no es de extrañar que cuando se contrasten y comparen resultados, frecuentemente concluyan que la calidad de la certificación médica de la CdM es insatisfactoria.<sup>109,113</sup> Las estadísticas de CdM obtenidas bajo estas circunstancias son de baja calidad, tienen un uso limitado en políticas de salud y podrían incluso desviar gravemente debates políticos sobre la salud.<sup>114</sup> Por otro lado, en la mayoría de los países en desarrollo, más de la mitad de las muertes ocurren fuera de los hospitales y rara vez se certifican médicamente.<sup>107,113</sup>

Hasta este punto, se observa que tanto las historias clínicas como los certificados de defunción tienen problemas semejantes en su implementación y que su uso no es tan extendido como se podría pensar. La historia clínica tiene sus propias limitaciones. A pesar de que los datos hospitalarios (historias o registros clínicos) son a menudo la única fuente de información sobre causas de muerte, raramente se evalúa su calidad, lo que puede llevar a una mala clasificación y, por ende, a decisiones políticas mal informadas.<sup>114–120</sup> Para comprender mejor esto, revisemos algunos ejemplos. Burger *et al.*<sup>114</sup> llevaron a cabo un estudio retrospectivo en 703 muertes ocurridas en dos suburbios de Ciudad del Cabo, Sudáfrica. Dos médicos completaron un certificado de defunción de revisando las historias clínicas, con el objetivo de validar el certificado de defunción para cada difunto. La comparación de la CdM registrada en los certificados de defunción y en los certificados simulados basados en las historias médicas, mostró una baja concordancia, solo el 55.3% (intervalo de confianza del 95%: 51.7, 59.0). En particular, el VIH/SIDA, la enfermedad cardíaca isquémica y la hipertensión estaban subinformados, mientras que la diabetes estaba sobreinformada como CdM. Los autores concluyeron que, con una correcta cumplimentación de los certificados de defunción, se pueden reducir las CdM mal definidas, además, se requiere cautela al

interpretar las tasas y tendencias basadas en mortalidad específica por causa basadas en los datos obtenidos para la Ciudad del Cabo. Por último, la capacitación de los médicos en el correcto llenado de los formularios de notificación de defunción es esencial.<sup>114</sup> González-Medina y Martínez-Natera<sup>116</sup> realizaron un estudio observacional retrospectivo, revisaron historias clínicas, certificados de defunción y protocolos de autopsia de pacientes fallecidos el año 1999 en el Hospital Central Militar, México, el estudio incluyó a niños y adultos, también incluyeron casos médico-legales. Los diagnósticos finales, de defunción y anatomopatológicos fueron comparados conforme al modelo CIE. Las discordancias diagnósticas se clasificaron en mayores y menores siguiendo el esquema de Goldman. De 956 defunciones, se realizaron 23 autopsias (2.4%), correspondiendo a 12 mujeres (52%) y ocho pacientes (35%) eran menores de un año. La discordancia total fue del 48% (mayores 13%, menores 35%), sin diferencias significativas entre grupos de edad (50% adultos y 47% niños). Concluyeron que, aunque el porcentaje de discordancias (48%) es inferior al informado en otros hospitales de enseñanza de tercer nivel (57%), el número de autopsias realizadas en el hospital es muy bajo (2.4% frente a 32%), lo que indica la necesidad de promover la práctica de estudios de necropsias. Hernández *et al.*<sup>117</sup> evaluaron la concordancia entre la causa de muerte (CdM) reportada en certificados oficiales de defunción y un diagnóstico de referencia derivado de historias clínicas hospitalarias. Analizaron 1,589 defunciones en 34 hospitales públicos de Morelos y el Distrito Federal, México en 2009. El estudio incluyó muertes neonatales, infantiles y de adultos, categorizadas en enfermedades infecciosas, no transmisibles y lesiones. Encontraron una concordancia ajustada por azar del 54.3% para neonatos, 38.5% para niños y 66.5% para adultos entre la CdM reportada y el diagnóstico de referencia. Concluyeron que es imprescindible mejorar los procedimientos de certificación de defunción, sobre todo en muertes de niños y neonatos, debido a problemas significativos con la calidad de la información en los sistemas de RCEV. Pattaraarchachai *et al.*<sup>119</sup> expusieron en un estudio que en Tailandia, un 35% de las muertes se producen en hospitales, siendo certificadas por médicos. No

obstante, cerca del 15% de dichas muertes se registran con diagnósticos vagos a pesar de la información de las historias clínicas. Buscaron medir la validez de los diagnósticos registrados en una muestra de muertes que ocurrieron en hospitales en Tailandia durante 2005. Revisaron las historias clínicas de 3,316 muertes hospitalarias, no encontrando sesgos por edad, sexo o causa en los casos no seguidos. Identificaron causas subyacentes específicas para la mayoría de las muertes inicialmente registradas con causas inespecíficas o asignadas a categorías residuales. Indicaron que es crucial validar periódicamente los datos de registro sobre causas de muerte en hospitales para su uso en investigación epidemiológica o políticas de salud.

Una alternativa para mejorar la calidad de los diagnósticos clínicos, y por lo tanto de los certificados de defunción, sería implementar la autopsia completa (AC) diagnóstica, la cual es el estándar óptimo para verificar las causas de muerte, pero su costo y dificultad de implementación limitan su uso.<sup>120</sup> Otra opción propuesta es revisar las historias clínicas para validar la precisión de las CdM registradas, pero estas revisiones raramente se realizan debido a la falta de métodos y marcos estándar para evaluar la calidad de los datos de CdM.<sup>112</sup> Incluso después de un periodo de entrenamiento no se garantiza que los certificados se cumplimenten de forma adecuada, por ejemplo, los médicos de Bangladesh no lograron adherirse a los estándares internacionales al completar el certificado médico después de un extenso entrenamiento, como el uso de causas de muerte mal definidas.<sup>121</sup> Todos estos factores hacen necesario seguir explorando alternativas al uso de la historia y registros clínicos como fuente de información de las causas de muerte.

### *3.3. Autopsia verbal*

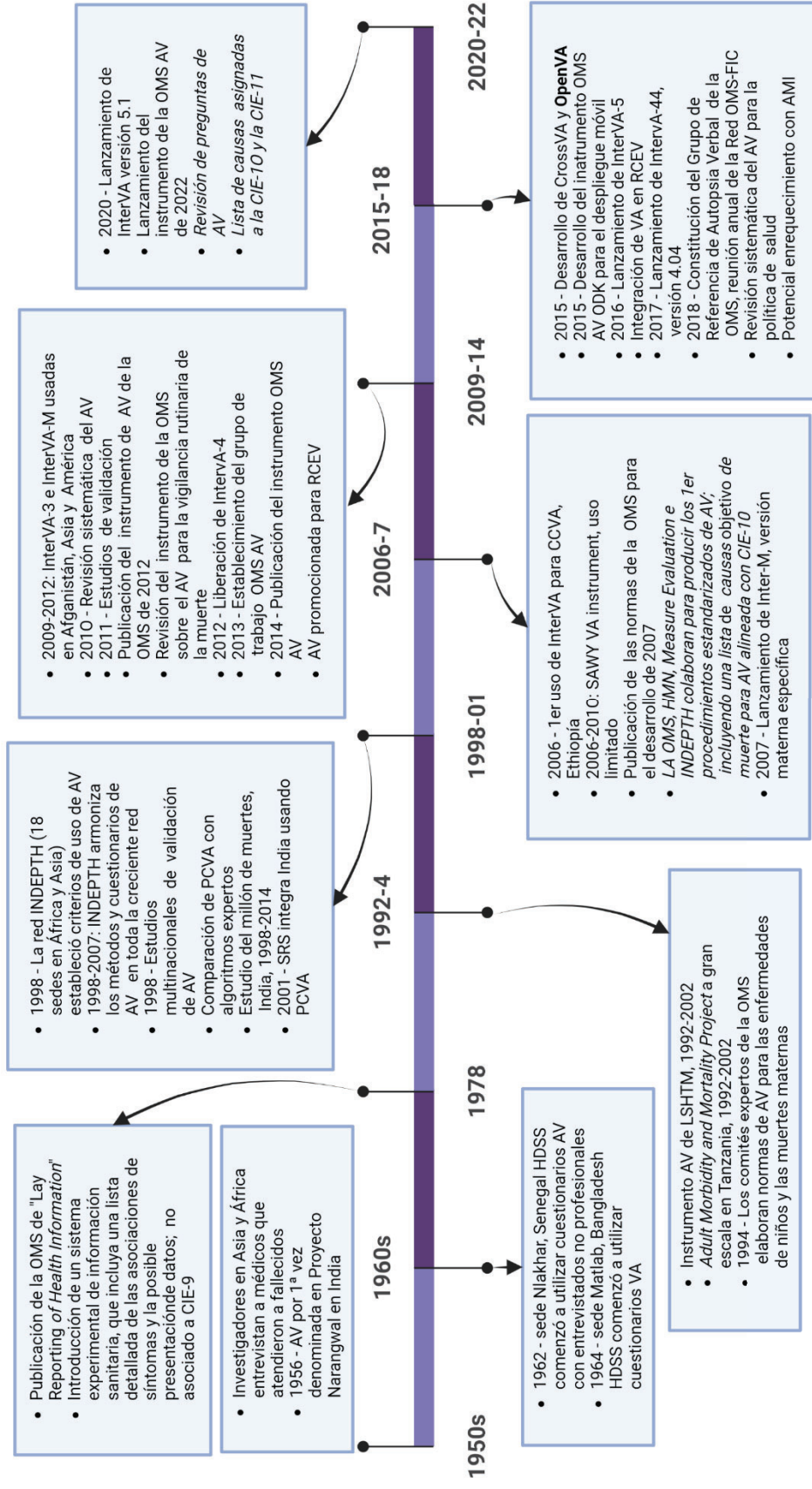
La autopsia verbal (AV) ha evolucionado en los últimos 70 años como un método para determinar la causa de muerte en comunidades sin certificación médica oficial. Consiste

en entrevistar a la familia o cuidadores del fallecido después de un período de duelo, indagando sobre las circunstancias, signos y síntomas previos a la muerte. Este proceso, que se ha beneficiado de las innovaciones del equipo liderado por el Prof. Peter Byass, se originó en Asia y África en las décadas de 1950 y 1960 (ver Figura N° 2), siendo posteriormente adoptado por la OMS en la década de 1970.<sup>122,123</sup> A principios de la década de 1990, se establecieron estándares de AV para muertes infantiles y maternas por comités de expertos convocados por la OMS.<sup>124,125</sup>

En 2006, se encontró que la AV se utilizaba en más de 35 lugares y se identificaron 18 instrumentos AV diferentes en 13 países<sup>126</sup>, lo que resaltó la necesidad de contar con procedimientos de AV confiables, armonizados y estandarizados para obtener información precisa a nivel nacional y permitir comparaciones internacionales.<sup>126</sup> Ante la necesidad de estandarización, la OMS publicó los primeros estándares internacionales de AV en 2007<sup>127,128</sup>, que incluían instrumentos para tres grupos de edad, certificación y codificación en línea con la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10), y un proceso de asignación de causas de muerte.<sup>128</sup> El método de asignación de la causa de muerte implicaba la intervención de tres médicos capacitados que interpretarían independientemente los datos de las entrevistas y asignarían una causa de muerte. Si había acuerdo entre al menos dos médicos, se asignaba la causa.<sup>128</sup>

Después de la primera publicación de los estándares de AV en 2007, se realizaron actualizaciones en 2012, 2014 y 2016.<sup>129-131</sup> Estas revisiones buscaron simplificar los instrumentos para un uso más práctico y a gran escala, incluyendo la modificación de preguntas para facilitar respuestas de sí/no y la reducción del número de preguntas. Las actualizaciones también promovieron el desarrollo de métodos automatizados para la recopilación de datos y para la asignación de causas de muerte.

**Figura Nº 2.** Cronología de hitos en la evolución de los estándares de autopsia verbal.



Modificado de Chandramohan, D. et al.<sup>132</sup>

Created with BioRender.com

El primer método automatizado y público para asignar causas de muerte por AV fue el modelo InterVA, desarrollado por Peter Byass en 2003, y la primera versión se lanzó en 2005. Su versión InterVA-4, lanzada en 2012, incorporó los 245 indicadores de la OMS para asignar una de las 62 categorías de causas de muerte.<sup>133</sup> La AV comenzó a ser utilizada de manera rutinaria, principalmente en países de bajos ingresos.<sup>134</sup> El impulso creciente también planteó algunas como consideraciones éticas como el consentimiento informado del encuestado, la confidencialidad de la información y la propiedad de los datos de AV.

En 2014, se inició un proceso para mejorar la compatibilidad del instrumento AV con algoritmos para autopsia verbal codificada por computadora (AVCC), con la incorporación de experiencias y pruebas de campo.<sup>135</sup> En 2016, la OMS y otras instituciones revisaron los estándares para permitir una total compatibilidad con los algoritmos AVCC disponibles públicamente: InterVA-5, InSilicoVA y Tariff/SmartVA.<sup>65</sup> Esto coincidió con las preocupaciones sobre la viabilidad y sostenibilidad de la AV certificada por un médico (AVCM) cuando se aplica a gran escala.

En entornos de investigación, los médicos solían leer las transcripciones de las entrevistas AV y asignaban la(s) causa(s) de muerte. Sin embargo, para la vigilancia rutinaria a gran escala, se utilizan algoritmos AVCC automatizados para asignar la(s) causa(s) de muerte. Los algoritmos más utilizados son InterVA/InSilicoVA<sup>136,137</sup> y SmartVA<sup>138</sup>, que se basan en un conjunto de información sobre síntomas y causas (ISC).<sup>139</sup>

Los algoritmos de AVCC buscan solucionar problemas de sesgo médico, viabilidad y coste, aunque la precisión de las causas de muerte que asignan depende de la relevancia del conjunto de ISC en un contexto específico. Los ISC de InterVA e InSilicoVA son probabilidades condicionales derivadas de la evidencia epidemiológica y el consenso médico, almacenadas en una matriz llamada "Probbase". En cambio, SmartVA utiliza puntuaciones calculadas a partir del conjunto de datos de mortalidad de

referencia del Consorcio de Investigación de Métricas de Salud de la Población (CIMSP). El enfoque Probbase no requiere datos de mortalidad de referencia costosas y logísticamente desafiantes, se basa en un amplio rango de conocimientos y experiencia médica. Su limitación es la menor precisión, ya que se basa en el juicio humano en lugar de datos directos. Por otro lado, el enfoque Tariff, aunque directamente extraído de los datos del CIMSP, puede ser limitado en su aplicabilidad debido a la especificidad geográfica y temporal de las muertes de referencia. Por ejemplo, el conjunto de datos del CIMSP incluye pocas muertes en África y escasas muertes por malaria, una causa de muerte muy relevante en esa región.

Interpretar la literatura sobre comparaciones de desempeño de métodos para asignar causas de muerte por AV es desafiante, debido a la variedad de enfoques y algoritmos utilizados, y a la falta de datos comparables en los estudios.<sup>139</sup> Es difícil evaluar la efectividad de cada enfoque, ya que solo un estudio aplicó todos los algoritmos a las mismas muertes con el mismo conjunto de ISC.<sup>136</sup>

La asignación de causas de muerte por AV presenta retos. Los algoritmos AVCM pueden ser más precisos, pero están sujetos a sesgo médico y baja repetibilidad, y son lentos y costosos para usos a gran escala. Los algoritmos basados en Probbase usan un ISC más general pero menos preciso, mientras que los basados en Tariff están limitados a un conjunto de datos de referencia específico. Los algoritmos empíricamente impulsados son una opción atractiva si se pueden generalizar y mantener actualizados con la epidemiología cambiante. Como solución se ha propuesto crear un ISC empírico, general y actualizado; y, además, permitir comparaciones entre algoritmos AVCC a través de un archivo actualizable de muertes de referencia<sup>140</sup> gestionado por un tercero confiable. Esto estandarizaría el ISC usado por todos los algoritmos, mejorando la comparabilidad de las causas de muerte por AV asignadas.

Ante la diversidad de opciones surge el problema de la elección del mejor enfoque algorítmico para una determinada necesidad. La solución se facilita con el uso del

Instrumento Estándar de la OMS, diseñado para funcionar con todos los algoritmos comunes.<sup>141</sup> Ahora, el enfoque es incorporar AV en los sistemas de registro civil y estadísticas vitales para proporcionar datos sobre las causas de muerte, especialmente en poblaciones rurales, hasta que otros sistemas de registros de las CdM (como los certificados de defunción, con todas sus limitaciones) estén ampliamente disponibles. Se ha propuesto que una gestión eficaz de los datos podría facilitar esta integración en los sistemas de registro y notificación de defunciones.<sup>142</sup>

Las AV se han utilizado en investigaciones y vigilancia de mortalidad en países de bajos y medianos ingresos. La Red INDEPTH, establecida en 1998, unió a los sitios que realizaban AV en poblaciones de al menos 25,000 personas con el objetivo de armonizar métodos y permitir investigaciones en múltiples sitios. Actualmente, 48 sitios INDEPTH en 19 países han adoptado el instrumento AV de la OMS, proporcionando un banco de pruebas para algoritmos de diagnóstico como InterVA e InSilicoVA.<sup>102</sup>

Más allá de la red INDEPTH, casi todos los nuevos proyectos de investigación multinacionales y ensayos de campo que necesitan datos de mortalidad por causas específicas utilizan el estándar AV de la OMS de 2016 o una adaptación, junto con sus algoritmos diagnósticos asociados. Ejemplos de estos son el Programa de Implementación de la Vacuna contra la Malaria de la OMS, CHAMPS (Vigilancia de Prevención de Mortalidad y Salud Infantil en Bangladesh, Etiopía, Kenia, Malí, Mozambique, Sierra Leona y Sudáfrica) y COMSA (Vigilancia Nacional de la Mortalidad para la Acción en Mozambique y Sierra Leona).

A nivel de país, la AV de la OMS de 2016 se ha empleado en encuestas de investigación, como la Encuesta Nacional de Mortalidad Materna en Ghana, la Evaluación de Mortalidad Posterior al Censo en Mozambique y una Encuesta Demográfica y de Salud en Uganda.

En los países de bajos y medianos ingresos, la AV estandarizado de la OMS, junto con el AVCC, posibilita llevar la AV más allá de los ámbitos de investigación, a sistemas de

información a gran escala.<sup>142</sup> Los esfuerzos para mejorar los RCEV están en curso, pero las muertes sin certificación médica adecuada continuarán ocurriendo, lo que mantiene la demanda de mejores herramientas y métodos estandarizados de AV para mejorar los sistemas de datos de mortalidad. La estrategia para AV dentro de los RCEV es registrar todas las muertes en la comunidad por edad y sexo, y luego generar distribuciones representativas de causas de muerte. La integración de los sistemas de recopilación de datos RCEV y AV asegura que las muertes se registren y produce un flujo continuo de datos sobre mortalidad. Esta integración requiere un marco legal y administrativo de apoyo, procesos claros y eficientes, responsabilidades definidas y un enfoque operativo integrado en la arquitectura del Sistema de Información de Salud y RCEV de cada país o región. La disponibilidad de recursos globales y nacionales estandarizados, incluyendo herramientas de AV y manuales para su uso, ha facilitado su adopción y adaptación en estrategias de expansión de RCEV-AV.<sup>129</sup>

Diversos países, apoyados por socios de desarrollo como el Fondo Mundial y el Banco Mundial, están en las primeras fases de ampliar las aplicaciones de AV en sus RCEV. Entre ellos se incluyen Bangladesh, Colombia, Etiopía, Ghana, Kenia, Marruecos, Mozambique, Ruanda, Senegal, Tanzania, Tailandia, Zambia y Zimbabue.

La pandemia de COVID-19 en 2020 añadió complejidad a la aplicación de la AV en encuestas y vigilancia. Por ello, algunos países buscan formas alternativas para realizar entrevistas de AV a nivel doméstico durante crisis de salud o conflictos humanitarios, como las entrevistas de AV telefónicas<sup>143</sup>, aunque son necesarias más evaluaciones para valorar su factibilidad y aceptabilidad. Los avances en modelos neuronales de aprendizaje profundo permiten procesar texto de manera eficiente y precisa, lo que permite extraer información de textos no estructurados y examinar grandes volúmenes de datos para inferir modelos de evolución de causas de mortalidad.<sup>144</sup> Esto deja ver el potencial que tiene la AV, la cual ha experimentado grandes avances en los últimos 20 años, resumidos previamente.

A pesar de los avances alcanzados, la AV ha mostrado resultados inconsistentes, su precisión diagnóstica varía dependiendo de la CdM, siendo mayor cuando la enfermedad presenta signos y síntomas definidos, y menor en condiciones con síntomas inespecíficos, como la malaria e infección respiratoria aguda en el caso de niños, o meningitis en todos los grupos de edad.<sup>43,66</sup> Esto lleva a clasificaciones erróneas frecuentes de la CdM y a tasas inexactas de mortalidad específicas por causa.<sup>66</sup> Para mitigar algunas de estas limitaciones, como se ha comentado previamente, se han desarrollado métodos informatizados de interpretación del cuestionario de AV.<sup>68</sup> Estos métodos de AV informatizados han sido validados contra AV certificadas por médicos y registros clínicos<sup>145-147</sup>, pero no se han validado ampliamente contra la AC, considerada el estándar de oro para la determinación de CdM. Un estudio de validación realizado en Mozambique entre 2013 y 2015 comparó la efectividad del método de AV codificado por computadora, InterVA, con la AC en 316 pacientes de diferentes grupos de edad.<sup>33</sup> Los resultados mostraron una baja concordancia del modelo a nivel individual y poblacional, con una sensibilidad particularmente baja para identificar enfermedades infecciosas. Se detectaron también inconsistencias en la clasificación de muertes maternas.

Todos estos hallazgos ponen en duda la fiabilidad de las estimaciones actuales de CdM mediante la AV, resaltando la necesidad de implementar métodos que ayuden a mejorar la calidad y efectividad de las técnicas de AV actuales.

### *3.4. Autopsia completa*

En 1844, cuando Carl Rokitansky se convirtió en profesor titular de patología, fue quizás el primer patólogo académico de carrera<sup>20</sup>. Nunca había tenido una práctica clínica. Durante cientos de años antes de eso, la mayoría de las autopsias se habían realizado como parte de una práctica clínica continua. Los médicos realizaron autopsias para comparar sus impresiones clínicas con los hallazgos anatómicos. Es decir, la autopsia

servió como control de calidad de sus diagnósticos. Por supuesto, hubo otros beneficios para la profesión médica, los médicos en formación y la sociedad, pero los clínicos académicos utilizaron las autopsias para hacerse mejores diagnosticadores. De esta forma, históricamente, la autopsia ha cumplido múltiples propósitos, incluyendo los relacionados con la atención médica (relacionados al diagnóstico y asegurando la garantía de calidad de atención al paciente), la ciencia médica (investigación y educación), la sociedad (salud pública, estadísticas vitales, cuestiones forenses) y la familia (asesoramiento y comprensión del ciclo de vida).<sup>148</sup> Además, las autopsias son las partes más importantes de la patología forense, donde establecer la causa exacta y la forma de muerte tiene importantes implicaciones médico-legales.<sup>149,150</sup> La importancia de la autopsia sigue siendo la misma a pesar de la disminución de las tasas de autopsia en las instituciones médicas fuera de la jurisdicción de los médicos forenses debido a los múltiples factores que afectan a la práctica médica hoy en día.<sup>151,152</sup> En países de Europa, como Inglaterra, la situación no es mejor.<sup>153</sup> Los factores multifacéticos que contribuyen a las bajas tasas de autopsia incluyen actitudes (de clínicos, patólogos, familias, administradores, políticos), restricciones de tiempo y responsabilidades concurrentes de patólogos, miedo de los médicos a la responsabilidad legal y a equivocarse, costos (profesionales, generales), la tecnología médica moderna que da una falsa confianza, la falta de inclusión de los hallazgos de la autopsia en la documentación del certificado de defunción y en informes clínicos publicados, y la frecuente imposibilidad de los clínicos de solicitar permiso apropiadamente a las familias de los difuntos.<sup>148-151</sup>

Aun así, hay espacios donde se ha avanzado de forma importante, uno de los cuales es el grupo de las enfermedades infecciosas y dentro de este grupo, la tuberculosis (TB) es un excelente ejemplo de las importantes contribuciones que la patología de la autopsia ha hecho para comprender esta devastadora enfermedad, que es la principal causa de muerte entre las enfermedades infecciosas. Está entre las 10 principales

causas de muerte a nivel mundial, matando alrededor de 5.000 personas al día. En los últimos 2 siglos, la TB ha matado a más personas que la malaria, la viruela, el VIH, la cólera, la plaga, el ébola y la influenza combinadas (solo superada por SARS-CoV-2 en el 2020).<sup>154,155</sup> Hoy en día, se estima que más de 2 mil millones de personas están infectadas latentemente.<sup>154</sup> La tuberculosis es extremadamente difícil de estudiar porque solo ocurre completamente desarrollada en los pulmones humanos y no hay justificación ética para realizar biopsias o resecciones de lesiones en desarrollo. Aunque estamos avanzando mucho en la definición de las células, moléculas y vías por las que *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) se establece, aún no podemos encajar las piezas para comprender su patogénesis, ya que los modelos animales no replican la enfermedad humana, lo que es un gran impedimento para el desarrollo de vacunas y nuevas terapias.<sup>156-160</sup> El director del Instituto Nacional de Alergias e Infecciones Infecciosas, Anthony Fauci, afirmó que "Necesitamos entender mejor el delicado equilibrio entre el huésped y el patógeno en el contexto del sistema biológico completo y esto requiere una "abordaje radical y transformador".<sup>157</sup>

Como hemos revisado, hasta los años '60 del siglo pasado, la autopsia mantenía un rol relevante en la medicina moderna, crucial para el descubrimiento, caracterización y comprensión de la enfermedad. Muestra de ello son las etiologías de más de 80 enfermedades que han sido dilucidadas desde 1950 mediante estudios anatomopatológicos, incluida la biopsia.<sup>161</sup>

En la década de 1960, la tasa de autopsias hospitalarias en Europa y EE. UU. rondaba el 60 %, pero ha ido cayendo y ahora ronda el 10 % o menos. En 1991, el *Royal College of Pathologists* de Inglaterra publicó *The Autopsy and Audit*<sup>162</sup>, dando una tasa de discrepancia del 75% para discrepancias clínicas significativas y del 10% para discrepancias donde se esperaba que el paciente viviera si el diagnóstico clínico hubiera sido correcto. El informe recomendaba que al menos el 10% de las muertes hospitalarias se sometieran a autopsias con fines de auditoría. En el siglo XXI, las tasas de autopsias

hospitalarias siguen cayendo y se ha cuestionado si la autopsia sigue siendo útil. Esto se debe en parte a la fuerte creencia en el poder de las imágenes diagnósticas y otras investigaciones<sup>163</sup>, pero también a que los médicos no solicitan autopsias debido a las posibles consecuencias medicolegales.<sup>161</sup> Otros factores implicados en la disminución de la tasa incluyen la comunicación inadecuada y tardía de los resultados de la autopsia a los médicos y la solicitud de autopsias delegadas al personal médico subalterno.<sup>163</sup>

Un punto muy relevante a la hora de comparar los resultados de la autopsia con los de la historia clínica es establecer las discrepancias y como clasificarlas. A pesar de más de un siglo de investigación, todavía es difícil comparar los resultados, ya que varios estudios analizan diferentes aspectos y tipos de discrepancia y clasifican las discrepancias de diferentes maneras. Goldman *et al.*<sup>29</sup> sugirieron un método útil de clasificación en 1983, Veress y Alafuzoff<sup>164,165</sup> diseñaron su propia clasificación de discrepancias, por mencionar dos de los trabajos ampliamente usados cuando se interpretan discrepancias. Una clara ventaja del uso de un sistema de clasificación definido permitiría comparar fácilmente los resultados de diferentes estudios. La clasificación de Goldman, la más frecuentemente usada, es útil porque diferencia entre discrepancias mayores y menores e identifica aquellas muertes en las que la discrepancia tuvo un impacto en la supervivencia del paciente. Sin embargo, esto requiere un juicio sobre si un paciente hubiera sobrevivido o no, lo que puede ser difícil de determinar.<sup>29</sup> Las discrepancias se pueden dividir mejor en:

- Discrepancias de condiciones importantes potencialmente tratables (aquellas que conducen a la muerte o contribuyen significativamente a ella)
- Discrepancias de condiciones mayores intratables
- Discrepancias de condiciones menores/coexistentes

Esto resaltaría las discrepancias más significativas sin requerir un juicio sobre la supervivencia potencial.

Estos estudios tratan con diferentes grupos de pacientes que pueden no ser comparables. Muchas de las condiciones que afectan y causan la muerte son diferentes entre niños y ancianos, y entre pacientes médicos y quirúrgicos. La misma condición también puede presentarse de manera diferente en un niño pequeño en comparación con un adulto o una persona mayor.

La tasa general de discrepancias importantes parece haber permanecido igual desde 1960.<sup>29</sup> Shojania *et al.*<sup>120</sup> encontró un cambio en las discrepancias de la clase 2 (un diagnóstico discrepante importante, pero con un impacto equívoco o sin impacto en la supervivencia) a la clase 1 (un diagnóstico discrepante con un impacto potencial en la supervivencia) entre las décadas de 1960 y 1980, pero sin cambios en la tasa de discrepancia general.

Es importante tener en cuenta que estas tasas de discrepancia se aplican solo a aquellos pacientes que mueren y se les realiza una autopsia. La tasa de errores de diagnóstico puede ser menor ahora, pero dado que la mayoría de los pacientes sobreviven a su estadía en el hospital, no están incluidos en nuestras cifras y la tasa de discrepancia parece permanecer igual. Los pacientes que fallecieron tras recibir el alta hospitalaria se han incluido en pocos estudios<sup>166</sup>, por lo que la mayoría tampoco aparece en las cifras que se manejan.

La AC, a pesar de las dificultades para estandarizar el análisis de las discrepancias, es indudablemente el patrón de oro para llegar al diagnóstico *post mortem* y aporta el marco para estimar la CdM en países y regiones con alta renta<sup>42</sup>, pero este procedimiento no es realizado de forma frecuente en regiones de baja y media renta. Existen varias razones, una de ellas es que la mayoría de las muertes en regiones de baja y mediana renta no ocurren en los hospitales. Un estudio<sup>167</sup> utilizó datos sobre el lugar de muerte en 49 países desde 2005 hasta 2019 para modelar el porcentaje de muertes en el hogar estandarizado para la edad de la población y la distribución de causas. A nivel global, el estudio estimó que el 53.4% (95% IC 50.8%–55.9%) de las

muerres ocurren en el hogar, mucho más alto en países de bajos ingresos (79.5%, 95% IC 77.3%–81.5%) y mucho menor (27.3%, 95% IC 25.2%–29.6%) en países de altos ingresos. Los países con el mayor porcentaje de muertes en el hogar se encuentran principalmente en el sur, este y sureste de Asia y en el África subsahariana (más del 90% en Etiopía, Chad y Sudán del Sur).

Otra dificultad que se suma a la implementación de la AC en regiones pobres, se debe a la insuficiencia de instalaciones adecuadas y de recursos humanos adecuadamente entrenados.<sup>168,169</sup> Mamudo *et al.*<sup>169</sup> describieron que para Mozambique, un país extenso con 29.5 millones de habitantes, solo se dispone de 4 hospitales con servicios de patología y se cuenta con 14 patólogos entrenados para todo el país, esto hace menos de 1 patólogo por millón de habitantes, situación muy similar a la detectada en otros países subsaharianos.<sup>170</sup>

Y otro factor a tener en cuenta son las prácticas culturales y religiosas de las personas en cada región, porque la perspectiva hacia la práctica de la AC puede variar en cada comunidad.<sup>171</sup> En general la AC tiene una aceptación usualmente pobre debido a la naturaleza desfigurante del procedimiento, y el tiempo requerido para llevarlo a cabo, lo que puede interferir con las prácticas ceremoniales y de entierro.<sup>172–174</sup>

Teniendo muy presente la capacidad de la AC para generar data de gran calidad sobre la CdM y sus limitaciones, es necesario buscar alternativas para poder identificar la CdM en diversos escenarios, la mayoría en países y regiones de baja y mediana renta. Ante esta situación, el uso de otras técnicas, como la autopsia mínimamente invasiva, deben ser exploradas.

### *3.5. Autopsia mínimamente invasiva*

En los países y regiones de alta renta, los amplios registros clínicos permiten caracterizar habitualmente los eventos previos a la muerte, identificando las causas del

desenlace fatal. Sin embargo, en los países y regiones de baja y mediana renta, donde ocurre la gran mayoría de las muertes prematuras; en estos entornos, el acceso al sistema de salud es mucho más limitado, lo que resulta en una proporción significativa de muertes que ocurren en el hogar<sup>167</sup> con la falta de registro de estas muertes así como sus causas.<sup>32</sup> Estrategias alternativas como la autopsia verbal (ver sección 3.3), han sido diseñadas para determinar las causas de muerte pero proporcionan una especificidad limitada y pueden dar resultados no fiables.<sup>42,43,175</sup> Y la autopsia completa (ver sección 3.4) presenta múltiples limitaciones para su implementación como es falta de recursos humanos entrenados, infraestructura y equipos de laboratorio insuficientes o inexistentes, y las costumbres y creencias religiosas de las comunidades que pueden estar contrapuestas a las acciones y tiempos que se emplean en la autopsia completa.<sup>32</sup>

Para compensar estas deficiencias y/o limitaciones, se han propuesto métodos alternativos basados en técnicas *post mortem* menos invasivas. Uno de los procedimientos más prometedores es la obtención de muestras de tejidos mediante la técnica de la autopsia mínimamente invasiva (AMI).<sup>176</sup> La técnica AMI es un examen *post mortem* basado en agujas que permite recoger pequeñas muestras de tejido y fluidos corporales de órganos clave. Este procedimiento, que puede ser realizado por patólogos o técnicos con formación especializada, requiere niveles más bajos de experiencia e infraestructura que el AC<sup>177</sup> y hay datos que muestran un alto nivel de interés en conocer la CdM y la posible aceptabilidad en comunidades de países de ingresos bajos y medianos.<sup>178</sup> Además, el uso de agujas sin manipulación de los órganos permite recolectar muestras para análisis microbiológico con menor riesgo de contaminación en comparación con la AC.

El concepto de AMI se remonta a finales del siglo XIX, cuando se describió la extracción de órganos manualmente para la autopsia.<sup>179</sup> Décadas después, durante un brote de fiebre amarilla en Brasil, se utilizó una técnica de examen *post mortem* con agujas para muestrear el hígado, conocida como 'viscerotomía'.<sup>180</sup>

Aunque históricamente, 'autopsia mínimamente invasiva' se ha referido a métodos de autopsia menos invasivos que emplean técnicas de imagen avanzadas como resonancia magnética, tomografía computarizada y ecografía, conocidas colectivamente como 'virtuopsia'<sup>181-183</sup>, estos métodos no siempre incorporan el muestreo de tejido. Esta situación viene cambiando, ya que en los últimos años se han publicado más estudios relacionando la AMI con la toma de muestras de tejido utilizando agujas. Paganelli *et al.*<sup>182</sup> realizaron una revisión del uso de la AMI en relación a la determinación de la CdM. Un total de 79 artículos de revistas con fechas de publicación desde 1955 hasta 2019 fueron incluidos en esta revisión. Pudieron identificar que, a pesar de que el concepto de AMI se introdujo en 1955, el 75% de las publicaciones sobre este tema se han producido en la última década. Desde 2010, el número de publicaciones sobre AMI se ha triplicado con respecto a todas las publicaciones previas a ese año. Entre los años de 1960's y 1980's los autores no lograron identificar publicaciones sobre AMI, pero en 1983 se publicó un artículo que describía las ventajas, factibilidad y limitaciones de la AMI.<sup>182,184</sup> La aplicación de esta técnica en PVVS no fue hasta más de 10 años después, en 1994, aunque como un método alternativo a la AC.<sup>182,185</sup> En la primera década del siglo XXI diferentes publicaciones mostraron resultados contrapuestos con respecto a la aceptación por parte de la comunidad de la AMI.<sup>182</sup> Entre 2010 y 2015, la cantidad de estudios enfocados en la validación de la AMI frente a otros procedimientos *post mortem*, experimentó un crecimiento notable.<sup>177,182,186-188</sup> En 2016, comenzaron a surgir publicaciones derivadas del innovador estudio de Validación de la Autopsia Mínimamente Invasiva para Investigación de la Causa de Muerte en Países en Desarrollo (CADMIA), que evaluó la aceptabilidad de la AMI y se propuso validar esta metodología comparándola con la AC, empezando por las necropsias en adultos<sup>178,182,189,190</sup> y en años posteriores saldrían publicaciones abarcando todos los grupos etarios<sup>189,191,192</sup> En esta serie de estudios de validación, la concordancia con la AC, el estándar de oro para la determinación de la

CdM fue de moderada a buena, y la AMI reconoció de manera confiable la mayoría de las enfermedades infecciosas y los cánceres que causan la muerte.

Otra importante iniciativa la viene desarrollando la red Red de Prevención de la Mortalidad Infantil y Salud Infantil (CHAMPS, siglas en inglés de Child Health and Mortality Prevention Surveillance), en octubre del 2019 publicó 13 artículos describiendo experiencias con la AMI y dada la promisorio naturaleza de los resultados obtenidos, la red CHAMPS respaldó rápidamente el uso de la AMI.<sup>182</sup>

Los interesantes resultados obtenidos y el aumento de su uso en la última década de la técnica AMI ha generado grandes expectativas porque puede proporcionar explicaciones más sólidas de la causa de la muerte que otros enfoques utilizados actualmente.<sup>32,193,194</sup> Es necesario evaluar su aplicación y viabilidad a una escala más amplia y en diversos escenarios.

#### *4. Aspectos relacionados con la identificación de la causa de muerte por infecciones: revisión de algunas infecciones y características relevantes.*

##### *4.1. Tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) fue identificado por Robert Koch hace 139 años como el agente causal de la Tuberculosis (TB) y la OMS declaró a la TB como una emergencia mundial por primera vez en 1993. La TB se ha convertido en una de las principales causas infecciosas de muerte en adultos en todo el mundo.<sup>154</sup> La capacidad del organismo para establecer eficazmente una infección latente le ha permitido propagarse a casi un tercio de las personas en todo el mundo. A nivel mundial, aproximadamente 10 millones (rango, 8,9–11,0 millones) de personas enfermaron de TB en 2019, un número que ha ido disminuyendo muy lentamente en los últimos años.<sup>154</sup>

El complejo *M. tuberculosis* tuvo un ancestro africano común hace 35.000 a 15.000 años.<sup>195</sup> Hay evidencia de TB espinal en restos neolíticos, precolombinos y egipcios tempranos.<sup>196</sup> Sin embargo, la tuberculosis no se convirtió en un problema importante hasta la Revolución Industrial, cuando las condiciones de vida hacinadas favorecieron su propagación.<sup>197</sup> En los siglos XVII y XVIII, la tuberculosis causó una cuarta parte de todas las muertes de adultos en Europa.<sup>198</sup> Antes de que los agentes antimicrobianos estuvieran disponibles, la piedra angular del tratamiento era descansar al aire libre en sanatorios especializados y el aislamiento.<sup>199</sup> Los regímenes de sanatorio probablemente beneficiaron a algunos pacientes que fueron diagnosticados antes de la cavitación, pero tuvieron poco impacto sobre la enfermedad cavitaria.<sup>200</sup> Cuando quedó claro que la cavitación era el evento fundamental en la tuberculosis pulmonar progresiva, la mayoría de las terapias especiales se centraron en el cierre de la cavidad.<sup>200</sup>

El complejo *M. tuberculosis* comprende al menos nueve especies del género *Mycobacterium*, la familia *Mycobacteriaceae* y el orden *Actinomycetales* que son causas de tuberculosis humana y enfermedad zoonótica. Las especies del complejo *M. tuberculosis* comparten una identidad de secuencia del 99,9% y probablemente evolucionaron a partir de un único ancestro clonal.<sup>201</sup> La especie *M. tuberculosis* sensu stricto causa la gran mayoría de la tuberculosis humana en todo el mundo.<sup>154</sup> Sin embargo, *Mycobacterium africanum* causa TB humana en África Occidental, donde representa hasta el 50% de los casos.<sup>154</sup> *Mycobacterium canettii* es una causa extremadamente rara de TB humana en el Cuerno de África Oriental.<sup>200</sup> *Mycobacterium bovis* causa enfermedades en el ganado y se transmite a los humanos a través del contacto con animales y el consumo de leche no pasteurizada.<sup>200</sup> Recientemente se demostró que *M. bovis* puede transmitirse por aerosol de pacientes con lesiones pulmonares.<sup>202</sup> *Mycobacterium caprae*, otro patógeno del ganado, *Mycobacterium microti*, un patógeno para roedores, y *Mycobacterium pinnipedii*, un patógeno para focas, se ha informado que causan tuberculosis zoonótica en humanos. Se han descrito

*Mycobacterium orygis* (antílope) y *Mycobacterium mungi* (mangosta) en animales, pero no se han notificado en humanos.<sup>200</sup>

Los avances en el análisis genético, incluida la secuenciación del genoma completo (SGC), han arrojado nueva luz sobre la filogenética del complejo *M. tuberculosis*.<sup>201,203</sup> Estos estudios muestran que *M. tuberculosis* sensu stricto y *M. africanum*, las causas predominantes de la enfermedad humana enfermedad, se puede dividir en siete linajes filogenéticos, L1 a L7. Este es un campo de estudio que cambia rápidamente, con múltiples nomenclaturas en uso. Por ejemplo, el linaje L2 también se denomina linaje de Asia oriental o la cepa de Beijing. Por otro lado se añaden cada vez más subgrupos, como el recientemente propuesto linaje 9 (L9).<sup>204</sup> Existe alguna evidencia de que los diferentes linajes varían en virulencia, adaptación del huésped, transmisibilidad o capacidad para adquirir resistencia a los medicamentos, pero se necesitan más investigaciones para aclarar la importancia clínica de tales diferencias.<sup>204</sup>

Como CdM única, la tuberculosis es la principal CdM infecciosa a nivel mundial<sup>154</sup>, sólo superada en el año 2020 por SARS-CoV-2, patógeno causante de la COVID-19 (se estima que durante el año 2020 a causa del SARS-CoV-2 murieron en todo el mundo 1,8 millones de personas).<sup>155</sup> Además, la TB es la CdM más frecuente asociada al VIH<sup>154,205,206</sup> y también encabeza la lista de CdM entre las mujeres en edad reproductiva.<sup>205-208</sup> Todos los años desde 1997, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado un informe mundial sobre TB, donde se comparten datos actuales de la situación mundial de la enfermedad. Dicho documento resume el progreso y los esfuerzos en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad, a distintos niveles (nacional, regional y mundial).<sup>154</sup> El informe Global TB 2020 se publicó el 14 de octubre de 2020, su desarrollo se ubica en el contexto de las estrategias globales de control de la TB y los objetivos de las Naciones Unidas (ONU) establecidos en la declaración política en la reunión de alto nivel de la Asamblea General de las Naciones Unidas sobre la TB celebrada en septiembre de 2018 en Nueva York (ver Tabla N° 1).

Se estima que los datos publicados en el informe representan más del 99% de la población mundial y fueron obtenidos a partir de los datos reportados de 198 países.<sup>154</sup> A nivel mundial, se estima que 10 millones de personas desarrollaron la enfermedad de TB en 2019 y se estima que se produjeron 1,2 millones (rango, 1,1–1,3 millones) de muertes por TB entre personas VIH negativas en 2019 (en comparación con los 1,7 millones de muertes en el año 2000), y 208.000 muertes adicionales (rango, 177.000–242.000) entre PVVS (en comparación con las 678.000 muertes en el año 2000).<sup>154</sup> Las personas  $\geq 15$  años representaron el 88% de casos, en este grupo los hombres representaron el 56% de las personas que desarrollaron TB en 2019 y las mujeres representaron el 32% de casos. Los niños (menores de 15 años) aportaron el 12% al total de casos. Entre todos los afectados, el 8,2% eran PVVS.<sup>154</sup> Todos los datos reportados muestran un avance importante en la reducción de infecciones y muertes relacionadas a TB, aun así la pandemia continua.

La mayoría de las personas que desarrollaron TB en 2019 se encontraban en Asia sudoriental (44%), África (25%) y el Pacífico occidental (18%), con porcentajes más pequeños en el Mediterráneo oriental (8,2%), América (2,9%) y Europa (2,5%). Treinta países representan el 86% de la carga global de TB (Indonesia, China, India, Filipinas, Pakistán, Nigeria, Bangladesh, Sudáfrica, República Democrática del Congo, Myanmar, Vietnam, Etiopía, Kenia, UR Tanzania, República Popular Democrática de Corea, Angola, Mozambique, Tailandia, Brasil, Federación de Rusia, Zambia, Camboya, Papúa Nueva Guinea, Zimbabue, República Centroafricana, Sierra Leona, Congo, Liberia, Lesoto y Namibia). Ocho países representaron dos tercios del total mundial: India (26%), Indonesia (8,5%), China (8,4%), Filipinas (6,0%), Pakistán (5,7%), Nigeria (4,4%), Bangladesh (3,6%) y Sudáfrica (3,6%).

**Tabla N° 1.** Objetivos mundiales de tuberculosis establecidos en los ODS, la Estrategia para poner Fin a la TB y la declaración política de la reunión de alto nivel de la ONU sobre la TB, para el período hasta la fecha límite de los ODS de 2030

**Meta 3.3 de los ODS** Para el 2030, poner fin a las epidemias de sida, TB, malaria y enfermedades tropicales desatendidas, y combatir la hepatitis, las enfermedades transmitidas por el agua y otras enfermedades transmisibles

<b>Estrategia de la OMS para poner fin a la TB</b>	Reducción del 80% en la tasa de incidencia de TB (casos nuevos y recidivantes por 100000 habitantes por año) para 2030, en comparación con 2015 Hito 2020: reducción del 20%; Hito 2025: reducción del 50%
	Reducción del 90% en el número anual de muertes por TB para 2030, en comparación con 2015 Hito 2020: reducción del 35%; Hito 2025: reducción del 75%
	Ningún hogar afectado por la TB enfrentará costos catastróficos para 2020
<b>Reunión de alto nivel de la ONU sobre la TB, 2018</b>	40 millones de personas tratadas por tuberculosis de 2018 a 2022, que incluyen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 3,5 millones de niños</li> <li>• 1,5 millones de personas con TB multidrogo resistente, incluidos 115 000 niños</li> </ul>
	Al menos 30 millones de personas recibieron tratamiento preventivo de la tuberculosis entre 2018 y 2022, que incluyen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 6 millones de personas que viven con el VIH</li> <li>• 4 millones de niños menores de 5 años y 20 millones de personas de otros grupos de edad, que son contactos domésticos de personas afectadas por la TB</li> </ul>
	Financiamiento de al menos US\$ 13 mil millones por año para el acceso universal a la prevención, el diagnóstico, el tratamiento y la atención de la TB para 2022
	Financiamiento de al menos US\$ 2.000 millones al año para la investigación de la TB de 2018 a 2022

Modificado de Global tuberculosis report 2020<sup>154</sup>

La mayoría de las personas que desarrollaron TB en 2019 se encontraban en Asia sudoriental (44%), África (25%) y el Pacífico occidental (18%), con porcentajes más

pequeños en el Mediterráneo oriental (8,2%), América (2,9%) y Europa (2,5%). Treinta países representan el 86% de la carga global de TB (Indonesia, China, India, Filipinas, Pakistán, Nigeria, Bangladesh, Sudáfrica, República Democrática del Congo, Myanmar, Vietnam, Etiopía, Kenia, UR Tanzania, República Popular Democrática de Corea, Angola, Mozambique, Tailandia, Brasil, Federación de Rusia, Zambia, Camboya, Papúa Nueva Guinea, Zimbabue, República Centroafricana, Sierra Leona, Congo, Liberia, Lesoto y Namibia). Ocho países representaron dos tercios del total mundial: India (26%), Indonesia (8,5%), China (8,4%), Filipinas (6,0%), Pakistán (5,7%), Nigeria (4,4%), Bangladesh (3,6%) y Sudáfrica (3,6%).

De los 10 millones de personas que se calcula desarrollaron la TB durante 2019, unos 3 millones no tenían diagnosticada la enfermedad, o sus casos no se notificaron oficialmente a las autoridades gubernamentales de cada país.<sup>154</sup> La capacidad de diagnosticar casos de TB varía según el contexto y la prevalencia. Un metaanálisis de las discrepancias clínicas/autopsia encontró que, en la década de 1930, la sensibilidad del diagnóstico clínico de TB era del 91%, pero para la década de 1970 había caído al 50%; los médicos dejaron de reconocer patrones clínicos de TB a medida que la prevalencia disminuía.<sup>209-211</sup> Además, donde la infección por micobacterias ocurre en conjunto con alguna otra condición significativa, o en pacientes con SIDA con síntomas inespecíficos y un curso terminal de rápida progresión, es extremadamente probable que se pase por alto.<sup>210-212</sup> En los países desarrollados, la TB se encuentra inesperadamente en la autopsia en el 0.1-3% de los casos.<sup>211,213,214</sup> En los países de baja y mediana renta, donde la prevalencia de TB es mayor, la situación es diferente. En India, la enfermedad infecciosa es la causa más común de muerte (46.8%), y la TB representa un tercio de estos casos. La alta conciencia clínica de la TB significa que más del 80% de los casos de autopsia se identifican antes de la muerte.<sup>215</sup> Sin embargo, también puede existir una tendencia a sobrediagnosticar; en una serie de 1000 autopsias, 5 de los 13 tumores cerebrales se diagnosticaron incorrectamente como

meningitis tuberculosa, y 7 de los 30 casos de linfoma maligno se pensó clínicamente que eran TB diseminada.<sup>215</sup>

La situación es aún más grave para las personas con TB multirresistente (MDR, por sus siglas en inglés de *multidrug-resistant*) (ver Tabla N° 2). En 2019 se diagnosticó esa forma de TB a unas 465 000 personas, de las cuales menos del 40% podían acceder al tratamiento. Los progresos han sido limitados también en lo que respecta a la ampliación del acceso al tratamiento preventivo de la tuberculosis.<sup>154</sup>

En el marco de la Estrategia para Poner Fin a la TB (del inglés, *End TB Strategy*) el objetivo era reducir la incidencia de TB en un 20% entre 2015 y 2020,<sup>216</sup> el informe mundial de TB de 2020 indica que hubo una reducción de solo el 9% en la incidencia de TB en este período, con una reducción anual de solo alrededor del 2%.<sup>154</sup> El avance es muy lento y se prevé que el mundo no acabará con la TB como una amenaza mundial para la salud pública en 2035, tal como se estimaba la Estrategia para Poner Fin a la TB.

Un problema particular es la coinfección TB y VIH, la cual presenta tasas elevadas en muchas regiones del mundo, especialmente en la región del África Subsahariana, siendo la TB la causa más común de hospitalización y muerte entre las PVVS. Todas las personas que viven con el VIH y que inician terapia antirretroviral (TAR) deben recibir una atención óptima para la TB, la cual incluye evaluación para inicio del tratamiento preventivo o tratamiento antituberculoso. Desde 2012, la OMS ha recomendado que todas las personas recién diagnosticadas de infección por VIH deban someterse a pruebas de detección de TB.<sup>217</sup> Si no tienen síntomas de TB (como tos, tos con sangre, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, dolor en el pecho, dificultad para respirar o fatiga) deben recibir tratamiento preventivo contra la TB. Si tienen algún síntoma de TB, deben ser investigados a fondo para detectar la enfermedad de TB. Si se descubre que

**Tabla Nº 2.** Número estimado de casos nuevos de tuberculosis (TB), tasa de incidencia de TB, número de muertes asociadas a TB entre todas las personas y entre las personas VIH positivas, y número de pacientes con TB con TB resistente a la rifampicina (TB-RR), por cada región de la Organización Mundial de la Salud y mundial, 2019.

Región de la OMS	N.º de casos de TB, x1,000	Incidencia*	N.º de muertes, x1,000 (TL, %)	N.º de casos de TB entre personas viviendo con VIH, x1,000	N.º de muertes por TB entre personas viviendo con VIH, x1,000	N.º de casos TB-RR,† x1,000	Incidencia de TB-RR*,†	% de casos TB-RR†
<b>Mundial (todas las regiones)</b>	9 960	130	1 418 (14,2)	815,0	208,0	465	6,1	4,7
<b>África</b>	2 470	226	547 (22,1)	595,0	169,0	77	7,0	3,1
<b>América</b>	290	29	22,9 (7,9)	29,0	5,9	11	1,0	3,8
<b>Mediterráneo Oriental</b>	819	114	78,7 (9,6)	7,9	2,7	36	5,0	4,4
<b>Europa</b>	246	26	24,2 (9,8)	30,0	4,2	70	7,5	28,5
<b>Sudeste Asiático</b>	4 340	217	652 (15,0)	117,0	20,0	171	8,6	3,9
<b>Pacífico Occidental</b>	1 800	93	90,3 (5,0)	36,0	6,3	101	5,2	5,6

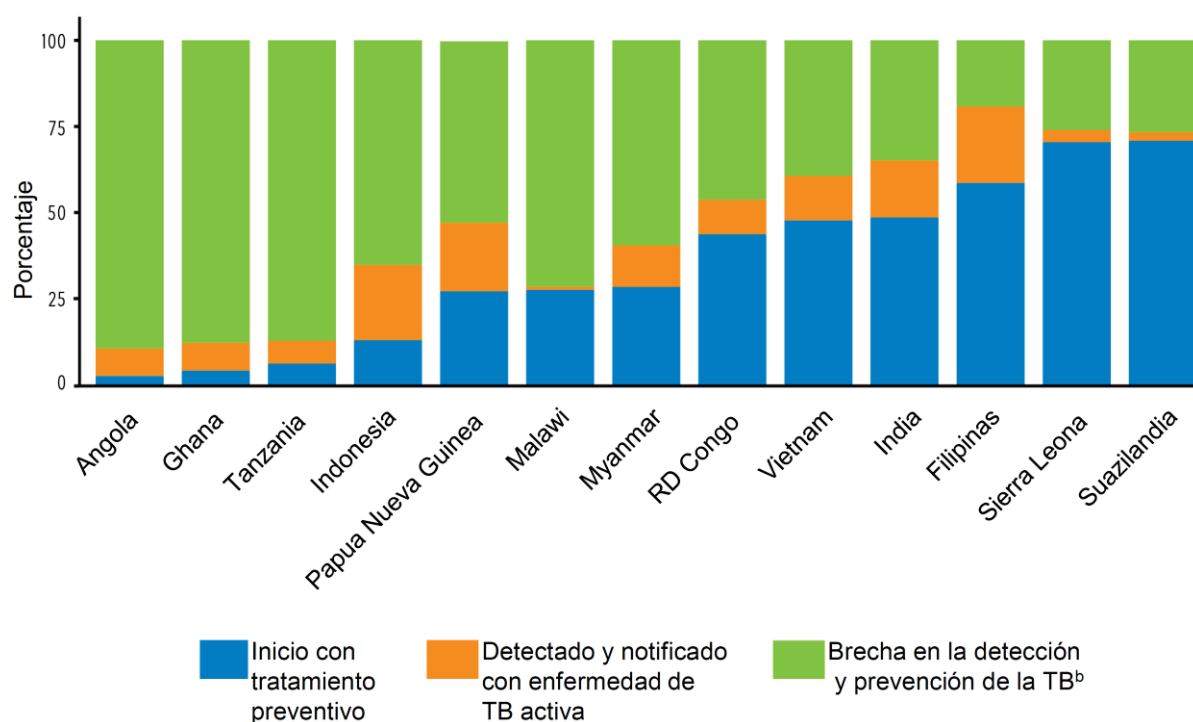
TL = tasa de letalidad, \* Número de casos por 100.000 habitantes, † Incluye TB multirresistente. Modificado de Fukunaga, R. *et al.*<sup>218</sup>

tienen la enfermedad, deben comenzar el tratamiento de la TB de inmediato. Si no hay evidencia de la enfermedad de la TB, deben comenzar con el tratamiento preventivo de la tuberculosis.<sup>217</sup>

En 2019, la TB fue responsable del 30% de muertes relacionadas con el sida. Esto significa que una de cada 3 muertes entre las PVVS está causada por TB.<sup>154</sup> Esto contrasta con la capacidad que tiene el tratamiento, preventivo o específico, de reducir la mortalidad entre las PVVS. El tratamiento preventivo de la tuberculosis reduce el riesgo de desarrollar la enfermedad de tuberculosis y puede reducir las muertes entre las personas que viven con el VIH en casi un 40%. En la Gráfico N° 2 podemos observar que hay una gran disparidad entre los países con alta carga de TB, unos tienen alrededor del 75% de las PVVS en tratamiento (preventivo o específico) para TB, como Suazilandia, mientras otros no llegan al 20%, como son los casos de Angola o Ghana. Y es que como nos dicen las estimaciones, sin tratamiento, es probable que una persona que vive con el VIH y padezca la enfermedad de TB muera.<sup>154</sup>

Dentro de este panorama, los datos precisos y fiables sobre la mortalidad por TB son fundamentales para mejorar el tratamiento de los pacientes, priorizar las intervenciones de salud pública y evaluar el progreso en los indicadores de la estrategia de la OMS para poner fin a la TB.<sup>219</sup> La recolección de los datos a nivel local, nacional y regional suponen un enorme esfuerzo para los sistemas de salud, aun así los datos presentados en el Informe Mundial de TB están sujetos a algunas limitaciones. En primer lugar, la calidad de los datos obtenidos, en particular para la vigilancia, podría afectar la precisión de las estimaciones en los países que han reportado estos datos. En segundo lugar, las diferentes metodologías utilizadas para generar estimaciones a nivel de cada país podrían afectar la comparabilidad de las estimaciones entre regiones y países. Finalmente, no se tiene un dato fiable del gasto que significa la enfermedad en las comunidades, ya que un número limitado de países completó una encuesta nacional de costos que enfrentan los pacientes con TB y sus

**Gráfico N° 2.** Brechas en la prevención de la TB y la detección de la TB para las PVVS que comenzaron con el TAR en países seleccionados con alta carga de TB o TB/VIH<sup>a</sup>, 2019



<sup>a</sup> Los países seleccionados son países con alta carga de TB o TB/VIH que informaron sobre los tres siguientes datos: número de personas que comenzaron con el TAR; número de casos de TB detectados entre las personas que comenzaron con el TAR y número de personas que comenzaron con el TAR que también comenzaron con el tratamiento preventivo de la TB. En los países con una alta carga de TB, las pruebas de detección de la infección por TB no son un requisito para el inicio del tratamiento preventivo de la TB, de modo que todas las personas sin la enfermedad activa de TB son elegibles para el tratamiento preventivo de la TB.

<sup>b</sup> La brecha representa a las personas que viven con el VIH que deberían haberse sometido a una evaluación completa de la enfermedad de tuberculosis o al tratamiento preventivo de la tuberculosis.

Modificado de Global tuberculosis report 2020<sup>154</sup>

hogares, lo que podría afectar la generalización de este indicador.<sup>218</sup> Llegamos a una situación en la cual a pesar de la enorme carga de TB, existe una considerable incertidumbre en cuanto a la mortalidad real atribuible a esta enfermedad, especialmente en algunos países de bajos ingresos con una alta carga de enfermedad.<sup>220</sup>

## 4.2. Criptococosis

Las infecciones fúngicas invasivas (IFI) son una importante causa de morbilidad y mortalidad (Tabla N° 3) entre las personas que viven o se exponen a los hábitats donde se distribuyen hongos patógenos, o para personas con inmunodepresión y pacientes hospitalizados que pueden desarrollar una infección causada por hongos oportunistas<sup>221</sup>.

Los hongos patógenos capaces de causar una enfermedad clínica en individuos sin inmunodeficiencias tienen, por lo general, una distribución geográfica restringida<sup>222</sup>. Estos hongos incluyen *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma* y *Sporothrix*. Por otro lado, los hongos oportunistas se encuentran en todo el mundo. Los ejemplos de estos últimos incluyen especies de *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* y *Rhizopus*.<sup>222</sup> Las fuentes de los diversos hongos se pueden encontrar en la Tabla N° 4 y algunas especies representativas en la Figura N° 3.

**Tabla N° 3.** Casos por año y tasa de mortalidad de las especies de hongos relevantes que causan infección fúngica invasiva a nivel mundial.

Micosis	Agente etiológico principal	Casos por año	Tasa de mortalidad (%)
Candidiasis invasiva	<i>Candida albicans</i>	~ 750,000	~ 40
Aspergilosis invasiva	<i>Aspergillus fumigatus</i>	> 300,000	30-70
Neumonía por <i>Pneumocystis</i>	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	> 400,000	10-60
Meningitis criptocócica	<i>Cryptococcus neoformans</i>	~ 225,000	15 -50
Histoplasmosis diseminada	<i>Histoplasma capsulatum</i>	~ 100,000	10-60
Mucormicosis	<i>Rhizopus oryzae</i>	> 10,000	35-100

Tomado de Firacative<sup>221</sup>

Una de las principales complicaciones de las IFI son las infecciones micóticas del sistema nervioso central (SNC) y, aunque raras, se han vuelto cada vez más frecuentes en las últimas décadas y se asocian con resultados de salud potencialmente devastadores<sup>223</sup>. Actualmente hay más de 100.000 especies de hongos que han sido reconocidos, pero solo un par de cientos de estas especies identificadas han demostrado ser patógenas y solo el 10-15% de ellas producen enfermedades neurológicas<sup>223</sup>. Los factores de riesgo más comunes de infección por hongos incluyen trasplante de órganos, inmunosupresión con quimioterapia o corticosteroides, neoplasias hematológicas y la propagación del VIH/SIDA.<sup>224</sup>

**Tabla Nº 4.** Hábitats de algunos hongos que responsables de infecciones fúngicas invasivas.

<b>Organismo</b>	<b>Hábitat</b>
<b><i>Cryptococcus</i></b>	Excrementos de paloma secos y envejecidos; distribución mundial
<b><i>Histoplasma</i></b>	Suelo contaminado por excrementos de aves (especialmente estornino, cuervo, mirlo, tordo, gaviota, pavo, pollo) y excrementos de murciélago; Las áreas donde se ha registrado el mayor número de casos clínicos se sitúan a lo largo de los valles de los ríos Ohio, Mississippi y Missouri en Norteamérica, en diversas zonas de México y del istmo centroamericano y en las cuencas de los ríos Orinoco, Magdalena, Amazonas, San Francisco, Paraná y de La Plata, así como la Serra do Mar, en Sudamérica. Otras áreas, con menos casos: África occidental, con casos dispersos por África central y oriental, incluidos casos aislados en Madagascar, Asia oriental, norte de la India, Sudeste Asiático y Oceanía.
<b><i>Coccidioides</i></b>	Suelo; América, con zonas hiperendémicas en el Suroeste de Estados Unidos.
<b><i>Blastomyces</i></b>	Suelo; se ha reportado en América del Norte, África y la India, pero las áreas de alta prevalencia se ubican en los valles de los ríos Mississippi y Ohio, Medio Oeste y Grandes Lagos de Norteamérica.
<b><i>Aspergillus</i></b>	Ubicua; ampliamente difundido
<b><i>Paracoccidioides</i></b>	Suelo; América Central y América del Sur

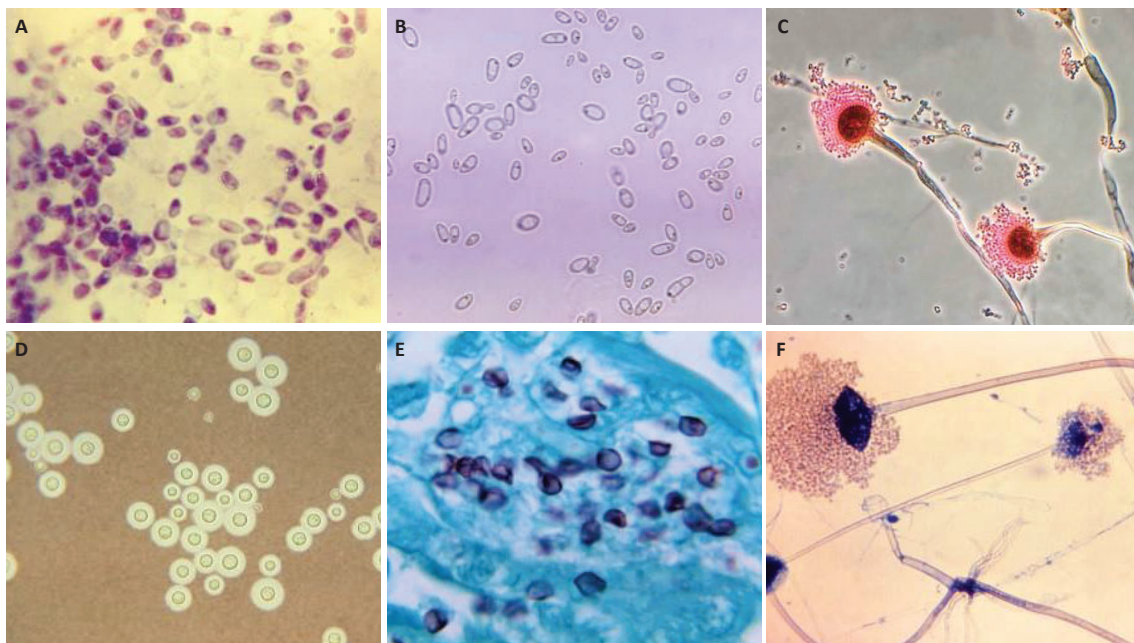
Modificado de Nathan *et al.*<sup>222</sup>

En todo el mundo, un par de especies del género *Cryptococcus* son la causa más común de meningitis fúngica reconocida clínicamente y representa aproximadamente el 70%

de las infecciones fúngicas en general, seguida de coccidioidomicosis (16,4%), candidiasis (7,6%) e histoplasmosis (6%)<sup>222</sup>. A continuación, haremos una revisión sobre los complejos *C. neoformans* y *C. gattii* y su relevancia como agente causante de meningitis.

*Cryptococcus* es un género de levaduras encapsuladas pertenecientes al filo *Basidiomycota* del orden *Tremellales*, está ampliamente distribuido en todo el mundo<sup>225-227</sup> y consta de más de 70 especies que exhiben una biodiversidad significativa entre ellas.<sup>228,229</sup> Las dos principales especies criptocócicas patógenas para humanos y animales son *C. neoformans* y *C. gattii*.<sup>230</sup>

**Figura N° 3.** Fotomicrografías de los hongos patógenos más comunes que causan enfermedades invasivas en humanos



A: *Histoplasma capsulatum* en su fase de levadura; B: *Candida albicans* en su fase de levadura; C: conidióforos filamentosos de *Aspergillus fumigatus*; D: levaduras encapsuladas de *Cryptococcus neoformans*; E: quistes de *Pneumocystis jirovecii*; F: esporangios reproductivos de *Rhizopus oryzae*. Las imágenes no tienen derechos de autor y se obtuvieron del dominio público de la Biblioteca de Imágenes de Salud Pública (PHIL) de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) ([phil.cdc.gov](http://phil.cdc.gov)).<sup>231</sup> Modificado de Firacative<sup>221</sup>

Los nichos ambientales más comunes de *Cryptococcus* son material en descomposición dentro de los huecos de varias especies de árboles, madera en descomposición, plantas con flores y heces de aves.<sup>232-234</sup> Además, se ha encontrado *Cryptococcus* en climas árticos y en condiciones de pH extremos.<sup>226,227,235-239</sup> *C. neoformans* tiene una distribución mundial, mientras que *C. gattii* se ha considerado clásicamente como un hongo tropical o subtropical. Sin embargo, se han identificado reservorios ambientales de *C. gattii* en el norte de Estados Unidos, Canadá y el norte de Europa, lo que indica que esta especie también puede tener un rango ecológico más amplio que el reconocido anteriormente.<sup>240</sup> *C. neoformans* se encuentra comúnmente en los excrementos de palomas y su asociación con palomas salvajes podría ser una fuente importante de infección en áreas urbanas densamente pobladas<sup>234,240,241</sup>, mientras que *C. gattii* es más probable que se encuentre en la vegetación, como los árboles de eucalipto o árboles con cutículas más cerosas.<sup>233,234</sup> Se han sugerido como factores que apoyan la supervivencia y el crecimiento de *C. neoformans* en los excrementos de palomas al pH ácido de estas, una alta concentración de ácido úrico y glucosa, la capacidad de *C. neoformans* para sobrevivir contra la desecación y una competencia mínima con las especies bacterianas en comparación con otras excretas animales.<sup>240,242,243</sup> La migración mundial de muchas especies de aves respalda la omnipresencia propagación de *C. neoformans* mientras que *C. gattii* se limita a focos endémicos.<sup>244-251</sup>

La primera descripción definitiva de *C. neoformans* se asoció con una infección ósea en 1894.<sup>228,252</sup> En 1895, este hongo fue aislado del jugo de durazno, revelando su potencial origen ambiental.<sup>228</sup> *C. neoformans* se consideró originalmente como una especie de *Saccharomyces* y se denominó *Saccharomyces neoformans*.<sup>252</sup> En 1901, Vuillemin lo nombró *Cryptococcus neoformans* debido a la ausencia de producción de ascosporas,<sup>228</sup> que es una característica definitoria del género *Saccharomyces*. Un momento decisivo en su clasificación se produjo a principios de la década de 1970 cuando Shadomy y Utz observaron hifas y conexiones de pinza, que son características

de los basidiomicetos.<sup>252</sup> La identificación de basidios y basidiosporas en los ápices de hifas aéreas<sup>253</sup> y también de septos en hifas criptocócicas<sup>254</sup> establecieron firmemente a *C. neoformans* como un hongo basidiomicetoso. Las investigaciones posteriores dirigidos a determinar la diversidad entre los aislamientos ha definido un complejo de especies relacionadas.<sup>252</sup>

Se han reportado infecciones por *Cryptococcus* en una amplia gama de animales, tanto de compañía (gatos, perros, hurones, caballos y aves) como en animales salvajes (guepardos, koalas, delfines, marsopas, focas, leones marinos y ballenas).<sup>255–258</sup> Rinosinusitis criptocócica en perros y gatos,<sup>255,258</sup> criptococosis del tracto respiratorio inferior en koala<sup>258</sup> y mastitis criptocócica en ganado vacuno<sup>259</sup> son ejemplos de criptococosis en animales. Por el contrario, muchas aves son portadoras de *Cryptococcus* y contribuyen a su propagación, pero rara vez se infectan ellas mismas<sup>260</sup>.

Otras especies distintas a *C. neoformans* y *C. gattii*, como *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus luteolus*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Cryptococcus curvatus* (antes *Candida curvata*) y *Cryptococcus humicola* (antes *Candida humicola* y *Cryptococcus humicolus*) han surgido como patógenos oportunistas en los últimos años<sup>261</sup>. *C. laurentii* y *C. albidus* son responsables de cerca del 80% de los casos notificados de infección por especies distintas a *C. neoformans* y *C. gattii*.<sup>262,263</sup> El 20% restante de las infecciones son causadas por otras especies de *Cryptococcus*, clásicamente consideradas saprofitas y no patógenas; estas especies rara vez se notifican como patógenos humanos.<sup>263</sup> Otras especies de *Cryptococcus spp.* son menos patogénicas probablemente debido a una estructura capsular más débil, aunque pueden ser fatales en humanos como se observa en *C. liquefaciens*.<sup>264</sup>

Inicialmente *C. neoformans* y *C. gattii* se clasificaron como una sola especie, pero se distinguieron por su diversidad antigénica; las cepas de *C. neoformans* son de los serotipos A y D, y las cepas de *C. gattii* son de los serotipos B y C<sup>265,253,266–268</sup>, además de un serotipo híbrido denominado AD (Tabla N° 5). El descubrimiento de dos

teleomorfos diferentes, uno para *C. neoformans* y el otro para *C. gattii*,<sup>253,268</sup> finalmente condujo al reconocimiento de dos especies distintas mediante métodos moleculares en 2002,<sup>230,240</sup> que luego se verificó mediante secuenciación del genoma.<sup>269</sup> *Cryptococcus gattii* se divide además en cuatro tipos moleculares (variedad *gattii*; VGI-VGIV). Por otra parte, se propuso que *C. neoformans* contenía dos variedades que divergieron de un ancestro común hace unos 40 millones de años<sup>270</sup>: *C. neoformans var. neoformans* (serotipos A y D) y *C. neoformans var. gattii* (serotipos B y C).<sup>271</sup> Algunos investigadores aceptan los taxones de siete especies dentro del complejo patógeno *Cryptococcus*, con dos especies *C. neoformans* y *C. deneoformans* del complejo de especies original *C. neoformans* y cinco especies de *C. gattii*.<sup>272</sup> Otros mantienen la nomenclatura de dos complejos de especies, *C. neoformans* y *C. gattii*, para reconocer la diversidad genética y minimizar la inestabilidad de la nomenclatura.<sup>273</sup>

**Tabla N° 5.** Serotipos y tipos moleculares del complejo *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii*

Especie	Variedades	Serotipos	MLST
<b><i>C. neoformans</i></b>	<i>var. grubii</i>	A	VNI
	<i>var. grubiii</i>	A	VNII
	<i>var. grubiii</i>	A	VNB
	<i>var. neoformans</i>	D (2 linajes)	VNIV
	Híbridos	AD híbrido (3 linajes)	VNIII
<b><i>C. gattii</i></b>	–	B o C	VGI
	–	B o C	VGII
	–	B o C	VGIII
	–	B o C	VGIV
<b>Otras especies de Tremellales</b>		Otras 12 especies	

Modificado de Chang *et al.*<sup>227</sup>

Existen vacíos en el conocimiento de la distribución de *C. gattii* en diversas zonas del mundo. Sabemos poco sobre las infecciones por *C. gattii* en África, donde este patógeno se ha aislado de muestras clínicas y ambientales<sup>274</sup>. La mayoría de las cepas VGIV se han descrito en la parte sur de África, mientras que las cepas VGI y VGII se han informado en África central<sup>274</sup>. Se pensaba que las infecciones por *C. gattii* ocurrían

principalmente en los trópicos<sup>275</sup> hasta 2004, cuando se reconoció un brote de *C. gattii* en América del Norte<sup>276</sup>. Este brote fue causado por cepas VGII e incluyó la aparición de variantes hipervirulentas<sup>277</sup>.

Las estimaciones para el año 2014 de la incidencia global de meningitis criptocócica (MC) fue de 223.100 casos anuales (95% IC 150.600 – 282.400)<sup>278</sup>. La mayor carga de esta enfermedad se concentra en el África subsahariana, donde la criptococosis es la principal causa de meningitis en adultos que viven con el VIH<sup>279,280</sup>. En 2008, el número de casos de MC en esta región se estimó en 720.000 (rango 144 000-1,3 millones)<sup>281</sup>. Estimaciones recientes de 2014 indican que más de 160.000 (95% CI 113.600-193.900) casos de MC, incluidos más de 130.000 muertes ocurrieron en África subsahariana<sup>278</sup>. Esta significativa disminución en el número absoluto de los casos de 2008 a 2014 parece estar relacionado con la ampliación de la terapia antirretroviral eficaz (TAR)<sup>205</sup>. Sin embargo, la proporción de muertes relacionadas con el sida por *Cryptococcus sp.* sigue siendo similar (alrededor del 15%), lo que representa la segunda causa más común de mortalidad relacionada con el sida en adultos, después de la tuberculosis<sup>278</sup>.

Es probable que los seres humanos se infecten por *Cryptococcus sp.* al inhalar la forma basidiospora del hongo o levaduras pequeñas mal encapsuladas. Las basidiosporas son más pequeñas que las formas de levadura obtenidas de muestras clínicas y tienen cápsulas de polisacáridos mucho más pequeñas, lo que facilita la deposición en los alvéolos y bronquiolos terminales después de la inhalación.<sup>282</sup> La cápsula del hongo comprende polisacáridos glucuronoxilomanano y glucuronoxilomannogalactano, que son los principales factores que contribuyen a la virulencia del patógeno (Fig. N° 3).<sup>228,283</sup> La infección suele producirse por inhalación de esporas del medio ambiente. La infección inicial es mayoritariamente asintomática y en huéspedes inmunocompetentes, el patógeno puede eliminarse o establecer una infección latente.<sup>284</sup> La propagación de la enfermedad desde el sitio inicial de la infección se produce por diseminación hematogena en pacientes inmunodeprimidos y su diseminación al sistema nervioso

central (SNC) provoca meningitis, la forma más grave de la infección, que es mortal sin el tratamiento adecuado.<sup>285</sup> Otro mecanismo a través del cual puede desarrollarse la infección es la reactivación del organismo en el sitio inicial de la infección después de varios años cuando el paciente se vuelve inmunodeprimido.<sup>285</sup> En los países de bajos ingresos, se ha estimado que la mortalidad de un año por MC, incluso en pacientes infectados por el VIH que reciben atención, es de hasta el 70%<sup>278</sup>.

El conocimiento actual sobre la epidemiología y la presentación clínica de la infección por *C. neoformans* es claramente mayor que el relacionado con *C. gattii*. Las infecciones por *C. neoformans* ocurren predominantemente en personas infectadas por el VIH o con otras condiciones inmunodeprimidas, mientras que las infecciones por *C. gattii* se han descrito principalmente en pacientes aparentemente inmunocompetentes.<sup>275</sup> Los hallazgos de la autopsia revelan que el SNC y los pulmones son los órganos más frecuentemente afectados en infecciones diseminadas,<sup>286,287</sup> que también pueden afectar a múltiples órganos, especialmente en pacientes infectados por el VIH. Sin embargo, las series de autopsias notificadas no suelen incluir la identificación de especies criptocócicas y, por lo tanto, el conocimiento sobre la histopatología de *C. gattii* sigue siendo limitado.

Después de la inhalación, *Cryptococcus sp.* probablemente causa una neumonitis focal que puede ser sintomática o no. El estado inmunológico es el determinante más importante del curso subsiguiente de la infección.<sup>288,289</sup> Las infecciones primarias subclínicas son frecuentes y la mayoría son asintomáticas.<sup>290</sup> Los estudios *post mortem* en personas inmunocompetentes sin antecedentes de problemas respiratorios han demostrado pequeñas áreas de inflamación granulomatosa en el parénquima pulmonar y/o en los ganglios linfáticos hiliares.<sup>291,292</sup> Los focos son generalmente más pequeños que los que se observan en la tuberculosis y no parecen calcificarse con tanta frecuencia como se observa en la histoplasmosis. La infección puede persistir en estado latente; si

el sistema inmunológico del huésped se ve comprometido, los organismos pueden liberarse de los complejos granulomatosos y causar una infección activa.<sup>293</sup>

El diagnóstico de la criptococosis pulmonar puede ser problemático debido a la falta de especificidad de los síntomas, a menudo un bajo índice de sospecha y un diagnóstico limitado en regiones con recursos limitados. Los factores que determinan si una persona expuesta desarrolla una infección sintomática son inciertos, pero pueden incluir el inóculo de hongos (por ejemplo, la carga de exposición) y/o factores de virulencia de la cepa infectante. Los síntomas comunes incluyen tos, producción de esputo, hemoptisis, disnea, dolor torácico, fiebre, malestar, sudores nocturnos y pérdida de peso.<sup>294–296</sup> Los síntomas menos comunes incluyen erupciones cutáneas y molestias gastrointestinales. Se han reportado manifestaciones raras que incluyen casos de obstrucción de la vena cava superior, síndrome de Pancoast debido a inflamación granulomatosa por la respuesta del huésped a *C. neoformans*, neumonía eosinofílica y extensión desde el pulmón hasta la pared torácica.<sup>297–300</sup>

Los criptococos, que pueden asumir una morfología de células titán, liberan moléculas microbianas que contienen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*). Estas moléculas fúngicas suelen ser componentes de la pared celular o de la cápsula, como el  $\beta$ -glucano, la quitina o el glucuronoxilomanano (GXM), que son detectadas por células centinelas del sistema inmune, sobre todo las células dendríticas (DC, *dendritic cells*). La activación de DC luego convoca a las células T, lo que induce a las células T CD4+ a secretar citocinas que activan una respuesta de células T colaboradoras 1 (TH1) (incluida la secreción de interleucina-12 (IL-12) e IL-23). Las células TH1 producen citocinas proinflamatorias (como el interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ )), que en última instancia controlan la infección por hongos. Sin embargo, algunos PAMP fúngicos pueden influir en la activación de las DC, incluida la modulación de los niveles de la señalización del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II) o del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Esto activa una

respuesta TH2 (mediada por la producción de citocinas como IL-4 e IL-33); este entorno antiinflamatorio afecta la activación de los macrófagos (activación clásica de M1 y activación alternativa de M2) y la capacidad de los macrófagos para mediar la eliminación de hongos.

Cuando hay compromiso del SNC, los síntomas de la meningoencefalitis criptocócica, generalmente comienzan de manera indolente durante un período de una a dos semanas. Los síntomas más comunes son fiebre, malestar y dolor de cabeza.<sup>301</sup> Se observa rigidez en el cuello, fotofobia y vómitos en un cuarto a un tercio de los pacientes. En ocasiones, los pacientes pueden presentar coma y muerte fulminante en días.<sup>301</sup> En el caso de una enfermedad diseminada, además de los síntomas neurológicos asociados a compromiso de SNC, también se pueden observar tos, disnea y erupción cutánea.<sup>302</sup> También puede producirse pérdida visual y auditiva.<sup>303,304</sup>

En el caso de la afectación pulmonar, muy a menudo los pacientes diagnosticados con criptococosis pulmonar aislada son asintomáticos y, en cambio, presentan una anomalía radiológica "incidental", que simula una neoplasia maligna pulmonar.<sup>294,305</sup> Debido que la puerta de entrada del hongo suele ser a través de los pulmones, todos los pacientes con criptococosis del SNC deben ser evaluados radiológicamente en busca de afectación pulmonar.<sup>227,294</sup> La neumonía grave con insuficiencia respiratoria aguda no era infrecuente en estudios más antiguos de criptococosis pulmonar realizados al inicio de la epidemia del VIH/SIDA, donde la inmunodeficiencia avanzada era la norma.<sup>306</sup> La mayoría de los pacientes con criptococosis pulmonar son asintomáticos o simplemente informan de tos con escasa producción de esputo, fiebre, disnea y dolor torácico,<sup>307-310</sup> indistinguibles de otras causas de neumonía. También hay descripciones de criptococosis pulmonar en pacientes aparentemente inmunocompetentes.<sup>294,305,311</sup> En una revisión de aproximadamente 90 huéspedes inmunocompetentes con criptococosis pulmonar, el 32% de los pacientes estaban asintomáticos y se descubrió una infección pulmonar como hallazgo incidental.<sup>294</sup> En ocasiones, los pacientes asintomáticos con

hallazgos en la radiografía de tórax sospechosos de malignidad que se someten a biopsia tienen criptococosis.<sup>305,311</sup>

No existen estudios comparativos directos entre pacientes infectados por el VIH y no infectados. Es probable que la gama de síntomas sea similar, aunque las presentaciones graves son más probables en hospedadores inmunodeprimidos. En un estudio de pacientes no infectados por el VIH con criptococosis pulmonar,<sup>308</sup> se observó enfermedad incidental asintomática en el 46,4% de los que tenían enfermedades subyacentes y en el 64,2% sin ninguna enfermedad subyacente. Entre los pacientes, reportados en la serie, con y sin enfermedad subyacente la frecuencia (en porcentaje) de los síntomas fue como sigue: tos (17,6% y 22,3%), dolor torácico (3,6% y 10,4%), producción de esputo (17,6 y 6%) y fiebre (3 y 23%).<sup>308</sup> En otra serie de 23 pacientes realizada en Corea, el 57% de los pacientes no tuvo síntomas ni signos, y el 26% tenía tos, el 17% tenía dolor en el pecho y el 9% tenía fiebre.<sup>310</sup> La sospecha clínica por lo general es baja, en el estudio previamente comentado, por ejemplo, un solo paciente fue diagnosticado con criptococosis pulmonar antes de la confirmación del cultivo.<sup>310</sup> En un estudio retrospectivo de infección pulmonar criptocócica en individuos inmunocompetentes realizado en China, el 24% estaban asintomáticos; los síntomas incluyeron tos (62%), expectoración (38%), disnea (22%), fiebre (21%), dolor de pecho (20%) y pérdida de peso (13%).<sup>307</sup> Esto contrasta con los síntomas entre los pacientes que tienen una infección criptocócica por *C. gattii*. Un estudio de la infección por *C. gattii* en Australia reveló afectación pulmonar en el 63% de los casos, la mayoría de los cuales ocurren al mismo tiempo que la enfermedad del SNC (81% de los casos).<sup>312</sup> Por el contrario, en los brotes de América del Norte, muchos pacientes presentaron síntomas respiratorios (87% de los casos de Columbia Británica y 59% de los casos de EE. UU.),<sup>313</sup> a menudo sin afectación del SNC.

El examen físico proporciona datos según si hay compromiso del SNC o no, en caso de compromiso de SNC los signos pueden ser llamativos a causa del letargo o confusión

en asociación con fiebre. En un informe, el 24% de los pacientes presentaba alteraciones mentales en el momento de la presentación y el 6% presentaba déficits neurológicos focales, como neuropatías craneales.<sup>301</sup> Cuando la presentación es de una enfermedad diseminada pueden ser evidentes otras manifestaciones, como taquipnea y lesiones cutáneas que se asemejan al molusco contagioso.<sup>302</sup> El aumento de la hipertensión diastólica puede ser un reflejo de un aumento de la presión intracraneal.

Los estudios generales de laboratorio son inespecíficos. Los pacientes con inmunosupresión avanzada pueden tener leucopenia, anemia, hipoalbuminemia y un aumento de la fracción de anticuerpos de gammaglobulina.<sup>301</sup>

El tratamiento se ha estudiado mejor para la meningitis criptocócica en pacientes infectados que viven con VIH/SIDA. El tratamiento se inicia con anfotericina B, preferiblemente con la formulación liposomal a 3 a 6 mg/kg diarios (menor riesgo de toxicidad renal),<sup>314,315</sup> siendo las alternativas el complejo lipídico a 5 mg/kg o anfotericina B convencional a 0,7 mg /kg/día.<sup>301,315</sup> Cualquiera de estos puede usarse más flucitosina 25 mg/kg cada 6 horas (100 mg /kg /día con función renal normal) durante al menos 2 semanas y hasta que mejore clínicamente.<sup>301</sup> En la meningitis criptocócica, retrasar el TAR durante estas 2 semanas puede evitar que el IRIS complique el tratamiento y aumente las muertes tempranas. Los pacientes que responden a la terapia antifúngica combinada en la fase de inducción pueden cambiarse a fluconazol, 400 a 800mg/día, durante 8 a 10 semanas como fase de consolidación. Finalmente, se inicia una fase supresora con 200 mg de fluconazol una vez al día. La terapia antimicótica en pacientes infectados por VIH puede interrumpirse después de 1 a 2 años en pacientes que responden al TAR con un recuento de CD4 superior a 100/ $\mu$ L durante al menos 3 meses, una carga viral indetectable y un antígeno criptocócico sérico negativo o bajo. En pacientes no infectados por el VIH que mejoran, la terapia también se extiende generalmente por 1 año.<sup>301</sup>

Las complicaciones de la meningitis criptocócica que requieren atención especial son (1) aumento temprano de la presión intracraneal, que puede provocar ceguera, demencia permanente y muerte; (2) desarrollo de hidrocefalia, que puede requerir la colocación de una derivación ventriculoperitoneal; y (3) IRIS, que puede confundirse con un fracaso terapéutico.<sup>293,301,313</sup>

### *4.3. La microbiología post mortem y el intervalo post mortem*

La importancia y la significación de la microbiología *post mortem* han constituido un ámbito de relevancia académica y debate desde los inicios del estudio microbiológico como una disciplina científica autónoma. A escasos 35 años de que Louis Pasteur empleara técnicas de cultivo líquido para el aislamiento bacteriano y 14 años después de que Robert Koch hiciera uso inicial de medios de cultivo sólido, Archard y Phulpin publicaron en 1895 sus observaciones relacionadas con la identificación de bacterias en estudios *post mortem*<sup>316</sup>. Igualmente, las interrogantes acerca de la validez de los resultados derivados de muestras *post mortem* se manifestaron tempranamente en el discurso científico.<sup>317,318</sup> Para abordar estos cuestionamientos, es imperativo considerar que los hallazgos microbiológicos *post mortem* están influenciados por una multiplicidad de factores y acontecimientos que afectan al cadáver en un proceso de descomposición. El dilema fundamental radica en discernir si el microorganismo aislado o identificado es resultado de una infección pre mortem o simplemente representa una modificación *post mortem*. En el contexto académico, un aislamiento microbiológico *post mortem* legítimo se asocia con la invasión y colonización de microorganismos en órganos o fluidos corporales objetivo antes del deceso, entendido también como infección pre mortem.

No obstante, es crucial enfatizar que la mera presencia de microorganismos no constituye per se un indicativo de enfermedad infecciosa letal. Por ejemplo, la diseminación hematogena de un microorganismo—ya sea bacteriemia, viremia,

parasitemia o fungemia—puede presentarse de manera asintomática o sin lesiones tisulares apreciables. Sin embargo, si tal fenómeno ocurre previamente al deceso y se hallan evidencias relacionadas con una infección durante la evaluación *post mortem*, dicho microorganismo podría ser considerado un agente etiológico contribuyente a la causa de la muerte.

La correlación clínica de manifestaciones sintomáticas, signos específicos de enfermedad e inflamación (modificaciones histológicas) amplía la pertinencia de la presencia microbiana. Esta relevancia se magnifica cuando el microorganismo identificado es un patógeno genuino, es decir, con potencial patogénico previamente establecido, proporcionando así un marcador fiable para la etiología infecciosa en el contexto del análisis *post mortem*.

Un aspecto adicional que merece ser cuidadosamente examinado es la propensión a la aparición de artefactos en el microbioma, derivados de las fluctuaciones *post mortem*. Estas variaciones tienden a magnificarse a medida que se extiende el intervalo *post mortem* (IPM).<sup>319</sup> En la esfera de la microbiología *post mortem*, resulta necesario hacer una distinción meticulosa entre los microorganismos que residen en la superficie cutánea y su entorno inmediato —conocido como microbioma epinecrótico— y aquellos situados en órganos internos y fluidos corporales, designados bajo el término tanatomiobioma.<sup>319</sup> La precisa diferenciación y el estudio detallado de estos dos conjuntos microbianos se postulan como indispensables para una interpretación fidedigna de los resultados *post mortem*. El microbioma epinecrótico está, por regla general, constituido por microorganismos presentes en la piel (que frecuentemente inducen contaminación de hemocultivos pre mortem si no se ejecuta una limpieza adecuada en la zona de venopunción), la orofaringe (donde las secreciones pueden descender a las vías respiratorias bajas cuando la epiglotis se relaja), y el tracto gastrointestinal<sup>319</sup> (que puede atravesar las mucosas desvitalizadas, como veremos más adelante). Por su parte, el tanatomiobioma incluye microorganismos identificados

en una gama completa de órganos internos que son anatómicamente inaccesibles desde el entorno circundante, tales como el sistema nervioso central, la cavidad interna del globo ocular, los pulmones, el corazón y el sistema circulatorio, el hígado, el bazo, los riñones, la vejiga, entre otros.<sup>319</sup> Cabe destacar que un cadáver en avanzado estado de descomposición, particularmente cuando el IPM es prolongado, presentará componentes de ambos ecosistemas microbianos.

Los paradigmas en la práctica de la bacteriología *post mortem* han sufrido una serie de cambios desde los primeros informes de Archard y Phulpin en 1895<sup>316</sup> en 1895. Inicialmente, esta disciplina fue objeto de considerable interés y apoyo; sin embargo, la utilidad de los cultivos bacteriológicos *post mortem* ha persistido como un punto de debate en el ámbito académico<sup>317</sup>. Uno de los primeros trabajos que indagó sobre utilidad de los hemocultivos *post mortem* fue el publicado por Fredette<sup>318,320</sup> en 1916. Además, este autor hipotetizó sobre la fuente de estos microorganismos presentes en los hemocultivos y propuso que se debía a la diseminación desde un foco infeccioso en los momentos agónicos de los pacientes (diseminación agonal), debido que la estructura celular, la función y la viabilidad disminuyen permitiendo que los microorganismos endógenos invadan el torrente sanguíneo en los momentos previos al término de la vida o durante las maniobras de resucitación.<sup>318,320,321</sup> La teoría propuesta por Fredette se basó en un estudio que incluyó 119 autopsias, de las cuales solo recuperó agentes microbianos en 42 (31 fueron monomicrobianos). Este autor tuvo acceso a datos de aislamientos microbianos pre mortem en solo 14 casos, mostrando además una elevada discordancia pre y *post mortem*. De esto se desprende que los contextos clínicos para establecer una correlación pre y *post mortem* no fueron evaluados adecuadamente o incluso no se les dio la importancia adecuada. A pesar de esto, diversos estudios posteriores mostraron resultados que dieron soporte a esta teoría, entre ellos se encuentran los estudios de Giordano y Barnes<sup>322</sup> en 1922, quienes hallaron resultados semejantes a los obtenidos por Fredette en hemocultivos, pero en esta ocasión fue

sobre cultivos de tejido. Koneman y Davis<sup>323</sup> en 1974 también consideraron la diseminación agonal como una teoría viable; en su estudio realizaron hemocultivos y cultivos de tejidos obtenidos de autopsias con un intervalo *post mortem* de menos de 6 horas en 396 voluntarios, hallaron ausencia de correlación entre resultados de cultivos pre mortem y *post mortem* en una elevada proporción (52%), concluyendo que esto respaldaba la diseminación agonal de agentes causantes de la infección así como de agentes contaminantes. Smith et al.<sup>324</sup> en 1975 llevaron a cabo un estudio prospectivo de niños que murieron por complicaciones secundarias a quemaduras. Encontraron que los hallazgos microbiológicos *ante mortem* y *post mortem* se correlacionaban. Datos más recientes también apoyaron la teoría de la diseminación agonal, Saegeman et al. (2009)<sup>325</sup> realizaron un estudio en donantes de tejido, para ello investigó los hemocultivos *post mortem* obtenidos durante y después de las primeras 24 horas *post mortem*, los autores encontraron que la tasa de positividad más alta de los hemocultivos se veía en las primeras 5 horas después de la muerte y que no había una diferencia significativa en la positividad entre las primeras 24 horas de la muerte y después. En ese estudio, se obtuvieron muestras de sangre de los vasos subclavios o femorales, utilizando técnicas asépticas, sin embargo, la mayoría de los organismos que se encontraron fueron *Staphylococcus* coagulasa-negativos, considerados habitualmente como un contaminante. En general, no hubo un aumento o disminución significativa en la tasa de positividad de los hemocultivos durante las primeras 48 horas después de la muerte. A pesar de la ausencia de una diferencia significativa entre los intervalos *post mortem*  $\leq 24$  h y  $>24$  h en las tasas de positividad de los hemocultivos, los autores observaron un ligero aumento en los niveles de *Enterobacteriaceae* recuperados en los hemocultivos *post mortem* recolectados después del intervalo inicial de 24 horas *post mortem* (19%) en comparación con los hemocultivos recolectados dentro de las primeras 24 horas después de la muerte (11%). Aún con esta observación, los autores argumentaron contra el concepto de transmigración bacteriana *post mortem* como causa de este hallazgo.

Algún tiempo después de propuesta la teoría de la diseminación agonal surgió una alternativa, la teoría denominada translocación bacteriana *post mortem*, la cual hace referencia al proceso que se produce tras la degradación de las superficies mucosas, permitiendo la migración microbiana a través de membranas hacia la sangre y tejidos del cuerpo, una vez detenida la circulación, pero antes de la realización de la autopsia. Este fenómeno fue inicialmente descrito por Gradwohl<sup>324</sup> en 1904 y ha sido corroborado por múltiples estudios posteriores, como el llevado a cabo por Carpenter y Wilkins<sup>326</sup> en 1964, quienes reportaron los resultados de una revisión retrospectiva completa de 2033 autopsias y mostraron que la tasa de cultivos de sangre *post mortem* positivos aumentó del 20% al 40% en correlación con el tiempo transcurrido del intervalo *post mortem* y el tiempo de obtención de los hemocultivos durante las primeras 18 horas después de la muerte. Esos autores también investigaron la utilidad de los cultivos de muestras de pulmones *post mortem* y encontraron que la tasa de positividad aumentó en correlación con la duración de la estancia hospitalaria y el intervalo *post mortem* antes de que se obtuviera el tejido pulmonar para el cultivo. La hipótesis de la traslocación bacteriana (que surgió como alternativa a la diseminación agonal) propuesta por Carpenter y Wilkins<sup>326</sup> sugiere que las bacterias endógenas se multiplican y migran por todo el cuerpo solo después de la muerte. Kellerman et al. (1976)<sup>327</sup> apoyaron esta teoría con los resultados de sus experimentos in vitro mostrando que las bacterias podrían migrar a través de la pared intestinal intacta de los humanos dentro de las 12 a 15 horas posteriores a la muerte. Otras observaciones clínicas y estudios con animales han respaldado la teoría<sup>324,328</sup> y las pruebas de la migración *post mortem* son generalmente mucho más fuerte que para la diseminación agonal. Sin embargo, la hipótesis no ha sido fácil de corroborar. Uno esperaría que el número de microorganismos por mililitro o miligramo de muestra aumentaría con la duración del intervalo *post mortem*, pero los estudios basados en cultivos no han podido confirmar esto.<sup>329-334</sup> No fue hasta 2013 con la publicación de las investigaciones de Tuomisto et al.<sup>335</sup> que se pudo validar la translocación bacteriana *post mortem* en diversos tejidos y fluidos, como hígado y

líquido pericárdico, mediante cultivo bacteriano y PCR cuantitativa en tiempo real. En este estudio, se observó que las muestras más estériles hasta 5 días *post mortem* eran el líquido pericárdico y el hígado, donde raramente se detectaba cualquier tipo de crecimiento bacteriano. La PCR cuantitativa resultó ser más sensible que el cultivo y mostró un aumento en la presencia bacteriana en todas las muestras estudiadas. Las cantidades relativas de ADN bacteriano intestinal (como bifidobacterias, bacteroides, enterobacterias y clostridios) mostraron un incremento a lo largo del tiempo. La esterilidad de las muestras sanguíneas se mantuvo baja durante los períodos de tiempo evaluados (1-7 días). Solo con la aparición de técnicas moleculares, y el uso de PCR cuantitativa en tiempo real, ha quedado claro que la esterilidad disminuye con el tiempo después de la muerte en una variedad de tejidos y que hay cambios en el número y especies de los organismos invasores.

También un aspecto para tener en cuenta, que a lo largo del tiempo se ha investigado de forma reiterada, es la utilidad de los cultivos de sangre y tejidos *post mortem* para ayudar en el diagnóstico de sepsis y neumonía. En 1965, O'Toole *et al.*<sup>336</sup> publicaron un estudio que demostraba que los cultivos de tejidos bacteriológicos *post mortem* solo eran indicativos de infección en el 44% de los casos examinados. En su estudio, los investigadores utilizaron cultivos de tejido esplénico en lugar de hemocultivos para detectar bacteriemia. A pesar de que otros estudios han demostrado un valor algo mayor de los exámenes microbiológicos *post mortem*<sup>337</sup>, los resultados presentados por O'Toole, junto con estudios publicados en décadas posteriores<sup>323,329,338</sup>, han llevado a, y quizás aún respaldan, la creencia predominante entre muchos patólogos y microbiólogos de que los exámenes microbiológicos *post mortem* carecen de utilidad diagnóstica significativa y son, de hecho, poco fiables. Las preocupaciones sobre la confiabilidad de los resultados de los cultivos llevaron a un marcado declive del interés en este campo. Finalmente, la opinión predominante fue que el examen microbiológico *post mortem* no era útil y, de hecho, era engañoso. Esto fue reforzado por un estudio<sup>329</sup>,

que comparó los hemocultivos positivos *post mortem* con los resultados de los hemocultivos *ante mortem* en 111 pacientes. Los resultados de los hemocultivos *ante mortem* y *post mortem* coincidían en el 35% de los casos, pero en el resto los resultados eran inconsistentes y los cultivos a menudo estaban contaminados. Los autores concluyeron que los resultados de los hemocultivos *post mortem* deberían ser considerados con un alto índice de sospecha, rara vez, si acaso, proporcionaban información nueva y útil y solo valdrían la pena en situaciones en las que los cultivos *ante mortem* no estuvieran disponibles. Toda esta información debe de ser ponderada a la luz de las técnicas utilizadas en el momento que fueron llevados a cabo. Se ha logrado un gran avance con la implementación de las técnicas moleculares en el estudio de las muestras *post mortem*. Sin embargo, faltaban estudios que validen el uso clínico de estas técnicas en amplias cohortes, esta situación cambió con los datos del estudio CaDMIA llevado a cabo nuestro grupo de investigación. En un estudio observacional para determinar las causas de muerte en una población de adultos<sup>189</sup>, se realizaron análisis de AMI y AC en 112 pacientes fallecidos en el Hospital Central de Maputo, Mozambique. Los análisis de AMI se llevaron a cabo de manera ciega, sin conocimiento de los datos clínicos o los resultados de la AC. El procedimiento de autopsia fue llevado a cabo por un equipo conformado por un patólogo y un técnico. Después de la desinfección de la superficie del cuerpo, se recolectó de 20 mL tanto de sangre como de líquido cefalorraquídeo (LCR), y se obtuvieron muestras de hígado, pulmones, médula ósea y sistema nervioso central mediante punción, utilizando agujas de biopsia, para análisis microbiológico e histológico. Adicionalmente, se tomaron muestras del corazón, bazo y riñones exclusivamente para análisis histológico. Inmediatamente después de la AMI, se llevó a cabo el procedimiento de AC por un segundo patólogo no involucrado en la AMI. La AC se realizó en todos los casos en un lapso de una hora tras la finalización de la AMI. La AC siguió un protocolo estandarizado. Se recogieron muestras de los mismos tejidos que se tomaron en la AMI y de cualquier lesión identificada a simple vista para análisis histológico y microbiológico. Para realizar el

análisis histológico y microbiológico, todas las muestras fijadas en bloques de parafina y las muestras microbiológicas fueron enviadas al Hospital Clínic de Barcelona. Dos patólogos y un microbiólogo, sin conocimiento previo de la información clínica o los hallazgos de la AC, analizaron las láminas histológicas y las muestras microbiológicas obtenidas en la AMI. Tras un intervalo (mínimo de 3 meses, con un rango 3–6 meses), los mismos expertos evaluaron las muestras obtenidas en la AC sin tener conocimiento de los hallazgos de la AMI. Para la histología, se emplearon tinciones rutinarias con hematoxilina y eosina. Se utilizaron tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas adicionales (p.ej., Ziehl-Neelsen) según fuese necesario para el diagnóstico. Se llevó a cabo un cribado universal que incluía la detección de *Plasmodium falciparum* por PCR, detección de anticuerpos contra el VIH-1/2, y cultivos bacterianos/fúngicos de sangre, LCR, hígado, pulmones y SNC. En muestras positivas para anticuerpos contra el VIH, se determinó la carga viral. Además de los cribados universales, se llevaron a cabo pruebas moleculares guiadas por los resultados histológicos o microbiológicos, los cuales consistían en PCR en tiempo real para citomegalovirus, PCR del gen 16S rRNA para detectar bacterias, PCR 18S rRNA-ITS para detectar hongos, PCR en tiempo real para *Toxoplasma gondii*, PCR en tiempo real para *Pneumocystis jirovecii*, PCR en tiempo real para *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y RT-PCR multiplex para virus respiratorios. Todas las reacciones de secuenciación de amplicones obtenidos por PCR de 16S rRNA o 18S rRNA-ITS se realizaron mediante el método Sanger en la plataforma de secuenciación del Hospital Clínic de Barcelona. La identificación de patógenos se realizó comparando las secuencias obtenidas con las presentes en GenBank utilizando el algoritmo BLAST. En casos positivos para VIH, se aplicó el siguiente algoritmo de pruebas universales: las muestras de LCR y SNC se examinaron mediante PCR para *T. gondii*, PCR 18S rRNA-ITS y PCR para MTB, y las muestras de pulmón se analizaron para *P. jirovecii* y MTB. Además, se realizaron pruebas adicionales según los hallazgos histológicos. En este sentido, los casos de meningitis/meningoencefalitis se analizaron para HSV-1, HSV-2, CMV, PCR 16S rRNA y enterovirus. Los casos histológicamente

compatibles con neumonía se analizaron mediante PCR 16S rRNA, PCR de MTB y PCR multiplex para virus respiratorios. El equipo estuvo al tanto de todos los hallazgos de la AC (macroscópicos, histológicos y microbiológicos) y de la información clínica. Todos los análisis histológicos y microbiológicos se realizaron en el laboratorio central de Barcelona, excepto los cultivos de sangre, LCR y tejidos, y los análisis de VIH, que se llevaron a cabo localmente (Mozambique). Se compararon los diagnósticos de AMI con los diagnósticos de AC en relación con la causa de la muerte. Los diagnósticos de AC incluyeron enfermedades infecciosas (80; 71,4%), tumores malignos (16; 14,3%) y otras enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares, gastrointestinales, renales y pulmonares no infecciosas (16; 14,3%). Se obtuvo un diagnóstico de AMI en 100 de 112 casos (89,2%). La concordancia general entre el diagnóstico de AMI y AC fue del 75,9% (85/112). La concordancia fue mayor para las enfermedades infecciosas y los tumores malignos (63/80 [78,8%] y 13/16 [81,3%], respectivamente) que para otras enfermedades (9/16; 56,2%). Los microorganismos específicos que causaron la muerte se identificaron mediante AMI en 62 de los 74 casos (83,8%) de fallecimientos por enfermedades infecciosas con una causa reconocida. Este estudio validó el uso de un procedimiento específico y estandarizado, aplicando técnicas de diagnóstico bacteriológico y molecular en autopsias en adultos para la determinación de la causa de muerte.

Otro punto importante, que es en gran medida prevenible, es que las muestras pueden contaminarse durante la recolección en el examen *post mortem*. Esto es particularmente importante al tomar muestras de sitios que están relativamente protegidos de la invasión bacteriana, como el cerebro, las meninges y el pericardio, donde la contaminación tiene el potencial de generar resultados engañosos. Las especies potencialmente patógenas se mezclan comúnmente con comensales en las muestras de sangre y tejido *post mortem*<sup>329,335</sup>, y, como puede ser difícil atribuir la causa en esta situación, cualquier paso para minimizar los contaminantes vale la pena el esfuerzo. Se han intentado varios

enfoques para reducir la contaminación bacteriana. Algunos patólogos han utilizado técnicas quirúrgicas modificadas con buenos resultados. En un extremo, usando una sala de autopsias quirúrgicamente limpia, fregando el cuerpo durante 5 minutos con povidona-yodo con un enjuague de 5 minutos con alcohol al 70%, lavado, vestimenta, guantes y máscaras rutinarias del personal de autopsia y recolectando porciones de cada órgano usando un conjunto separado de instrumentos para cada muestra, hasta el 45% de los especímenes pulmonares y el 75% de los especímenes renales pueden ser recuperados estériles.<sup>336,339</sup> Sin embargo, esta técnica compleja es impráctica para su uso rutinario y puede ser innecesaria para obtener resultados confiables de cultivo microbiológico. En otro estudio<sup>340</sup> obtuvieron resultados similares usando métodos mucho menos elaborados.

A pesar de las controversias históricas, las muestras de autopsia bien tomadas pueden ser de valor incalculable tanto para confirmar un diagnóstico de infección presuntiva *ante mortem* como para destacar a un organismo oscuro o insospechado como la causa de la enfermedad de un paciente.<sup>341,342</sup> Con la aparición de técnicas de diagnóstico molecular, el uso del cultivo, con todas sus limitaciones, deja de ser gravitante en el estudio de las muestras *post mortem*. Esto permite la posibilidad de una sensibilidad mucho mayor y, permitirá, que la microbiología haga una mayor contribución al examen *post mortem*.

# Hipótesis



Cerca de la mitad de las personas en el mundo, la mayoría de ellas habitantes de países de baja y mediana renta, mueren sin que conste información sobre el proceso que los lleva a la muerte. Esta ausencia de datos confiables sobre las causas de muerte se ha señalado como un factor limitante para reducir la mortalidad en el mundo. Existe la necesidad de implementar métodos que mejoren la obtención y precisión de los datos de las causas de muerte, especialmente en personas que viven en regiones de baja renta. **La hipótesis general de esta tesis es que la autopsia mínimamente invasiva puede proporcionar una información precisa y valiosa para las muertes de causa infecciosa en países de renta baja y mediana.**

Las hipótesis específicas del proyecto son;

**1.1. La autopsia mínimamente invasiva permitirá obtener datos de calidad sobre las causas de muerte materna, equiparables a los datos obtenidos con la autopsia completa diagnóstica.**

**1.2. Es posible tomar muestras autópsicas más allá de 24 horas *post mortem* sin una alteración importante en los resultados microbiológicos.**

**1.3. La autopsia mínimamente invasiva y el análisis detallado de los datos autópsicos permiten determinar y caracterizar la mortalidad por criptococo.**

**1.4. La autopsia mínimamente invasiva y el análisis detallado de los datos autópsicos permiten determinar y caracterizar la mortalidad por tuberculosis, así como contribuir a simplificar el diagnóstico de causa de muerte por tuberculosis.**



## Objetivos



1. Determinar el rendimiento de la autopsia mínimamente invasiva para determinar las causas de muerte materna en Mozambique, comparando sus resultados con los de la autopsia completa considerada como el estándar de oro para la atribución de causa de muerte.
2. Evaluar la influencia del intervalo *post mortem* (IPM) en el rendimiento diagnóstico de la autopsia mínimamente invasiva y la autopsia completa.
3. Evaluar la calidad de las muestras obtenidas en la autopsia mínimamente invasiva para la práctica de estudios microbiológicos, y determinar si dichas muestras permiten identificar de forma precisa a los diversos microorganismos causantes de la muerte de los pacientes, y realizar estudios finos de caracterización molecular de dichos microorganismos.
4. Evaluar la contribución de *Cryptococcus spp.* a la mortalidad en áreas de baja renta y realizar una caracterización detallada de estas infecciones.
5. Determinar la mortalidad asociada a la tuberculosis en autopsias realizadas en Mozambique.
6. Investigar la utilidad de técnicas moleculares rápidas en el diagnóstico de *post mortem* de tuberculosis.



## **Material, Métodos y Resultados**



A continuación, se detallan los artículos científicos publicados derivados de esta tesis doctoral, indicando la hipótesis y objetivos de esta con los que se relacionan.

## Artículo 1

**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS RELACIONADOS:** Hipótesis 1.1 y Objetivo 1

**AUTORES:** Castillo P\*, Hurtado JC\*, Martínez MJ, Jordao D, Lovane L, Ismail MR, Carrilho C, Lorenzoni C, Fernandes F, Mocumbi S, Jaze ZO, Mabota F, Cossa A, Mandomando I, Cisteró P, Mayor A, Navarro M, Casas I, Vila J, Maixenchs M, Munguambe K, Sanz A, Quintó L, Macete E, Alonso P, Bassat Q, Ordi J, Menéndez C.

\*Ambos autores han contribuido de idéntica manera al trabajo y ambos deben ser considerados como primer autor del mismo.

**TÍTULO:** Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in maternal deaths in Mozambique: An observational study.

**REVISTA, VOLUMEN (NÚMERO): PÁGINAS, FECHA DE PUBLICACIÓN:** PLOS *Medicine*, 14(11): 15. November 8, 2017

**DOI:** 10.1371/journal.pmed.1002431

**FACTOR DE IMPACTO:** 11.675

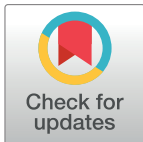
**CUARTIL (JCR):** Q1 (Medicine General and Internal)



RESEARCH ARTICLE

# Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in maternal deaths in Mozambique: An observational study

Paola Castillo<sup>1,2</sup>✉, Juan Carlos Hurtado<sup>1,3</sup>✉, Miguel J. Martínez<sup>1,3</sup>, Dercio Jordao<sup>4</sup>, Lucilia Lovane<sup>4</sup>, Mamudo R. Ismail<sup>4,5</sup>, Carla Carrilho<sup>4,5</sup>, Cesaltina Lorenzoni<sup>4,5</sup>, Fabiola Fernandes<sup>4</sup>, Sibone Mocumbi<sup>6</sup>, Zara Onila Jaze<sup>6</sup>, Flora Mabota<sup>6</sup>, Anelsio Cossa<sup>7</sup>, Inacio Mandomando<sup>7</sup>, Pau Cisteró<sup>1</sup>, Alfredo Mayor<sup>1,7</sup>, Mireia Navarro<sup>1,3</sup>, Isaac Casas<sup>1,3</sup>, Jordi Vila<sup>1,3</sup>, Maria Maixenchs<sup>1,7</sup>, Khátia Mungambe<sup>5,7</sup>, Ariadna Sanz<sup>1</sup>, Llorenç Quintó<sup>1</sup>, Eusebio Macete<sup>7</sup>, Pedro Alonso<sup>1,7</sup>, Quique Bassat<sup>1,7,8</sup>, Jaume Ordi<sup>1,2</sup>‡, Clara Menéndez<sup>1,7,9</sup>‡\*



**1** ISGlobal, Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clinic of Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Department of Pathology, Hospital Clinic of Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Department of Microbiology, Hospital Clinic of Barcelona, Universitat de Barcelona, Spain, **4** Department of Pathology, Maputo Central Hospital, Maputo, Mozambique, **5** Faculty of Medicine, Eduardo Mondlane University, Maputo, Mozambique, **6** Department of Gynecology and Obstetrics, Maputo Central Hospital, Maputo, Mozambique, **7** Centro de Investigação em Saúde de Manhiça, Maputo, Mozambique, **8** ICREA, Catalan Institution for Research and Advanced Studies, Pg. Lluís Companys, Barcelona, Spain, **9** Consorcio de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain

**OPEN ACCESS**

**Citation:** Castillo P, Hurtado JC, Martínez MJ, Jordao D, Lovane L, Ismail MR, et al. (2017) Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in maternal deaths in Mozambique: An observational study. *PLoS Med* 14(11): e1002431. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002431>

**Academic Editor:** Peter Byass, Umeå Centre for Global Health Research, Umeå University, SWEDEN

**Received:** May 5, 2017

**Accepted:** October 6, 2017

**Published:** November 8, 2017

**Copyright:** © 2017 Castillo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. Additional data are available upon request, in accordance with the consortium agreement signed by the CaDMIA project partnership. Data use and transfer are monitored by ISGlobal's Biostatistics and Data Management Unit (contact email: [ubioesdm@isglobal.org](mailto:ubioesdm@isglobal.org)).

✉ These authors contributed equally to this work.

‡ JO and CM also contributed equally to this work. JO and CM are joint senior authors on this work.

\* [clara.menendez@isglobal.org](mailto:clara.menendez@isglobal.org)

## Abstract

### Background

Despite global health efforts to reduce maternal mortality, rates continue to be unacceptably high in large parts of the world. Feasible, acceptable, and accurate postmortem sampling methods could provide the necessary evidence to improve the understanding of the real causes of maternal mortality, guiding the design of interventions to reduce this burden.

### Methods and findings

The validity of a minimally invasive autopsy (MIA) method in determining the cause of death was assessed in an observational study in 57 maternal deaths by comparing the results of the MIA with those of the gold standard (complete diagnostic autopsy [CDA], which includes any available clinical information). Concordance between the MIA and the gold standard diagnostic categories was assessed by the kappa statistic, and the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and their 95% confidence intervals (95% CI) to identify the categories of diagnoses were estimated. The main limitation of the study is that both the MIA and the CDA include some degree of subjective interpretation in the attribution of cause of death.

**Funding:** The CaDMIA research project (Validation of the minimally invasive autopsy tool for cause of death investigation in developing countries) was funded by the Bill & Melinda Gates Foundation (Global Health grant number OPP1067522; QB) (<http://www.gatesfoundation.org>) and by the Spanish Instituto de Salud Carlos III (FIS, PI12/00757; CM) (<https://portafis.isciii.es>). Data analysis has been supported by the CaDMIA plus research project, funded by the Bill & Melinda Gates Foundation (Global health grant number OPP1128001; JO) (<http://www.gatesfoundation.org>) and the Spanish Instituto de Salud Carlos III (Acciones CIBER; CM) (<http://www.ciberisciii.es/>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** CM is a member of the Editorial Board of *PLOS Medicine*.

**Abbreviations:** CDA, complete diagnostic autopsy; CI, confidence interval; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; ICD-10 MM, International Classification of Diseases, 10th revision for maternal mortality; MIA, minimally invasive autopsy; MMR, maternal mortality ratio.

A cause of death was identified in the CDA in 98% (56/57) of cases, with indirect obstetric conditions accounting for 32 (56%) deaths and direct obstetric complications for 24 (42%) deaths. Nonobstetric infectious diseases (22/32, 69%) and obstetric hemorrhage (13/24, 54%) were the most common causes of death among indirect and direct obstetric conditions, respectively. Thirty-six (63%) women were HIV positive, and HIV-related conditions accounted for 16 (28%) of all deaths. Cerebral malaria caused 4 (7%) deaths. The MIA identified a cause of death in 86% of women. The overall concordance of the MIA with the CDA was moderate ( $\kappa = 0.48$ , 95% CI: 0.31–0.66). Both methods agreed in 68% of the diagnostic categories and the agreement was higher for indirect (91%) than for direct obstetric causes (38%). All HIV infections and cerebral malaria cases were identified in the MIA. The main limitation of the technique is its relatively low performance for identifying obstetric causes of death in the absence of clinical information.

## Conclusions

The MIA procedure could be a valuable tool to determine the causes of maternal death, especially for indirect obstetric conditions, most of which are infectious diseases.

The information provided by the MIA could help to prioritize interventions to reduce maternal mortality and to monitor progress towards achieving global health targets.

## Author summary

### Why was this study done?

- Since 1990, the maternal mortality ratio (MMR) has dropped by 43%, but despite this progress, hundreds of women still die every day in large parts of the world due to pregnancy or childbirth complications.
- A reliable knowledge of the causes of maternal death is a necessary condition to reduce this burden through adequate health planning.
- Current methods, such as verbal autopsies or the review of clinical data, have shown a high degree of misclassification in this specific group of deaths.
- We aimed to validate a minimally invasive autopsy (MIA) approach as a possible complement to verbal autopsies by comparing its performance against the complete diagnostic autopsy, the gold standard for cause of death investigation.

### What did the researchers do and find?

- We performed paired MIA and CDA in 57 maternal deaths that occurred at the Maputo Central Hospital, Mozambique, and assessed the concordance between both methods.
- Indirect obstetric diseases caused 56% of all deaths and direct obstetric complications accounted for 42% of deaths.
- Infectious diseases and obstetric hemorrhage were the most common causes of death among indirect and direct obstetric conditions, respectively.

- The overall concordance of the MIA with the CDA was moderate and both methods agreed in 68% of the diagnostic categories.
- The etiological microorganisms in infectious diseases causes of death were identified in 67% of the MIAs.

### What do these findings mean?

- The MIA procedure could be a valuable tool to determine the causes of maternal death, especially in indirect obstetric conditions, most of which are infectious diseases.
- This information may be helpful for decision-making on health planning and prioritization of interventions to reduce maternal mortality and for monitoring progress towards achieving global health targets.

## Introduction

As the Millennium Development Goals came to a close in 2015, the maternal mortality ratio (MMR) had dropped by 43% since 1990 [1]. Although this progress is certainly encouraging, it is lower than the 75% target initially planned, and hundreds of women still die every day due to complications of pregnancy or childbirth. In 2015, the number of estimated maternal deaths occurring worldwide was 303,000, most of which were preventable and disproportionately took place in low- and middle-income countries. The MMR in low-income countries in 2015 was 239 per 100,000 live births versus 12 per 100,000 live births in high-income countries, according to WHO [2]. In Mozambique, in 2015, the MMR was 489 per 100,000 live births, with an annual rate of reduction of 4.4% from 2005–2015 [3]. The aim of Sustainable Development Goal 3.1 is to reduce the global MMR to less than 70 per 100,000 live births by 2030 [4]. The accomplishment of this objective requires robust data sources to develop accurate estimates and, importantly, a thorough understanding of the causes of these deaths. Monitoring progress towards the 5th Millennium Development Goal, focusing on maternal health, revealed the lack of high-quality data in most countries, especially those with the highest MMR [1].

Recently, a minimally invasive autopsy (MIA) protocol has been adapted for cause of death determination in middle- and low-income settings [5]. This postmortem procedure, which consists of the sampling of key organs and fluids for histological and microbiological analysis, could add value to the currently used methods that rely on verbal autopsies and clinical records, which have been shown to have a high level of imprecision, especially for maternal and perinatal deaths [6,7].

The complete diagnostic autopsy (CDA) is the gold standard for cause of death determination but it is not free of limitations. The CDA is an invasive procedure, often not accepted by the relatives, and requires trained pathologists to perform it. The MIA, as opposed to the CDA, has been shown to be simple and more acceptable [8] and can be performed by less qualified personnel. The MIA has been recently validated in a series of in-hospital stillbirth, neonate, pediatric, and adult deaths in Mozambique [5]. These validation studies have shown that the MIA may reliably identify the cause of death with high concordance when compared with the gold standard CDA diagnosis, particularly for infectious diseases.

In this study, we analyzed the validity of the MIA to determine the cause of death in a series of in-hospital maternal deaths from Mozambique.

## Methods

### Study setting and design

This observational study received the approval of the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona (Spain; approved, File 2013/8677) and the National Bioethics Committee of Mozambique (Mozambique; approved, Ref. 342/CNBS/13).

The study was conducted at the Departments of Gynecology and Obstetrics and Pathology of the Maputo Central Hospital, a 1,500-bed government-funded institution that serves as the referral center for other hospitals in southern Mozambique. Recruitment of maternal deaths was conducted from November 2013 to March 2015 as part of a comprehensive validation study of the validity of the MIA in different age groups [9].

We included in the study all deceased women fulfilling the following inclusion criteria: (1) death during pregnancy or within 42 days of termination of pregnancy, irrespective of its cause (maternal deaths, as defined by WHO) [10,11]; (2) a CDA requested by the clinician as part of the medical evaluation of the patient; and (3) oral informed consent to perform the autopsy given by the relatives. Accidental or incidental deaths were excluded.

The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement and the prospective analysis plan are included as supplementary information (S1 STROBE Checklist and S1 Text, respectively).

The overall study plan, indicating how postmortem procedures were performed, the laboratory investigations involved, and site and timing of each procedure, has been reported elsewhere [5].

### Autopsy procedures

Detailed MIA pathological and microbiological methods have been reported elsewhere [12,13]. The procedure, tailored for maternal deaths, included an initial disinfection of the surface of the body followed by the collection of blood and cerebrospinal fluid (CSF), aiming to collect about 20 mL. The procedure also included the puncture of solid organs (liver, lungs, and central nervous system [CNS]) for microbiological and pathological analysis using biopsy needles (14G–16G). In addition, the heart, spleen, and kidneys were targeted for pathology examination. In this particular group, biopsy samples of the uterus were attempted with a 14G biopsy needle, which were analyzed histologically and microbiologically. In addition, a sample of amniotic fluid, if available, was obtained.

Immediately after the MIA, the CDA procedure was conducted by a second pathologist not involved in the MIA and following a standardized protocol for maternal autopsies [5]. Histological and microbiological analyses were conducted in samples from the same viscera collected in the MIA and from any grossly identified lesions. The microbiological results of the blood and CSF were also included in the CDA evaluation.

### Histological and microbiological analyses

A team of 2 pathologists (J.O., P.Ca.) and 2 microbiologists (M.J.M., J.H.) reviewed and analyzed the samples from the MIA blindly to any clinical data except the information on the maternal status at death (pregnant, puerperal, previous abortion) that allowed classifying the case as a maternal death. All samples collected for histology were routinely stained with hematoxylin and eosin. Additional histochemical (e.g., Masson trichrome) and/or

immunohistochemical stains and in situ hybridization techniques (e.g., Epstein–Barr virus-encoded small RNAs) were used, whenever needed, to reach a diagnosis. The microbiological methods have been reported in detail elsewhere [13]. In all patients, screening for context-epidemiologically common pathogens was conducted, including *Plasmodium falciparum* by real-time PCR detection of antibodies against human immunodeficiency virus (HIV)-1/2, hepatitis B virus surface antigen, and antibodies against hepatitis C virus. In all HIV-infected patients, the viral load was determined routinely. Additionally, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis*, and *Cryptococcus* spp. in CSF and CNS samples and *Pneumocystis jirovecii*, *Cryptococcus* spp., and *M. tuberculosis* in the lungs were tested by real-time PCR. Any other microorganisms were only investigated depending on the pathological findings observed in the MIA-obtained tissues.

After a washout period of 3–6 months, the same team of experts analyzed the samples of the CDA following the same approach used for the analysis of the MIA samples.

### Determination of the cause of death

The methodology for cause of death determination has been detailed elsewhere [5]. Briefly, once all the analysis of the MIA samples had been completed, a panel composed of a pathologist, a microbiologist, an obstetrician, and an epidemiologist evaluated all the data of the MIA and assigned the MIA diagnosis, i.e., the disease or condition putatively leading to death. The participants in the MIA cause of death attribution panel were aware of the external macroscopic examination of the body (but not of the organs) and the histological and microbiological results obtained in the MIA sampling but were blind for the information on the clinical records, except for the pregnancy status and gestational age.

After a washout period (minimum time 3 months, range 3–6 months), the same panel evaluated the data from the CDA and assigned the CDA diagnosis of cause of death, which was considered the gold standard. As per routine practice in CDA procedures, investigators involved in the CDA diagnosis were aware of the clinical data, the macroscopic (external and internal) findings, and the histological and microbiological results. Using a combination of the strength of the evidence of the histological and the microbiological findings, a category was assigned to the certainty of the cause of death attribution of the MIA diagnosis and the CDA diagnosis (details published elsewhere) [5]. In this particular group, the obstetric history of severe intrapartum hemorrhage increased by 2 levels the strength of the pathological findings of the CDA.

All morbid conditions were codified following the International Classification of Diseases, 10th revision for maternal mortality (ICD-10 MM) [10,14]. Up to 4 diagnoses were established following the most probable sequence of events leading to death, starting from the immediate cause and going back to the earliest event, i.e., the underlying condition. Finally, other conditions or concomitant infections that may have existed prior to development of the underlying cause of death or developed during the chain of events leading to death and that, by their nature, contributed to the death, were considered as contributory conditions (e.g., multiple pregnancy) [10]. As indicated by WHO, all deaths were classified either as (1) direct obstetric deaths (i.e., those resulting from obstetric complications of the pregnancy, labor, or puerperium) or (2) indirect obstetric deaths (i.e., those resulting from previous existing diseases or diseases developed during pregnancy but not due to direct obstetric causes) [10].

Additionally, all deaths were aggregated in 8 categories according to the underlying causes of death as stated in the ICD-10 MM [10], which included the following: (1) pregnancies with abortive outcome; (2) hypertensive disorders in pregnancy, childbirth, and puerperium; (3) obstetric hemorrhage; (4) pregnancy-related infections; (5) other obstetric complications; (6)

unanticipated complications of management; (7) nonobstetric complications; and (8) unexplained deaths. Nonobstetric complications include the following diseases: cardiovascular (including preexisting hypertension), endocrine, gastrointestinal tract, CNS, respiratory, genitourinary, autoimmune, skeletal, psychiatric diseases, neoplasm, and infections that are not a direct result of pregnancy. Categories 1 to 6 were considered direct obstetric deaths, and deaths classified as category 7 were considered indirect obstetric deaths.

## Statistical methods

The concordance between the MIA and the CDA diagnosis (gold standard) was established based on the concordance in the underlying cause of death categories, was assessed by the kappa statistic, and was interpreted as suggested by Landis and Koch [15]. The diagnostic performance of the MIA to identify the categories established by the gold standard diagnosis was evaluated in terms of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and total percentage of cases correctly classified.

The level of coincidence between the MIA and the CDA diagnoses was analyzed by comparing the ICD-10 MM codes in order to identify the conditions that were concordant in the disease category but were not coincident in the main diagnosis (e.g., a case categorized as an indirect obstetric death in both methods but as pneumonia in the CDA and as sepsis in the MIA). As the ICD-10 system classifies diagnoses into nested classes of different hierarchical levels in which diseases or conditions are organized in chapters, blocks, and 3-character categories [14], a coincidence was classified as (i) perfect when the ICD-10 codes were identical in chapter, block, and 3-character categories; (ii) moderate when the codes were within the same chapter and block but there was a discrepancy in the 3-character category; or (iii) low when the codes were within the same chapter but not in the same block and 3-character categories. When the MIA and the CDA diagnoses were in different chapters, the coincidence was classified as “none.” The statistical analyses were performed using Stata version 14.1 (Stata, College Station, TX, USA). The analytical plan was determined once all the histological and microbiological results as well as the ICD10-MM codes were available.

## Results

Coupled MIA and CDA procedures were performed in 57 women. Median age was 27 years (range 15–39 years). Thirty-one women (54%) died in the puerperal period, 9 (16%) died after an abortion, and 16 (28%) were pregnant at the time of death. In all 16 cases, the fetus and the placenta were in situ. Nevertheless, no autopsy was performed on these in situ fetuses because it was not considered as relevant to determine the cause of death. The placenta was analyzed as part of the CDA in 8 of these cases but was not contributory to the final diagnosis. Forty-four lived in the Maputo urban area, whereas 13 were transferred from a rural district.

In 40 cases (70%), the interval between death and the beginning of postmortem procedures was  $\leq 24$  hours, whereas in 17/57 (30%), it ranged between 25 and 64 hours. The age of the patients, time from death to procedure, HIV status, MIA and CDA diagnoses, ICD-10 coding, level of certainty, and concordance between both diagnoses are shown for all patients in [S1 Table](#).

Blood was obtained in all cases, but in 3 women, less than 10 mL were obtained (in 1 of these cases, the MIA was done 34 hours after death). In 56/57 cases (98%), 10 mL of CSF were obtained. In the MIA procedure, liver, CNS, and bone marrow samples were obtained in 100% of the cases, whereas lung was sampled in 93%, heart in 86%, spleen in 79%, and kidneys in 61% of the cases. The uterus was successfully obtained in 53/57 (93%) of the cases. Amniotic

**Table 1. Concordance of the cause of death categorization between the MIA and the CDA (gold standard).**

MIA diagnosis	CDA diagnosis						Total
	Pregnancies with abortive outcome	Hypertensive disorders in pregnancy	Obstetric hemorrhage	Pregnancy-related infections	Nonobstetric complications	Non-conclusive	
Pregnancies with abortive outcome	5	0	0	0	1	0	6 (11%)
Hypertensive disorders in pregnancy	0	1	0	0	0	0	1 (2%)
Obstetric hemorrhage	0	0	1	0	0	0	1 (2%)
Pregnancy-related infections	0	0	1	2	0	0	3 (5%)
Nonobstetric complications	0	0	6	2	29	0	37 (65%)
Non-conclusive	1	0	5	0	2	1	9 (16%)
<b>Total</b>	<b>6 (11%)</b>	<b>1 (2%)</b>	<b>13 (23%)</b>	<b>4 (7%)</b>	<b>32 (56%)</b>	<b>1 (2%)</b>	<b>57 (100%)</b>

Kappa statistic: 0.48 (moderate agreement); 95% CI: 0.31–0.66.

**Abbreviations:** CDA, complete diagnostic autopsy; MIA, minimally invasive autopsy.

<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002431.t001>

fluid was obtained in 7 (12%) cases. The placenta was available for analysis in 8/16 (50%) women that were pregnant at the time of death.

[S1 Table](#) summarizes the cause of death for each patient according to each of the 2 methods used.

### Gold standard (CDA) diagnosis of cause of death

A cause of death was identified in the CDA in 98% (56/57) of cases. The level of certainty of the CDA diagnosis was considered high or very high in 51/57 (89%) cases and moderate in 5 cases (9%).

Direct obstetric conditions accounted for 24 out of 57 deaths (42%). This included obstetric hemorrhages (13/24; 54%), complications of abortive pregnancies (6/24; 25%), pregnancy-related infections (4/24; 17%), and hypertensive disorders of the pregnancy (1/24; 4%) ([Table 1](#), [S1 Table](#)). No deaths were classified in the categories “other obstetric complications” and “unanticipated complications of management”.

Indirect obstetric conditions accounted for 32/57 (56%) deaths. Among them, infectious diseases accounted for 22/32 deaths (69%), other diseases not related to pregnancy for 7/32 (22%), and malignant tumors for 3/32 (9%) of the deaths ([Table 1](#), [S1 Table](#)). Five women died of tuberculosis (*M. tuberculosis*) and 4 of cryptococcal infection. Cerebral malaria with histological evidence of sequestration of parasitized erythrocytes in the capillaries of the CNS and *P. falciparum* detected by PCR was diagnosed in 4 women. Of these 4 patients, 3 (out of 44; 6.8%) came from the Maputo urban area, whereas 1 (out of 13; 7.7%) was transferred from a rural district.

HIV was detected in 36 women (63%). All HIV positive cases showed detectable viral load for HIV-1. HIV infection was identified in 13/24 (54%) women who died from direct obstetric causes and in 22/32 (69%) women who died from nonobstetric complications. HIV was also

detected in the single case with nonconclusive diagnosis. Nearly 3 quarters (16/22; 73%) of the HIV-positive nonobstetric maternal deaths were considered to be AIDS related, which included all 5 tuberculosis cases, the 4 cryptococcal disseminated infections, 3 pneumonias, 1 streptococcal sepsis, 1 pyelonephritis, 1 meningoencephalitis, and 1 Burkitt lymphoma. The other 6 HIV-positive cases died from cerebral malaria (3 cases), liver failure due to massive liver necrosis (2 cases), and dilated cardiomyopathy (1 case). Hepatitis B virus infection was identified in 3 HIV-positive cases.

### MIA diagnosis and concordance in the categorization of disease between the MIA and the CDA gold standard diagnosis

A cause of death was identified in the MIA in 48 out of the 57 cases (84%). In 9 cases (16%), the MIA diagnosis was nonconclusive. The certainty of the MIA diagnosis was high or very high in 22/48 (46%) cases, moderate in 19/48 (40%), and low in 7/48 (14%).

Table 1 shows the diagnostic concordance between the MIA and the CDA (gold standard) for the categories of causes of death. The 2 procedures agreed in the diagnostic categories in 39/57 cases (68%) and the concordance was moderate according to the kappa statistics (kappa = 0.48, 95% CI: 0.31–0.66).

A perfect or almost perfect coincidence in the cause of death established by each method was observed in 36 of the 39 cases that were concordant in the diagnostic category. One case showed a low level of coincidence (diagnosed as chronic hypertensive disease in pregnancy in the CDA and as suggestive of cardiovascular disease in the MIA). The 2 remaining cases were noncoincident (a case of pneumonia and a case of liver necrosis according to the CDA, diagnosed as sepsis due to *Escherichia coli* and pneumonia, respectively, in the MIA).

Table 2 shows the sensitivity, specificity, and the positive and negative predictive values of the MIA diagnosis for the major diagnostic categories, as well as the percentage of false-positive and false-negative diagnoses, and the cases correctly classified (accuracy) in the MIA. The sensitivity of the MIA was very high for indirect causes of death (91%) and low (<10%) for obstetric hemorrhage. Overall, the accuracy of the MIA was at least 79% for all diagnostic categories.

### Etiological agents in infectious diseases causes of death

Overall, infectious diseases accounted for 30/57 (57%) of maternal deaths. Infectious diseases included 8 obstetric infections (4 puerperal sepsis and 4 septic abortions) and 22 nonobstetric infections. An etiologic agent was identified in the CDA in 22 out of the 30 (73%) infectious

**Table 2. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, and accuracy of the MIA for the different diagnostic categories in maternal deaths.** Figures are percentages and 95% CI. S1 Table summarizes the cause of death for each patient according to each of the 2 methods used.

Causes of death in the CDA (gold standard)	Cases	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Positive predictive value (95%CI)	Negative predictive value (95% CI)	Correctly classified (95% CI)
Pregnancies with abortive outcome	6	83 (36–100)	98 (90–100)	83 (36–100)	98 (90–100)	96 (88–100)
Hypertensive disorders	1	100 (2–100)	100 (94–100)	100 (2–100)	96 (94–100)	100 (94–100)
Obstetric hemorrhage	13	8 (0–36)	100 (92–100)	100 (2–100)	79 (66–88)	79 (66–88)
Pregnancy-related infections	4	50 (7–93)	98 (90–100)	67 (9–99)	96 (87–100)	95 (85–99)
Nonobstetric complications	32	91 (75–98)	68 (46–85)	78 (62–90)	85 (62–97)	81 (68–90)
Nonconclusive	1	100 (2–100)	86 (74–94)	11 (0–48)	100 (93–100)	86 (74–94)

**Abbreviations:** CDA, complete diagnostic autopsy; MIA, minimally invasive autopsy.

<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002431.t002>

**Table 3. Etiological microorganisms identified in the CDA (gold standard) and in the MIA, and the number identified in both methods.**

Etiological microorganisms	Microorganisms identified in the CDA (gold standard)	Microorganisms identified in the MIA and in the CDA	Microorganisms identified in the MIA but not in the CDA
<b>Direct obstetric infections</b>			
<b>Septic abortion</b>			
Enterobacteriaceae*	2	2	-
<i>Escherichia coli</i>	1	1	-
<i>Mycoplasma hominis</i>	1	1	-
<i>Aeromonas sobria</i> <sup>†</sup>	0	0	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	1
<b>Puerperal sepsis</b>			
<i>S. pyogenes</i>	1	1	-
<i>Prevotella</i> spp.	1	0	-
<i>Aeromonas</i> spp. <sup>†</sup>	0	0	1
<b>Nonobstetric infections</b>			
<b>Disseminated infection</b>			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4	4	-
<i>Cryptococcus</i> spp.	3	3	-
<i>S. pneumoniae</i>	1	1	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1	2
<i>Cytomegalovirus</i> <sup>†</sup>	0	0	3
Enterobacteriaceae* <sup>††</sup>	0	0	3
<i>E. coli</i>	0	0	1
<i>Toxoplasma gondii</i>	0	0	1
<b>Pulmonary infection</b>			
<i>S. aureus</i>	1	1	-
<i>M. tuberculosis</i>	1	0	-
<b>Central nervous system infection</b>			
<i>Plasmodium falciparum</i>	4	4	-
<i>Cryptococcus</i> spp.	1	1	-
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>20</b>	<b>13</b>

\* Mixed infection of at least 2 of these enterobacteria: *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, or *K. pneumoniae*

<sup>†</sup> All the microorganisms identified in the MIA were also identified in the CDA but by definition were not considered as the cause of death.

<sup>††</sup> One of the enterobacteria identified in the MIA was also identified in the CDA but was not considered the cause of death.

**Abbreviations:** CDA, complete diagnostic autopsy; MIA, minimally invasive autopsy.

<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002431.t003>

diseases (6 obstetric and 16 nonobstetric). The same microorganism was identified in both the CDA and the MIA in 20 out of the 22 cases (91%). A microorganism was identified in the MIA in 13 additional cases and considered the MIA cause of death. In 5 cases, both the CDA and the MIA diagnosed an infectious disease, but whereas the CDA did not identify any microorganism, the MIA identified a causative agent. In 6 cases, the CDA (gold standard) cause of death was hemorrhagic shock and, consequently, the microorganism identified in the MIA was considered as not contributing to the death. Finally, in 2 cases, the CDA diagnosed an infectious disease, probably of bacterial origin, with no agent identifiable (a meningoencephalitis and a puerperal sepsis, respectively), whereas in the MIA the cause of death was considered to be a disseminated cytomegalovirus infection. In both cases, the cytomegalovirus was also identified in the CDA but it was not considered as the cause of death. Table 3 shows the etiological agents identified in the CDA and in the MIA.

## Discussion

This validation study shows, for the first time to our knowledge, that the MIA, a simplified postmortem procedure, can provide an acceptable correlation with the gold standard CDA diagnosis in maternal deaths. In this group, the agreement of the technique was 68% (kappa statistic: 0.48, 95% CI 0.31–0.66), a percentage of agreement similar to those observed in other age groups [16,17]. These findings suggest that this new method could provide reliable and relevant data regarding the causes of mortality associated with pregnancy and childbirth, particularly for indirect obstetric deaths, and thus contribute to reducing maternal mortality in the settings where this burden is highest.

This study was not designed to describe the causes of maternal death. However, our findings are similar to previous reports indicating that obstetric hemorrhage and indirect obstetric conditions are the leading causes of maternal mortality in low-income countries [18,19]. Interestingly, and unlike what it is usually reported [20,21], the proportion of indirect obstetric deaths (56%) observed in our study is larger than that of direct obstetric deaths (42%). These results are similar to a previous study carried out over 10 years ago in the same setting [19] and suggest that nonobstetric complications may be missed using the current methodologies and sources of data collection utilized for maternal cause of death estimation. Our study also confirmed the significant contribution of malaria and HIV to maternal mortality in endemic countries such as Mozambique [1,19,22,23]. In this series, malaria accounted for 7% (4/57) and HIV-related conditions for 28% (16/57) of all maternal deaths. Cerebral malaria could be detected in the MIA in all 4 cases [24], a finding of particular relevance, taking into account that the study was conducted in an urban setting where malaria transmission is known to be minimal. Interestingly, 3 out of the 4 women with cerebral malaria were of urban origin, although we cannot exclude a visit to a rural area with higher malaria transmission during pregnancy. This finding is very relevant for improving the knowledge on the impact of malaria on maternal mortality in endemic areas, which is usually underestimated [25]. As observed in previous reports [19,26,27], HIV and tuberculosis coinfection were found to be important causes of indirect obstetric deaths (9% of deaths). Tuberculosis was identified in the MIA in 4 out of 5 cases in which the infection was determined to be the cause of death in the CDA. This is of relevance given the low sensitivity of the clinical diagnosis of tuberculosis as a cause of maternal mortality [28]. Importantly, disseminated cryptococcal infection contributed significantly to death among HIV-positive women (7%, 4/57), and all the cases were also identified in the MIA. *Cryptococcus* spp. is the leading cause of adult meningitis in sub-Saharan Africa, where it is estimated to cause 15%–20% of all AIDS-related deaths [28–30]. Nevertheless, data in pregnant women are scarce, with only a few published studies having reported cryptococcal infection among pregnant women. This study highlights the importance of cryptococcosis as a cause of maternal death and thus the need to improve the diagnosis and management of this fungal infection during pregnancy [31–33].

Interestingly, the sensitivity of the MIA procedure was very high (91%) for indirect causes of death. In contrast, the sensitivity was much lower (36%) for direct obstetric causes. The sensitivity of the MIA procedure was particularly poor (less than 10%) for obstetric hemorrhage. Only 1 case was captured in the MIA because a retained placenta was identified in a woman during puerperium. Although only 1 death was attributed to eclampsia, the disease was identified in the MIA. This accuracy was probably influenced by our strict criteria to diagnose eclampsia, which required the presence of the typical pathological lesions in the liver and the absence of any other lethal lesion, in order to avoid overassignment of this condition as a cause of death [28]. This is relevant given the high number of false-positive clinical diagnoses of eclampsia that has been reported and the likely overestimation of this condition in clinical

reports and verbal autopsies [34,35]. Indeed, it is essential to establish thoroughly the contribution of eclampsia to maternal mortality to guide maternal health programs that are based on preeclampsia prevention.

This study was designed to determine the validity of the MIA procedure by itself, without using any additional clinical data. The only exception to this purist approach was the knowledge of whether the death of the woman occurred while pregnant or within 42 days of termination of pregnancy (irrespective of the duration and the site of the pregnancy), as this information was essential to know when a case fulfilled the definition of WHO and, consequently, had to be included as a maternal death. Our findings indicate that the MIA without any clinical data has a relatively limited performance for direct obstetric causes of death. Some degree of obstetric information from the clinical record or the verbal autopsy could significantly improve the results of the MIA. Importantly, obstetric hemorrhage was missed in all but 1 case in the MIA; however, this condition is easily identified in the clinical records and is likely not to be difficult to retrieve from a verbal autopsy. On the contrary, most indirect obstetric deaths that are frequently misclassified in verbal autopsies were identified in the MIA. Future research should focus on the performance of the MIA with the inclusion of clinical data.

The extensive microbiological sampling and analysis proposed in our MIA protocol result in the adequate identification of the etiological agent in a high number of infectious diseases. Moreover, in 5 cases considered as infectious by the gold standard, the etiological agent was successfully identified in the MIA but not in the CDA. It is possible that the less invasive sampling procedure performed in the MIA might improve the performance of the microbiological analysis by reducing the probability of microbiological contamination [36,37]. On the other hand, the MIA may result, in the absence of any clinical information, in an overestimation of the microbiological results, as it may be the cases of the 5 women who died of obstetric hemorrhage that were considered as infectious deaths in the MIA.

A limitation of this study is the relatively low sample size, which has resulted in a poor representation of some causes of death. Nevertheless, the study was not designed to describe all the causes of maternal death and validate the method for each specific cause or category of disease but rather to assess the validity of the method for the group of maternal death as a whole. A second limitation of this study is that its diagnostic accuracy of the MIA could have been influenced by the dissemination of many diseases. More than half of the patients were HIV-infected adults with highly disseminated infections, and the performance of the procedure could be significantly reduced in focal lesions and in limited infections in immunocompetent hosts. Finally, both the MIA and the CDA include some degree of subjective interpretation in the attribution of cause of death.

In conclusion, establishing reliably the causes of maternal deaths is crucial for health planning and prioritization, which in turn are essential elements to reduce maternal mortality. The lack of quality data on these causes of death in high-burden countries has been recognized as a major limitation to achieving the 5th Millennium Developmental Goal [38], especially in sub-Saharan Africa, where the MMR only dropped by 26% since 1990 [1]. In these settings, a tool such as the MIA might provide quality information mainly for those conditions that are more difficult to identify through routinely used methods for cause of death determination, while improving clinical management and verbal autopsies with refined algorithms. This would lead to improving the most underachieving global health goal, which relates to maternal health.

## Supporting information

**S1 STROBE Checklist. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) checklist for the observational study developed in Mozambique to**

**validate the minimally invasive autopsy for cause of death determination in maternal deaths.**

(DOCX)

**S1 Table. Gold standard and minimally invasive autopsy results of each case.** The table includes the concordance between the 2 methods in terms of the disease category and the coincidence in terms of International Classification of Diseases, 10th revision for maternal mortality (ICD-10 MM) coding hierarchy.

(DOCX)

**S1 Text. Prospective analysis plan on pathological and microbiological procedures used during the study.**

(DOCX)

## Acknowledgments

We would like to thank the families of the deceased patients included in this study. The authors are grateful to all the members of the Department of Pathology of the MCH, whose work and enthusiasm made this study possible, and also to the staff of the “Centro de Investigação em Saúde de Manhiça” for their invaluable support. We also thank Mr. Bento Nhandale for his logistic support of the study. ISGlobal is a member of the CERCA Programme, Generalitat de Catalunya.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Mamudo R. Ismail, Carla Carrilho, Jordi Vila, Khátia Munguambe, Eusebio Macete, Pedro Alonso, Quique Bassat, Jaume Ordi, Clara Menéndez.

**Data curation:** Paola Castillo, Juan Carlos Hurtado, Miguel J. Martínez, Ariadna Sanz, Llorenç Quint , Quique Bassat, Jaume Ordi, Clara Menéndez.

**Formal analysis:** Llorenç Quint .

**Funding acquisition:** Pedro Alonso, Quique Bassat, Jaume Ordi, Clara Menéndez.

**Investigation:** Paola Castillo, Juan Carlos Hurtado, Miguel J. Martínez, Dercio Jordao, Lucilia Lovane, Mamudo R. Ismail, Carla Carrilho, Cesaltina Lorenzoni, Fabiola Fernandes, Sibone Mocumbi, Zara Onila Jaze, Flora Mabota, Anelsio Cossa, Inacio Mandomando, Pau Cisteró, Alfredo Mayor, Mireia Navarro, Isaac Casas, Quique Bassat, Jaume Ordi, Clara Menéndez.

**Methodology:** Paola Castillo, Juan Carlos Hurtado, Miguel J. Martínez, Dercio Jordao, Lucilia Lovane, Mamudo R. Ismail, Carla Carrilho, Cesaltina Lorenzoni, Fabiola Fernandes, Inacio Mandomando, Jordi Vila, Maria Maixenchs, Khátia Munguambe, Ariadna Sanz, Llorenç Quint , Quique Bassat, Jaume Ordi, Clara Menéndez.

**Project administration:** Ariadna Sanz, Quique Bassat.

**Resources:** Paola Castillo, Miguel J. Martínez, Mamudo R. Ismail, Carla Carrilho, Cesaltina Lorenzoni, Fabiola Fernandes, Inacio Mandomando, Jordi Vila, Khátia Munguambe, Llorenç Quint , Eusebio Macete, Pedro Alonso, Quique Bassat, Jaume Ordi, Clara Menéndez.

**Software:** Llorenç Quint .

**Supervision:** Paola Castillo, Miguel J. Martínez, Inacio Mandomando, Eusebio Macete, Pedro Alonso, Quique Bassat, Jaume Ordi, Clara Menéndez.

**Validation:** Paola Castillo, Juan Carlos Hurtado, Miguel J. Martínez, Quique Bassat, Jaume Ordi, Clara Menéndez.

**Visualization:** Paola Castillo, Juan Carlos Hurtado, Miguel J. Martínez, Ariadna Sanz, Llorenç Quintó, Quique Bassat, Jaume Ordi, Clara Menéndez.

**Writing – original draft:** Paola Castillo, Juan Carlos Hurtado, Miguel J. Martínez, Quique Bassat, Jaume Ordi, Clara Menéndez.

**Writing – review & editing:** Paola Castillo, Juan Carlos Hurtado, Miguel J. Martínez, Dercio Jordao, Lucilia Lovane, Mamudo R. Ismail, Carla Carrilho, Cesaltina Lorenzoni, Fabiola Fernandes, Sibone Mocumbi, Zara Onila Jaze, Flora Mabota, Anelsio Cossa, Inacio Mandomando, Pau Cisteró, Alfredo Mayor, Mireia Navarro, Isaac Casas, Jordi Vila, Maria Maixenchs, Khátia Munguambe, Ariadna Sanz, Llorenç Quintó, Eusebio Macete, Pedro Alonso, Quique Bassat, Jaume Ordi, Clara Menéndez.

## References

1. Alkema L, Chou D, Hogan D, Zhang S, Moller AB, Gemmill A, et al. Global, regional, and national levels and trends in maternal mortality between 1990 and 2015, with scenario-based projections to 2030: a systematic analysis by the UN Maternal Mortality Estimation Inter-Agency Group. *Lancet*. 2016 Jan 30; 387(10017):462–74. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00838-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00838-7) PMID: 26584737
2. World Health Organization [Internet]. WHO Media Center: Maternal mortality fact sheet; updated November 2016 [cited September 2017]. [Internet]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs348/en/>
3. World Health Organization [Internet]. WHO countries: Mozambique—Maternal mortality in 1990–2015 [cited September 2017]. [Internet]. Available from: [http://www.who.int/gho/maternal\\_health/countries/moz.pdf](http://www.who.int/gho/maternal_health/countries/moz.pdf)
4. United Nations. UN Transforming our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development. Resolution adopted by the General Assembly by September 25, 2015. New York [Internet]. 2015. Available from: [http://www.un.org/ga/search/view\\_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E](http://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E)
5. Castillo P, Martinez MJ, Ussene E, Jordao D, Lovane L, Ismail MR, et al. Validity of a Minimally Invasive Autopsy for Cause of Death Determination in Adults in Mozambique: An Observational Study. *PLoS Med*. 2016 Nov 22; 13(11):e1002171. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002171> PMID: 27875530
6. Snow RW, Winstanley MT, Marsh VM, Newton C, Waruiru C, Mwangi I, et al. Childhood deaths in Africa: uses and limitations of verbal autopsies. *The Lancet*. 1992 Aug; 340(8815):351–5.
7. Garenne M, Fontaine O. Assessing probable causes of death using a standardized questionnaire: a study in rural Senegal. *BullWorld Health Organ*. 2006 Mar; 84(3):248–53.
8. Maixenchs M, Anselmo R, Zielinski-Gutierrez E, Odhiambo FO, Akello C, Ondire M, et al. Willingness to Know the Cause of Death and Hypothetical Acceptability of the Minimally Invasive Autopsy in Six Diverse African and Asian Settings: A Mixed Methods Socio-Behavioural Study. *PLoS Med*. 2016 Nov 22; 13(11):e1002172. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002172> PMID: 27875532
9. Bassat Q, Ordi J, Vila J, Ismail MR, Carrilho C, Lacerda M, et al. Development of a post-mortem procedure to reduce the uncertainty regarding causes of death in developing countries. *Lancet GlobHealth*. 2013 Sep; 1(2214–109X (Electronic)):e125–6.
10. World Health Organization. The WHO Application of ICD-10 to deaths during pregnancy, childbirth and the puerperium: ICD-MM [Internet]. 2012. Available from: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/monitoring/9789241548458/en/>
11. World Health Organization. International Classification of Diseases (ICD) [Internet]. 2016. [Internet]. Available from: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en>
12. Castillo P, Ussene E, Ismail MR, Jordao D, Lovane L, Carrilho C, et al. Pathological Methods Applied to the Investigation of Causes of Death in Developing Countries: Minimally Invasive Autopsy Approach. *PLoS ONE*. 2015 Jun 30; 10(6):e0132057. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132057> PMID: 26126191
13. Martinez MJ, Massora S, Mandomando I, Ussene E, Jordao D. Infectious cause of death determination using minimally invasive autopsies in developing countries. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016; 84(1879–0070 (Electronic)):80–6. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.002> PMID: 26508103

14. World Health Organization. ICD-10 Volume 2 Instruction Manual [Internet]. 2016. Available from: [http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/Content/statchtml/ICD10Volume2\\_en\\_2016.pdf?ua=1](http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/Content/statchtml/ICD10Volume2_en_2016.pdf?ua=1)
15. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977 Mar; 33(1):159–74. PMID: [843571](#)
16. Bassat Q, Castillo P, Martinez MJ, Jordao D, Lovane L, Hurtado JC, et al. Validity of a minimally invasive autopsy tool for cause of death determination in pediatric deaths in Mozambique: An observational study. *PLoS Med*. 2017 Jun 20; 14(6):e1002317. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002317> PMID: [28632739](#)
17. Menendez C, Castillo P, Martinez MJ, Jordao D, Lovane L, Ismail MR, et al. Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in stillborn babies and neonates in Mozambique: An observational study. *PLoS Med*. 2017 Jun 20; 14(6):e1002318. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002318> PMID: [28632735](#)
18. Bailey PE, Keyes E, Moran AC, Singh K, Chavane L, Chilundo B. The triple threat of pregnancy, HIV infection and malaria: reported causes of maternal mortality in two nationwide health facility assessments in Mozambique, 2007 and 2012. *BMC Pregnancy Childbirth* [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 Sep 28]; 15(1).
19. Menendez C, Romagosa C, Ismail MR, Carrilho C, Saute F, Osman N, et al. An autopsy study of maternal mortality in Mozambique: the contribution of infectious diseases. *PLoS Med*. 2008 Feb; 5(2):e44. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050044> PMID: [18288887](#)
20. Murray CJL, Ortblad KF, Guinovart C, Lim SS, Wolock TM, Roberts DA, et al. Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2014 Sep; 384(9947):1005–70.
21. Say L, Chou D, Gemmill A, Tunçalp Ö, Moller A-B, Daniels J, et al. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health*. 2014 Jun; 2(6):e323–33. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70227-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70227-X) PMID: [25103301](#)
22. Black R, Laxminarayan R, Temmerman M, Walker N, editors. *Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 2): Reproductive, Maternal, Newborn, and Child Health* [Internet]. The World Bank; 2016 [cited 2017 Jun 1]. Available from: <http://elibrary.worldbank.org/doi/book/10.1596/978-1-4648-0348-2>
23. Lathrop E, Jamieson DJ, Danel I. HIV and maternal mortality. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet*. 2014 Nov; 127(2):213–5.
24. Taylor TE, Fu WJ, Carr RA, Whitten RO, Mueller JS, Fosiko NG, et al. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *NatMed*. 2004 Feb; 10(1078–8956 (Print)):143–5.
25. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoia K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2007 Feb; 7(2):93–104. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70021-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70021-X) PMID: [17251080](#)
26. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PFA. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet Lond Engl*. 2006 Apr 1; 367(9516):1066–74.
27. Grange J, Adhikari M, Ahmed Y, Mwaba P, Dheda K, Hoelscher M, et al. Tuberculosis in association with HIV/AIDS emerges as a major nonobstetric cause of maternal mortality in Sub-Saharan Africa. *Int J Gynecol Obstet*. 2010 Mar; 108(3):181–3.
28. Ordi J, Ismail MR, Carrilho C, Romagosa C, Osman N, Machungo F, et al. Clinico-Pathological Discrepancies in the Diagnosis of Causes of Maternal Death in Sub-Saharan Africa: Retrospective Analysis. *PLoS Med* [Internet]. 2009 Feb [cited 2016 Dec 3]; 6(2).
29. Parkes-Ratanshi R, Achan B, Kwizera R, Kambugu A, Meya D, Denning DW. Cryptococcal disease and the burden of other fungal diseases in Uganda; Where are the knowledge gaps and how can we fill them? *Mycoses*. 2015 Oct; 58 Suppl 5:85–93.
30. French N, Gray K, Watera C, Nakyingi J, Lugada E, Moore M, et al. Cryptococcal infection in a cohort of HIV-1-infected Ugandan adults. *AIDS Lond Engl*. 2002 May 3; 16(7):1031–8.
31. Singh N, Perfect JR. Immune Reconstitution Syndrome and Exacerbation of Infections after Pregnancy. *Clin Infect Dis*. 2007 Nov 1; 45(9):1192–9. <https://doi.org/10.1086/522182> PMID: [17918082](#)
32. Ely EW, Peacock JE, Haponik EF, Washburn RG. Cryptococcal pneumonia complicating pregnancy. *Medicine (Baltimore)*. 1998 May; 77(3):153–67.
33. Nayak SU, Talwani R, Gilliam B, Taylor G, Ghosh M. Cryptococcal Meningitis in an HIV-Positive Pregnant Woman. *J Int Assoc Physicians AIDS Care JIAPAC*. 2011 Mar 1; 10(2):79–82.
34. Ordi J, Ismail MR, Carrilho C, Romagosa C, Osman N, Machungo F, et al. Clinico-pathological discrepancies in the diagnosis of causes of maternal death in sub-Saharan Africa: retrospective analysis. *PLoS Med*. 2009 Feb 24; 6(2):e1000036. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000036> PMID: [19243215](#)

35. Geelhoed DW, Visser LE, Asare K, Schagen van Leeuwen JH, van Roosmalen J. Trends in maternal mortality: a 13-year hospital-based study in rural Ghana. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003 Apr 25; 107(2):135–9. PMID: [12648857](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12648857/)
36. Morris JA, Harrison LM, Partridge SM. Practical and theoretical aspects of postmortem bacteriology. *Curr Diagn Pathol.* 2007 Feb; 13(1):65–74.
37. Riedel S. The Value of Postmortem Microbiology Cultures. *J Clin Microbiol.* 2014 Apr 1; 52(4):1028–33. <https://doi.org/10.1128/JCM.03102-13> PMID: [24403308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24403308/)
38. Fehling M, Nelson BD, Venkatapuram S. Limitations of the Millennium Development Goals: a literature review. *Glob Public Health.* 2013 Dec; 8(10):1109–22. <https://doi.org/10.1080/17441692.2013.845676> PMID: [24266508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24266508/)



## Artículo 2

**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS RELACIONADOS:** Hipótesis 1.2 y Objetivo 2

**AUTORES:** Hurtado JC, Quintó L, Castillo P, Carrilho C, Fernandes F, Jordao D, Lovane L, Navarro M, Casas I, Bene R, Nhampossa T, Santos Ritchie P, Bandeira S, Sambo C, Chicamba V, Mocumbi S, Jaze Z, Mabota F, Ismail MR, Lorenzoni C, Guisseve A, Rakislova N, Marimon L, Castrejon N, Sanz A, Cossa A, Mandomando I, Munguambe K, Maixenchs M, Muñoz-Almagro C, Macete E, Alonso P, Vila J, Bassat Q, Menéndez C, Martínez MJ, Ordi J.

**TÍTULO:** Postmortem Interval and Diagnostic Performance of the Autopsy Methods.

**REVISTA, VOLUMEN (NÚMERO): PÁGINAS, FECHA DE PUBLICACIÓN:** *Scientific Reports*, 8 (1):16112. Published 2018 Oct 31.

**DOI:** 10.1038/s41598-018-34436-1

**FACTOR DE IMPACTO:** 4.011

**CUARTIL (JCR):** Q1 (Multidisciplinary Sciences)



# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Postmortem Interval and Diagnostic Performance of the Autopsy Methods

Received: 13 July 2018  
Accepted: 10 October 2018  
Published online: 31 October 2018

Juan Carlos Hurtado<sup>1,2</sup>, Llorenç Quintó<sup>1</sup>, Paola Castillo<sup>1,3</sup>, Carla Carrilho<sup>4,5</sup>, Fabiola Fernandes<sup>4,5</sup>, Dercio Jordao<sup>4</sup>, Lucilia Lovane<sup>4</sup>, Mireia Navarro<sup>1,2</sup>, Isaac Casas<sup>1,2</sup>, Rosa Bene<sup>6</sup>, Tacilta Nhampossa<sup>7</sup>, Paula Santos Ritchie<sup>8</sup>, Sónia Bandeira<sup>8</sup>, Calvino Sambo<sup>8</sup>, Valeria Chicamba<sup>8</sup>, Sibone Mocumbi<sup>9</sup>, Zara Jaze<sup>9</sup>, Flora Mabota<sup>9</sup>, Mamudo R. Ismail<sup>4,5</sup>, Cesaltina Lorenzoni<sup>4,5</sup>, Assucena Guisseve<sup>4,5</sup>, Natalia Rakislova<sup>1,3</sup>, Lorena Marimon<sup>1,3</sup>, Natalia Castrejon<sup>3</sup>, Ariadna Sanz<sup>10</sup>, Anelsio Cossa<sup>7</sup>, Inacio Mandomando<sup>7</sup>, Khátia Munguambe<sup>5,7</sup>, Maria Maixenchs<sup>1,7</sup>, Carmen Muñoz-Almagro<sup>10,11,12</sup>, Eusebio Macete<sup>7</sup>, Pedro Alonso<sup>1,7</sup>, Jordi Vila<sup>1,2</sup>, Quique Bassat<sup>1,7,13,14</sup>, Clara Menéndez<sup>1,7,11</sup>, Miguel J. Martínez<sup>1,2</sup> & Jaume Ordi<sup>1,3</sup>

Postmortem studies, including the complete diagnostic autopsy (CDA) and the minimally invasive autopsy (MIA), an innovative approach to post-mortem sampling and cause of death investigation, are commonly performed within 24 hours after death because the quality of the tissues deteriorates over time. This short timeframe may hamper the feasibility of the procedure. In this study, we compared the diagnostic performance of the two postmortem procedures when carried out earlier and later than 24 hours after death, as well as the impact of increasing postmortem intervals (PMIs) on the results of the microbiological tests in a series of 282 coupled MIA/CDA procedures performed at the Maputo Central Hospital in Mozambique between 2013 and 2015. 214 procedures were conducted within 24 hours of death (early autopsies), and 68 after 24 hours of death (late autopsies). No significant differences were observed in the number of non-conclusive diagnoses (2/214 [1%] vs. 1/68 [1%]  $p = 0.5645$  for the CDA; 27/214 [13%] vs. 5/68 [7%]  $p = 0.2332$  for the MIA). However, increasing PMIs were associated with a raise in the number of bacteria identified (rate: 1.014 per hour [95%CI: 1.002–1.026];  $p = 0.0228$ ). This increase was mainly due to rising numbers of bacteria of the *Enterobacteriaceae* family and *Pseudomonas* genus strains. Thus, performing MIA or CDA more than 24 hours after death can still render reliable diagnostic results, not only for non-infectious conditions but also for many infectious diseases, although, the contribution of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* as etiological agents of infections leading to death may be overestimated.

The minimally invasive autopsy (MIA) is a postmortem diagnostic method based on obtaining samples of body fluids and key organs using needle biopsies. Such an approach has been designed as a potential alternative of the

<sup>1</sup>ISGlobal, Hospital Clinic - Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Department of Microbiology, Hospital Clinic - Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Department of Pathology, Hospital Clinic - Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Department of Pathology, Maputo Central Hospital, Maputo, Mozambique. <sup>5</sup>Faculty of Medicine, Eduardo Mondlane University, Maputo, Mozambique. <sup>6</sup>Department of Medicine, Maputo Central Hospital, Maputo, Mozambique. <sup>7</sup>Centro de Investigação em Saúde de Manhiça, Maputo, Mozambique. <sup>8</sup>Department of Pediatrics, Maputo Central Hospital, Maputo, Mozambique. <sup>9</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, Maputo Central Hospital, Maputo, Mozambique. <sup>10</sup>Department of Molecular Microbiology, University Hospital Sant Joan de Déu (University of Barcelona), Barcelona, Spain. <sup>11</sup>Consorcio de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain. <sup>12</sup>Faculty of Medicine, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain. <sup>13</sup>ICREA, Catalan Institution for Research and Advanced Studies, Pg. Lluís Companys 23, 08010, Barcelona, Spain. <sup>14</sup>Pediatric Infectious Diseases Unit, Pediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu (University of Barcelona), Barcelona, Spain. Juan Carlos Hurtado, Llorenç Quintó and Paola Castillo contributed equally. Miguel J. Martínez and Jaume Ordi jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.O. (email: [jordi@clinic.ub.es](mailto:jordi@clinic.ub.es))

complete diagnostic autopsy (CDA)<sup>1</sup> in resource limited settings. The MIA requires lower levels of expertise and infrastructures than the CDA<sup>1</sup> and there are data showing a high level of interest in knowing cause of death and potential acceptability in low- and middle-income countries<sup>2</sup>. Moreover, the use of needles without manipulation of the organs allows collecting samples for microbiology analysis with lower risk of contamination compared with CDA. The procedure has recently been validated in Mozambique in all age groups, including stillbirths, neonates, children, adults and maternal deaths<sup>3–6</sup>. In this validation analysis, the concordance with the CDA, the gold standard for cause of death determination, was moderate to good, and the MIA reliably recognized most infectious diseases and cancers causing death. This new method has raised high expectations among global health researchers because it may provide more robust explanations for the cause of death than other currently used approaches<sup>7–9</sup>.

To deploy such methods to study mortality in low- and middle-income countries, we need to understand the timeframe limits whereby the results of a MIA are adequate, which have not been previously defined. However, data evaluating the possible effects of the postmortem interval (PMI) in the diagnostic yield of the MIA are scarce. In the clinical routine, the CDA is generally conducted within 24 hours after death<sup>10,11</sup>, because the quality of the tissues, and consequently, the quality of the results obtained, deteriorates over time due to autolysis, and other decay processes that affect the body<sup>12</sup>. One of these phenomena is the active participation of microorganisms in the decomposition of bodies. Temperature and anaerobic conditions have been proposed as major factors driving the decomposition process<sup>13,14</sup>. The bacterial translocation, a phenomenon that rapidly initiates following death and by which viable bacteria originating principally from the intestinal microbiota migrate to other organs, may pose challenges when trying to ascertain the contribution of detected microorganisms to the fatal event. Indeed, judging whether a potentially pathogenic microorganism is the expression of a true ante-mortem bacterial infection or a false-positive result related to events occurring after death is not straightforward<sup>15,16</sup>. Understandingly, general consensus recommends conducting any postmortem evaluation as soon as possible following death, once the family consent has been obtained. However, such short timeframes may hamper the feasibility of the MIA procedure, particularly when implemented in health facilities from rural areas where many deaths occur at home and it may take some time to reach the health facility.

When designing the MIA protocol, a period of 24 hours after death was established as the maximum “ideal time” to perform the procedure. However, due to a variety of circumstances, some of the autopsies were performed after this timeframe. In this study, we aimed to evaluate the impact of the PMI on the diagnostic performance of the MIA and the CDA and provide information on the timeframe limits in which the results of a postmortem evaluation may be adequate.

## Methods

**Study setting and design.** This analysis derives from the CaDMIA project, a validation study of the MIA vs. the CDA in different age groups. The study was conducted at the Department of Pathology of the Maputo Central Hospital, a 1500-bed government-funded tertiary health care center, in collaboration with the departments of medicine, obstetrics and gynecology, and pediatrics. The study received the approval of the National Bioethics Committee of Mozambique (Ref. 342/CNBS/13) and the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona in Spain (Ref. 2013/8677). All research was performed in accordance with relevant guidelines and regulations of the Montreal Statement on Research Integrity in Cross-Boundary Research Collaborations, and the Singapore Statement on Research Integrity.

Deaths of all ages having occurred within the hospital premises from November 2013 to March 2015 were submitted to coupled MIA and CDA procedures. Eligible criteria for case recruitment were: 1) an autopsy requested by the clinician as part of the medical evaluation of the patient, and 2) informed consent to perform the autopsy given by the relatives. Accidental or traumatic deaths were excluded.

**Autopsy procedures.** Detailed MIA pathological and microbiological methods have been reported elsewhere<sup>1,3–6</sup>. In brief, the procedure included an initial disinfection of the surface of the body followed by the collection of blood and cerebrospinal fluid (CSF), aiming to collect ~10–15 mL of each fluid, and puncture of solid organs (liver, lungs, and central nervous system [CNS]) using biopsy needles (14G-16G), for microbiological and pathological analysis. In addition, punctures aiming to obtain heart, spleen, kidneys and, in maternal deaths, uterus, were performed for pathology examination.

Immediately after the MIA, the CDA procedure was conducted by a second pathologist not involved with the MIA and following a standardized protocol for adult deaths<sup>17</sup> or pediatric and perinatal deaths<sup>18</sup>. Histological and microbiological samples were obtained from the same viscera collected in the MIA and CDA, as well as from any grossly identified lesions. Time of death and start of MIA and CDA procedures were recorded for all cases.

**Histological and microbiological analyses.** The histological evaluation included staining with hematoxylin and eosin in all samples and additional histochemical and/or immunohistochemical staining whenever needed to reach a diagnosis<sup>1,3–6</sup>. All microbiological methods, that included both culture and molecular tests, have been reported in detail elsewhere<sup>15,19</sup>. Microbiological cultures were performed only with the fluids and tissues obtained in the MIA. Briefly, 5–10 mL of blood were inoculated into aerobic blood culture bottles and incubated into the BACTEC system (Beckton Dickinson, MD, USA). Positive blood cultures were subjected to Gram stain and sub-cultured in agar plates according to the morphology observed under the microscope. CSF samples were sub-cultured into blood, chocolate and MacConkey agar plates, because between all these culture media allow the recovery of the maximum amount of cultivable microorganisms with medical interest. Tissue samples from CNS, liver, lung and uterus were inoculated into thioglycolate broth-containing tubes, a multipurpose, enriched, differential medium and incubated at 37 °C. If signs of bacterial or fungal growth were observed, Gram stain and sub-culture into appropriate agar plates for the recovery of bacteria were performed; if yeasts were observed in the gram stain or if fungal filamentous growth were observed, sub-cultured into appropriate media

was performed. Identification of the isolates was performed by standard biochemical techniques at the laboratory of the Manhiça Health Research Center (CISM). The strains were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until shipment to the Hospital Clinic of Barcelona for final identification by matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI-TOF, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

Molecular analyses were performed both in body fluids and tissues obtained in the MIA and in tissues obtained in the CDA. For these analyses, plasma and CSF aliquots, as well as tissue samples, were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until testing. All tissue samples obtained through MIA and CDA procedures were homogenized using a hand-held rotor-stator homogenizer (TissueRuptor, Qiagen) and disposable probes for each tissue sample processed. Nucleic acid extractions (DNA + RNA) were performed using a semi-automated system (Qiacube, Qiagen). For formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues, three thick sections of  $10\ \mu\text{m}$  were prepared. The microtome blade was replaced after each case to avoid cross-contamination. Nucleic acid extraction included overnight proteinase K digestion and DNA isolation using a commercially available kit (QIAamp DNA minikit, Qiagen) according to the manufacturer's instructions. DNA from whole blood collected in filter paper was subjected to DNA extraction using Purelink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen, Waltham MA, USA).

We performed generic PCRs (16S rRNA PCR and 18S rRNA-ITS PCR) and specific PCR (e.g. cytomegalovirus real-time PCR, *Toxoplasma gondii* real time PCR, *Pneumocystis jirovecii* real time PCR, *Mycobacterium tuberculosis* real time PCR, multiplex respiratory virus RT-PCR, *P. falciparum* real time PCR)<sup>18</sup>. All sequencing reactions from amplicons obtained by either the 16S rRNA PCR or the 18S rRNA-ITS PCR were performed by the Sanger method. Pathogen identification was performed by comparison of the sequences obtained with those present in the GenBank using the BLAST algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Two scales ranging from 0 to 4 were developed to grade the strength of the evidence of the findings; one based on the severity of the pathological findings and the other on the pathogenicity of each individual microorganism, the number of organs (one or more organs) and the type of techniques (classic cultures, molecular tests or both) in which the microorganism was identified<sup>3–6</sup>. Microorganisms were categorized as causing true infection or as contaminants based on criteria previously reported by our group, which varied slightly for adults, children, neonates and stillborn babies<sup>3–6</sup>. Briefly, these criteria comprised the type of microorganism, the number of organs involved, the presence or absence of pathologic findings associated with the infection, and the clinical data (for the CDA). The true infection category included infections causing death and infections present during life as associated conditions. Any other microorganism identified not fulfilling these criteria were classified as contaminant microorganisms.

**Cause of death determination.** Once all the analyses of the MIA samples had been completed, a panel composed of a pathologist, a microbiologist, and a clinician with expertise in infectious diseases and epidemiology evaluated all the pathological and microbiological results and assigned the MIA diagnosis, following a methodology previously described<sup>3–6</sup>.

Whenever identified, a chain of conditions leading to death (up to four) was recorded following the most probable chronological sequence of events<sup>1,3–6</sup>. The direct cause of death was considered as the main cause of death (e.g. bacterial pneumonia in a toddler with malnutrition, or lymphoma in an HIV-infected patient), only in the group of maternal death we considered the underlying disease as cause of death. Finally, other conditions or concomitant infections contributing to death but not related to the chain of events leading to death were considered as other significant conditions.

After a washout period (minimum 3 months, range 3–6 months), and blindly to the MIA diagnosis, the same team analyzed the samples of the CDA following the same approach used for the analysis of the MIA samples, with the only exception that tissues obtained during CDA were not routinely cultured, and only molecular methods were used to investigate pathogens. The panel evaluating the CDA integrated all the findings including not only the pathological and microbiological results, but also the clinical information and the macroscopic data.

Using a combination of the strength of the evidence of the histological and the microbiological findings, a category was assigned to the certainty of the cause of death attribution of the MIA diagnosis and the CDA diagnosis. These categories included no diagnosis and diagnosis of low, moderate, high, and very high certainty<sup>3–6</sup>.

The CDA diagnosis was considered the “gold standard”. Diagnoses were grouped into infectious diseases, non-infectious diseases and non-conclusive.

**Time lapse between death and postmortem procedures and definition of the study groups.** The day and time of death (with a precision of minutes) as well as the exact day and time when the MIA procedure started were recorded for each case. The PMI was defined as the time from death to the MIA procedure. For stillborn babies in whom the precise time of death was not clearly defined, the PMI was defined as the time from delivery to the MIA. All cases were classified in two groups: a) cases in which the autopsy procedures started within the first 24 hours after death (“early autopsy” group); and b) all cases in which the autopsy procedures started after the first 24 hours after death (“late autopsy” group). The microorganisms identified, as well as the technique in which they were identified were correlated with the PMI. The bodies were kept under refrigeration from death until the post-mortem procedure.

**Statistical methods and definitions.** We compared the differences in the distribution of causes of death and the percentage of inconclusive cases observed in early and late autopsies. The differences were assessed using the Chi-square test or Fisher's exact test. The differences in levels of strength and certainty between early and late MIAs were analyzed using the Student's t-test for independent groups and Fisher's exact test respectively. The coincidence between the MIA and the CDA diagnoses was evaluated, by comparing the ICD-10 codes of the main diagnosis<sup>3–6</sup>. As the ICD-10 system classifies diagnoses into nested classes of different hierarchical levels in which diseases or conditions are organized in chapters, blocks, and 3-character categories, a coincidence was classified

as (i) perfect; (ii) moderate; or (iii) low<sup>20</sup>. When the MIA and the CDA diagnoses were in different chapters, the coincidence was classified as “none”.

For the microbiological tests, we analyzed both for the MIA (cultures and molecular tests) and the CDA (only molecular tests) the association between the microorganisms identified and the elapsed time after death. The sample performance was assessed using the following indicators: number of tests and number of tests with a positive result (detection of one or multiple microorganisms in a culture or in a molecular test). The positive results were divided into positive results due to microorganisms considered as contaminants (microorganism considered as associated with translocation and not causing disease) and positive results due to microorganisms considered as responsible of true infections (detection of microorganisms considered as associated with disease).

The analysis was stratified by the type of microbiological test used to identify the pathogen (culture or molecular test). The number of tests with positive results was analyzed as count data potentially with excess zeros, since the number of tests performed was not the same for all cases. Hence, zero inflated Poisson regression models (ZIP) or standard Poisson regression as appropriate according to the Vuong test<sup>21</sup> were estimated using the number of tests as inflation factor and standard errors clustered at case level, relaxing the usual requirement that the observations be independent. The ZIP models were essentially two-stage models in which the probability of being tested was estimated first, followed by the estimation of Poisson regression among cases with a nonzero probability of being tested.

The concordance between MIA and CDA was assessed by the Cohen’s Kappa statistic and differences were assessed based on Student’s *t* distribution of 1000 bootstrap replications of paired differences for comparing correlated kappa coefficients<sup>22</sup>.

Statistical analyses were performed using Stata version 14.1 (Stata, College Station, TX, USA)<sup>23</sup>.

**Ethics approval and consent to participate.** The study protocol received approval of the National Mozambican Ethics Committee (ref.342/CNBS/13) and the Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona (Spain; approved, File 2013/8677). MIA and CDA procedures were only conducted after verbal informed consent was provided by the relatives.

## Results

Coupled MIA and CDA procedures were performed in 282 individuals including 18 stillborn babies, 41 neonates, 54 children, 57 maternal deaths and 112 other adults older than 15 years.

Two hundred fourteen (75.9%) MIA/CDA procedures were conducted within the first 24 hours (early autopsies) and 68 (24.1%) more than 24 hours after death (late autopsies). In the early autopsy group, the median time after death was 14 hours (range 4–24 hours). In this group 12 (5.6%) cases were stillborn babies, 29 (13.6%) were neonates, 33 (15.4%) were children, 37 (17.3%) were women of childbearing age, and finally 103 (48.1%) were other adults. In the group of late autopsies, the median time after death was 27 hours (range 24–65 hours). Of them, 6 (8.9%) were stillborn babies, 12 (17.6%) were neonates, 21 (30.9%) were children, 20 (29.4%) were maternal deaths, and 9 (13.2%) were other adults. In this group the procedures were performed between 24 and 36 hours after death in 52 cases (76.5%), and after 36 hours or more after death (range 36–64 hours) in 16 cases (23.5%).

Table 1 shows the causes of death grouped by main categories (i.e. infectious vs. non-infectious, vs. no diagnosis) identified at the CDA (gold standard) in the different groups of patients. No differences were observed either in terms of diagnostic distribution between the early autopsies and the late autopsies or in the number of cases with non-conclusive diagnosis.

**Level of strength of the findings, level of certainty of the diagnoses and coincidence between the mia and the cda.** No significant differences were found in the mean level of strength of the pathological and microbiological findings of the MIA and the CDA between early and late autopsy groups, with the only exception of a slightly lower level of strength of the pathological findings in the CDA in the late autopsy group (3.6 in the early, vs. 3.3 in the late,  $p = 0.0155$ ) (see Supplementary Information Table 1).

Table 2 shows the level of certainty of the MIA and the CDA diagnoses in the early and late autopsy groups. No significant differences were identified between the two groups.

Table 3 shows the concordance between the MIA and the CDA diagnoses in early and late autopsy groups. No differences were observed in any of the age groups.

**Relationship between the pmi and identification of microorganisms.** Figure 1 shows the relationship between the estimated rates of microorganisms identified and the PMI. The list of microorganisms identified in this study is shown in Supplementary Table 2. The results of the microorganisms classified as contaminants are presented in Fig. 1A,B, and those of the microorganisms considered as associated with true infections (either as direct causes of death, involved in the chain of events leading to death or present during life as associated conditions) in Fig. 1C,D. The estimations for the conventional cultures are shown in graphics 1A and 1C and those of the molecular tests in graphics 1B and 1D. For the molecular tests, the graphics include the estimations for the MIA (in green) and the CDA (in blue). Long PMI were associated with higher rates of contaminants in the conventional cultures and in the molecular tests (Fig. 1A,B respectively). For the microorganisms considered as associated with true infections the PMI was only associated with a higher rate of detection in conventional cultures but not in the molecular tests (Fig. 1C,D respectively). This association was observed in the samples of the cerebrospinal fluid ( $p = 0.0240$ ), the brain ( $p < 0.0001$ ), the lungs ( $p = 0.0001$ ), and the uterus ( $p = 0.0447$ ).

Figure 2 shows the relationship between the PMI and the estimated detection rates of bacteria, fungi, viruses and parasites identified in the molecular tests. Long PMI was associated with high detection of bacteria in the

	Time from death to autopsy procedures			p-value*
	Early autopsies (n = 214)	Late autopsies (n = 68)	Total (n = 282)	
Stillbirths				0.1787
Infectious diseases	1 (8%)	3 (50%)	4 (22%)	
Non-infectious diseases	9 (75%)	3 (50%)	12 (67%)	
Non-conclusive	2 (17%)	0 (0%)	2 (11%)	
Total	12 (100%)	6 (100%)	18 (100%)	
Neonates				0.1650
Infectious diseases	17 (59%)	10 (83%)	27 (66%)	
Non-infectious diseases	12 (41%)	2 (17%)	14 (34%)	
Non-conclusive	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Total	29 (100%)	12 (100%)	41 (100%)	
Children				0.3291
Infectious diseases	24 (73%)	18 (86%)	42 (78%)	
Non-infectious diseases	9 (27%)	3 (14%)	12 (22%)	
Non-conclusive	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Total	33 (100%)	21 (100%)	54 (100%)	
Maternal deaths				0.4466
Infectious diseases	18 (49%)	8 (40%)	26 (45%)	
Non-infectious diseases	19 (51%)	11 (55%)	30 (53%)	
Non-conclusive	0 (0%)	1 (5%)	1 (2%)	
Total	37 (100%)	20 (100%)	57 (100%)	
Other adults				0.7132
Infectious diseases	74 (72%)	6 (67%)	80 (71%)	
Other Non-infectious diseases	29 (28%)	3 (33%)	32 (29%)	
Non-conclusive	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Total	103 (100%)	9 (100%)	112 (100%)	

**Table 1.** Causes of death identified at the complete diagnostic autopsy (gold standard) in the different groups of patients in the early autopsy group (performed within 24 hours of death) and the late autopsy group (performed more than 24 hours after death). The data are presented as absolute numbers and (percentages of the column). \*Fisher's exact test.

Level of certainty of the cause of death	Time from death to the postmortem procedures		p-value
	Early autopsies (n = 214) n (%)	Late autopsies (n = 68) n (%)	
Minimally invasive autopsy			0.1871*
Very high	74 (35%)	19 (28%)	
High	52 (24%)	17 (25%)	
Moderate	36 (17%)	20 (29%)	
Low	25 (12%)	7 (10%)	
No diagnosis	27 (13%)	5 (7%)	
Complete diagnostic autopsy			0.8169 <sup>#</sup>
Very high	93 (43%)	26 (38%)	
High	80 (37%)	28 (41%)	
Moderate	29 (14%)	11 (16%)	
Low	10 (5%)	2 (3%)	
No diagnosis	2 (1%)	1 (1%)	

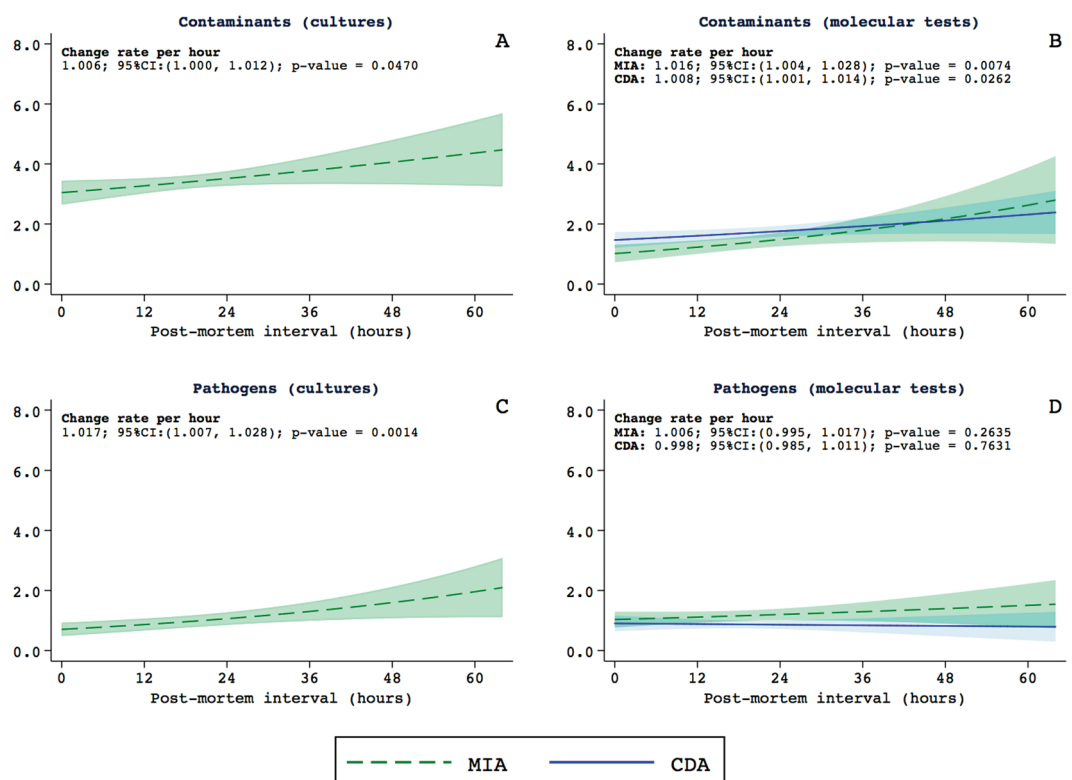
**Table 2.** Level of certainty of the MIA and the CDA diagnoses in the early (performed within 24 hours of death) and the late autopsy groups (performed more than 24 hours after death). \*Chi-square test; <sup>#</sup>Fisher's exact test.

MIA samples. No relationship between the PMI and estimated detection rates of viruses (Fig. 2C). There was a statistically significant decrease in the identification of fungi and parasites in cases with the PMI longer than 12 hours (Fig. 2B,D).

The analysis of the different families of bacteria showed that long PMI were associated with high rates of the identification of *Enterobacteriaceae* in the MIA samples both in conventional cultures (Fig. 3A) and in molecular tests (Fig. 3B). This association was not observed in the CDA samples. Increases in the PMI were associated with increases in the identification of *Pseudomonas* genus both in the MIA and in the CDA samples in the molecular analyses, but not in the conventional cultures (Fig. 3C,D).

Group	Time from death to the postmortem procedures				p-value <sup>†</sup>
	Early autopsies (n = 214)		Late autopsies (n = 68)		
	Agreement (%) <sup>*</sup>	Kappa value <sup>‡</sup>	Agreement (%) <sup>*</sup>	Kappa value <sup>‡</sup>	
Stillbirths	10/12 (83%)	0.7576	5/6 (83%)	0.7692	0.9698
Neonates	18/29 (62%)	0.3794	10/12 (83%)	0.4419	0.8618
Children	28/33 (85%)	0.6429	20/21 (95%)	0.8372	0.4583
Maternal deaths	24/37 (65%)	0.4025	15/20 (75%)	0.6183	0.2376
Other adults	89/103 (86%)	0.7274	8/9 (89%)	0.7857	0.7679

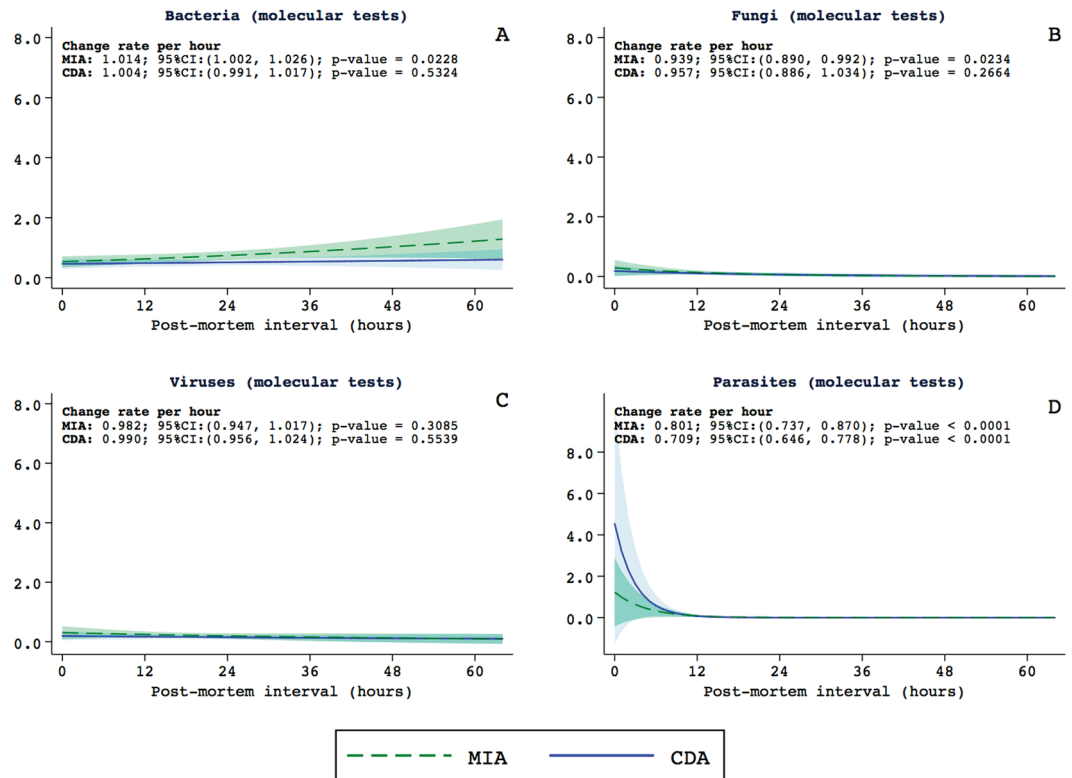
**Table 3.** Concordance between the MIA and the CDA in the early (performed within 24 hours after death) and the late autopsy groups (performed more than 24 hours after death). Number of cases classified in the same disease group by MIA and CDA; <sup>\*</sup>Concordance between the MIA and the CDA; <sup>‡</sup>Based on Student's t distribution of 1000 bootstrap replications of paired differences



**Figure 1.** Relationship between the estimated rates of microorganisms identified and the postmortem interval. Microorganisms classified as contaminants are shown in (A,B) and the microorganisms considered as associated with true infections in (C,D). The estimations for the conventional cultures are shown in graphics (A,C) and those of the molecular tests in graphics (B,D). For the molecular tests, the graphics include the estimations for the minimally invasive autopsy (MIA, in green) and the complete diagnostic autopsy (CDA, in blue).

There were borderline significant differences in the number of patients considered to have died of infections caused by strains of *Enterobacteriaceae* family or *Pseudomonas* genus between the early and the late autopsy groups (15/214 [7.0%] vs. 10/68 [14.7%]) ( $p = 0.0518$ ). When adding to these patients, the cases in which these bacteria were considered as having contributed to the death (addition of infections included in the chain of events leading to death, but not directly having caused the death and the infections considered as other significant conditions) the differences became significant with less deaths attributed to these bacteria in the early autopsy group (19/214 [8.9%]) than in the late autopsy group (13/68 [19.1%]) ( $p = 0.0204$ ).

Finally, in only one of the 15 patients (6.7%) of the early autopsy group and in 2/10 (20.0%) of the late autopsy group, who were considered to have died of infections caused by strains of the *Enterobacteriaceae* family or *Pseudomonas* genus, the final diagnosis was established based on very low pathological evidence and, consequently it was mainly based on the microbiological evidence.



**Figure 2.** Relationship between the postmortem interval and the estimated detection rates of bacteria (A), fungi (B), viruses (C) and parasites (D) identified in the molecular tests. The graphics include the estimations for the minimally invasive autopsy (MIA, in green) and the complete diagnostic autopsy (CDA, in blue).

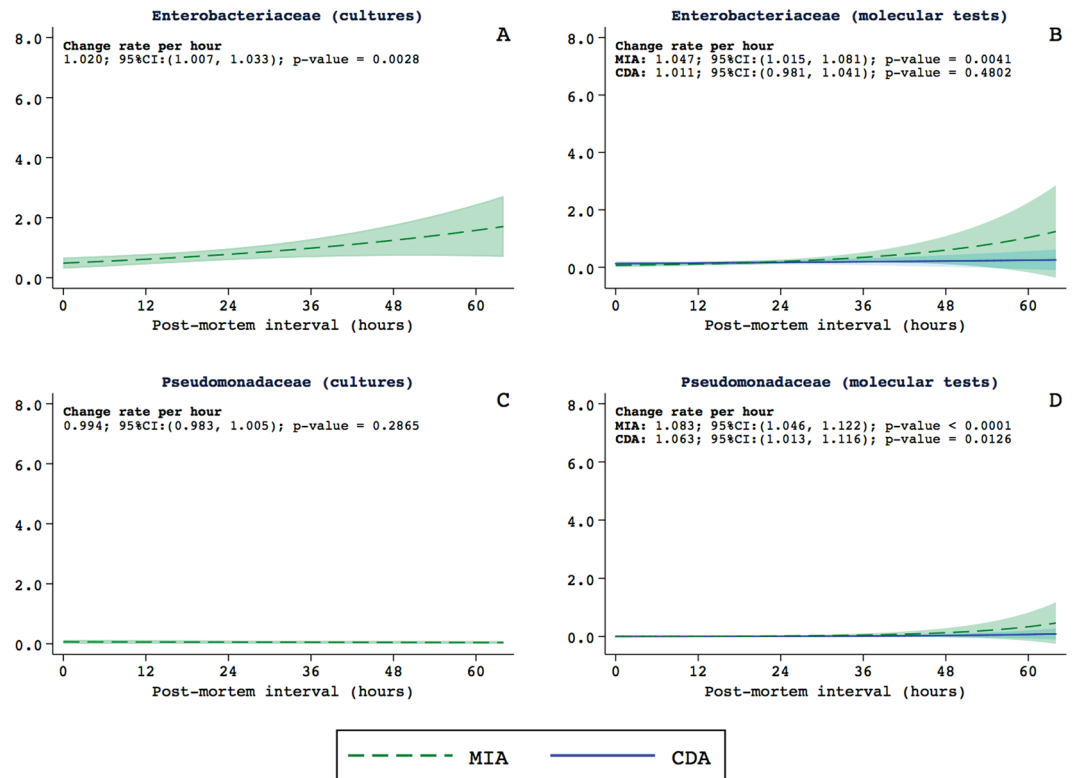
## Discussion

The appearance of the minimally invasive autopsy for post-mortem sampling to investigate the causes of death has stirred a significant revolution in the way we study mortality in low-income settings. However, short timeframes after death may hamper the feasibility of the MIA procedure when implementing the tool in low and middle-income countries, particularly in health facilities located in rural areas. For this reason, it appears relevant to generate evidence about the robustness of the data provided through the MIA beyond the first 24 hours after death.

In our study, no variations were observed related to the PMI in the number of cases in which no final diagnosis of cause of death was reached between the MIA and the CDA. Moreover, no diagnostic differences were observed between procedures performed earlier and later than 24 hours after death<sup>3–6</sup>. No differences were observed either regarding the level of between the MIA and the CDA diagnosis between the early and the late autopsy groups and no variations were observed either for the non-infectious conditions or for most of the infectious diseases. In particular, the microbiological results related to fungi and viruses seem not to be affected by changes related to the PMI and are, consequently, reliable<sup>23,24</sup>. These findings indicate that the MIA and the CDA, performed more than 24 hours after death can yield reliable results, and support their use after this period.

However, our study showed raising numbers of bacteria identified in the MIA (rate: 1.014 per hour [95%CI: 1.002–1.026];  $p = 0.0228$ ) with increasing PMI. This raise in the number of identified microorganisms with increasing PMI was evident for contaminating bacteria, but an increase was also observed in the number of bacteria considered as associated with true infections according to our criteria. This increase was mainly related with increases in the number of *Enterobacteriaceae* family and *Pseudomonas* genus strains.

In our study, the classification of a microorganism as a contaminant or as a microorganism associated with true infection was largely based on a grading scheme, which depend on the internal validity of the results obtained from the microbiology tests<sup>3–6</sup>. This grading scheme to determine the level of strength of a particular finding was applied not only to the microbiological results, but also to the pathological findings. For the microbiological findings, these criteria were based on the pathogenicity of each individual microorganism, but also on the number of organs (one or more organs) and the type of techniques (classic cultures, molecular tests or both) in which the microorganism was identified<sup>3–6</sup>. Accordingly, whereas some microorganisms such as *Cryptococcus* spp. or *M. tuberculosis* were always considered as associated with true infections, other microorganisms such as *Enterobacteriaceae* could be considered as contaminants or as associated with true infections depending on whether they have been isolated in a single or in multiple organs and on whether they had been identified by cultures, molecular tests or by both techniques simultaneously. However, these criteria are obviously influenced, not only by the sensitivity and specificity of the tests, but also by the quality of the samples.



**Figure 3.** Relationship between the postmortem interval and the estimated detection rates of *Enterobacteriaceae* in cultures (A), and in molecular tests (B), *Pseudomonadaceae* in cultures (C), and in molecular tests (D). For molecular tests, the graphics include the estimations for the MIA (in green) and the CDA (in blue).

The results of this study indicate that the abovementioned criteria may overestimate the contribution of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. as responsible of infections leading or contributing to death, particularly in procedures performed more than 24 hours after death. The higher number of deaths attributed to these microorganisms in the late autopsy group (10/68 [14.7%] vs. 15/214 [7.0%] in the early autopsy group,  $p = 0.0518$ ), and of infections contributing to death (13/68 [19.1%] in the late autopsy group vs. 19/214 [8.9%] in the early autopsy group,  $p = 0.0204$ ) are in keeping with this hypothesis. However, the number of cases in which the diagnosis was established based only on the microbiological criteria, which might represent true over diagnosis, was very small (3 cases) whereas most of the cases had strong pathological evidence and represented only an overestimation of the etiological agent.

Bacterial translocation is a physiologic phenomenon that occurs during life and after death<sup>15</sup>. Viable bacteria originating principally from the intestinal microbiota have been isolated in samples (such as blood) taken from human bodies, providing evidence that this bacterial translocation occurs before death<sup>16</sup>. The three main factors resulting in this phenomenon in the living human (intestinal mucosa alteration, modification of the intestinal microbiota, and a weak immune system) also occur after death<sup>25</sup>. However, the results reported in the literature about the relationship between the PMI and detection of microorganisms are diverse. There is some controversy regarding the effect of the PMI on bacterial isolation rates. It has been reported a small effect of the PMI on the isolation rates in cultures from blood and CSF<sup>13</sup>; in contrast, other studies have shown that the PMI have no influence on bacterial growth<sup>26</sup>. However, in the latter series no sample was taken beyond 48 hours and only pure growth of potentially pathogenic bacteria were included in the analysis. Published data showing that *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium* spp., *P. aeruginosa*, *Enterococci*, and *Streptococci* have a higher potential of translocation<sup>27,28</sup>, are in keeping with our findings and stress the need of considering the PMI when evaluating the microbiological results related to these bacteria. Finally, a longer PMI was associated with an increase in the number of *Pseudomonas* spp. strains detected with molecular techniques. In contrast, an increased PMI was not associated with an increase in the number of strains of this genus in conventional cultures. This may be related to the low number of translocated bacteria, which can be detected by molecular tools but not by culture, because anaerobic strains limit the growth of species with high translocation potential<sup>28</sup>.

In our study, the bodies were refrigerated between the time of death and the autopsy procedures. However, some delays in the refrigeration with bodies exposed to high temperatures cannot be excluded. Refrigeration has been shown to reduce autolysis<sup>29,30</sup> and bacterial translocation<sup>13,31</sup>, and consequently expand the period in which the postmortem pathological and microbiological analyses are reliable. Inaccessibility to refrigeration may reduce the efficiency interval and thus hinder the performance of the postmortem examination.

In conclusion, the MIA and the CDA, performed more than 24 hours after death can yield reliable results, provided bodies have been kept under adequate refrigeration. However, the contribution to death of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. infections may be overestimated, particularly in procedures performed more than 24 hours after death. Thus, these bacteria should be probably disregarded as cause or contributors to death when evaluating autopsy procedures performed more than 24 hours after death. Further studies are needed to determine the maximum time beyond which such investigations using pathological and microbiological methods are likely to no longer provide valuable results.

### Availability of data and material

All relevant data are within the paper. Any additional data use and transfer is monitored by ISGlobal's Data Management and Biostatistics Unit (contact e-mail: ubioesdm@isglobal.org).

### References

- Castillo, P. *et al.* Pathological methods applied to the investigation of causes of death in developing countries: Minimally invasive autopsy approach. *PLoS One* **10**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132057> (2015).
- Maixenchs, M. *et al.* Willingness to Know the Cause of Death and Hypothetical Acceptability of the Minimally Invasive Autopsy in Six Diverse African and Asian Settings: A Mixed Methods Socio-Behavioural Study. *PLoS Med.* **13**, <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002172> (2016).
- Menendez, C. *et al.* Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in stillborn babies and neonates in Mozambique: An observational study. *PLoS Med.* **14**, <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002318> (2017).
- Bassat, Q. *et al.* Validity of a minimally invasive autopsy tool for cause of death determination in pediatric deaths in Mozambique: An observational study. *PLoS Med.* **14**, <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002317> (2017).
- Castillo, P. *et al.* Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in adults in mozambique: an observational study. *PLoS Med.* **13** <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002171> (2016).
- Castillo, P. *et al.* Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in maternal deaths in Mozambique: An observational study. *PLoS Med.* **14**, <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002431> (2017).
- Bassat, Q. *et al.* Development of a post-mortem procedure to reduce the uncertainty regarding causes of death in developing countries. *Lancet Glob. Heal.* **1**, 125–126 (2013).
- Byass, P. Minimally Invasive Autopsy: A New Paradigm for Understanding Global Health? *PLoS Med.* **13**, 8–11 (2016).
- Farag, T. H. *et al.* Precisely tracking childhood death. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **97**, 3–5 (2017).
- Morris, J. A., Harrison, L. M. & Partridge, S. M. Practical and theoretical aspects of postmortem bacteriology. *Curr. Diagnostic Pathol.* **13**, 65–74 (2007).
- Weber, M. *et al.* Infection and sudden unexpected death in infancy: a systematic retrospective case review. *Lancet* **371**, 1848–1853 (2008).
- Heimesaat, M. M. *et al.* Comprehensive postmortem analyses of intestinal microbiota changes and bacterial translocation in human flora associated mice. *PLoS One* **7**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040758> (2012).
- Morris, J. A. Postmortem bacteriology: a re-evaluation. *J. Clin. Pathol.* **59**, 1–9 (2006).
- Mesli, V., Neut, C. & Hedouin, V. Postmortem bacterial translocation in *Forensic Microbiology* (eds. Carter, D. O., Tomberlin, J. K., Benbow, M. E. & Metcalf, J. L.) 192–211 (John Wiley & Sons Ltd, 2017).
- Balzan, S. *et al.* Bacterial translocation: Overview of mechanisms and clinical impact. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**, 464–471 (2007).
- Yatsunenkov, T. *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nat.* **2012** **486**, 222–227 (2012).
- Hutchins, G. M., Berman, J. J., Moore, G. W. & Hanzlick, R. Practice guidelines for autopsy pathology: autopsy reporting. Autopsy Committee of the College of American Pathologists. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **123**, 1085–92 (1999).
- Bove, K. E. Practice guidelines for autopsy pathology: the perinatal and pediatric autopsy. Autopsy Committee of the College of American Pathologists. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **121**, 368–76 (1997).
- Martínez, M. J. *et al.* Infectious cause of death determination using minimally invasive autopsies in developing countries. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **84**, 80–86 (2016).
- World Health Organization (WHO). ICD-10 Volume 2 Instruction Manual. (2016). Available at: [http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/Content/statchtml/ICD10Volume2\\_en\\_2016.pdf?ua=1](http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/Content/statchtml/ICD10Volume2_en_2016.pdf?ua=1). (Accessed: 20th December 2017).
- Vuong, Q. H. Likelihood Ratio Tests for Model Selection and Non-Nested Hypotheses. *Econometrica* **57**, 307 (1989).
- Vanbelle, S. & Albert, A. A bootstrap method for comparing correlated kappa coefficients. *J. Stat. Comput. Simul.* **78**, 1009–1015 (2008).
- StataCorp. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, Texas. USA. <https://www.stata.com/products/> (2015).
- Tsokos, M. & Püschel, K. Postmortem bacteriology in forensic pathology: Diagnostic value and interpretation. *Leg. Med.* **3**, 15–22 (2001).
- Caplan, M. J. & Koontz, F. P. in *Cumitech 35, Postmortem Microbiology*. (ed. McCurdy, B. W.) 1–37 (ASM Press, 2001).
- Plantefève, G. & Bleichner, G. Translocation bactérienne: mythe ou réalité? *Réanimation.* **10**, 550–561 (2001).
- Lobmaier, I. V. K., Vege, Å., Gaustad, P. & Rognum, T. O. Bacteriological investigation-significance of time lapse after death. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 1191–1198 (2009).
- Laffineur, G. *et al.* Bacterial translocation in Crohn disease. *Gastroentérologie Clin. Biol.* **16**, 777–81 (1992).
- Palmiere, C., Egger, C., Prod'Hom, G. & Greub, G. Bacterial Translocation and Sample Contamination in Postmortem Microbiological Analyses. *J. Forensic Sci.* **61**, 367–374 (2016).
- Cocariu, E. A. *et al.* Correlations Between the Autolytic Changes and Postmortem Interval in Refrigerated Cadavers. *Rom. J. Intern. Med.* **54**, 105–112 (2016).
- George, J., Van Wettere, A. J., Michaels, B. B., Crain, D. & Lewbart, G. A. Histopathologic evaluation of postmortem autolytic changes in bluegill (*Lepomis macrochirus*) and crappie (*Pomoxis anularis*) at varied time intervals and storage temperatures. *PeerJ* **4**, e1943 (2016).
- Burcham, Z. M. *et al.* Fluorescently labeled bacteria provide insight on post-mortem microbial transmigration. *Forensic Sci. Int.* **264**, 63–69 (2016).

### Acknowledgements

We would like to thank the families of the deceased patients included in this study. The authors are grateful to all the members of the Department of Pathology of Maputo Central Hospital, whose support made this study possible, and to the staff of the *Centro de Investigação em Saúde de Manhiça* (CISM) for their logistic support. We specifically thank Mr. Bento Nhancale for his invaluable support to the study. We also thank the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group for Forensic and Postmortem Microbiology (ESGFOR) for valuable training and advice. The CaDMIA research project (Validation of the minimally invasive

autopsy tool for cause of death investigation in developing countries) was funded by the Bill & Melinda Gates Foundation (Global Health grant numbers OPP1067522; QB) (<http://www.gatesfoundation.org/>) and by the Spanish Instituto de Salud Carlos III (FIS, PI12/00757; CM) (<https://portalfis.isciii.es>). Data analysis has been supported by the CaDMIA plus research project, funded by the Bill & Melinda Gates Foundation (Global health grant numbers OPP1128001; JO) (<http://www.gatesfoundation.org>) and the Spanish Instituto de Salud Carlos III (Acciones CIBER; CM) (<http://www.ciberisciii.es/>). ISGlobal is a member of the CERCA Programme, Generalitat de Catalunya (<http://cerca.cat/en/suma/>). CISM is supported by the Government of Mozambique and the Spanish Agency for International Development (AECID). No funding bodies had any role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Author Contributions

J.C.H., L.Q., P.C., Q.B., C.M., M.J.M. and J.O. wrote the main manuscript text. C.C., F.F., D.J., L.L., R.B., T.N., P.S.R., S.B., C.S., V.C., S.M., Z.J., F.M., M.R.I., C.L., A.G., A.C., I.M., M.M. and K.M. provided the data from Mozambique. J.C.H., L.Q., P.C., M.N., I.C., N.R., L.M., N.C., A.S., C.M.A., Q.B., C.M., M.J.M. and J.O. provided the data from Spain. L.Q. prepared Figs 1–3. C.C., A.S., I.M., K.M., E.M., P.A., J.V., Q.B., C.M., M.J.M. and J.O. supervised research activity. All authors reviewed the manuscript.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34436-1>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

## Artículo 3

**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS RELACIONADOS:** Hipótesis 1.3 y Objetivos 3 y 4

**AUTORES:** Hurtado JC, Castillo P, Fernandes F, Navarro M, Lovane L, Casas I, Quintó L, Marco F, Jordao D, Ismail MR, Lorenzoni C, Martinez-Palhares AE, Ferreira L, Lacerda M, Monteiro W, Sanz A, Letang E, Marimon L, Jesri S, Cossa A, Mandomando I, Vila J, Bassat Q, Ordi J, Menéndez C, Carrilho C, Martínez MJ.

**TÍTULO:** Mortality due to *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in low-income settings; an autopsy study.

**REVISTA, VOLUMEN (NÚMERO): PÁGINAS, FECHA DE PUBLICACIÓN:** *Scientific Reports*, 9 (1):7493. Published 2019 May 16.

**DOI:** 10.1038/s41598-019-43941-w

**FACTOR DE IMPACTO:** 3,998

**CUARTIL:** Journal Citation Reports (JCR): Q1 (Multidisciplinary Sciences)



# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Mortality due to *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in low-income settings: an autopsy study

Juan Carlos Hurtado<sup>1,2</sup>, Paola Castillo<sup>2,3</sup>, Fabiola Fernandes<sup>4</sup>, Mireia Navarro<sup>1,2</sup>, Lucilia Lovane<sup>4</sup>, Isaac Casas<sup>1,2</sup>, Llorenç Quintó<sup>1</sup>, Francesc Marco<sup>1,2</sup>, Dercio Jordao<sup>4</sup>, Mamudo R. Ismail<sup>4,5</sup>, Cesaltina Lorenzoni<sup>4,5</sup>, Antonio E. Martinez-Palhares<sup>6</sup>, Luiz Ferreira<sup>7</sup>, Marcus Lacerda<sup>7,8</sup>, Wuelton Monteiro<sup>7</sup>, Ariadna Sanz<sup>1</sup>, Emilio Letang<sup>1,9</sup>, Lorena Marimon<sup>2,3</sup>, Susan Jesri<sup>2,3</sup>, Anelsio Cossa<sup>10</sup>, Inacio Mandomando<sup>10</sup>, Jordi Vila<sup>1,2</sup>, Quique Bassat<sup>1,10,11,12</sup>, Jaume Ordi<sup>1,2,3</sup>, Clara Menéndez<sup>1,10,13</sup>, Carla Carrilho<sup>4,5</sup> & Miguel J. Martínez<sup>1,2</sup>

*Cryptococcosis* is a major opportunistic infection and is one of the leading causes of death in adults living with HIV in sub-Saharan Africa. Recent estimates indicate that more than 130,000 people may die annually of cryptococcal meningitis in this region. Although complete diagnostic autopsy (CDA) is considered the gold standard for determining the cause of death, it is seldom performed in low income settings. In this study, a CDA was performed in 284 deceased patients from Mozambique ( $n = 223$ ) and Brazil ( $n = 61$ ). In depth histopathological and microbiological analyses were carried out in all cases dying of cryptococcosis. We determined the cryptococcal species, the molecular and sero-mating types and antifungal susceptibility. We also described the organs affected and reviewed the clinical presentation and patient management. Among the 284 cases included, 17 fatal cryptococcal infections were diagnosed. *Cryptococcus* was responsible for 16 deaths among the 163 HIV-positive patients (10%; 95%CI: 6–15%), including four maternal deaths. One third of the cases corresponded to *C. gattii* (VGI and VGIV molecular types, B $\alpha$  and C $\alpha$  strains) and the remaining infections typed were caused by *C. neoformans* var. *Grubii* (all VNI and A $\alpha$  strains). The level of pre-mortem clinical suspicion was low (7/17, 41%), and 7/17 patients (41%) died within the first 72 hours of admission. Cryptococcosis was responsible for a significant proportion of AIDS-related mortality. The clinical diagnosis and patient management were inadequate, supporting the need for cryptococcal screening for early detection of the disease. This is the first report of the presence of *C. gattii* infection in Mozambique.

*Cryptococcosis* is the leading cause of meningitis in adults living with HIV in sub-Saharan Africa<sup>1,2</sup>. In 2008, the number of cryptococcal meningitis (CM) cases in this region was estimated to be 720,000 (range 144,000–1.3

<sup>1</sup>ISGlobal, Hospital Clínic - Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Department of Microbiology, Hospital Clínic of Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Department of Pathology, Hospital Clínic of Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Department of Pathology, Maputo Central Hospital, Maputo, Mozambique. <sup>5</sup>Faculty of Medicine, Eduardo Mondlane University, Maputo, Mozambique. <sup>6</sup>Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil. <sup>7</sup>Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Viera Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil. <sup>8</sup>Instituto de Pesquisas Leônidas & Maria Deane, Fiocruz, Manaus, Brazil. <sup>9</sup>Hospital del Mar. Service of Infectious Diseases, Hospital del Mar, Hospital del Mar Research Institute (IMIM), Barcelona, Spain. <sup>10</sup>Centro de Investigação em Saúde de Manhiça, Maputo, Mozambique. <sup>11</sup>ICREA, Catalan Institution for Research and Advanced Studies, Pg. Lluís Companys 23, 08010, Barcelona, Spain. <sup>12</sup>Pediatric Infectious Diseases Unit, Pediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu (University of Barcelona), Barcelona, Spain. <sup>13</sup>Consorcio de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain. Juan Carlos Hurtado and Paola Castillo contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.J.M. (email: myoldi@clinic.cat)

million)<sup>3</sup>. Recent estimates from 2014 indicate that over 160,000 (95%CI 113,600–193,900) cases of CM, including more than 130,000 deaths occurred in sub-Saharan Africa<sup>4</sup>. This significant decrease in the absolute number of cases from 2008 to 2014 seems to be related to the scale-up of effective antiretroviral therapy (ART)<sup>5</sup>. However, the proportion of AIDS-related deaths due to *Cryptococcus* remains similar (around 15%), representing the second most common cause of AIDS-related mortality in adults, after tuberculosis<sup>4</sup>. Cryptococcal infection is believed to be acquired by inhalation of fungal cells from the environment. In immunocompetent hosts, the pathogen can be cleared or establish a latent infection<sup>6</sup>. In immunocompromised patients, *Cryptococcus* may induce pneumonia and its dissemination to the central nervous system (CNS) causes meningitis, the most severe form of the infection, which is fatal without appropriate treatment. In low income countries, the one-year mortality of CM, even in HIV-infected patients in care, has been estimated to be as high as 70%<sup>4</sup>.

Human cryptococcal infections were traditionally attributed to *Cryptococcus neoformans* until *Cryptococcus gattii* was classified as a distinct species by molecular methods in 2002<sup>7</sup>. *Cryptococcus gattii* is further divided into four molecular types (variety *gattii*; VGI-VGIV) and little is known about *C.gattii* infections in Africa, where this pathogen has been isolated from both clinical and environmental samples<sup>8</sup>. Most VGIV strains have been described in the southern part of Africa, whereas VGI and VGII strains have been reported in central Africa<sup>8</sup>. *C. gattii* infections were thought to occur mainly in the tropics<sup>9</sup> until 2004, when an outbreak of *C. gattii* in North America was recognized<sup>10</sup>. This outbreak was caused by VGII strains and included the emergence of hypervirulent variants<sup>11</sup>. Current knowledge on the epidemiology and clinical presentation of *C. neoformans* infection is clearly greater than that related to *C. gattii*. *C. neoformans* infections occur predominantly in people infected with HIV or with other immunocompromising conditions, whereas *C. gattii* infections have been mainly described in apparently immunocompetent patients<sup>9</sup>. Autopsy findings reveal that the CNS and the lungs are the organs most frequently affected in disseminated infections<sup>12,13</sup>, which may also affect multiple organs, especially in HIV-infected patients<sup>14</sup>. However, reported autopsy series do not usually include cryptococcal species identification, and therefore, knowledge regarding the histopathology of *C. gattii* remains limited.

In the present study, we determined the *Cryptococcus*-associated mortality of a series of 284 autopsies performed in two hospitals located in high prevalence HIV areas, Mozambique in sub-Saharan Africa and the Brazilian Amazonia. We also analysed the clinical presentation, management, and histopathological and microbiological findings of 17 cases of fatal cryptococcal infection.

## Methods

**Study setting and design.** An observational study was performed at the Department of Pathology of the Maputo Central Hospital in Maputo, Mozambique and at the *Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado*, in Manaus, Western Brazilian Amazon. The study was approved by the *Comissão Nacional de Ética em Pesquisa* - CONEP (Brazil; Ref. 1.074.304), the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona (Spain; File 2013/8677) and National Bioethics Committee of Mozambique (Mozambique; Ref. 342/CNBS/13), which deemed verbal consent sufficient in this study. All research was performed in accordance with guidelines and regulations of the Montreal Statement on Research Integrity in Cross-Boundary Research Collaborations, and the Singapore Statement on Research Integrity.

From November 2013 to March 2015, complete diagnostic autopsies (CDAs) were performed in 284 deceased patients in the two study sites. Two hundred twenty-three cases were recruited from Mozambique: 169 were adults over 15 years of age (112 women, 57 of whom were maternal deaths, i. e., women dying during pregnancy, partum, post-partum or within 42 days of termination of pregnancy<sup>15</sup>), and 54 were children from 1 month to 15 years of age (37 males and 17 females). Sixty-one cases were recruited from Brazil: 59 adults (38 males and 21 females, including one maternal death) and two children. A description of the study design and inclusion criteria for the cases has been published elsewhere<sup>16–18</sup>. All cases fulfilling the inclusion criteria were included in the study; these were (1) a CDA requested by the clinician as part of the medical evaluation of the patient and; (2) a verbal informed consent to perform the autopsy given by the relatives. Traumatic deaths were excluded. A member of the study staff was tasked with liaising with the families in cases of deaths occurring in the pediatric department, but only after the clinicians had asked for consent for postmortem examination<sup>17</sup>. All the clinical records available regarding admission preceding death of each patient were reviewed and the clinical data were collected in a standardized manner.

**Autopsy procedures and determination of the cause of death.** The autopsy procedures and a description of the pathological and microbiological methods used have been reported elsewhere<sup>19,20</sup> and for Briefly, samples of blood, cerebrospinal fluid (CSF), bone marrow and key organs such as the liver, lungs, CNS, spleen and kidneys, as well as uterus in all women of reproductive age were collected for histopathological and microbiological analysis. The microbiological methods included universal screening for relevant pathogens (e.g. HIV, viral hepatitis, tuberculosis, malaria) and bacterial/fungal culture of autopsy samples, targeted screening depending on the patient's condition (i.e. screening for *Cryptococcus*, *Toxoplasma gondii* and *Pneumocystis jirovecii* in HIV-infected cases), and additional specific testing according to the histopathological findings. Following the analysis of the CDA samples, a panel composed of a pathologist, a microbiologist, and a clinician with expertise in infectious diseases and epidemiology evaluated all the data (including the clinical information) and assigned the final cause of death.

**Laboratory methods.** All cases in which the cause of death was assigned to a cryptococcal infection were further characterized. The histological evaluation included periodic acid–Schiff staining (PAS) of the samples of both lungs, CNS, bone marrow, spleen, liver, kidney and uterus, as well as Grocott-Gomori methenamine silver staining in all CNS samples. Microbiological evaluation included a specific real time PCR for *Cryptococcus* spp.<sup>21</sup>, which was performed in the samples of both lungs, CNS, bone marrow, spleen, liver and uterus. PCR cycle

threshold values >38 were considered negative. Plasma and CSF samples were tested by both real time PCR and the *Cryptococcus* antigen (CrAg) lateral flow assay (LFA) (IMMY Inc., Norman, Oklahoma). Discrimination between *C. neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans*, and *C. gattii* was achieved by amplification of the rRNA intergenic spacer (IGS) region, followed by forward and reverse Sanger sequencing of the amplicons. Identities of the cryptococcal species were assigned based on a >98% match to the IGS sequence of a *Cryptococcus* reference strain (*C. gattii*: CBS 6289, ATCC MYA-4561, CBS 6955, ATCC MYA-4563; *C. neoformans* var. *grubii*: ATCC MYA-4564, ATCC MYA-4565 and *C. neoformans* var. *neoformans*: ATCC MYA-4567) as described previously<sup>22</sup>.

Cryptococcal strains isolated from the cultures of the autopsy samples underwent a consensus multi-locus sequence typing scheme for *C. neoformans* and *C. gattii*<sup>23</sup>. In addition, the sero-mating type of these strains was determined by multiplex PCR as described previously<sup>24,25</sup>. An anti-fungogram was performed for each strain using the Sensititre<sup>®</sup> YeastOne<sup>®</sup> susceptibility plate (TREK Diagnostic Systems, Thermo Fisher Scientific, Oakwood Village, USA).

**Statistical methods.** Descriptive analysis was performed using univariate statistics with means and standard deviations for continuous variables and frequency distributions for categorical variables. All analyses, data manipulation, and implementations were done using Stata MP version 15 (Stata, College Station, TX, USA).

## Results

**Mortality due to cryptococcal infections.** Among the 284 deceased patients included in this study, 163 (57%) tested positive for HIV, and a total of 17 (6%) fatal cryptococcal infections were confirmed in the CDA. All the deaths except one occurred in HIV-infected cases. Among the HIV-infected cases, cryptococcosis was responsible for 16 deaths (10%; 95% confidence interval [CI]: 6–15%). Among the Mozambican adults, 109 out of 169 (64%) were HIV-infected, and 11 died of fatal cryptococcal infection (10%). Four of these cases were maternal deaths (three pregnant women and one in the puerperal period), accounting for 11% of the 36 maternal deaths occurring in HIV-infected women. None of the 17 HIV-positive children over one month of age had cryptococcal infection. Thirty-seven out of the 61 (61%) patients from Brazil were HIV-infected, and *Cryptococcus* was responsible for five of these deaths (13%). The only death caused by *Cryptococcus* in an HIV-negative patient occurred in a six-year-old child (infected with *C. gattii*).

**Clinical presentation and management of fatal cryptococcal infections.** The demographic features, HIV status, clinical presentation and management of the 17 patients with fatal cryptococcal infection are summarized in Table 1. The median age was 34 years (range 6–44 years); 11 cases (65%) were men. In 13 out of the 16 (81%) HIV-infected patients, a positive HIV test result was reported in the clinical records and was apparently unknown by the clinician in the other 3 cases. Four out of the 16 (25%) HIV-infected patients were on ART, but the duration of ART was only reported in one case.

Headache was the most common symptom (13 patients, 76%), followed by fever and vomiting (eight cases each, 47%). Upon admission to hospital, eight patients (47%) were confused and/or agitated, two patients (12%) were lethargic, and another two (12%) were fully comatose. Meningeal signs were detected in seven patients (41%). The mean time from admission to death was 9.3 days (95%CI: 2.4–16.2). Cryptococcal infection was considered the first clinical diagnostic option in only 4/17 (23%) of the confirmed cases, whereas it was included in the differential diagnosis in eight patients (47%). Antifungal treatment (fluconazole or Amphotericin B) had been prescribed to seven patients but to only five of the clinically suspected cases. Seven of the patients (41%) died within 72 hours of admission, and 12 out of the 16 HIV-positive patients (75%) died within one week of admission.

The clinical records of the remaining 267 cases included in this study were reviewed for clinical diagnosis of cryptococcal infection. Among these, three HIV-infected patients were clinically diagnosed with cryptococcal meningitis, but no evidence of cryptococcal infection was found in the autopsy (the cause of death was identified as toxoplasmosis in two cases and tuberculosis in one case).

**Histopathological and microbiological analysis of the fatal cryptococcal infections.** Table 2 shows the final cause of death, the cryptococcal species, other associated diagnoses identified in the CDA, as well as the results of the PAS staining, *Cryptococcus* real time PCR and CrAg test in the different samples analysed. Identification of the cryptococcal species was successful in 15 out of the 17 cases. In two cases, the tissue samples provided insufficient DNA to perform IGS amplification and sequencing. Interestingly, among the 15 cases identified, five (33%) were *C. gattii* whereas the remaining cases (66.6%) were *C. neoformans* var. *grubii*.

Twelve of the 17 cases (70%) were diagnosed as disseminated infections and the remaining 5 (30%) as meningoencephalitis. The CNS was affected in all 17 cases. The following were the most affected organs (PAS and/or PCR positive): the lungs (88%), spleen (76%), liver (71%), bone marrow (59%) and kidney (47%). In addition, in five out of six (83%) deceased women, the pathogen was detected in uterus samples, and in one case it was detected in the placenta. *Cryptococcus* was found in more than 5 different samples in 11 patients (65% of the cases). More organs were affected in *C. neoformans* var. *grubii* than in *C. gattii* infections (mean of 6.2 vs. 2.8 organs positive by PAS staining), but no specific histopathological differences were observed between the two *Cryptococcus* species. Molecular testing expanded the detection of *Cryptococcus* in 14 additional tissues that were negative for PAS staining. In contrast, two tissue samples were positive for PAS staining but negative by real time PCR. Periodic acid–Schiff staining and Grocott–Gomori methenamine silver staining showed identical results. Representative histopathological images of different affected tissues are shown in Fig. 1. *Cryptococcus* was detected by PCR in CSF and plasma in 80% and 47% of the cases tested, respectively. All plasma and CSF samples tested for CrAg LFA were positive. Co-infections with other AIDS-related pathogens or AIDS-defining illnesses

Case	Age (in years), sex and origin	Maternal death	HIV Serology	HIV Viral load (copies/mL)	Main symptoms	Pre-mortem Clinical Diagnoses*	Antimicrobial treatment received during illness	Antifungal treatment	Time from admission to death (days)	ART
1	6; M; MOZ	NA	Negative	NA	Fever, seizure, headache, bilateral exophthalmos	<b>Cerebral cryptococcosis</b> , pulmonary tuberculosis not confirmed bacteriologically or histologically, essential (primary) hypertension, hypoglycemia unspecified, sepsis due to <i>Staphylococcus aureus</i>	Penicillin, chloramphenicol, cephalosporin, quinolones, acyclovir	No	52.3	No
2	30; F; MOZ	Yes	Positive	28,600	Fever, vomits, headache, behavioral changes	HIV disease resulting in encephalopathy, unspecified HIV disease, pneumonia, organism unspecified	Co-trimoxazole, penicillin, cephalosporin	Fluconazole	24.4	Yes 72 months
3	29; F; MOZ	No	Positive	>10,000**	Fever, cough, vomiting, seizure, headache, night sweats, hematemesis	Encephalitis, myelitis and encephalomyelitis, unspecified HIV disease	Cephalosporin, acyclovir	Fluconazole	2.9	NA
4	34; M; MOZ	NA	Positive	7,720	Fever, vomiting, headache, behavioral changes	Encephalitis, myelitis and encephalomyelitis	Cephalosporin	No	1.1	NA
5	36; M; MOZ	NA	Positive	1,180	Headache, exophthalmos, loss of visual acuity	<b>Cerebral cryptococcosis</b> , cytomegaloviral disease, unspecified HIV disease, chronic kidney disease, liver failure unspecified	Co-trimoxazole, Cephalosporin	Fluconazole	21.9	NA
6	44; M; MOZ	NA	Positive	8,290	Fever, headache, behavioral changes	Hypertensive encephalopathy, acute renal failure	None	No	4.4	No
7	43; M; MOZ	NA	Positive	21,100	Seizure, headache	Encephalitis, myelitis and encephalomyelitis, unspecified HIV disease	Cephalosporin	No	0.4	Yes
8	25; M; MOZ	NA	Positive	>1,000**	Fever, dyspnea, diarrhea, headache, abdominal pain, melena	Severe and complicated <i>Plasmodium falciparum</i> malaria, gastroenteritis and colitis of infectious and unspecified origin	Cephalosporin, quinolone, metronidazole, albendazole	No	0.3	NA
9	35; F; MOZ	No	Positive	18,500	Fever, headache, visual hallucinations, incoherent speech	<b>Cerebral cryptococcosis</b> , unspecified HIV disease	Co-trimoxazole, cephalosporin	Amphotericin B	3.2	No
10	21; F; MOZ	Yes	Positive	>100**	Dyspnea	Pneumocystosis, fetal death of unspecified cause, anemia unspecified, unspecified HIV disease, pre-eclampsia	Co-trimoxazole, cephalosporin, metronidazole	No	0.9	NA
11	34; F; MOZ	Yes	Positive	>10,000**	Fever, dyspnea, vomiting, headache	<b>Cryptococcal meningitis</b> , unspecified HIV disease, severe acute respiratory syndrome, unspecified hypoglycaemia	Co-trimoxazole, cephalosporin	Amphotericin B	2.8	NA
12	31; F; MOZ	Yes	Positive	>10,000**	Dyspnea, uterine bleeding	Pulmonary edema, unspecified HIV disease; other complications of labor and delivery	Data not available	No	0.0	Yes

Continued

Case	Age (in years), sex and origin	Maternal death	HIV Serology	HIV Viral load (copies/mL)	Main symptoms	Pre-mortem Clinical Diagnoses*	Antimicrobial treatment received during illness	Antifungal treatment	Time from admission to death (days)	ART
13	28; M; BRA	NA	Positive	263	Dyspnea, diarrhea, vomiting, abdominal pain	Unspecified HIV disease, pulmonary tuberculosis confirmed by sputum microscopy with or without culture, other gastroenteritis and colitis of infectious and unspecified origin, sepsis, unspecified	Quinolones, metronidazole, meropenem	No	5.9	Yes
14	32; M; BRA	NA	Positive	NT	Vomiting, headache	Unspecified HIV disease, <b>cerebral cryptococcosis</b>	Macrolides, co-trimoxazole	No	12.7	No
15	43; M; BRA	NA	Positive	1,020	Diarrhea, vomiting, headache, asthenia	Unspecified HIV disease, pulmonary tuberculosis, confirmed by unspecified means, <b>cerebral cryptococcosis</b> , gastrointestinal hemorrhage, unspecified	None	Fluconazole	4.7	No
16	38; M; BRA	NA	Positive	574,000	Headache	Unspecified HIV disease, <b>cerebral cryptococcosis</b> , pneumonia unspecified, respiratory failure unspecified	Macrolides, quinolones, co-trimoxazole	No	15.6	NA
17	34; M; BRA	NA	Positive	17,800	Diarrhea, vomiting, abdominal pain	Unspecified HIV disease, pneumonia unspecified, <b>cerebral cryptococcosis</b> , acidosis	Macrolides	Amphotericin B	4.1	No

**Table 1.** Clinical characteristics and management of fatal cryptococcal infections. Clinical diagnoses are listed in the order of differential diagnoses included in the clinical charts. Cryptococcosis is identified in bold, when considered in the list of diagnoses. \*As written in the clinical charts by clinicians in charge of patients; M: male; F: female; MOZ: Maputo-Mozambique; BRA: Manaus-Brazil; ART: antiretroviral therapy; NA: not applicable. \*\*The precise quantification was not possible due to the presence of PCR inhibitors in the plasma, which inhibited the amplification of the internal control of the assay. A minimal viral load was inferred from samples with quantifiable viral loads showing a similar cycle threshold for HIV-1 in the PCR assay; NT: not tested due to insufficient amount of sample.

(*Mycobacterium tuberculosis*, cytomegalovirus, esophageal candidiasis, *Toxoplasma gondii*, and *Histoplasma capsulatum*) were detected in five cases.

**Cryptococcus strain characterization.** Eight strains were isolated by culture, seven from the CSF and one from the blood. The molecular characterization and antifungal susceptibility of the cryptococcal strains isolated are shown in Table 3. All *C. neoformans* var. *grubii* corresponded to the VNI molecular type, whereas two different genotypes, VGI and VGIV, were identified in the two *C. gattii* isolates. Sero-mating type A $\alpha$  was found in all the *C. neoformans* isolates. B $\alpha$  and C $\alpha$  strains were found among the *C. gattii* strains.

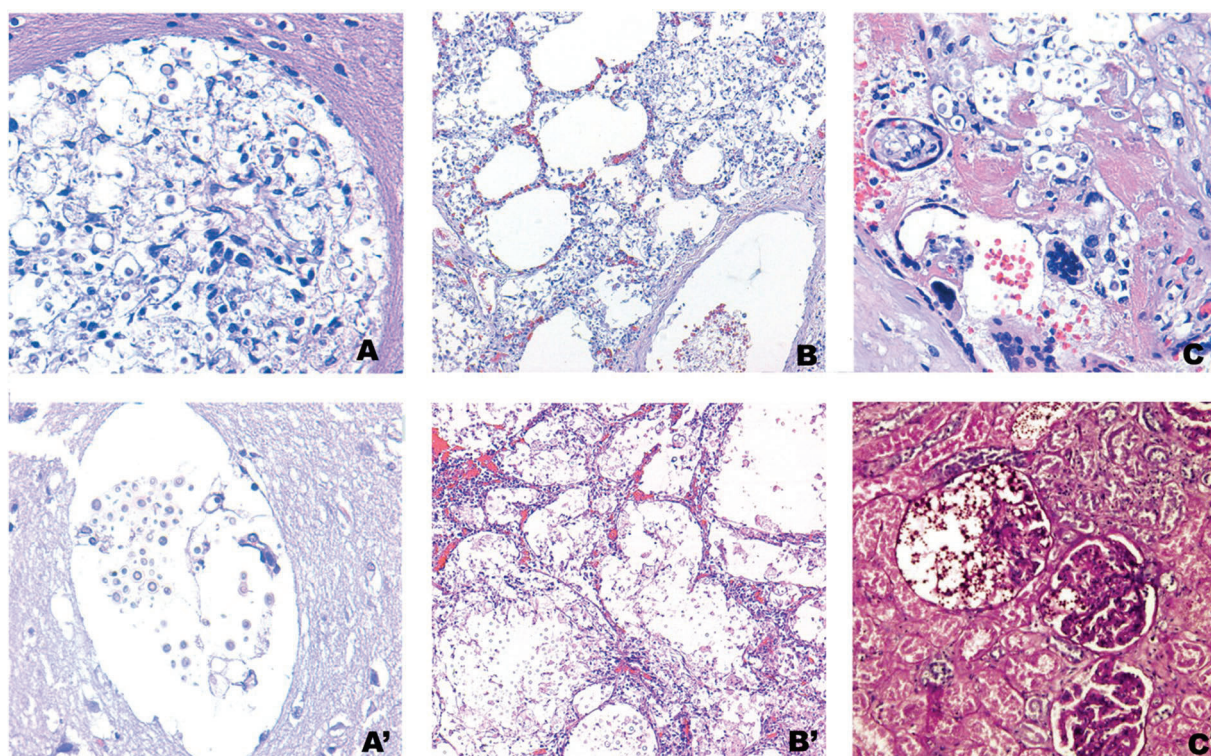
Minimum inhibitory concentrations (MICs) of a variety of antifungal agents were determined (Table 3). All triazole antifungal agents (fluconazole, voriconazole, itraconazole and posaconazole) had MICs less than or equal to the defined epidemiological cut-off values (ECVs)<sup>26</sup>. One isolate showed a MIC to flucytosine (16  $\mu$ g/mL), one dilution higher than the ECV (8  $\mu$ g/mL). Although all the isolates presented a MIC  $\leq$  1  $\mu$ g/mL to amphotericin, the MICs of three *C. neoformans* molecular type VNI (1  $\mu$ g/mL) and two *C. gattii* (1  $\mu$ g/mL) were one dilution higher than the defined ECVs (0.5  $\mu$ g/mL)<sup>27</sup>.

## Discussion

In a large series of nearly 300 autopsies, we performed a thorough histopathological and microbiological analysis of 17 fatal cryptococcal infections, 12 from Mozambique and five from Brazil. Several studies on cryptococcal infection have been carried out in Brazil<sup>14,28</sup>, but there are no data from Mozambique. Indeed, despite being a highly endemic area for HIV, a literature search was unable to find reports describing the burden of this pathogen in this country. Thus, to our knowledge, this is the largest autopsy-based description of fatal cryptococcal infections in Mozambique. Interestingly, albeit being Maputo and Manaus two sites from different countries in terms of climate and income, some of the results obtained were very similar, such as the HIV prevalence in deceased

Case	Cause of death (cryptococcal species)	Other diagnosis/findings	Plasma (PCR Ct value/ CrAg titer)	CSF (PCR Ct value/ CrAg titer)	CNS (PAS/ PCR Ct value)	Lung Right (PAS/PCR Ct value)	Lung Left (PAS/PCR Ct value)	Bone marrow (PAS/PCR Ct value)	Liver (PAS/ PCR Ct value)	Spleen (PAS/ PCR Ct value)	Uterus (PAS/ PCR Ct value)	Kidney ** (PAS)
1	Cryptococcal meningoenkephalitis ( <i>C. gattii</i> )	Not relevant	TND / $\geq$ 1:2560	34.6 / $\geq$ 1:2560	Positive/31.6	Negative/TND	Negative/TND	Negative/TND	Negative/TND	Negative/TND	NA	Negative
2	Cryptococcal meningoenkephalitis ( <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> )	Splenic tuberculosis, esophageal candidiasis	TND / $\geq$ 1:2560	26.2 / $\geq$ 1:2560	Positive/35.7	Negative/TND	Negative/32.9	Negative/TND	Negative/32.2	Negative/32.9	Negative/36.9	Negative
3	Cryptococcal disseminated disease ( <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> )	Focal cerebral hemorrhages	34.5 / $\geq$ 1:2560	27.0 / $\geq$ 1:2560	Positive/31.0	Positive/27.4	Positive/26.7	Positive/27.7	Positive/30.0	Positive/29.8	Positive/NT	Positive
4	Cryptococcal disseminated disease ( <i>C. gattii</i> )	Past malaria	TND / $\geq$ 1:2560	26.3 / $\geq$ 1:2560	Positive/31.3	Positive/30.6	Positive/TND	Negative/TND	Negative/TND	Negative/TND	NA	Negative
5	Cryptococcal disseminated disease ( <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> )	Not relevant	TND / $\geq$ 1:2560	32.9 / $\geq$ 1:2560	Positive/36.2	Positive/30.0	Positive/31.6	Positive/36.6	Positive/29.4	Positive/34.3	NT/TND	Positive
6	Cryptococcal disseminated disease ( <i>C. gattii</i> )	Ischemic cerebrovascular disease, hypertrophic heart, hepatitis	TND / $\geq$ 1:2560	TND/NT	Positive/33.1	Positive/28.7	Positive/30.8	Negative/TND	Negative/31.5	Negative/32.6	NA	Negative
7	Cryptococcal disseminated disease ( <i>C. gattii</i> )	Not relevant	NT	29.0/1:160	Positive/34.4	Positive/33.9	Positive/31.6	Negative/37.5	Negative/31.4	Positive/30.5	NA	Negative
8	Cryptococcal disseminated disease ( <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> )	Not relevant	30.8 / $\geq$ 1:2560	30.0 / $\geq$ 1:2560	Positive/29.1	Positive/23.4	Positive/24.3	Positive/25.7	Positive/31.8	Positive/22.4	NA	Positive
9	Cryptococcal meningoenkephalitis ( <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> )	Not relevant	TND / $\geq$ 1:2560	23.3 / $\geq$ 1:2560	Positive/33.5	Positive/29.9	Positive/31.0	Positive/36.1	Negative/29.7	Positive/29.3	NA	Negative
10	Cryptococcal disseminated disease ( <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> )	Not relevant	30.5 / $\geq$ 1:2560	25.9 / $\geq$ 1:2560	Positive/24.1	Positive/33.2	Positive/31.0	Positive/29.9	Positive/27.6	Positive/27.4	Positive/28.2	Positive
11	Cryptococcal disseminated disease ( <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> )	Not relevant	30.3 / $\geq$ 1:2560	31.1 / $\geq$ 1:2560	Positive/30.8	Positive/27.1	Positive/27.6	Positive/34.8	Positive/30.0	Positive/29.2	NT*/28.5	Positive
12	Cryptococcal disseminated disease ( <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> )	Esophageal candidiasis	35.1 / $\geq$ 1:2560	TND/1:40	Positive/31.8	Positive/29.7	Positive/29.0	Positive/29.9	Positive/31.0	Positive/28.0	Negative/29.5	Positive
13	Cryptococcal disseminated disease ( <i>C. gattii</i> )	Tuberculosis	29.9/1:320	NT	Positive/34.6	Positive/28.6	Positive/24.7	Negative/TND	Negative/TND	Negative/31.1	NA	Negative
14	Cryptococcal disseminated disease ( <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> )	Not relevant	NT / $\geq$ 1:2560	NT / $\geq$ 1:2560	Positive/22.1	Positive/33.7	Positive/26.6	Negative/33.2	Negative/32.2	Positive/28.9	NA	Positive
15	Cryptococcal disseminated disease ( <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> )	Sepsis due to <i>Streptococcus pneumoniae</i>	32.0 / $\geq$ 1:2560	29.2 / $\geq$ 1:2560	Positive/31.6	Positive/28.8	Positive/27.6	Positive/28.9	Positive/TND	Positive/26.4	NA	Positive
16	Cryptococcal meningitis ( <i>Cryptococcus</i> spp.)	Pneumonia (CMV)	TND /1:1280	TND/NT	Positive/31.5	Negative/TND	Negative/30.9	Negative/TND	Negative/TND	Negative/TND	NA	Negative
17	Cryptococcal meningitis ( <i>Cryptococcus</i> spp.)	Pulmonary histoplasmosis, Toxoplasmosis	TND / $\geq$ 1:2560	31.5/1:1280	Positive/29.7	Negative/TND	Negative/TND	Negative/TND	Negative/TND	Negative/TND	NA	Negative

**Table 2.** Causes of death, histopathological and microbiological findings. CNS: Central Nervous system; CSF: cerebrospinal fluid; CoD: cause of death; TND: Target Not Detected; NT: not tested due to insufficient amount of sample; NA: Not applicable; PAS: Periodic acid–Schiff staining; \*PAS positive in placental tissue; PCR: Cycle threshold of a specific real time PCR for *Cryptococcus* is indicated; \*\*no kidney samples for PCR testing were collected.



**Figure 1.** Cryptococcal disseminated infections: (A) *Cryptococcus neoformans* infecting the central nervous system (hematoxylin and eosin, 400×). (A') *Cryptococcus gattii* infecting the central nervous system (hematoxylin and eosin, 400×); abundant capsulated yeasts growing extensively in the perivascular spaces, which become cystically dilated; virtually no inflammatory reaction is seen. (B) *Cryptococcus neoformans* infecting the lung (hematoxylin and eosin, 100×); (B') *Cryptococcus gattii* infecting the lung (hematoxylin and eosin, 100×); abundant capsulated yeasts growing extensively in the alveolar spaces; scant inflammatory reaction is seen. (C) *Cryptococcus neoformans* infecting the placenta (hematoxylin and eosin, 400×); (C') *Cryptococcus neoformans* infecting the kidney (Periodic Acid Schiff (PAS) Stain, 100×).

Study number	Sample	Species	Molecular type	Sero-Mating type	Minimum inhibitory concentration (µg/mL)					
					Amphotericin B	Fluconazole	Voriconazole	Itraconazole	Posaconazole	Flucytosine
2	CSF	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VNI	A α	1	8	0.12	0.12	0.25	8
3	CSF	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VNI	A α	1	4	0.06	0.03	0.06	4
4	CSF	<i>Cryptococcus gattii</i>	VGI	B α	1	4	0.12	0.03	0.06	1
7	Blood	<i>Cryptococcus gattii</i>	VGIV	C α	1	16	0.25	0.06	0.06	4
8	CSF	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VNI	A α	1	4	0.06	0.06	0.06	4
9	CSF	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VNI	A α	0.5	8	0.06	0.03	0.06	16
10	CSF	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>Grubii</i>	VNI	A α	1	8	0.06	0.03	0.12	4
11	CSF	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>Grubii</i>	VNI	A α	0.5	8	0.06	0.06	0.12	4

**Table 3.** Molecular characterization and antifungal susceptibility of isolated cryptococcal strains. CSF: cerebrospinal fluid.

patients (over 60%) and the *Cryptococcus* associated mortality in HIV positive patients. In this study *Cryptococcus* was responsible for 10% of the deaths among HIV-infected patients. This figure is in agreement with current estimates of 15% of AIDS-related deaths due to CM<sup>4</sup>. Although treatment with ART has led to an important reduction in the mortality of HIV-infected patients in sub-Saharan Africa, at present, cryptococcal-related death seems to remain similar to 2008 estimates. In agreement with other autopsy series, HIV-associated cryptococcosis is frequently presented as a disseminated infection<sup>14,28</sup>. Other studies have reported that up to one half of cryptococcal

infections are detected in HIV-infected patients receiving ART<sup>29</sup>. In our series, only a quarter of the HIV-positive cases (4/16) were under ART. Unfortunately, the duration of ART was only available in one case. This case had a 6-year history of ART and a high viral load, and therefore, likely represents a treatment failure or defaulted. Other explanations for cryptococcal infection in patients receiving adequate ART include recent treatment initiation in patients with very low CD4 counts (late HIV diagnosis) and cases of immune reconstitution inflammatory syndrome<sup>30</sup>, which might also have been present in our series. Despite progress in ART deployment in sub-Saharan Africa, close to 50% of HIV-infected patients continue presenting to health facilities with advanced HIV disease<sup>31</sup>, thereby being at high risk of cryptococcal infection and death. In this regard, the CrAg can be detected up to three weeks before the onset of CM symptoms<sup>32</sup> and therefore, screening of asymptomatic HIV patients followed by preemptive antifungal treatment might identify patients at risk of developing the disease and contribute to reducing CM-related mortality<sup>33,34</sup>. In the present study, most cases died within the first week of hospital admission, which is in contrast with other series reporting a mean of two weeks between admission and death<sup>35</sup>. Several factors might have contributed to the rapid fatal outcome in our series. Firstly, the low frequency of clinical suspicion of cryptococcosis may explain the absence of prescribed antifungal treatment in more than half of the patients. On the other hand, some patients may have presented to the hospital with advanced severe stages of cryptococcal infection, considering that seven died within three days of admission (four within 24 hours). The longest hospital admission involved a child who died of *C. gattii* meningitis about two months after hospital admission. *C. gattii* infections are rare in children, and as in the child in this series, the infection often occurs in previously healthy children and presents with CNS involvement<sup>9</sup>. The little knowledge available about *C. gattii* in sub-Saharan Africa has been obtained from studies performed in South Africa. Interestingly, in our study four out of the 12 cryptococcal infections (25%) from Mozambique were due to *C. gattii* infections. Although the numbers are small and should be interpreted with caution, these data contrast with previous findings from South Africa, where *C. gattii* represented only 2.4% of the cryptococcal strains isolated over a two-year period<sup>36</sup>. *C. gattii* infections have mainly been reported in immunocompetent hosts, until studies from South Africa revealed that it affects immunocompromised patients as well<sup>37,38</sup>. It has been reported that the VGI *C. gattii* molecular type is much more likely to affect immunocompetent patients than VGIV<sup>9</sup>. However, both genotypes were detected in HIV-infected patients in our study. All strains of *C. neoformans* var. *grubii* were molecular type VNI and possessed the sero-mating type A $\alpha$ , similar to most of the strains described in South Africa. To our knowledge, this is the first report of *C. gattii* in Mozambique, and the B $\alpha$  and C $\alpha$  types detected have been previously reported in South Africa<sup>39,40</sup>. Although no clinical breakpoints are available for *Cryptococcus*, antifungal susceptibility testing did not suggest clear resistance patterns, with only MICs one dilution above the ECV being found.

A few isolated autopsy reports of fatal *C. gattii* infections in immunocompetent patients have been reported<sup>41</sup>, which may be explained by the fact that the distinction between *C. gattii* and *C. neoformans* was not performed in many studies. Although the numbers are small, dissemination of the infection seems to be less intense in HIV-infected patients with *C. gattii* compared to *C. neoformans*. Larger studies are needed to better assess the histopathological features of *C. gattii* in HIV-infected patients. Moreover, studies based on post-mortem examinations should be performed to better assess the mortality attributable to specific pathogens in low- and middle-income countries. Accurate mortality data can then impact public health policies, for example, guiding prophylactic and treatment schemes for infectious diseases.

In conclusion, our study highlights the substantial mortality associated with cryptococcal infections among HIV-infected patients, supporting current recommendations<sup>42</sup> of CrAg screening and preemptive therapy, which is even more relevant in settings in which insufficient pre-mortem clinical suspicion is given to this highly prevalent and life-threatening opportunistic infection.

**Ethics approval and consent to participate.** The study protocol received approval of the National Mozambican Ethics Committee (ref.342/CNBS/13) and the Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona (Spain; approved, File 2013/8677). MIA and CDA procedures were only conducted after verbal informed consent was provided by the relatives.

### Data Availability

All relevant data are within the paper. Any additional data use and transfer is monitored by ISGlobal's Data Management and Biostatistics Unit (contact e-mail: ubioesdm@isglobal.org).

### References

- Jarvis, J. N. *et al.* Adult meningitis in a setting of high HIV and TB prevalence: findings from 4961 suspected cases. *BMC Infect. Dis.* **10**, 67, <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-67> (2010).
- Siddiqi, O. K. *et al.* Molecular Diagnosis of Central Nervous System Opportunistic Infections in HIV-Infected Zambian Adults. *Clin. Infect. Dis.* **58**, 1771–1777 (2014).
- Park, B. J. *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids.* **23**, 525–530 (2009).
- Rajasingham, R. *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: An updated analysis. *Lancet Infect. Dis.* **17**, 873–881 (2017).
- Fact sheet | UNAIDS. Available at, <http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/2014/2014gapreport/factsheet/>. Accessed 9 August (2017).
- Bielska, E. & May, R. C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? *FEMS Yeast Res.* <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov106> (2015).
- May, R. C., Stone, N. R., Wiesner, D. L., Bicanic, T. & Nielsen, K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat Rev Microbiol.* **14**, 106–117 (2016).
- Herkert, P. F. *et al.* Ecoepidemiology of *Cryptococcus gattii* in Developing Countries. *J Fungi (Basel)*, <https://doi.org/10.3390/jof3040062> (2017)
- Chen, S. C. A., Meyer, W. & Sorrell, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 980–1024 (2014).

10. Lockhart, S. R., McCotter, O. Z. & Chiller, T. M. Emerging Fungal Infections in the Pacific Northwest: The Unrecognized Burden and Geographic Range of *Cryptococcus gattii* and *Coccidioides immitis*. *Microbiol Spectr.* **4**, 375–384 (2016).
11. Byrnes, E. J. *et al.* Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS Pathog.* <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000850> (2010).
12. Markowitz, G. S., Concepcion, L., Factor, S. M. & Borczuk, A. C. Autopsy patterns of disease among subgroups of an inner-city Bronx AIDS population. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **13**, 48–54 (1996).
13. Lee, S. C., Dickson, D. W. & Casadevall, A. Pathology of cryptococcal meningoencephalitis: Analysis of 27 patients with pathogenetic implications. *Hum. Pathol.* **27**, 839–847 (1996).
14. Torres, R. G. *et al.* Cryptococcosis in acquired immunodeficiency syndrome patients clinically confirmed and/or diagnosed at necropsy in a teaching hospital in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **95**, 781–785 (2016).
15. Health OW. The WHO application of ICD-10 to deaths during pregnancy, childbirth and the puerperium: ICD-MM. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **129**, 30–33 (2015).
16. Castillo, P. *et al.* Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in adults in mozambique: an observational study. *PLoS Med.* <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002171> (2016).
17. Bassat, Q. *et al.* Validity of a minimally invasive autopsy tool for cause of death determination in pediatric deaths in Mozambique: An observational study. *PLoS Med.* <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002317> (2017).
18. Castillo, P. *et al.* Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in maternal deaths in Mozambique: An observational study. *PLoS Med.* <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002431> (2017).
19. Castillo, P. *et al.* Pathological Methods Applied to the Investigation of Causes of Death in Developing Countries: Minimally Invasive Autopsy Approach. *PLoS One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132057> (2015).
20. Martínez, M. J. *et al.* Infectious cause of death determination using minimally invasive autopsies in developing countries. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **84**, 80–6 (2016).
21. Gago, S. *et al.* A multiplex real-time PCR assay for identification of *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* in samples from AIDS patients with opportunistic pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 1168–1176 (2014).
22. McTaggart, L. *et al.* Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans*, and *C. gattii* by use of rapid biochemical tests, differential media, and DNA sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2522–2527 (2011).
23. Meyer, W. *et al.* onsenus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med. Mycol.* **47**, 561–570 (2009).
24. Esposto, M. C., Cogliati, M., Tortorano, A. M. & Viviani, M. A. Determination of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* mating type by multiplex PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 1092–1094 (2004).
25. Cogliati, M., D'Amicis, R. & Tortorano, A. M. *Cryptococcus gattii* sero-mating type allelic pattern determined by multiplex PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 190.e1–190.e4 (2015).
26. Espinel-Ingroff, A. *et al.* *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 5898–906 (2012).
27. Espinel-Ingroff, A. *et al.* *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 3107–13 (2012).
28. Klock, C., Cerski, M. & Goldani, L. Z. Histopathological aspects of neurocryptococcosis in HIV-infected patients: autopsy report of 45 patients. *Int. J. Surg. Pathol.* **17**, 444–8 (2009).
29. Rhein, J. *et al.* Efficacy of adjunctive sertraline for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: an open-label dose-ranging study. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 809–818 (2016).
30. Scriven, J. E., Lalloo, D. G. & Meintjes, G. Changing epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in sub-Saharan Africa. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 891–892 (2016).
31. IeDEA and ART Cohort Collaborations TI and cohort, A. *et al.* Immunodeficiency at the Hurtado, J. C. *et al.* Mortality due to *Cryptococcus* spp. in low-income settings start of combination antiretroviral therapy in low-, middle-, and high-income countries. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **65**, e8–16 (2014).
32. French, N. *et al.* Cryptococcal infection in a cohort of HIV-1-infected Ugandan adults. *Aids.* **16**, 1031–1038 (2002).
33. Meya, D. B. *et al.* Serum Cryptococcal Antigen (CRAG) Screening is a Cost- Effective Method to Prevent Death in HIV- infected persons with CD4  $\leq$  100/ $\mu$ L starting HIV therapy in Resource-Limited Settings. *Clin Infect Dis.* **51**, 448–455 (2011).
34. Vidal, J. E. & Boulware, D. R. Lateral Flow Assay for Cryptococcal Antigen: an Important Advance To Improve the Continuum of Hiv Care and Reduce Cryptococcal Meningitis-Related Mortality. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **57**, 38–45 (2015).
35. Jarvis, J. N. *et al.* Determinants of mortality in a combined cohort of 501 patients with HIV-associated cryptococcal meningitis: Implications for improving outcomes. *Clin. Infect. Dis.* **58**, 736–745 (2014).
36. Morgan, J. *et al.* *Cryptococcus gattii* infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002–2004. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1077–1080 (2006).
37. Karstaedt, A. S., Crewe-Brown, H. H. & Dromer, F. Cryptococcal meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, in AIDS patients in Soweto, South Africa. *Med. Mycol.* **40**, 7–11 (2002).
38. Litvintseva, A. P., Thakur, R., Reller, L. B. & Mitchell, T. G. Prevalence of Clinical Isolates of *Cryptococcus gattii* Serotype C among Patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. *J. Infect. Dis.* **192**, 888–892 (2005).
39. Van Wyk, M., Govender, N. P., Mitchell, T. G. & Litvintseva, A. P. Multilocus sequence typing of serially collected isolates of *cryptococcus* from HIV-infected patients in South Africa. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 1921–1931 (2014).
40. Miglia, K. J., Govender, N. P., Rossouw, J., Meiring, S. & Mitchell, T. G. Group for Enteric, Respiratory and Meningeal Disease Surveillance in South Africa. Analyses of pediatric isolates of *Cryptococcus neoformans* from South Africa. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 307–314 (2011).
41. Walraven, C. J. *et al.* Fatal disseminated *Cryptococcus gattii* infection in New Mexico. *PLoS One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028625> (2011).
42. Organization WH. Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children. Geneva World Heal. Organ.; Available at, <http://apps.who.int/iris/handle/10665/44786> (2011).

## Acknowledgements

We would like to thank the families of the deceased patients included in this study. The authors are grateful to all the members of the Department of Pathology of Maputo Central Hospital and Department of Pathology of Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Viera Dourado, whose support made this study possible, and to the staff of the *Centro de Investigação em Saúde de Manhiça* (CISM) for their logistic support. We specifically thank Mr. Bento Nhancale for his invaluable support to the study. We thank Dr. Sean Zhang (Mycology Laboratory, Department of Pathology, The Johns Hopkins University School of Medicine) for kindly providing the IGS sequences of the *Cryptococcus* reference strains and IMMY (OK, U.S.A) for providing the CrAg LFA

tests. We also thank the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group for Forensic and Postmortem Microbiology (ESGFOR) for valuable training and advice. The CaDMIA research project (Validation of the minimally invasive autopsy tool for cause of death investigation in developing countries) was funded by the Bill & Melinda Gates Foundation (Global Health grant numbers OPP1067522; QB) (<http://www.gatesfoundation.org/>) and by the Spanish Instituto de Salud Carlos III (FIS, PI12/00757; CM) (<https://portalfis.isciii.es>). Data analysis has been supported by the CaDMIA plus research project, funded by the Bill & Melinda Gates Foundation (Global health grant numbers OPP1128001; JO) (<http://www.gatesfoundation.org>) and the Spanish Instituto de Salud Carlos III (Acciones CIBER; CM) (<http://www.ciberisciii.es/>). This study was partially supported by the Agència de gestió Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) - Departament d'Empresa i Coneixement. Generalitat de Catalunya [2017 SGR 794 to M.J.M.]. ISGlobal is a member of the CERCA Programme, Generalitat de Catalunya (<http://cerca.cat/en/suma/>). CISM is supported by the Government of Mozambique and the Spanish Agency for International Development (AECID). No funding bodies had any role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Author Contributions

J.C.H., P.C., Q.B., E.L., C.M., J.O. and M.J.M. wrote the main manuscript text. C.C., F.F., D.J., L.L., M.R.I., C.L., A.C. and I.M. provided the data from Mozambique. A.M.P., M.L., W.M. and L.F. provided the data from Brazil. J.C.H., P.C., M.N., I.C., L.Q., F.M., L.M., S.J., A.S., E.L., Q.B., C.M., J.O. and M.J.M. provided the data from Spain. C.C., L.F., A.S., I.M., J.V., Q.B., C.M., J.O. and M.J.M. supervised research activity. All authors reviewed the manuscript.

### Additional Information

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

## Artículo 4

**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS RELACIONADOS:** Hipótesis 1.4 y Objetivo 5

**AUTORES:** García-Basteiro AL\*, Hurtado JC\*, Castillo P, Fernandes F, Navarro M, Lovane L, Casas I, Quintó L, Jordao D, Ismail MR, Lorenzoni C, Carrilho C, Sanz A, Rakislova N, Mira A, Alvarez-Martínez MJ, Cossa A, Cobelens F, Mandomando I, Vila J, Bassat Q, Menéndez C, Ordi J, Martínez MJ.

\*Ambos autores han contribuido de idéntica manera al trabajo y ambos deben ser considerados como primer autor del mismo.

**TÍTULO:** Unmasking the hidden tuberculosis mortality burden in a large postmortem study in Maputo Central Hospital, Mozambique.

**REVISTA, VOLUMEN (NÚMERO): PÁGINAS, FECHA DE PUBLICACIÓN:** *European Respiratory Journal*, 54 (3):1900312. Published 2019 Oct 1.

**DOI:** 10.1183/13993003.00312-2019

**FACTOR DE IMPACTO:** 12.339

**CUARTIL (JCR):** Q1 (Respiratory System)





# Unmasking the hidden tuberculosis mortality burden in a large *post mortem* study in Maputo Central Hospital, Mozambique

Alberto L. Garcia-Basteiro<sup>1,2,3,13</sup>, Juan Carlos Hurtado<sup>1b2,4,13</sup>, Paola Castillo<sup>1b2,5,13</sup>, Fabiola Fernandes<sup>6</sup>, Mireia Navarro<sup>4</sup>, Lucilia Lovane<sup>6</sup>, Isaac Casas<sup>4</sup>, Llorenç Quintó<sup>2</sup>, Dercio Jordao<sup>6</sup>, Mamudo R. Ismail<sup>6</sup>, Cesaltina Lorenzoni<sup>6,7</sup>, Carla Carrilho<sup>6</sup>, Ariadna Sanz<sup>1b2</sup>, Natalia Rakislova<sup>2,5</sup>, Aurea Mira<sup>8</sup>, Miriam J. Alvarez-Martínez<sup>2,4</sup>, Anélsio Cossa<sup>1</sup>, Frank Cobelens<sup>3</sup>, Inácio Mandomando<sup>1,9</sup>, Jordi Vila<sup>2,4</sup>, Quique Bassat<sup>1,2,10,11,12,14</sup>, Clara Menendez<sup>1,2,12,14</sup>, Jaume Ordi<sup>2,5,14</sup> and Miguel J. Martínez<sup>2,4,14</sup>



@ERSpublications

**This study shows the usefulness of molecular assays in ascertaining TB diagnosis at death. It questions the information of clinical diagnoses obtained from hospital registries as a reliable tool for TB mortality estimation.** <http://bit.ly/2KrzTBj>

**Cite this article as:** Garcia-Basteiro AL, Hurtado JC, Castillo P, *et al.* Unmasking the hidden tuberculosis mortality burden in a large *post mortem* study in Maputo Central Hospital, Mozambique. *Eur Respir J* 2019; 54: 1900312 [<https://doi.org/10.1183/13993003.00312-2019>].

**ABSTRACT** Sensitive tools are needed to accurately establish the diagnosis of tuberculosis (TB) at death, especially in low-income countries. The objective of this study was to evaluate the burden of TB in a series of patients who died in a tertiary referral hospital in sub-Saharan Africa using an in-house real time PCR (TB-PCR) and the Xpert MTB/RIF Ultra (Xpert Ultra) assay.

Complete diagnostic autopsies were performed in a series of 223 deaths (56.5% being HIV-positive), including 54 children, 57 maternal deaths and 112 other adults occurring at the Maputo Central Hospital, Mozambique. TB-PCR was performed in all lung, cerebrospinal fluid and central nervous system samples in HIV-positive patients. All samples positive for TB-PCR or showing histological findings suggestive of TB were analysed with the Xpert Ultra assay.

TB was identified as the cause of death in 31 patients: three out of 54 (6%) children, five out of 57 (9%) maternal deaths and 23 out of 112 (21%) other adults. The sensitivity of the main clinical diagnosis to detect TB as the cause of death was 19.4% (95% CI 7.5–37.5) and the specificity was 97.4% (94.0–99.1) compared to autopsy findings. Concomitant TB (TB disease in a patient dying of other causes) was found in 31 additional cases. Xpert Ultra helped to identify 15 cases of concomitant TB. In 18 patients, *Mycobacterium tuberculosis* DNA was identified by TB-PCR and Xpert Ultra in the absence of histological TB lesions. Overall, 62 (27.8%) cases had TB disease at death and 80 (35.9%) had TB findings.

The use of highly sensitive, easy to perform molecular tests in complete diagnostic autopsies may contribute to identifying TB cases at death that would have otherwise been missed. Routine use of these tools in certain diagnostic algorithms for hospitalised patients needs to be considered. Clinical diagnosis showed poor sensitivity for the diagnosis of TB at death.

Received: 13 Feb 2019 | Accepted after revision: 17 June 2019

Copyright ©ERS 2019. This version is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Licence 4.0.

## Introduction

Tuberculosis (TB) remains a major public health concern in most countries of the world. In 2017, the World Health Organization (WHO) estimated that ~10 million new cases and 1.6 million deaths attributable to TB [1]. As a single cause of death (CoD), TB is the main infectious killer at a global level. In addition, it is the most frequent cause of HIV-associated deaths [2], and ranks among the principal CoD among females of reproductive age [3–5]. Similar to other countries in the region, the HIV and TB epidemic in Mozambique is devastating [1, 6]. The estimated national incidence rate of TB in 2017 was 551 per 100 000 inhabitants with a case fatality ratio of 31% (~49 000 deaths in 2017) and HIV co-infection rate of 40% among new TB cases [1].

Accurate and reliable TB mortality data are fundamental to improve patient management, prioritise public health interventions and assess progress in the WHO End TB strategy indicators [7]. Despite the enormous TB burden, there is considerable uncertainty as to the actual mortality attributable to this disease, especially in some low-income countries with high disease burden [8]. Mortality estimates based on case fatality rates reported by national TB programmes are of low quality [9]. Clinical diagnosis and verbal autopsies have limited sensitivity and specificity for diagnosing TB as the CoD compared to complete diagnostic autopsy (CDA), the current gold standard [2, 9–13]. Studies assessing clinicopathological discrepancies have shown a high degree of misclassification when assigning deaths to TB in either direction (clinically missed TB causing death and false attribution of TB as the CoD when not present) [10, 11].

Additionally, most of the TB disease identified in CDA studies is considered to be responsible for the death of the patients [2]. The diagnosis of TB disease in these studies is based on obvious macroscopic disease, confirmed microscopically by the presence of granulomas with Ziehl–Neelsen stain-positive bacilli. However, it is likely that earlier forms of TB, in which pathological findings might not be that obvious, are missed. When there are other plausible causes of death and concomitant TB disease, the exact role that TB might have played in the chain of events leading to death may not be clear. This can be especially true in immunocompromised HIV-positive patients [14].

As part of a large post-mortem study conducted at a tertiary referral hospital in Mozambique [15–18], two molecular tests were used to diagnose TB, an in-house real-time PCR and the Xpert MTB/RIF Ultra assay (Xpert Ultra). The study had two main objectives: 1) to describe the overall burden of TB as the CoD and as a concomitant finding (TB disease identified at death, but not directly causing death) and 2) to assess the proportion of clinically missed TB cases.

## Methods

### Study design

This was an ancillary study to a prospective observational *post mortem* evaluation aimed at validating minimally invasive autopsy for CoD determination in different age groups compared with CDA, the gold standard technique [19]. This study included childhood ( $\geq 1$  month to 15 years), adult and maternal deaths (the latter defined as deaths among females while pregnant or within 42 days of termination of pregnancy) [20]. Traumatic deaths were excluded. The study was conducted from November 2013 to March 2015 at the Department of Pathology of the Maputo Central Hospital (Mozambique), a 1500-bed government-funded tertiary healthcare centre, in collaboration with the departments of paediatrics, internal medicine and obstetrics and gynaecology. Prior informed consent was obtained from the relatives of the deceased. The study received approval from the clinical research ethics committee of the Hospital Clinic of Barcelona (Spain; file 2013/8677) and the National Bioethics Committee of Mozambique (Mozambique; ref. 342/CNBS/13).

---

**Affiliations:** <sup>1</sup>Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM), Maputo, Mozambique. <sup>2</sup>ISGlobal, Hospital Clínic – Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Amsterdam Institute for Global Health and Development, Amsterdam University Medical Centers, Amsterdam, The Netherlands. <sup>4</sup>Dept of Microbiology, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>5</sup>Dept of Pathology, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>6</sup>Dept of Pathology, Faculty of Medicine/Eduardo Mondlane University and Maputo Central Hospital, Maputo, Mozambique. <sup>7</sup>Ministry of Health – National Cancer Control Programme, Mozambique. <sup>8</sup>Biomedical Diagnostic Centre (CDB), Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>9</sup>Instituto Nacional de Saúde (INS), Ministério da Saúde, Maputo, Mozambique. <sup>10</sup>ICREA, Catalan Institution for Research and Advanced Studies, Barcelona, Spain. <sup>11</sup>Pediatric Infectious Diseases Unit, Pediatrics Dept, Hospital Sant Joan de Déu (University of Barcelona), Barcelona, Spain. <sup>12</sup>Consorcio de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain. <sup>13</sup>Contributed equally to this work and share primary authorship. <sup>14</sup>Contributed equally to this work and share senior authorship.

**Correspondence:** Miguel J. Martínez, Dept of Microbiology, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Spain, Barcelona Institute for Global Health, Spain. E-mail: myoldi@clinic.cat

The pathological and microbiological methods of the CDA procedures have been described elsewhere [21, 22]. Samples were obtained from all organs for histological and microbiological analysis. Samples for microbiological testing were collected in nucleic-acid preserving buffer (ATL lysis buffer; Qiagen, Hilden, Germany). Clinical information was collected from each patient using a standardised questionnaire after thorough revision of the entire medical record. The data obtained included demographic data, past medical history, as well as information about the inpatient admission process, signs and symptoms, physical examination, laboratory and imaging results when available and treatment received during hospitalisation. For maternal deaths, the obstetric history was reviewed in addition. Following analyses of the CDA samples, a panel composed of a pathologist, a microbiologist and a clinician (paediatrician, internist or gynaecologist, depending on the age group) evaluated the pathological and microbiological reports of the CDA and the clinical data and assigned the CDA diagnosis of CoD. The main results of this validation project have been published [15–18].

HIV status was confirmed *post mortem* by an automated method detecting antibodies against HIV (ADVIA Centaur HIV 1/0/2 Enhanced assay; Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA) and by viral load testing using the Cobas TaqMan HIV-1 test v2.0 (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA).

#### ***TB testing strategy and laboratory procedures***

The TB testing strategy of the study is summarised in figure 1. The initial microbiological diagnosis of TB was performed using an in-house real-time PCR targeting *Mycobacterium tuberculosis* (TB-PCR). TB-PCR was performed in all lung samples obtained at CDA, independently of the presence or absence of histological lesions, and in any other organ showing histological lesions suggestive of TB (granulomatous inflammatory reaction and/or caseous necrosis). In addition, in HIV-positive patients, TB was routinely tested by TB-PCR in all central nervous system and cerebrospinal fluid (CSF) samples (independently of the presence or absence of lesions). Histological testing for TB included Ziehl–Neelsen staining when TB was suspected on the haematoxylin and eosin-stained slides.

In addition, the Xpert MTB/RIF Ultra assay (hereafter Xpert Ultra) was performed in 1) any organ with histological lesions suggestive or compatible with TB and positive TB-PCR (cases with TB disease) and 2) in all deaths in which there was microbiological–histological discordance (histological lesions suggestive of TB with negative TB-PCR or positive TB-PCR without histological lesions suggestive of TB).

Tissue samples for Xpert Ultra were thawed and homogenised using a hand-held rotor-stator homogeniser (Qiagen) in ATL lysis buffer (Qiagen). 100 µL of the homogenised tissue sample was added to 300 µL of saline solution. The resulting 400 µL of sample were mixed with 1600 µL of Xpert Ultra Sample Reagent and then loaded into the cartridge. In house TB-PCR was performed using the procedures described by ESPASA *et al.* [23].

#### ***Definitions of TB associated findings***

“Histological lesions suggestive of TB” were defined as granulomatous inflammatory reactions with or without caseous necrosis, independently of the presence or absence of visible acid-fast bacilli on Ziehl–Neelsen staining. “Histological lesions compatible with TB” included nonspecific inflammatory reactions (such as neutrophilic inflammation) which have been described in TB [24].

“TB disease at death” included histological lesions suggestive of TB with a positive TB-PCR or a positive Xpert Ultra in any sample or when there were TB-compatible histological lesions and both TB-PCR and Xpert Ultra were positive. TB disease at death was further classified as “TB as CoD” when the review of the entire CDA (including histological, microbiological and clinical data) following a previously described algorithm of CoD determination, deemed TB to be the CoD [15], which corresponds to the “-a diagnosis” in the WHO international form of medical certificate of death [25]. A case was classified as “concomitant TB” when histological lesions compatible with TB were present at death, but the review of the CDA deemed another disease as the most likely CoD (“-b” or “-c” diagnoses or “other significant conditions” in the WHO international form of medical certificate of death). Finally, a case was classified as “*M. tuberculosis* DNA detection” when both TB-PCR and Xpert Ultra were positive in the absence of compatible histological findings. A single positive TB-PCR without any histological finding compatible with TB was considered a false-positive result, since sample contamination or a true false-positive result due to assay- or human-related performance could not be ruled out.

#### ***Statistical analysis***

All the clinical data and the results of the histopathological and microbiological examination of the samples were analysed using Stata 13 (StataCorp, College Station, TX, USA). We calculated the proportions of 1) cases in which TB was the CoD; 2) cases with concomitant TB; and 3) cases with

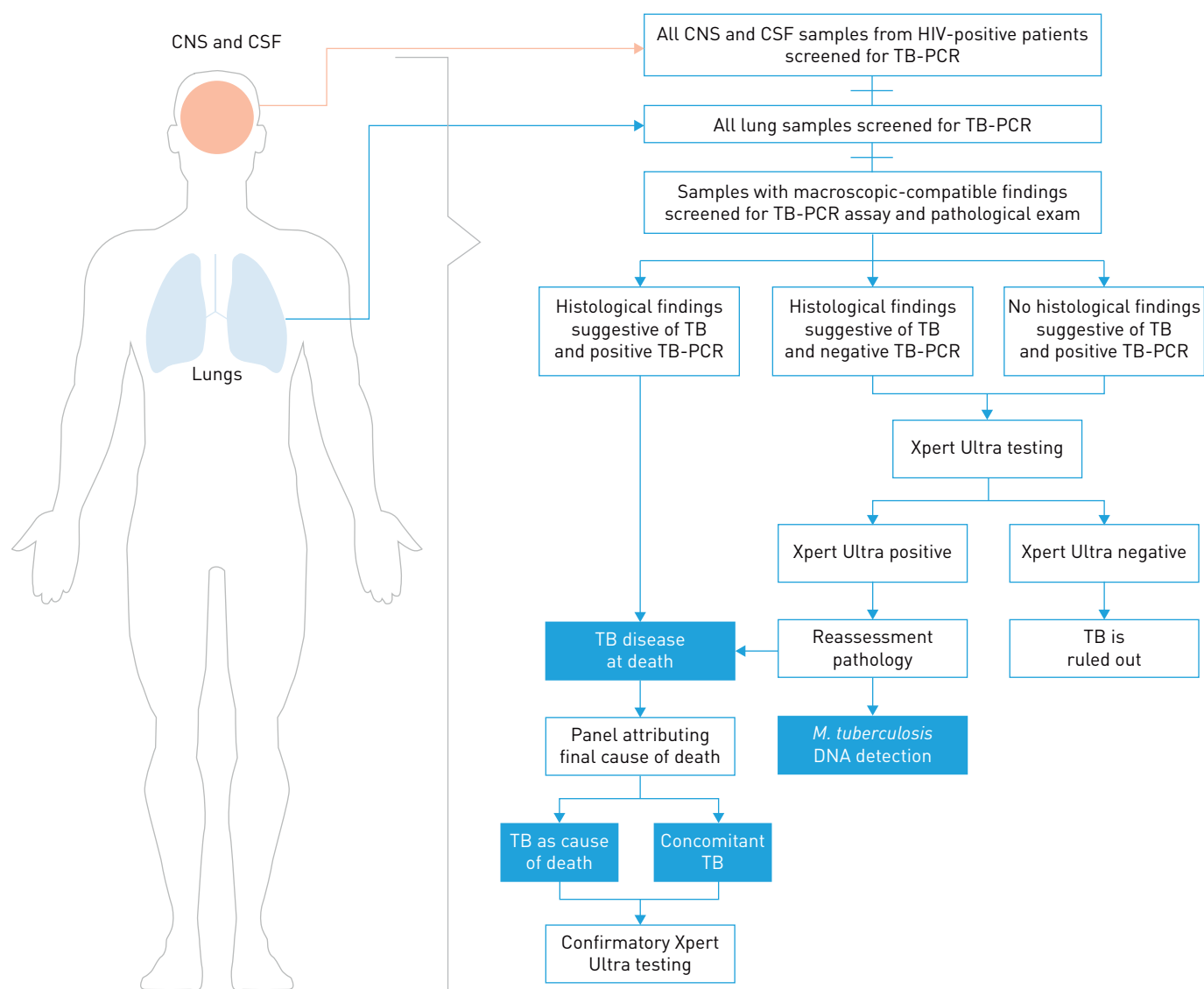


FIGURE 1 Algorithm for determination of tuberculosis (TB) diagnosis used in samples from complete diagnostic autopsies. CNS: central nervous system; CSF: cerebrospinal fluid; *M. tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*.

*M. tuberculosis* DNA. We estimated the sensitivity, specificity and predictive values of the clinical diagnoses to detect TB disease as the CoD (when the clinician specified TB as the main diagnosis as well as to detect concomitant TB (when the clinician specified TB among the diagnoses or initiated anti-TB treatment), using CDA diagnoses as the gold standard.

## Results

The analysis included 223 deaths: 54 children, 57 maternal deaths and 112 other adults. HIV infection was identified in 32.7% (17 out of 52), 65.2% (36 out of 57) and 63.2% (73 out of 112) of these deaths, respectively (56.5% of the overall series).

### TB-associated findings

TB was diagnosed as the CoD in 31 patients: three out of 54 children (5.6%, 95% CI 1.2–15.4%), five out of 57 maternal deaths (8.8%, 95% CI 2.9–19.3%) and 23 out of 112 other adults (20.5%, 95% CI 13.5–29.2%). Among HIV-positive cases, TB was identified as the CoD in none out of 17 children (0%), three out of 34 (8.8%, 95% CI 1.9–23.7%) maternal deaths and 18 out of 73 (24.6%, 95% CI 15.3–36.1%) other adults. The most frequent form of TB as the CoD was miliary TB (23 out of 31; 74.2%), followed by pulmonary TB (six out of 31; 19.4%) and TB meningitis (two out of 31; 6.5%) (table 1). Among the 31 patients who died of TB, Xpert Ultra tested positive in all lung samples and 14 CSF samples.

TABLE 1 Number of patients with tuberculosis (TB) disease as the cause of death (CoD), with concomitant TB disease and with *Mycobacterium tuberculosis* detection at death by study group and among HIV-positive cases.

	Autopsies	TB as CoD <sup>#</sup>	Concomitant TB <sup>¶</sup>	Total	<i>M. tuberculosis</i> DNA detection <sup>+</sup>	Total cases with TB findings <sup>§</sup>
<b>All autopsies</b>						
Children	54	3 (5.6)	8 (14.8)	11 (20.4)	3 (5.6)	14 (25.9)
Maternal deaths	57	5 (8.8)	5 (8.8)	10 (17.5)	5 (8.8)	15 (26.3)
Adults	112	23 (20.5)	18 (16.1)	41 (36.6)	10 (8.9)	51 (45.5)
Total	223	31 (13.9)	31 (13.9)	62 (27.8)	18 (8.1)	80 (35.9)
<b>Autopsies among HIV-positive cases</b>						
Children <sup>f</sup>	17	0 (0.0)	3 (17.6)	3 (17.6)	0 (0.0)	3 (17.6)
Maternal deaths	36	5 (13.9)	4 (11.1)	9 (25.0)	5 (13.9)	14 (38.9)
Adults	73	18 (24.7)	13 (17.8)	31 (42.5)	6 (8.2)	37 (50.7)
Total	126	23 (18.3)	20 (15.9)	43 (34.1)	11 (8.7)	54 (42.9)

Data are presented as n or n (%). #: HIV status of two cases could not be ascertained; ¶: when review of the entire complete diagnostic autopsy (CDA) (including histological, microbiological and clinical data) following a previously described algorithm of CoD determination deemed TB to be the CoD. This definition required the presence of histological TB-compatible lesions and microbiological confirmation of TB by molecular assays; +: when histological lesions compatible with TB were present at death, but review of the CDA deemed another disease to be the most likely cause. This definition required the presence of histological TB-compatible lesions and microbiological confirmation of TB by molecular assays; §: attributed when both TB-PCR and Xpert Ultra were positive in the absence of compatible histological findings; f: all cases in which TB disease was found at death (as the cause of death or as a concomitant finding) and cases in which only *M. tuberculosis* DNA were detected.

Concomitant TB was identified in 31 additional patients: eight out of 54 (14.8%) children, 18 out of 112 (13.9%) adults and five out of 57 (8.8%) maternal deaths. Of these, 22 had pulmonary TB, five disseminated TB (more than one organ involved) and four had extrapulmonary TB involving a single organ (one case with splenic TB, three with TB meningitis). Table 2 and figure 2 show the CoD of the cases with concomitant TB. Initially, 15 out of 31 (48.4%) cases of concomitant TB disease did not have histological lesions suggestive of TB. Only after Xpert Ultra results were available (which prompted further histological review) were the histological findings deemed as TB compatible lesions (mostly inflammatory lesions).

18 additional cases fulfilled the definition of *M. tuberculosis* DNA detection: three out of 54 (5.6%) children, five out of 57 (8.8%) maternal deaths and 10 out of 112 (8.9%) adults. Of these cases, six died of an infectious cause and 12 of non-infectious conditions. Of the 18 cases in which only *M. tuberculosis* DNA was detected, six (33.3%) were HIV-positive, and one (5.6%) had a history of past TB.

Overall, TB findings were confirmed in 80 cases: 14 out of 54 (25.9%) children, 15 out of 57 (26.3%) maternal deaths and 51 out of 112 (45.5%) other adults. Among HIV-positive patients, TB was confirmed in three out of 17 (17.6%), 14 out of 36 (38.9%) and 37 out of 74 (50.7%) of patients in each study group, respectively (table 1). Rifampicin resistance was detected by Xpert Ultra in eight cases.

#### Clinical characteristics of patients with TB findings

A clinical history of TB was reported in none of the children, in two (3.5%) maternal deaths and in 16 (14.3%) adults. 20 out of 31 (64.5%) patients with TB as the CoD had reported cough compared to nine out of 31 (29%) among those with concomitant TB at death ( $p=0.005$ ). Among patients with TB findings, eight cases were on anti-TB treatment prior to admission, and in 10 cases anti-TB treatment was initiated during admission. No differences were observed in terms of fever at admission, between patients with TB as the CoD and those with concomitant TB (17 out of 31 (55%) versus 19 out of 31 (61%),  $p=0.6$ ). The characteristics of cases with TB disease as the CoD, with concomitant TB, with *M. tuberculosis* DNA detection and those without any TB finding are shown in table 3.

#### Clinicopathological discrepancies

Assuming that the first (main) clinical diagnosis was the CoD for clinicians, they had considered TB disease as the CoD in 11 of the 223 patients (4.9%). However, the clinical diagnosis of TB as the CoD was correct in only six patients (figure 2). Thus, the main clinical diagnosis had a sensitivity to detect TB disease as CoD of 19.4% (six out of 31, 95% CI 7.5–37.5%) and a specificity of 97.4% (95% CI 94.0–99.1%) (table 4). Among the six cases in which clinicians correctly specified TB as the main clinical diagnosis, complete agreement with the form or localisation was only confirmed in two cases of

TABLE 2 Main cause of death of patients with concomitant tuberculosis (TB)

	Group	HIV status	CDA A diagnosis	Infectious agent identified	Type of TB (organs affected)
1	Children	Negative	Rabies	Rabies virus	Pulmonary
2	Children	Negative	Peritonitis	Unspecified	Pulmonary
3	Children	Negative	Malignant brain tumour		Pulmonary
4	Children	Positive	Sepsis	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pulmonary
5	Children	Negative	Meningoencephalitis	<i>Cryptococcus gattii</i>	Extrapulmonary (CNS)
6	Children	Positive	Meningitis	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pulmonary
7	Children	Positive	Pneumocystosis	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Extrapulmonary (CNS)
8	Children	Negative	Sepsis	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pulmonary
9	Maternal deaths	Positive	Meningoencephalitis	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Extrapulmonary (spleen)
10	Maternal deaths	Positive	Septic abortion	<i>Mycoplasma hominis</i>	Pulmonary (miliary, both lungs)
11	Maternal deaths	Positive	Encephalitis	Unspecified	Pulmonary
12	Maternal deaths	Positive	Puerperal sepsis		Pulmonary
13	Maternal deaths	Negative	Pneumonia	Unspecified	Pulmonary
14	Other adults	negative	Mucormycosis	<i>Rhizopus oryzae</i>	Extrapulmonary (CNS)
15	Other adults	Positive	Diffuse large B-cell lymphoma		Pulmonary
16	Other adults	Positive	Intracerebral haemorrhage		Pulmonary
17	Other adults	Positive	Sepsis	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Pulmonary
18	Other adults	Positive	Pneumonia	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Disseminated (liver lung)
19	Other adults	Positive	Diffuse large B-cell lymphoma		Pulmonary
20	Other adults	Negative	Meningitis	Herpes simplex virus type 1	Pulmonary
21	Other adults	Positive	Sepsis	<i>Escherichia coli</i>	Pulmonary
22	Other adults	Negative	Sepsis	<i>Candida glabrata</i>	Pulmonary
23	Other adults	Positive	Disseminated Kaposi's sarcoma	Human herpesvirus 8	Pulmonary
24	Other adults	Negative	Sepsis	<i>Enterobacter</i> spp.	Pulmonary
25	Other adults	Positive	Pneumonia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Disseminated (lung, CNS)
26	Other adults	Positive	Toxoplasmosis	<i>Toxoplasma gondii</i>	Disseminated (lung, liver, spleen)
27	Other adults	Negative	Cardiac arrest		Pulmonary
28	Other adults	Positive	Toxoplasmosis	<i>Toxoplasma gondii</i>	Pulmonary
29	Other adults	Positive	Sepsis	<i>Legionella pneumophila</i>	Disseminated (spleen, lung)
30	Other adults	Positive	Meningitis	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Disseminated (lung, CNS)
31	Other adults	Positive	Pneumonia	Unspecified	Pulmonary

n=31. CDA: complete diagnostic autopsy; CNS: central nervous system.

pulmonary TB. Four patients showing miliary TB in the CDA were diagnosed as pulmonary TB or TB meningitis (n=3 and n=1, respectively).

Clinicians specified tuberculosis as one of the diagnoses at death (or initiated TB treatment) in 36 cases. However, only 20 cases were correctly diagnosed. The sensitivity of the clinical diagnosis (including decision to treat TB) for diagnosing TB disease at death (regardless of whether it was the CoD or concomitant TB) was 32.3% (20 out of 62, 95% CI 20.9–45.3%) with a specificity of 90.1% (95% CI 84.1–94.2%). Thus, TB disease at death remained undiagnosed in 67.7% (42 out of 62) of cases. By study group, the sensitivity of any clinical diagnosis to detect TB disease at death was 27.3% (three out of 11) in children, 24.4% (10 out of 41) in adults and 10.0% (two out of 10) in maternal deaths (table 4).

### Discussion

This study, which is part of one of the largest autopsy studies conducted in sub-Saharan Africa, demonstrates the enormous burden of TB among children and adults, including maternal deaths, dying in a reference hospital in Mozambique. An even higher burden was found among HIV-positive adults and maternal cases, in whom the proportion of TB findings rose up to 51% and 39%, respectively. Importantly, it also shows alarming proportions of TB disease missed by clinicians and highlights the limitations of clinical diagnosis for ascertaining TB in resource-constrained settings. In addition, the use of molecular assays (this is the first time Xpert Ultra has been used in a *post mortem* study) allowed *M. tuberculosis* to be detected in 8% (18 out of 223) of patients in whom no histological changes were identified, possibly reflecting early forms of TB. This indicates that the total burden of TB at death might be even higher than what has been reported in clinical and epidemiological and even in many autopsy studies.

A high burden of TB has also been found in some autopsy studies in the countries neighbouring Mozambique, within the context of high HIV and TB burden. In Zambia, 65% of deaths in hospitalised

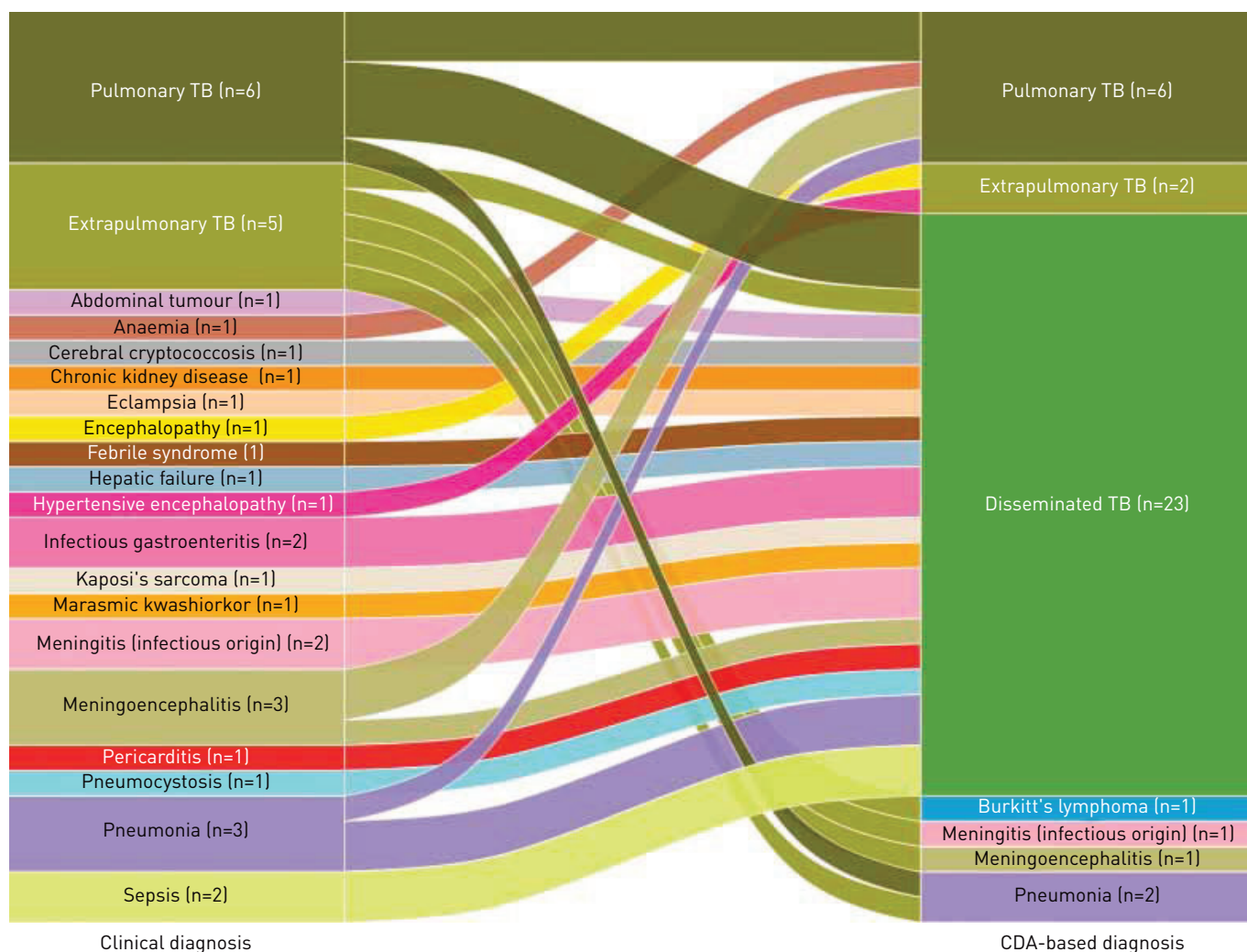


FIGURE 2 Alluvial diagram showing cause of death (CoD) as assigned in the complete diagnostic autopsy (CDA) and per clinical diagnosis whenever a tuberculosis (TB) diagnosis was involved. The right column shows all the TB diagnoses (as CoD) in CDA ( $n=31$ ) as well as the associated CDA diagnoses when clinicians assigned TB as the CoD ( $n=5$ ). The left column shows the clinical diagnoses of CoD when TB was specified by clinicians as well as the associated clinical diagnosis when the results of the CDA assigned TB as the CoD.

patients aged >16 years (81% HIV-positive) were due to TB, and in Kwazulu Natal, South Africa, 50% of adult inpatient deaths aged 20–45 years had culture-confirmed TB (96% HIV-positive) [10, 26]. A meta-analysis of autopsy studies showed that the prevalence of TB among HIV-positive adult deaths in sub-Saharan Africa was 43.2% (95% CI 38.0–48.3%) [2]. We found a slightly lower percentage of cases in which TB was the CoD, perhaps because of different HIV treatment status, or because in some cases TB findings were not deemed as the most likely CoD. In fact, in their meta-analysis GUPTA *et al.* [2] reported that in 91.4% (95% CI 85.8–97.0%) of cases in which TB was present at death it was also the primary CoD. Interestingly, we found that TB was the CoD in 50% of cases in which TB disease was present at death. This considerable proportion of TB disease not causing death can largely be explained by the additional cases with concomitant TB that were captured by a detailed pathological evaluation and the use of TB-PCR and Xpert Ultra in the diagnostic algorithm, and which might have been missed in other studies using traditional diagnostic tools.

Additionally, in 18 cases with no histological evidence of TB, *M. tuberculosis* DNA was detected by two different molecular methods. These findings make the classification of this form of TB especially difficult, since the *post mortem* diagnosis of TB is not based on the diagnostic criteria used in living patients (sputum sample, presence of symptoms or chest radiography). It is unlikely that these findings correspond to contamination in the autopsy room, since disposable materials are used in each autopsy and the time that the tissue samples are exposed to potential airborne contamination is limited. Neither is it likely that these are false-positive cases, since DNA was detected by two different assays with different molecular

TABLE 3 Characteristics of cases in whom the cause of death was tuberculosis (TB), with concomitant TB disease at death and with *Mycobacterium tuberculosis* detection without histological evidence of TB

	TB as cause of death	Concomitant TB	<i>M. tuberculosis</i> DNA detection	Others (no TB findings)	Total
<b>Subjects</b>	31	31	18	143	223
<b>Sex</b>					
Male	13 (41.9)	20 (64.5)	7 (38.9)	55 (38.5)	95 (42.6)
Female	18 (58.1)	11 (35.5)	11 (61.1)	88 (61.5)	128 (57.4)
<b>Study group</b>					
Children	3 (9.7)	8 (25.8)	3 (16.7)	40 (28.0)	54 (24.2)
Maternal deaths	5 (16.1)	5 (16.1)	5 (27.8)	42 (29.4)	57 (25.6)
Adults	23 (74.2)	18 (58.1)	10 (55.6)	61 (42.7)	112 (50.2)
<b>HIV status<sup>#</sup></b>					
Positive	23 (76.7) <sup>#</sup>	20 (64.5)	6 (35.3) <sup>#</sup>	71 (49.7)	95 (43.0)
Negative	7 (23.3) <sup>#</sup>	11 (35.5)	11 (64.7) <sup>#</sup>	72 (50.3)	126 (57.0)
<b>History of TB</b>					
Yes	6 (19.4)	4 (12.9)	1 (5.6)	7 (4.9)	18 (8.1)
No	25 (80.6)	27 (87.1)	17 (94.4)	136 (95.1)	105 (91.9)
<b>On anti-TB treatment prior to admission</b>					
Yes	4 (13.3) <sup>*</sup>	4 (12.9)	0 (0.0) <sup>*</sup>	6 (4.4) <sup>*</sup>	14 (6.4)
No	26 (86.7) <sup>*</sup>	27 (87.1)	17 (100) <sup>*</sup>	136 (95.6) <sup>*</sup>	206 (93.6)
<b>Reported fever at admission<sup>¶</sup></b>					
Yes	17 (54.8)	19 (61.3)	7 (38.9)	49 (35.5) <sup>¶</sup>	92 (42.2)
No	14 (45.2)	12 (38.7)	11 (61.1)	89 (64.5) <sup>¶</sup>	126 (57.8)
<b>Reported cough at admission<sup>¶</sup></b>					
Yes	20 (64.5)	9 (29.0)	2 (11.1)	28 (20.3) <sup>¶</sup>	59 (27.1)
No	11 (35.5)	22 (71.0)	16 (88.9)	110 (79.7) <sup>¶</sup>	159 (72.9)

Data are presented as n or n (%). <sup>#</sup>: HIV status could not be ascertained in two cases (one in the group who died of TB, and the other among those with *M. tuberculosis* detection; <sup>¶</sup>: fever or cough was not recorded in five cases. *M. tuberculosis* detection included patients in whom *M. tuberculosis* DNA was detected without histological evidence of TB; <sup>\*</sup>: information was not available in three cases.

targets. These findings may represent cases of incipient TB in which small histological lesions might be present but missed, since not all the tissue from all the organs was sampled for histological analysis [27]. However, these *M. tuberculosis* DNA findings may also represent the increasingly controversial concept of latent TB infection. Although it has been postulated that TB infection cannot be detected through direct diagnostic methods [28], it has been suggested that it might be detected through detailed molecular studies in cases without histological evidence [29]. It has also been suggested that there could be periods in the so-called latency or unstable infection period during which *M. tuberculosis* replicates at a higher rate, but this replication remains self-controlled [14]. The present study suggests and supports the idea of the existence of a spectrum of TB disease, ranging from early forms of TB in which few bacilli are present (that might not necessarily develop into TB disease) to the traditional patent TB lesions (figure 3).

Clinical misclassification of TB was very frequent. In >80% of TB identified as the CoD in CDA, the clinicians failed to identify TB as the event leading to death, and overall 67% of cases with TB disease at death were missed by the clinicians. Conversely, in 45% of the cases clinicians incorrectly established TB as the main cause of death or the presence of TB disease at death. The clinicopathological discrepancies of

TABLE 4 Diagnostic performance of clinical diagnosis to determine cause of death, concomitant tuberculosis (TB) and TB disease at death (TB as cause of death + concomitant TB)

	TB as cause of death	Concomitant TB	TB disease at death
<b>Sensitivity</b>	19.4 (7.5–37.5)	19.4 (7.5–37.5)	32.3 (18.0–49.8)
<b>Specificity</b>	97.4 (94.0–99.1)	90.1 (85.0–93.9)	90.1 (87.0–95.4)
<b>PPV</b>	54.5 (23.4–83.3)	24 (9.4–45.1)	55.6 (25.5–64.7)
<b>NPV</b>	88.2 (83.1–92.2)	87.4 (81.9–91.7)	77.5 (81.7–91.6)

Data are presented as % (95% CI). PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

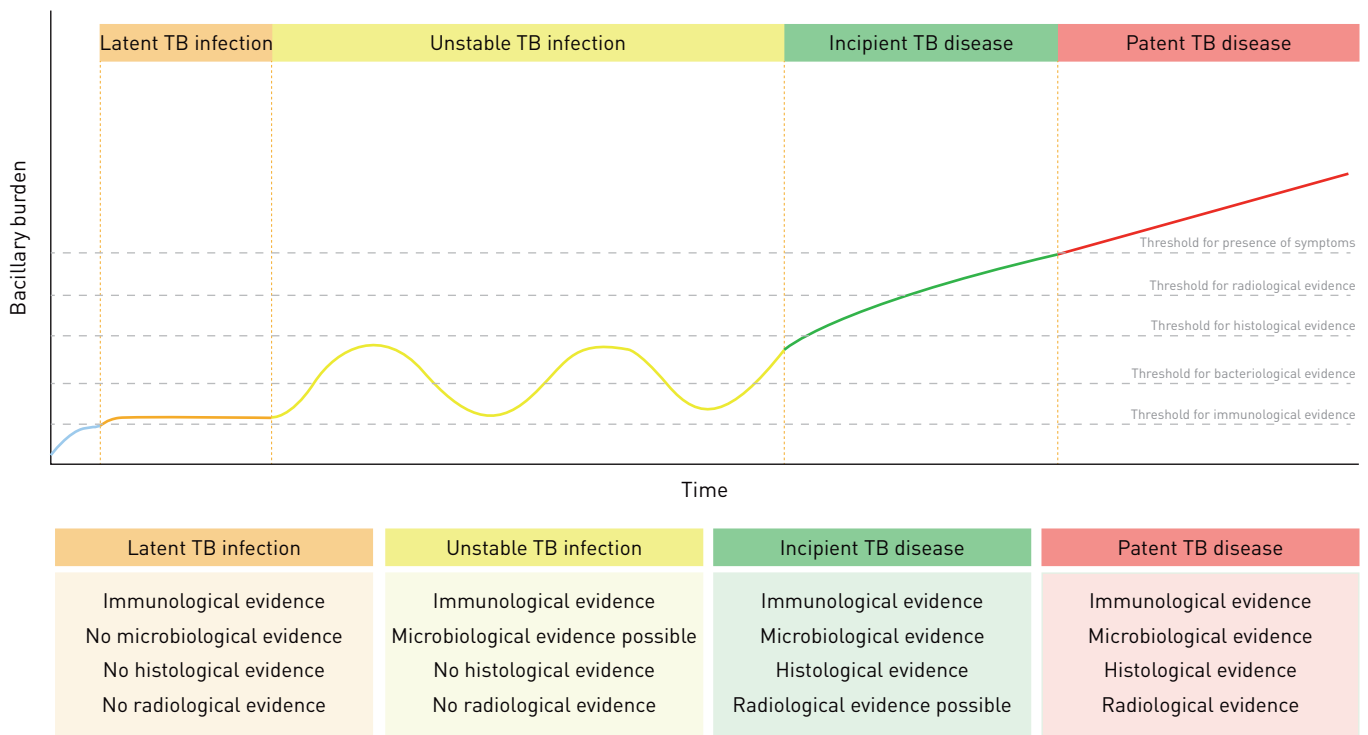


FIGURE 3 Natural history of the tuberculosis (TB) model depending on bacillary burden and the likelihood of having immunological, microbiological, histological or radiological evidence at the time of death. Adapted from a model described by ESMAIL *et al.* [14].

TB disease at death have been reported previously and have implications for patient management as well as for estimating TB mortality burden [9, 10]. Clinical diagnosis is not a good proxy of mortality by TB, and contrarily to what it was expected, it was poor in both HIV-positive and HIV-negative cases with TB disease. Thus, it is likely that the results of verbal autopsies are similarly bad or even worse as a tool to quantify TB mortality [12, 13, 30]. Nonetheless, more studies comparing verbal autopsies with CDA are needed in order to demonstrate their usefulness as a tool for assessing TB mortality burden. It was of note that out of the 36 cases with TB findings in whom clinicians specified TB as a clinical diagnosis, only 18 were started on anti-TB treatment (prior to or during admission). Possible reasons for this may be that when the patient died, clinicians might have reconsidered the potential diagnoses of the patient and then added TB, or that patients might have been too ill or died very early during admission, thus anti-TB treatment was not initiated. Poor reporting of anti-TB treatment initiation cannot be discarded.

Our study has several limitations. First, our conclusions can only be generalised to hospitalised patients of settings with similar epidemiological characteristics and do not necessarily represent the contribution of TB to all population-based mortality in Maputo or Mozambique. The likelihood of being hospitalised depends on access to healthcare, health infrastructure, severity of disease determined by healthcare workers and severity perceived by patients and relatives, among other sociological and behavioural factors. Likewise, diagnostic discrepancies might occur less frequently in larger hospitals, thus, those found in this study (carried out at the main reference hospital of the country) might underestimate the number of clinicopathological discrepancies in general Mozambican health facilities. Second, as mentioned previously, all the organ samples were analysed histologically, but not all in their entirety, thus some cases of concomitant TB might have been missed. Third, TB culture was not contemplated in the study design, and this method could have helped to better characterise the microbiological findings. Likewise, the use of Xpert Ultra as a screening tool in all cases could have determined a higher number of confirmed cases and allowed estimation of the added yield of the use of this highly sensitive technology. Last, the quality of the clinical information may have been suboptimal in some cases of hospitalised patients with severe disease status, and their degree of consciousness might have caused information bias in some of the results. Thus, despite comprehensive evaluation of all the clinical records available, some relevant information about the medical history might have been missed by patients or relatives.

In conclusion, we found a high burden of TB disease at death (as CoD and as concomitant disease) in all groups studied. The use of highly sensitive molecular tests in CDA helped to identify cases of TB disease

at death that would have otherwise been missed. Indeed, the results demonstrate that in our setting, clinical diagnoses miss most of the TB disease which is detected in CDA. In addition, Xpert Ultra may have the potential to identify earlier forms of TB, before histological lesions are evident, or potentially, unstable latent TB infection.

**Acknowledgements:** We would like to thank the families of the deceased patients included in this study. The authors are grateful to all the members of the Dept of Pathology of Maputo Central Hospital, whose support made this study possible, and also to the staff of the Centro de Investigação em Saúde de Manhica (CISM) for their logistic support. We specifically thank Bento Nhancale (CISM) for his invaluable support to the study. We thank Cepheid for providing the Xpert Ultra cartridges used in the study.

**Support statement:** The CaDMIA research project (Validation of the minimally invasive autopsy tool for cause of death investigation in developing countries) was funded by the Bill and Melinda Gates Foundation (global health grant numbers OPP1067522; Q. Bassat) ([www.gatesfoundation.org/](http://www.gatesfoundation.org/)) and by the Spanish Instituto de Salud Carlos III (FIS, PI12/00757; C. Menendez) (<https://portalfis.isciii.es>). Data analysis was supported by the CaDMIA plus research project, funded by the Bill and Melinda Gates Foundation (global health grant numbers OPP1128001; J. Ordi) ([www.gatesfoundation.org/](http://www.gatesfoundation.org/)) and the Spanish Instituto de Salud Carlos III (Acciones CIBER; C. Menendez) ([www.ciberisciii.es/](http://www.ciberisciii.es/)). ISGlobal is a member of the CERCA Programme, Generalitat de Catalunya (<http://cerca.cat/en/suma/>). No funding bodies had any role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. This study was also partially supported by grant 2017 SGR 794 from the Agència de gestió Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) – Departament d'Empresa i Coneixement, Generalitat de Catalunya. Funding information for this article has been deposited with the Crossref Funder Registry.

**Conflict of interest:** None declared.

## References

- 1 World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2018. WHO, Geneva, 2018.
- 2 Gupta RK, Lucas SB, Fielding KL, *et al*. Prevalence of tuberculosis in post-mortem studies of HIV-infected adults and children in resource-limited settings. *AIDS* 2015; 29: 1987–2002.
- 3 Sugarman J, Colvin C, Moran AC, *et al*. Tuberculosis in pregnancy: an estimate of the global burden of disease. *Lancet Glob Health* 2014; 2: e710–e716.
- 4 World Health Organization. 2013. Date last accessed: December 4, 2017. [www.who.int/tb/publications/tb\\_women\\_factsheet.pdf?ua=1](http://www.who.int/tb/publications/tb_women_factsheet.pdf?ua=1).
- 5 Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Compare. Seattle, WA, IHME, University of Washington, 2016. <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>. Date last accessed: June 20, 2018.
- 6 García-Basteiro AL, López-Varela E, Respeito D, *et al*. High tuberculosis burden among people living with HIV in southern Mozambique. *Eur Respir J* 2015; 45: 547–549.
- 7 Uplekar M, Weil D, Lonnroth K, *et al*. WHO's new End TB Strategy. *Lancet* 2015; 385: 1799–1801.
- 8 García-Basteiro AL, Brew J, Williams B, *et al*. What is the true tuberculosis mortality burden? Differences in estimates by the World Health Organization and the Global Burden of Disease study. *Int J Epidemiol* 2018; 47: 1549–1560.
- 9 Korenromp EL, Bierrenbach AL, Williams BG, *et al*. The measurement and estimation of tuberculosis mortality. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 283–303.
- 10 Bates M, Mudenda V, Shibemba A, *et al*. Burden of tuberculosis at post mortem in inpatients at a tertiary referral centre in sub-Saharan Africa: a prospective descriptive autopsy study. *Lancet Infect Dis* 2015; 15: 544–551.
- 11 Ordi J, Ismail MR, Carrilho C, *et al*. Clinico-pathological discrepancies in the diagnosis of causes of maternal death in sub-Saharan Africa: retrospective analysis. *PLoS Med* 2009; 6: e1000036.
- 12 Maraba N, Karat AS, McCarthy K, *et al*. Verbal autopsy-assigned causes of death among adults being investigated for TB in South Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2016; 110: 510–516.
- 13 Murithi S, Sitienei J, Mitchell E, *et al*. TB mortality measurement: comparing verbal autopsy methods to necropsy in a setting of high HIV prevalence in Siaya County, Kenya. The 46th Union World Conference on Lung Health. 2015. SOA-625-06.
- 14 Esmail H, Barry CE, Young DB, *et al*. The ongoing challenge of latent tuberculosis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2014; 369: 20130437.
- 15 Castillo P, Martínez MJ, Ussene E, *et al*. Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in adults in Mozambique: an observational study. *PLoS Med* 2016; 13: e1002171.
- 16 Bassat Q, Castillo P, Martínez MJ, *et al*. Validity of a minimally invasive autopsy tool for cause of death determination in pediatric deaths in Mozambique: an observational study. *PLoS Med* 2017; 14: e1002317.
- 17 Menendez C, Castillo P, Martínez MJ, *et al*. Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in stillborn babies and neonates in Mozambique: an observational study. *PLoS Med* 2017; 14: e1002318.
- 18 Castillo P, Hurtado JC, Martínez MJ, *et al*. Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in maternal deaths in Mozambique: an observational study. *PLoS Med* 2017; 14: e1002431.
- 19 Bassat Q, Ordi J, Vila J, *et al*. Development of a post-mortem procedure to reduce the uncertainty regarding causes of death in developing countries. *Lancet Glob Health* 2013; 1: e125–e126.
- 20 World Health Organization. Maternal Mortality in 2000. Geneva, 2004. [www.who.int/healthinfo/statistics/indmaternalmortality/en/](http://www.who.int/healthinfo/statistics/indmaternalmortality/en/)
- 21 Castillo P, Ussene E, Ismail MR, *et al*. Pathological methods applied to the investigation of causes of death in developing countries: minimally invasive autopsy approach. *PLoS One* 2015; 10: e0132057.
- 22 Martínez MJ, Massora S, Mandomando I, *et al*. Infectious cause of death determination using minimally invasive autopsies in developing countries. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 84: 80–86.

- 23 Espasa M, González-Martín J, Alcaide F, *et al.* Direct detection in clinical samples of multiple gene mutations causing resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampicin using fluorogenic probes. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 860–865.
- 24 Diedrich CR, O’Hern J, Wilkinson RJ. HIV-1 and the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma: a systematic review and meta-analysis. *Tuberculosis* 2016; 98: 62–76.
- 25 World Health Organization (WHO). Medical Certification of Cause of Death, 4th Edn. WHO, Geneva, 1979. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/40557/1/9241560622.pdf>
- 26 Cohen T, Murray M, Wallengren K, *et al.* The prevalence and drug sensitivity of tuberculosis among patients dying in hospital in KwaZulu-Natal, South Africa: a postmortem study. *PLoS Med* 2010; 7: e1000296.
- 27 Kik S V, Schumacher S, Cirillo DM, *et al.* An evaluation framework for new tests that predict progression from tuberculosis infection to clinical disease. *Eur Respir J* 2018; 52: 1800946.
- 28 Getahun H, Matteelli A, Chaisson RE, *et al.* Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *N Engl J Med* 2015; 372: 2127–2135.
- 29 Hernández-Pando R, Jeyanathan M, Mengistu G, *et al.* Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet* 2000; 356: 2133–2138.
- 30 Karat AS, Tlali M, Fielding KL, *et al.* Measuring mortality due to HIV-associated tuberculosis among adults in South Africa: comparing verbal autopsy, minimally-invasive autopsy, and research data. *PLoS One* 2017; 12: e0174097.



## Artículo 5

**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS RELACIONADOS:** Hipótesis 1.4 y Objetivo 6

**AUTORES:** García-Basteiro AL\*, Hurtado JC\*, Castillo P, Fernandes F, Navarro M, Lovane L, Casas I, Quintó L, Jordao D, Ismail MR, Lorenzoni C, Carrilho C, Sanz A, Rakislova N, Mira A, Alvarez-Martínez MJ, Cossa A, Cobelens F, Mandomando I, Vila J, Bassat Q, Menéndez C, Ordi J, Martínez MJ.

\*Ambos autores han contribuido de idéntica manera al trabajo y ambos deben ser considerados como primer autor del mismo.

**TÍTULO:** Performance of the Xpert MTB/RIF Ultra assay for determining cause of death by tuberculosis in tissue samples obtained by minimally invasive autopsies.

**REVISTA, VOLUMEN (NÚMERO): PÁGINAS, FECHA DE PUBLICACIÓN:** Chest. 2020; S0012-3692(20)31876-6.

**DOI:** 10.1016/j.chest.2020.06.071

**FACTOR DE IMPACTO:** 9.410

**CUARTIL (JCR):** Q1 (Respiratory system)



## Performance of the Xpert MTB/RIF Ultra Assay for Determining Cause of Death by TB in Tissue Samples Obtained by Minimally Invasive Autopsies



### To the Editor:

An estimated 1.5 million deaths were attributable to TB in 2018.<sup>1</sup> However, some uncertainty exists as to the exact global figures, given that approximately 30% of incident cases are not diagnosed, and because of the difficulties of ascertaining TB as cause of death (CoD).<sup>2</sup> Undoubtedly, complete diagnostic autopsies (CDAs) constitute the gold standard for establishing a diagnosis of TB at death. However, CDAs are seldom performed in high-TB-burden countries because of the scarcity of trained pathologists, the time-consuming nature of the

procedure, and the meager acceptability of the practice by relatives.<sup>3</sup>

In recent years, an alternative minimally invasive autopsy (MIA), a procedure well accepted by the next of kin, has been developed.<sup>4,5</sup> MIA can be conducted relatively rapidly with the use of biopsy needles for sampling key organs, which leave barely visible marks, which is thus more acceptable to relatives. This method has shown good sensitivity for diagnosing TB as CoD.<sup>6</sup> Nonetheless, MIA has thus far used standard histological and microbiological approaches for TB diagnosis (identification of granulomatous lesions, acid-fast bacilli smears, in-house polymerase chain reaction methods),<sup>7</sup> which remain time consuming, require specific expertise, and have limited sensitivity.

Thus, we evaluated the diagnostic accuracy of the molecular Xpert MTB/RIF Ultra (hereafter referred to as Xpert Ultra) assay in samples obtained by MIA to detect CoD by TB.

### Methods

This was an ancillary study to a large observational postmortem evaluation (CADMIA study) aimed at validating MIA against CDA for any CoD determination in different age groups in Maputo, Mozambique.<sup>3,5</sup> Both the CDA and MIA pathological and microbiological methods have been comprehensively described elsewhere.<sup>8,9</sup> In a previous analysis from CADMIA, TB-related lesions were extensively investigated in CDA samples.<sup>6</sup> Microbiological methods include acid-fast bacilli smear and two molecular tools: in-house real-time polymerase chain reaction and Xpert Ultra following a pre-specified algorithm.<sup>6</sup> CDA diagnosis was considered the gold standard for CoD determination in CADMIA.

For this specific analysis, we selected MIA samples from the lung, CNS, cerebrospinal fluid (CSF), and plasma from all the study cases with any TB finding (TB disease or *Mycobacterium TB* DNA detected in CDA samples). This analysis included a total of 117 patients. In 31 patients, TB was the final CoD, 31 cases had TB disease at death but had died of another CoD, and in 18 cases DNA of *M TB* was detected but no histological lesions compatible with TB were found.

In addition, we included a subset of 37 patients with no TB findings in the CDA and with availability of the four MIA samples.

MIA samples were collected in tubes containing 1 mL lysis buffer (ATL buffer, Qiagen), and stored and processed by Xpert Ultra. Lung and CNS tissue samples were processed as described previously,<sup>6,10</sup> and 0.5 mL plasma and CSF were mixed with the assay sample reagent buffer in a 1:3 ratio before testing.

We determined the performance of Xpert Ultra for each MIA sample and for combinations of samples. We also estimated the number needed to misdiagnose (NNM) as:  $NNM = \text{Total}/(\text{false positives} + \text{false negatives})$ . The NNM is the number of patients who need to be tested for one patient to be misdiagnosed. Because specific MIA samples were not available for some patients with TB findings, a sensitivity analysis of the performance of Xpert Ultra in MIA samples was conducted among cases in which all four MIA samples were available.

The Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona, Spain (Ref:2013/8677) and the National Bioethics Committee of Mozambique (Ref. 342/CNBS/13) approved this study.

### Results

Of the 117 cases included in this analysis, 14 patients (12.0%) were children, 85 (72.7%) were adults, and 18 (15.4%) were maternal deaths. Seventy-eight patients (67.8%) were HIV positive (HIV status could not be ascertained in two cases).

Table 1 shows the diagnostic performance of Xpert Ultra in different MIA samples and combinations of samples to diagnose TB as CoD. As a single organ, the highest sensitivity was observed in the lung (0.78; 95% CI, 0.58-0.91). The sensitivity of the test in plasma and CSF was high, being 0.68 (95% CI, 0.47-0.83) and 0.67 (95% CI,

**TABLE 1 ] Diagnostic Performance of Xpert Ultra in Different Minimally Invasive Autopsy Samples to Diagnose TB as the Cause of Death**

Sample/ Combination of Samples	No. True Positive	No. False Negative	No. False Positive	No. True Negative	Total Samples <sup>a</sup>	Sensitivity	95% CI		Specificity	95% CI		PPV	95% CI		NPV	95% CI		NNM
							Lower Limit	Upper Limit		Lower Limit	Upper Limit		Lower Limit	Upper Limit		Lower Limit	Upper Limit	
Lung	21	6	2	81	110	0.78	0.58	0.91	<b>0.98</b>	0.92	<b>1.00</b>	<b>0.91</b>	0.72	<b>0.99</b>	0.93	0.86	0.97	<b>13.8</b>
CNS	21	10	4	80	115	0.68	0.49	0.83	0.95	0.88	0.99	0.84	0.64	0.95	0.89	0.81	0.95	8.2
Plasma	20	10	2	80	112	0.67	0.47	0.83	<b>0.98</b>	<b>0.91</b>	<b>1.00</b>	<b>0.91</b>	<b>0.71</b>	<b>0.99</b>	0.89	0.81	0.95	9.3
CSF	15	16	3	80	114	0.48	0.30	0.67	0.96	0.90	0.99	0.83	0.59	0.96	0.83	0.74	0.90	6.0
Lung and CNS	23	4	5	77	109	<b>0.85</b>	<b>0.66</b>	<b>0.96</b>	0.94	0.86	0.98	0.82	0.63	0.94	<b>0.95</b>	<b>0.88</b>	<b>0.99</b>	12.1
Lung and plasma	21	6	4	75	106	0.78	0.58	0.91	0.95	0.88	0.99	0.84	0.64	0.95	0.93	0.85	0.97	10.6
Lung and CSF	22	5	4	76	107	0.81	0.62	0.94	0.95	0.88	0.99	0.85	0.65	0.96	0.94	0.86	0.98	11.9
CNS and plasma	23	7	5	75	110	0.77	0.58	0.90	0.94	0.86	0.98	0.82	0.63	0.94	0.91	0.83	0.96	9.2
CNS and CSF	23	8	6	75	112	0.74	0.55	0.88	0.93	0.85	0.97	0.79	0.60	0.92	0.90	0.82	0.96	8.0
Plasma and CSF	22	8	4	75	109	0.73	0.54	0.88	0.95	0.88	0.99	0.85	0.65	0.96	0.90	0.82	0.96	9.1
Lung, CNS, & plasma	23	4	6	72	105	0.85	0.66	0.96	0.92	0.84	0.97	0.79	0.60	0.92	0.95	0.87	0.99	10.5
Lung, CNS, & CSF	23	4	6	73	106	0.85	0.66	0.96	0.92	0.84	0.97	0.79	0.60	0.92	0.95	0.87	0.99	10.6
Lung, plasma, & CSF	22	5	5	71	103	0.81	0.62	0.94	0.93	0.85	0.98	0.81	0.62	0.94	0.93	0.85	0.98	10.3
CNS, plasma, & CSF	24	6	7	70	107	0.80	0.61	0.92	0.91	0.82	0.96	0.77	0.59	0.90	0.92	0.84	0.97	8.2

The diagnostic values of samples or combinations of samples that may represent a significant diagnostic advantage are highlighted in bold. CSF = cerebrospinal fluid; NNM = number needed to misdiagnose; NPV = negative predictive value; PPV = positive predictive value.

<sup>a</sup>Some MIA samples were not tested by Xpert Ultra in some cases because of lack of remaining tissue in the biobank.

**TABLE 2 ] Diagnostic Performance of Xpert Ultra in Different Minimally Invasive Autopsy Samples to Diagnose TB as the Cause of Death (Includes Only Cases in Which the Four Samples Were Available: Lung, CNS, Plasma, and CSF)**

Sample/ Combination of Samples	No. True Positive	No. False Negative	No. False Positive	No. True Negative	Total Samples	Sensitivity	95% CI		Specificity	95% CI		PPV	95% CI		NPV	95% CI		NIM
							Lower Limit	Upper Limit		Lower Limit	Upper Limit		Lower Limit	Upper Limit		Lower Limit	Upper Limit	
Lung	21	6	2	73	102	0.78	0.58	0.91	0.97	0.82	0.99	0.91	0.72	0.99	0.92	0.84	0.97	<b>12.8</b>
CNS	20	7	3	72	102	0.74	0.54	0.89	0.96	0.89	0.99	0.87	0.66	0.97	0.91	0.83	0.96	10.2
Plasma	19	8	2	73	102	0.70	0.50	0.86	0.97	0.91	1.00	0.90	0.70	0.99	0.90	0.81	0.96	10.2
CSF	15	12	1	74	102	0.56	0.35	0.75	<b>0.99</b>	<b>0.93</b>	<b>1.00</b>	<b>0.94</b>	<b>0.70</b>	<b>1.00</b>	0.86	0.77	0.93	7.8
Lung and CNS	23	4	4	71	102	<b>0.85</b>	<b>0.66</b>	<b>0.96</b>	0.95	0.87	0.99	0.85	0.66	0.96	<b>0.95</b>	<b>0.87</b>	<b>0.99</b>	<b>12.8</b>
Lung and Plasma	21	6	4	71	102	0.78	0.58	0.91	0.95	0.87	0.99	0.84	0.64	0.95	0.92	0.84	0.97	10.2
Lung and CSF	22	5	3	72	102	0.81	0.62	0.93	0.96	0.89	0.99	0.88	0.69	0.97	0.94	0.85	0.98	<b>12.8</b>
CNS and Plasma	22	5	5	70	102	0.81	0.62	0.93	0.93	0.85	0.98	0.81	0.62	0.93	0.93	0.85	0.98	10.2
CNS and CSF	22	5	4	71	102	0.81	0.62	0.93	0.95	0.87	0.99	0.85	0.65	0.96	0.93	0.85	0.98	11.3
Plasma and CSF	21	6	3	72	102	0.78	0.58	0.91	0.96	0.89	0.99	0.88	0.68	0.97	0.92	0.84	0.97	11.3
Lung CNS Plasma	23	4	6	69	102	0.85	0.66	0.96	0.92	0.83	0.97	0.79	0.60	0.92	0.95	0.87	0.98	10.2
Lung CNS CSF	23	4	5	70	102	0.85	0.66	0.96	0.93	0.85	0.98	0.82	0.63	0.94	0.95	0.87	0.99	11.3
Lung Plasma CSF	22	5	5	70	102	0.81	0.62	0.93	0.93	0.85	0.98	0.81	0.62	0.93	0.93	0.85	0.98	10.2
CNS Plasma CSF	23	4	6	69	102	0.85	0.62	0.93	0.92	0.83	0.97	0.79	0.60	0.92	0.95	0.87	0.98	10.2
Any tissue	23	4	7	68	102	0.85	0.66	0.96	0.91	0.82	0.96	0.77	0.58	0.90	0.94	0.86	0.98	9.3

The diagnostic values of samples or combinations of samples that may represent a significant diagnostic advantage are highlighted in bold. See Table 1 legend for expansion of abbreviations.

0.30-0.67), respectively. For combinations of organs, the highest performance was observed for lung and CNS: sensitivity, 0.85% (95% CI, 0.66-0.96) and negative predictive value of 0.95 (95% CI, 0.88-0.99). The highest specificity in a single organ or fluid was obtained in the lung (0.98; 95% CI, 0.92-1.00).

The highest NNM was obtained using the MIA sample of the lung (13.8) and combinations including lung samples (lung and CNS, 12.1; lung and CSF, 11.9; lung and plasma, 10.6). The sensitivity analysis of only cases in which the four MIA samples were available showed similar results, although the point estimate with the highest specificity (0.99; 95% CI, 0.93-1.00) and positive predictive value (PPV) (0.94; 95% CI, 0.70-1.00) was obtained with the CSF sample (Table 2).

## Discussion

This analysis shows that Xpert Ultra (a simple, rapid, and highly sensitive molecular tool) can be directly applied to specific MIA samples and achieve a reasonably high accuracy for confirming or ruling out TB as the CoD. We observed that only 15% of TB deaths would have been missed with the use of Xpert Ultra in lung and CNS MIA samples. More than two thirds of TB cases would have been diagnosed by performing Xpert Ultra in an easily accessible and homogeneous sample such as plasma, a sample with great potential for confirming TB as CoD given its high associated PPV (0.90 in this setting) and which would seldom be positive if the patient had not died of TB (specificity, 0.98). A similar high specificity and PPV are obtained with CSF, probably reflecting that most TB deaths are caused by disseminated TB, and bacilli are released and found in great quantities in peripheral blood and other compartments, such as CSF.

The study includes a well-characterized sample of patients with different TB findings at death. It also includes cases from different age groups and HIV statuses. Nonetheless, it has certain limitations. First, the sample size of cases with TB as the CoD was limited. Second, we could not analyze all of the CADMIA cases in this analysis because MIA samples were not available in all of the cases. Thus, the prevalence of TB as the CoD is not real in this sample, a factor that might affect the interpretation of PPV and negative predictive value. Taking into account that we included all cases with any type of TB finding in the CDA but only a subset of cases without any finding, the specificity of the MIAs might be slightly underestimated.

In conclusion, this study shows that the use of Xpert Ultra in body fluids, such as plasma or CSF, obtained at MIA, can easily and quickly diagnose or rule out TB as the CoD. This diagnostic strategy can accelerate and adequately and accurately determine CoD in settings with high TB and HIV prevalence. Nonetheless, the implications for pre-mortem patient management still need to be elucidated.

*Alberto L. Garcia-Basteiro, PhD*

*Maputo, Mozambique*

*Juan Carlos Hurtado, MD*

*Paola Castillo, PhD*

*Barcelona, Spain*

*Fabiola Fernandes, MD*

*Maputo, Mozambique*

*Mireia Navarro, MSc*

*Lucilia Lovane, MD*

*Isaac Casas*

*Barcelona, Spain*

*Llorenç Quintó, MSc*

*Dercio Jordao, MD*

*Mamudo R. Ismail, MD*

*Cesaltina Lorenzoni, PhD*

*Carla Carrilho, PhD*

*Maputo, Mozambique*

*Ariadna Sanz, MSc*

*Natalia Rakislova, MD*

*Aurea Mira, PhD*

*Miriam J. Alvarez-Martínez, PhD*

*Barcelona, Spain*

*Anélsio Cossa, DVM*

*Maputo, Mozambique*

*Frank Cobelens, PhD*

*Amsterdam, The Netherlands*

*Inácio Mandomando, PhD*

*Maputo, Mozambique*

*Jordi Vila, PhD*

*Barcelona, Spain*

*Quique Bassat, PhD*

*Maputo, Mozambique*

*Clara Menendez, PhD*

*Maputo, Mozambique*

*Jaume Ordi, PhD*

*Miguel J. Martínez, PhD*

*Barcelona, Spain*

**AFFILIATIONS:** From the Centro de Investigaçaoem Saúde de Manhiça (CISM) (Drs Garcia-Basteiro, Mandomando, Bassat, and Menendez; and Messrs Quintó and Cossa); ISGlobal, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona (Drs Garcia-Basteiro, Hurtado, Castillo, Rakislova, Alvarez-Martínez, Vila, Bassat, Menendez, Ordi, and

Martínez; Mr Quintó; and Ms Sanz), Universitat de Barcelona; the Amsterdam Institute for Global Health and Development (Drs Garcia-Basteiro and Cobelens), Amsterdam University Medical Centers; the Department of Microbiology (Drs Hurtado, Lovane, Alvarez-Martínez, Vila, and Martínez; Ms Navarro; and Mr Casas), Hospital Clinic, Universitat de Barcelona; the Department of Pathology (Drs Castillo, Rakislova, and Ordi), Hospital Clinic, Universitat de Barcelona; the Department of Pathology (Drs Fernandes, Jordao, Ismail, Lorenzoni, and Carrilho), Faculty of Medicine/Eduardo Mondlane University and Maputo Central Hospital; Biomedical Diagnostic Centre (CDB), Hospital Clinic (Dr Mira), University of Barcelona; Instituto Nacional de Saúde (INS), Ministério da Saúde, Maputo, Moçambique (Dr Mandomando); ICREA, Catalan Institution for Research and Advanced Studies (Dr Bassat), Pg. Lluís Companys 23; Pediatric Infectious Diseases Unit, Pediatrics Department (Dr Bassat), Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Barcelona, Spain; Consorcio de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP) (Drs Menendez and Bassat), Madrid, Spain  
Drs Ordi and Martínez contributed equally to this manuscript.  
Drs Garcia-Basteiro and Hurtado contributed equally to this manuscript.

**FINANCIAL/NONFINANCIAL DISCLOSURES:** None declared.

**FUNDING/SUPPORT:** The CaDMIA research project (Validation of the minimally invasive autopsy tool for cause of death investigation in developing countries) was funded by the Bill & Melinda Gates Foundation (Global Health grant numbers OPP1067522; QB) (<http://www.gatesfoundation.org/>) and by the Spanish Instituto de Salud Carlos III (FIS, PI12/00757; CM) (<https://portalfis.isciii.es>). Data analysis has been supported by the CaDMIA plus research project, funded by the Bill & Melinda Gates Foundation (Global Health grant numbers OPP1128001; JO) (<http://www.gatesfoundation.org/>) and the Spanish Instituto de Salud Carlos III (Acciones CIBER; CM) (<http://www.ciberisciii.es/>). ISGlobal is a member of the CERCA Programme, Generalitat de Catalunya (<http://cerca.cat/en/suma/>). No funding bodies had any role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. This study was also partially supported by grant 2017 SGR 794 from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR)—Departament d'Empresa i Coneixement, Generalitat de Catalunya. C. I. S. M. is supported by the Government of Mozambique and the Spanish Agency for International Development (AECID).

**CORRESPONDENCE TO:** Miguel J. Martínez, PhD, Barcelona Institute for Global Health, Department of Microbiology, Escalera 11. 5<sup>a</sup> Planta. Villarroel 170. 08036 Barcelona, Spain; e-mail: [myoldi@clinic.cat](mailto:myoldi@clinic.cat)

Copyright © 2020 The Authors. Published by Elsevier Inc under license from the American College of Chest Physicians. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**DOI:** <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.06.071>

## Acknowledgments

**Other contributions:** The authors thank the families of the deceased patients included in this study. The authors are grateful to all the members of the Department of Pathology of Maputo Central Hospital, Mozambique, whose support made this study possible, and also to the staff of the *Centro de Investigaçaoem Saúde de Manhiça* (CISM) for their logistic support. We specifically thank Mr Bento Nhandale for his invaluable support to the study. We thank Cepheid for providing the Xpert Ultra cartridges used in the study.

**Role of sponsors:** The sponsor had no role in the design of the study, the collection and analysis of the data, or the preparation of the manuscript.

## References

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019. Geneva, Switzerland: License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.; 2019.
2. Garcia-Basteiro AL, Brew J, Williams B, Borgdorff M, Cobelens F. What is the true tuberculosis mortality burden? Differences in estimates by the World Health Organization and the Global Burden of Disease study. *Int J Epidemiol.* 2018;47(5):1-12.
3. Bassat Q, Ordi J, Vila J, et al. Development of a post-mortem procedure to reduce the uncertainty regarding causes of death in developing countries. *Lancet Glob Health.* 2013;1:e125-e126.
4. Maixenchs M, Anselmo R, Zielinski-Gutiérrez E, et al. Willingness to know the cause of death and hypothetical acceptability of the minimally invasive autopsy in six diverse African and Asian settings: a mixed methods socio-behavioural study. *PLoS Med.* 2016;13:e1002172.
5. Castillo P, Martínez MJ, Ussene E, et al. Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in adults in Mozambique: an observational study. *PLoS Med.* 2016;13:e1002171.
6. Garcia-Basteiro A, Hurtado JC, Castillo P, et al. Unmasking the hidden tuberculosis mortality burden in a large post mortem study in Maputo Central Hospital. *Eur Respir J.* 2019;54(3):1900312.
7. Cox JA, Lukande RL, Lucas S, Nelson AM, Van Marck E, Colebunders R. Autopsy causes of death in HIV-positive individuals in sub-Saharan Africa and correlation with clinical diagnoses. *AIDS Rev.* 2010;12:183-194.
8. Castillo P, Ussene E, Ismail MR, et al. Pathological methods applied to the investigation of causes of death in developing countries: minimally invasive autopsy approach. *PLoS One.* 2015;10(6):e01.
9. Martínez MJ, Massora S, Mandomando I, et al. Infectious cause of death determination using minimally invasive autopsies in developing countries. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;84(1):80-86.
10. Garcia-Basteiro AL, Ismail MR, Carrilho C, et al. The role of Xpert MTB/RIF in diagnosing pulmonary tuberculosis in post-mortem tissues. *Sci Rep.* 2016;6:20703.



## Artículo 6

**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS RELACIONADOS:** Hipótesis general y Objetivo 1

**AUTORES:** Hurtado JC, Carrilho C, Mandomando I, Martínez MJ on behalf of the CaDMIA bacterial study group

**TÍTULO:** Fatal multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia in Maputo, Mozambique. A case report.

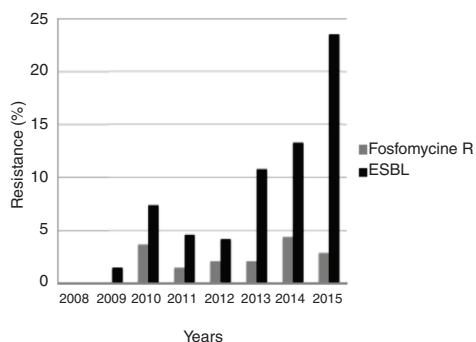
**REVISTA, VOLUMEN (NÚMERO): PÁGINAS, FECHA DE PUBLICACIÓN:**  
**Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 37(7):485-487. Agosto–  
Septiembre 2019

**DOI:** doi:10.1016/j.eimc.2018.06.016

**FACTOR DE IMPACTO:** 1.654

**CUARTIL (JCR):** Q4 (Microbiology)





**Fig. 1.** Trends in fosfomicin resistance and ESBL production in *E. coli* isolated from males with febrile urinary tract infection over the study period.  
Abbreviations: R: resistant; ESBL: extended-spectrum beta-lactamase.

We found that older age, dementia and FQ consumption were associated to FR. Nursing home residence has been described as a predictor of FR in ESBL-EC.<sup>6</sup> Further studies are required to fully evaluate the risk factors of FR in *E. coli*.

Our study suggests that FR has not increased over time. Most *E. coli* isolates were FS including ESBL-EC. Risk factors for FR should be considered when prescribing fosfomicin to males with a FUTI.

### Bibliografía

- Ulleryd P. Febrile urinary tract infection in men. *Int J Antimicrob Agents.* 2003; Suppl. 2:89–93.
- Lipsky BA, Byren I, Hoey CT. Treatment of bacterial prostatitis. *Clin Infect Dis.* 2010;50:1641–52.
- Smithson A, Ramos J, Bastida MT, Bernal S, Jove N, Niño E, et al. Differential characteristics of healthcare-associated compared to community acquired febrile urinary tract infections in males. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34:2395–402.
- Sastry S, Doi Y, Fosfomicin.: Resurgence of an old companion. *J Infect Chemother.* 2016;22:273–80.
- Los-Arcos I, Pigrau C, Rodríguez-Pardo D, Fernández-Hidalgo N, Andreu A, Larrosa N, et al. Long-term fosfomicin-tromethamine oral therapy for difficult-to-treat chronic bacterial prostatitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;60:1854–8.
- Oteo J, Bautista V, Lara N, Cuevas O, Arroyo M, Fernández S, et al. Parallel increase in community use of fosfomicin and resistance to fosfomicin in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:2459–63.
- Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I, Hernández E, Picazo JJ. Increasing prevalence of fosfomicin resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* urinary isolates (2005–2009–2011). *Rev Esp Quimioter.* 2013;26:43–6.
- Pourbaix A, Guerin F, Lastours V, Chau F, Auzou M, Bouley E, et al. Biological cost of fosfomicin resistance in *Escherichia coli* in a murine model of urinary tract infection. *Int J Med Microbiol.* 2017;307:452–9.
- Asencio Egea MÁ, Huertas Vaquero M, Carranza González R, Herráez Carrera Ó, Redondo González O, Arias Arias Á. Trend and seasonality of community-acquired *Escherichia coli* antimicrobial resistance and its dynamic relationship with antimicrobial use assessed by ARIMA models. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018;38:502–6.
- Benzerara Y, Gallah S, Hommeril B, Genel N, Decré D, Rottman M, et al. Emergence of plasmid-mediated fosfomicin-resistance genes among *Escherichia coli* isolates, France. *Emerg Infect Dis.* 2017;23:1564–7.

Javier Ramos<sup>a</sup>, Maria Teresa Bastida<sup>b</sup>,  
Esther Niño<sup>a</sup>, Alex Smithson<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Internal Medicine Department, Fundació Hospital de l'Esperit Sant, Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Microbiology Laboratory, Fundació Hospital de l'Esperit Sant, Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Infectious Diseases Unit, Fundació Hospital de l'Esperit Sant, Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain

\* Corresponding author.

E-mail address: asa30412@hotmail.com (A. Smithson).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.06.015>  
0213-005X/

© 2018 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

### Fatal multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia in Maputo, Mozambique: A case report



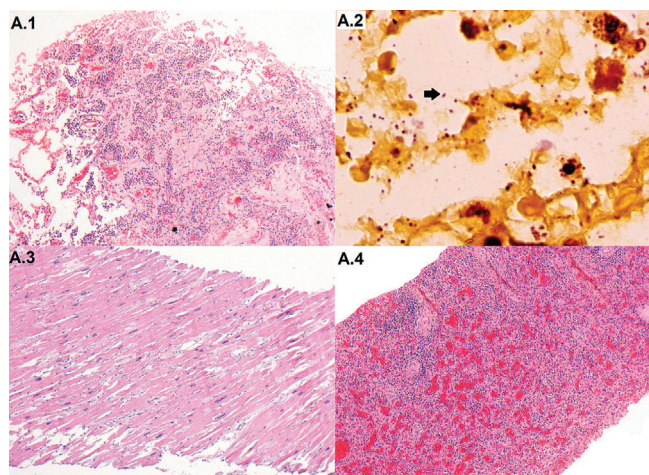
#### Neumonía con desenlace fatal por *Acinetobacter baumannii* multirresistente en Maputo, Mozambique: reporte de un caso

*Acinetobacter baumannii* is one of the six most important multidrug-resistant (MDR) microorganisms isolated in hospitalised patients worldwide, having an extraordinary capacity to spread to different areas.<sup>1</sup> In the last three decades *A. baumannii* has acquired resistance to antibiotics including carbapenems and even polymyxins, representing a challenge for achieving effective antibacterial treatment.<sup>1,2</sup> In the global priority list of antibiotic-resistant bacteria of the World Health Organisation, *A. baumannii* is considered the most critical pathogen.<sup>3</sup> Knowledge of the epidemiology and antibacterial susceptibility profile of *A. baumannii* is still incomplete in many parts of the world including Africa. Here, we report a fatal pulmonary infection by MDRA *A. baumannii* in Maputo, Mozambique.

In 2014, a woman in her 20s, with HIV infection on antiretroviral treatment for the preceding 12 months, was admitted to the Maputo Central Hospital with cough, dyspnoea and seizures of acute presentation. Physical examination revealed: a Glasgow score of 15/15, temperature 38.2 °C, blood pressure 180/120 mmHg, heart rate 100 bpm, and respiratory rate 24 rpm. Thick and thin smear tests for malaria were negative. Laboratory analyses during

hospitalisation showed anaemia (haematocrit 24.9% and haemoglobin 8.3 g/dL), leukopenia (white blood cell count  $2.9 \times 10^9/L$ ), elevated transaminases (AST 157 IU and ALT 726 IU), and kidney failure (maximum creatinine and urea levels were 363 µM/L and 29.4 µM/L respectively); the estimated glomerular filtration (Cockcroft-Gault Equation) was 18.8 mL/min. Chest X-ray was performed and only a cardiomegaly was reported. The nadir CD4 count was 192 cells/mL. Sputum Gram stain and blood culture were not performed. The patient received penicillin, cotrimoxazole, and oxygen but died on day 14 of hospitalisation. Pre-mortem clinical diagnoses were: HIV/AIDS, Kaposi's sarcoma, dilated cardiomyopathy, kidney failure, and pulmonary hypertension. The patient was not intubated or in mechanical ventilation.

The case was included in the CaDMIA project, a validation study of a minimally invasive autopsy (MIA) protocol against the complete diagnostic autopsy (CDA).<sup>4,5</sup> A universal screening for several key pathogens was conducted, and microbiological analysis were performed according to the histopathological findings.<sup>4,5</sup> The autopsy revealed a severe pyogenic pneumonia (Fig. 1). Serum samples tested positive for antibodies against HIV with a viral load of 182 copies/mL. Lung samples resulted negative for tuberculosis, *Cryptococcus*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis jirovecii* and respiratory viruses by PCR testing. *A. baumannii* was isolated from brain, lung and liver samples. Gram negative bacilli were visible in the Gram stain of histological lung samples (Fig. 1), brain, and liver. *A. baumannii* was also identified by 16S rRNA PCR in plasma, brain,



**Fig. 1.** Fatal MDR *A. baumannii* infection: microbiological and pathological results of post-mortem samples.

Histological images of relevant findings. (A.1) Lung with pyogenic pneumonia (haematoxylin and eosin, 100 $\times$ ); (A.2) Gram negative bacteria (*A. baumannii*) pneumonia (arrow) infecting the lung (gram stain, 1000 $\times$ ); (A.3) heart with hypertrophy (haematoxylin and eosin, 100 $\times$ ); (A.4) spleen with lymphocytic depletion and congestion (haematoxylin and eosin, 100 $\times$ ).

lung, liver and cerebrospinal fluid samples. The cause of death was assigned to fatal pneumonia caused by a MDR *A. baumannii* infection, following a previously described algorithm.<sup>6</sup> Clinical diagnosis of Kaposi's sarcoma and dilated cardiomyopathy were not confirmed at autopsy.

Antibiotic susceptibility tests were performed and interpreted according to the EUCAST guidelines (version 7.0,2017; <http://www.eucast.org>) which consider *A. baumannii* intrinsically resistant to penicillins and cephalosporins. In addition, the strain was resistant to the following antibiotics: ciprofloxacin, levofloxacin, trimethoprim-sulphamethoxazole, and gentamicin; showing intermediate resistance to meropenem (4  $\mu$ g/mL) and susceptibility to amikacin, tobramycin, imipenem and colistin. The MIC of tigecycline was 1  $\mu$ g/mL. Multi-Locus Sequence Typing following the Pasteur scheme (<https://pubmlst.org/abaumannii/>) identified all the *A. baumannii* isolates as belonging to international clone II and sequence type 2(ST2).

Few data are available in the literature regarding *A. baumannii* in Africa. A recent report analysed 65 strains from 5 different countries and found a high prevalence of MDR strains.<sup>7</sup> International clone II/ST2 isolates belong to one of the major clonal lineages associated with the spread of MDR *A. baumannii* worldwide, but in Africa they have only been reported in Algeria and Kenya.<sup>8,9</sup> Two recent studies<sup>10,11</sup> (one of them conducted at the Maputo Central Hospital) reported non-MDR *A. baumannii* in Mozambique, whereas, to our knowledge, this is the first report of a MDR *A. baumannii* strain in this country. The patient had several known risk factors for acquiring *A. baumannii* infection such as severe immunosuppression and having been hospitalised for two weeks. However, the final cause of death was only identified after a complete diagnostic autopsy and in depth microbiological studies were carried out. Diagnostic autopsies are rarely performed in sub-Saharan Africa due to, among others, the lack of resources and trained pathologists. We show that a standardised minimally invasive sampling procedure can provide accurate identification of a pathogen causing death. This method may improve the capacity of the current surveillance methods to detect bacterial infections and associated antimicrobial resistance. Our report highlights the utility of post-mortem investigations for accurate determination of cause of death and the need for microbio-

logical surveillance to tackle the growing problem of nosocomial MDR infections in low-income countries.

#### Availability of data and material

All relevant data are within the paper. Any additional data use and transfer is monitored by ISGlobal Data Management and Biostatistics Unit (contact e-mail: [ubioesdm@isglobal.org](mailto:ubioesdm@isglobal.org)).

#### Ethics approval and consent to participate

The study protocol received approval from the National Mozambican Ethics Committee (ref.342/CNBS/13) and the Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona (Spain; approved, File 2013/8677). The MIA and CDA procedures were only conducted after verbal informed consent was provided by the relatives.

#### Funding

The CaDMIA research project (Validation of the minimally invasive autopsy tool for cause of death investigation in developing countries) was funded by the Bill & Melinda Gates Foundation (Global Health grant numbers OPP1067522) and by the Spanish Instituto de Salud Carlos III (FIS, PI12/00757). Data analysis has been supported by the CaDMIA plus research project, funded by the Bill & Melinda Gates Foundation (Global health grant numbers OPP1128001) and the Spanish Instituto de Salud Carlos III (Acciones CIBER). ISGlobal is a member of the CERCA Programme, Generalitat de Catalunya (<http://cerca.cat/en/suma/>). No funding bodies had any role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

#### Appendix A.

**CaDMIA bacterial study group:** Juan Carlos Hurtado, Francesc Marco, Mamudo R. Ismail, Paola Castillo, Marta Marí-Almirall, Ignasi Roca, Dercio Jordao, Lucilia Lovane, Cesaltina Lorenzoni, Mireia Navarro, Isaac Casas, Inacio Mandomando, Anelsio Cossa, Ariadna Sanz, Quique Bassat, Jaume Ordi, Clara Menéndez, Jordi Vila, Carla Carrilho and Miguel J. Martínez.

#### Bibliografía

- Roca I, Espinal P, Vila-Farres X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* Oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front Microbiol.* 2012;3:148. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00148>
- Karah N, Sundsfjord A, Townner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updates.* 2012;15:237–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2012.06.001>
- World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Available at: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/> [accessed 16.03.17].
- Castillo P, Ussene E, Ismail MR, Jordao D, Lovane L, Carrilho C, et al. Pathological methods applied to the investigation of causes of death in developing countries: minimally invasive autopsy approach. *PLoS ONE.* 2015;10:e0132057. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0132057>
- Martínez MJ, Massora S, Mandomando I, Ussene E, Jordao D, Lovane L, et al. Infectious cause of death determination using minimally invasive autopsies in developing countries. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;84:80–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.002>
- Castillo P, Martínez MJ, Ussene EA, Jordao D, Lovane L, Ismail MR, et al. Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in adults in Mozambique: an observational study. *PLoS Med.* 2016;13:e1002171. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1002171>
- Lob SH, Hoban DJ, Sahn DF, Badal RE. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;47:317–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.01.015>
- Bakour S, Touati A, Bachiri T, Salhi F, Touit D, Naim M. First report of 16S rRNA methylaseArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread

of metallo-beta-lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *J Infect Chemother*. 2014;20:696–701, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2014.07.010>

9. Revathi G, Siu LK, Lu PL, Huang LY. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in East Africa. *Int J Infect Dis*. 2013;17:e1255–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2013.07.016>

10. Le Doare K, Bielicki J, Heath PT, Sharland M. Systematic review of antibiotic resistance rates among Gram-negative bacteria in children with sepsis in resource-limited countries. *J Pediatr Infect Dis Soc*. 2015;4:11–20, <http://dx.doi.org/10.1093/jpids/piu014>

11. Preziosi M, Zimba TF, Lee K, Tomas M, Kinlin S, Nhatave-Paiva C. A prospective observational study of bacteraemia in adults admitted to an urban Mozambican hospital. *S Afr Med J*. 2015;105:370–4, <http://dx.doi.org/10.7196/samj.8780>

Juan Carlos Hurtado<sup>a,b</sup>, Carla Carrilho<sup>c,d</sup>, Inacio Mandomando<sup>e</sup>, Miguel J. Martínez<sup>a,b,\*</sup>, on behalf of the CaDMIA bacterial study group<sup>1</sup>

<sup>a</sup> ISGlobal, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Department of Clinical Microbiology, Hospital Clínic of Barcelona, Universitat de Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Pathology, Maputo Central Hospital, Maputo, Mozambique

<sup>d</sup> Faculty of Medicine, Eduardo Mondlane University, Maputo, Mozambique

<sup>e</sup> Centro de Investigação em Saúde de Manhiça, Maputo, Mozambique

\* Corresponding author.  
E-mail address: [myoldi@clinic.ub.es](mailto:myoldi@clinic.ub.es) (M.J. Martínez).

<sup>1</sup> See Appendix A.

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.06.016>  
0213-005X/

© 2018 Published by Elsevier España, S.L.U.

### Análisis epidemiológico de las infecciones respiratorias agudas causadas por el enterovirus D68 clado A, subclado A1 en la población adulta



#### Epidemiological analysis of acute respiratory infections caused by enterovirus D68 clade A, subclade A1 in the adult population

El enterovirus D68 (EV-D68) es un virus que pertenece a la especie D del género *Enterovirus* dentro de la familia *Picornaviridae*. Fue descrito por primera vez en 1962 en California como rinovirus 87 y causante de infecciones respiratorias pediátricas<sup>1</sup>. En 2014 se comunicó en Estados Unidos una importante epidemia de infecciones respiratorias causadas por el EV-D68 afectando a más de 1.100 pacientes, en ocasiones asociadas a complicaciones neurológicas<sup>2</sup>. A raíz de esta situación diferentes países iniciaron la búsqueda de este virus en las infecciones respiratorias, tanto pediátricas como de adultos, habiéndose descrito en Francia, Italia, Holanda y Alemania, entre otros países europeos<sup>3,4</sup>.

En nuestro país se han comunicado algunos casos aislados de infección respiratoria aguda asociados al EV-D68 tanto en población adulta como en niños comunitarios y hospitalizados<sup>5,6</sup>. La escasa información referente a esta patología en adultos nos ha llevado a analizar las características epidemiológicas de los 12 casos de infección respiratoria aguda asociados al EV-D68 detectados recientemente.

Durante los meses de diciembre de 2017 y enero de 2018 se procesaron 1.050 muestras respiratorias de pacientes adultos. A cada uno de ellos se les realizó la detección de virus respiratorios mediante una RT-PCR comercial en tiempo real (Allplex Respiratory Full Panel Assay; Seegen, Corea del Sur).

En este período se detectaron 651 muestras positivas (62%) y en ellas 37 enterovirus (5,6%) de los cuales 12 (32,4%) fueron identificados como EV-D68 clado A, subclado A1 en el Centro Nacional de Enterovirus (Madrid) mediante una RT-nested para la región 3-VP1 del virus y posterior secuenciación del mismo<sup>6</sup>. Estos 12 enterovirus representaron el 1,8% de las muestras positivas y el 1% del total de las analizadas.

Las principales características clínicas y epidemiológicas de estos pacientes se presentan en la [tabla 1](#). La mayoría de las infecciones respiratorias fueron leves o moderadas o cuadros gripales; solo dos pacientes (16,6%) requirieron del ingreso en la UCI como consecuencia de una crisis asmática intensa y un cuadro gripal con distrés respiratorio. La edad media de nuestros pacientes (52,8 años) fue superior a la comunicada en otro estudio (36,7 años)<sup>7</sup>. En el estudio de Meijer et al.<sup>8</sup> el 28% de los casos en adultos tenían una edad situada entre los 40–59 años. Ningún paciente falleció y todos fueron dados de alta sin secuelas valorables.

Cuando se comparan nuestros datos de incidencia con los comunicados en otros estudios se observa que en Francia en 2014 Schuffenecker et al.<sup>4</sup> detectan que los 21 EV-D68 en adultos solo representan el 10,6% de todos los aislados y que sus características clínicas son semejantes a las observadas en nuestro estudio. Así 3 pacientes ingresaron en la UCI (14,2%) y 4 (19%) presentaron neumonía (8,3% en nuestro estudio). En Alemania Böttcher et al.<sup>3</sup> han observado entre los años 2013–2014 que el EV-D68 representa el 0,3% de todas las muestras respiratorias aunque no se especifica a qué grupos de edad corresponden. En otros estudios apenas se comunican casos en adultos, así Lu et al.<sup>9</sup> detectan 2 (22%) en el período 2009 y 2012 casos de EV-D68 en adultos con patología respiratoria leve; mientras que Zhang et al.<sup>10</sup> entre 2011 y 2015 solo detectan un caso, representando el 18% de todos los aislados. En el estudio comparativo entre la circulación del EV-D68 entre Europa y Estados Unidos realizado por Poelman et al.<sup>11</sup> en 2015 se confirma la baja prevalencia de este virus en Europa y su menor morbilidad durante el brote norteamericano. En España en 2014 Gimferrer et al.<sup>5</sup> fueron los primeros en comunicar 2 (40%) casos en adultos, en un grupo de 5 pacientes ingresados, sin necesidad de ingreso en la UCI.

En ninguno de estos estudios se han podido detectar en los adultos afectaciones neurológicas graves o parálisis flácidas como se ha

**Tabla 1**

Principales características de los 12 pacientes adultos con detección de EV-D68 en el tracto respiratorio

Hombre, n (%)	6 (50)
Mujer, n (%)	6 (50)
Edad media, años (rango)	52,8 (16–75)
Ingreso hospital, n (%)	6 (50)
Ingreso UCI, n (%)	2 (16,6)
Tratamiento antibiótico, n (%)	8 (66,6)
Síntomas, n (%)	
Fiebre	11 (91,6)
Tos	10 (83,3)
Malestar general	6 (50)
Mialgias	5 (41,6)
Faringitis	5 (41,6)
Cefalea	3 (25)
Disnea	2 (16,6)
Diagnóstico clínico, n (%)	
Gripe	4 (33,3)
Infección respiratoria aguda	3 (25)
Asma	2 (16,6)
Neumonía	1 (8,3)
Bronquitis	1 (8,3)
EPOC	1 (8,3)

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; UCI: unidad de cuidados intensivos.



## Discusión



Mediante la información recopilada en diversos artículos incluidos en esta tesis, se ha intentado destacar la importancia de la investigación *post mortem* de las CdM centradas en etiologías infecciosas en individuos residentes en países con ingresos bajos y medios. A continuación, procederemos con la discusión de los diferentes artículos que componen la tesis.

En el primer artículo, validamos la AMI como herramienta para diagnóstico *post mortem* de las muertes maternas. En el conjunto de muertes maternas, encontramos una concordancia del 68% entre la técnica AMI y la AC, con un índice kappa de 0,48 (IC 95% 0,31-0,66) Esta proporción de concordancia es análoga a la observada en otros grupos etarios.<sup>189,191,192</sup> Nuestros hallazgos sugieren que la implementación de este novedoso método podría aportar información confiable y relevante sobre las CdM vinculadas al embarazo y parto, especialmente en el caso de muertes obstétricas indirectas, muchas de las cuales en nuestra investigación se asociaron con enfermedades infecciosas, contribuyendo así a disminuir la mortalidad materna en contextos donde esta carga es más elevada.

La OMS estimó para el año 2012 que el 82% de las muertes maternas en todo el mundo se deben a causas directas, como hemorragia, sepsis, preeclampsia o eclampsia, parto obstruido y aborto inseguro, mientras que aproximadamente el 18% se debe a causas indirectas, incluyendo enfermedades crónicas e infecciosas.<sup>343</sup> Pero en una revisión sistemática del 2014<sup>51</sup> que comprendió los años 2003 al 2009 halló que las causas de muerte directa fueron el 72.5% mientras las indirectas alcanzaron el 27.5%. Estas estimaciones globales probablemente subestiman la importancia de las enfermedades infecciosas como una causa principal de mortalidad materna en algunas regiones del mundo, principalmente ubicadas en países de baja y mediana renta. Nuestros resultados concuerdan con informes previos que señalan que la hemorragia obstétrica (dentro de las condiciones directas) y las condiciones obstétricas indirectas son las

principales causas de mortalidad materna en países de bajos ingresos<sup>344,345</sup>. La mortalidad materna debida a hemorragia postparto lidera las causas de muerte materna a nivel global, siendo su distribución desigual, mientras que en los países de alta renta si sitúa en un 8%, en los países de baja y mediana renta puede llegar a encontrarse por encima del 20% del total de las muertes maternas.<sup>346</sup> Por otro lado, la proporción de muertes obstétricas indirectas (56%) observada en nuestra investigación es superior a la de muertes obstétricas directas (42%), lo cual difiere de lo usualmente reportado<sup>51,347</sup>. Estos resultados se asemejan a los de un estudio previo realizado hace más de quince años en el mismo contexto<sup>345</sup> sugiriendo que las complicaciones no obstétricas pueden ser subestimadas mediante las metodologías y fuentes de recolección de datos actuales, como la autopsia verbal, utilizadas para estimar la CdM materna. Al emplear la AMI en el diagnóstico *post mortem* de muertes maternas, también confirmamos la relevante contribución de la malaria y el VIH a la mortalidad materna en países endémicos como Mozambique<sup>345,348-351</sup>. En Mozambique para el año 2020 se estimaba que vivían 2.1 millones de personas con VIH, aunque solo el 72% de las PVVS conocían su diagnóstico.<sup>352</sup> En la serie descrita en este artículo las condiciones relacionadas con el VIH representaron el 28% (16/57) de todas las muertes maternas. De otra parte, la malaria, en esta serie, representó el 7% (4/57) y la malaria cerebral fue detectable mediante AMI en los 4 casos<sup>63</sup>, lo cual es especialmente relevante, dado que el estudio se llevó a cabo en un entorno urbano con transmisión mínima de malaria. Curiosamente, 3 de las 4 mujeres con malaria cerebral eran de origen urbano, aunque no podemos descartar una visita a una zona rural con mayor transmisión de malaria durante el embarazo. Este hallazgo es importante, ya que permite aproximarse al impacto de la malaria en la mortalidad materna en áreas endémicas, que generalmente se subestima<sup>353</sup>. En este estudio también se determinó que la coinfección por VIH y tuberculosis representa una causa relevante de las muertes obstétricas indirectas (9% de las muertes), tal como se observó en informes previos<sup>345,354,355</sup>. La tuberculosis fue identificada mediante AMI en 4 de 5 casos en los que la infección fue determinada como

CdM en la AC. Este hallazgo es significativo, dado la baja sensibilidad del diagnóstico clínico de tuberculosis como causa de mortalidad materna<sup>64</sup>. Cabe resaltar que la infección criptocócica diseminada contribuyó de manera notable a la muerte entre las mujeres con VIH (7%, 4/57), y todos los casos también se identificaron mediante AMI. *Cryptococcus spp.* es la principal causa de meningitis en adultos en África subsahariana, donde se estima que provoca entre el 15% y el 20% de todas las muertes relacionadas con el sida<sup>64,356,357</sup>. La inequidad en el acceso a la atención médica, una baja adherencia a la terapia antirretroviral y las elevadas tasas de pérdida en el seguimiento de las pacientes en los programas de control prenatal pueden poner a las mujeres embarazadas infectadas con VIH en un mayor riesgo de infecciones oportunistas, como la criptococosis<sup>358</sup>. Las mujeres en edad fértil constituyen aproximadamente el 41-55% de los pacientes con criptococosis en África<sup>359</sup>, sin embargo, se desconoce la incidencia de criptococosis en mujeres embarazadas infectadas con VIH debido a que los datos en mujeres embarazadas son limitados, con solo unos pocos estudios publicados que informaron infección criptocócica en mujeres embarazadas. Además, las mujeres embarazadas son en gran medida excluidas de la investigación en micología clínica debido a la teratogenicidad del fluconazol, un agente antifúngico esencial utilizado en el tratamiento de la criptococosis<sup>359</sup>. Esto limita aún más el conocimiento sobre la criptococosis y el embarazo. Este estudio resalta la importancia de la criptococosis como CdM materna y, por lo tanto, la necesidad de mejorar el diagnóstico y tratamiento de esta infección fúngica durante el embarazo<sup>360-362</sup>.

Notablemente, la sensibilidad del procedimiento AMI fue muy alta (91%) para causas indirectas de muerte. En contraposición, la sensibilidad fue considerablemente menor (36%) para causas obstétricas directas. La sensibilidad del procedimiento AMI fue particularmente baja (menos del 10%) para la hemorragia obstétrica. Solo se capturó 1 caso en el AMI debido a que se identificó la retención de placenta en una mujer durante el puerperio. Aunque solo se atribuyó 1 muerte a la eclampsia, la enfermedad fue

identificada mediante AMI. Esta precisión probablemente fue influenciada por nuestros estrictos criterios para diagnosticar la eclampsia, que requerían la presencia de lesiones patológicas típicas en el hígado y la ausencia de cualquier otra lesión letal, para evitar la sobreasignación de esta condición como CdM<sup>64</sup>. Dada la gran cantidad de diagnósticos clínicos falsos positivos de eclampsia reportados y la probable sobrestimación de esta afección en los informes clínicos y autopsias verbales<sup>64,363</sup>, los hallazgos adquieren relevancia. De hecho, es fundamental establecer a fondo la contribución de la eclampsia a la mortalidad materna para guiar los programas de salud materna basados en la prevención de la preeclampsia.

El estudio de la AMI como herramienta para el diagnóstico *post mortem* de las muertes maternas fue diseñado con el propósito de determinar la validez del procedimiento AMI por sí solo, sin emplear datos clínicos adicionales. La única excepción a este enfoque era tener conocimiento de si la muerte de la mujer ocurrió durante el embarazo o dentro de los 42 días posteriores a la terminación del embarazo (independientemente de la duración y el sitio del embarazo), ya que esta información era esencial para determinar si un caso cumplía con la definición de la OMS y, en consecuencia, debía ser incluido como una muerte materna. Los hallazgos sugieren que el AMI sin ningún dato clínico presenta un desempeño relativamente limitado para las causas obstétricas directas de muerte. Incorporar cierto grado de información obstétrica de la historia clínica o de la autopsia verbal podría mejorar significativamente los resultados de la AMI. Es importante señalar que la hemorragia obstétrica fue pasada por alto en todos menos en un caso cuando se analizó la CdM con la AMI; sin embargo, esta condición se identifica fácilmente en los registros clínicos y probablemente no sería difícil obtenerla de una autopsia verbal, aún con las limitaciones que puedan presentar<sup>364</sup>. Por otro lado, la mayoría de las muertes obstétricas indirectas, que a menudo se clasifican erróneamente en las autopsias verbales, fueron identificadas en la AMI. La investigación futura debe incluir los datos clínicos al evaluar el rendimiento de la AMI.

El extenso muestreo y análisis microbiológico propuesto en el protocolo AMI empleado como herramienta para el diagnóstico *post mortem* de las muertes maternas resulta en la adecuada identificación del agente etiológico en un elevado número de enfermedades infecciosas. Además, en los cinco casos considerados como infecciosos por AC, el agente etiológico se identificó exitosamente en el AMI, pero no en el AC. Es posible que el procedimiento de muestreo menos invasivo realizado en el AMI pueda mejorar el rendimiento del análisis microbiológico al reducir la probabilidad de contaminación microbiológica<sup>318,365</sup>. Por otro lado, la AMI puede generar, en ausencia de información clínica, una sobreestimación de los resultados microbiológicos, como en los casos de las cinco mujeres que fallecieron por hemorragia obstétrica y que fueron consideradas muertes infecciosas en la AMI.

Una limitación de este estudio es el tamaño de muestra relativamente bajo, lo que ha resultado en una pobre representación de algunas causas de muerte. Sin embargo, el estudio no fue diseñado para describir todas las causas de muerte materna y validar el método para cada causa específica o categoría de enfermedad, sino para evaluar la validez del método para el grupo de muerte materna en su conjunto. Una segunda limitación de este estudio es que su precisión diagnóstica de la AMI podría haber sido influenciada por la diseminación de muchas enfermedades. Más de la mitad de las pacientes eran mujeres infectadas por VIH con infecciones muy diseminadas, y el rendimiento del procedimiento podría verse significativamente reducido ante una lesión focalizada o en procesos infecciosos localizados en pacientes inmunocompetentes.

Establecer de manera confiable las causas de las muertes maternas es un paso importante para la planificación y priorización de la salud, que a su vez son elementos esenciales para reducir la mortalidad materna. Se ha reconocido que la falta de datos de calidad sobre estas CdM en los países con una carga alta es una limitación relevante para reducir la mortalidad materna y lograr el acceso universal a la salud reproductiva<sup>366</sup>, especialmente en el África subsahariana, donde la TMM solo se redujo en un 26 %

desde 1990<sup>348</sup>. En esta región, así como en otras regiones de baja y mediana renta, una herramienta como la AMI podría proporcionar información de calidad principalmente para aquellas condiciones que son más difíciles de identificar a través de los métodos utilizados de forma rutinaria para la determinación de la CdM.

El estudio de validación de la AMI como herramienta para diagnóstico *post mortem* de las muertes maternas muestra, por primera vez que sepamos, que el AMI, un procedimiento *post mortem* simplificado, puede proporcionar una correlación aceptable con el diagnóstico estándar de oro (la AC) en muertes maternas.

Por otro lado, la aparición de la AMI como herramienta estandarizada para el muestreo *post mortem* dirigido a investigar la CdM ha provocado una revolución significativa en la forma en que estudiamos la mortalidad en entornos de bajos ingresos. Sin embargo, los cortos períodos de tiempo fijados como ideales (menos de 24 horas) para el estudio de las muestras obtenidas después de la muerte pueden dificultar la viabilidad del procedimiento AMI al implementar la herramienta en países de bajos y medianos ingresos, particularmente en establecimientos de salud ubicados en áreas rurales. En el segundo manuscrito evaluamos si existe diferencia en los estudios *post mortem* practicados con menos de 24 horas de intervalo *post mortem* en comparación con los análisis hechos con intervalos *post mortem* mayores a 24 horas.

Se evaluó la influencia del intervalo *post mortem* en el rendimiento diagnóstico de la AMI y la AC, en este estudio no se observaron variaciones relacionadas con el IPM en el número de casos en los que no se llegó al diagnóstico final de CdM entre el AMI y el AC. Además, no se observaron diferencias diagnósticas entre los procedimientos realizados antes y después de las 24 horas después de la muerte<sup>189,191,192</sup>. Tampoco se observaron diferencias en cuanto al nivel de diagnóstico entre AMI y AC entre los grupos de autopsia temprana y tardía y no se observaron variaciones ni para las condiciones no infecciosas ni para la mayoría de las enfermedades infecciosas. En particular, los

resultados microbiológicos relacionados con hongos y virus parecen no verse afectados por cambios relacionados con el IPM y, en consecuencia, son confiables<sup>318</sup>. Estos hallazgos indican que el AMI y el AC, realizados más de 24 horas después de la muerte, pueden arrojar resultados confiables y respaldan su uso después de este período.

Sin embargo, los datos hallados en nuestro estudio mostraron un aumento en el número de bacterias identificadas en la AMI (tasa: 1,014 por hora [IC del 95 %: 1,002–1,026];  $p = 0,0228$ ) con el aumento del IPM. Este aumento en el número de microorganismos identificados con el aumento de IPM fue evidente para las bacterias contaminantes, pero también se observó un aumento en el número de bacterias consideradas asociadas a infecciones verdaderas según nuestros criterios. Este aumento se relacionó principalmente con aumentos en el número de cepas de la familia *Enterobacteriaceae* y del género *Pseudomonas*.

En nuestro estudio, la clasificación de un microorganismo como contaminante o como microorganismo asociado a una infección verdadera se basó en gran medida en un esquema de graduación, que depende de la validez interna de los resultados obtenidos de las pruebas de microbiología<sup>189,191,192</sup>. Este esquema de clasificación para determinar el nivel de fuerza de un hallazgo en particular se aplicó no solo a los resultados microbiológicos, sino también a los hallazgos patológicos. Para los hallazgos microbiológicos, estos criterios se basaron en la patogenicidad de cada microorganismo individual, pero también en el número de órganos (uno o más órganos) y el tipo de técnicas (cultivos clásicos, pruebas moleculares o ambas) en las que se identificó el microorganismo<sup>189,191,192</sup>. En consecuencia, mientras que algunos microorganismos como *Cryptococcus spp.* o *M. tuberculosis* siempre se consideraron asociados a infecciones verdaderas, otros microorganismos como *Enterobacteriaceae* podrían considerarse contaminantes o asociados a infecciones verdaderas dependiendo de si se han aislado en un único órgano o en múltiples y de si se han identificado por cultivos, pruebas moleculares o por ambas técnicas simultáneamente. Sin embargo, estos

criterios obviamente están influenciados, no solo por la sensibilidad y especificidad de las pruebas, sino también por la calidad de las muestras.

Los resultados de este estudio indican que los criterios mencionados pueden sobreestimar la contribución de *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas spp.* como responsable de infecciones que conducen o contribuyen a la muerte, particularmente en procedimientos realizados más de 24 horas después de la muerte. El mayor número de muertes atribuidas a estos microorganismos en el grupo de autopsia tardía (10/68 [14,7%] vs. 15/214 [7,0%] en el grupo de autopsia temprana,  $p=0,0518$ ), y de infecciones que contribuyeron a la muerte (13 /68 [19,1%] en el grupo de autopsia tardía vs. 19/214 [8,9%] en el grupo de autopsia temprana,  $p = 0,0204$ ) están de acuerdo con esta hipótesis. Sin embargo, el número de casos en los que el diagnóstico se estableció con base únicamente en los criterios microbiológicos, lo que podría representar un verdadero sobrediagnóstico, fue muy pequeño (3 casos), mientras que la mayoría de los casos tenían una fuerte evidencia patológica y representaban solo una sobreestimación de la etiología. agente.

La translocación bacteriana es un fenómeno fisiológico que ocurre durante la vida y después de la muerte<sup>367</sup>. Se han aislado bacterias viables que se originan principalmente de la microbiota intestinal en muestras (como sangre) extraídas de cuerpos humanos, lo que proporciona evidencia de que esta translocación bacteriana ocurre antes de la muerte<sup>368</sup>. Los tres factores principales que dan lugar a este fenómeno en el ser humano vivo (alteración de la mucosa intestinal, modificación de la microbiota intestinal y sistema inmunitario debilitado) también se dan después de la muerte<sup>369</sup>. Sin embargo, los resultados reportados en la literatura acerca de la relación entre el IPM y la detección de microorganismos son diversos. Existe cierta controversia con respecto al efecto del IPM en las tasas de aislamiento bacteriano. Se ha reportado un pequeño efecto del IPM sobre las tasas de aislamiento en cultivos de sangre y LCR<sup>370</sup>; en cambio, otros estudios han demostrado que los IPM no tienen influencia sobre el crecimiento bacteriano<sup>371</sup>. Sin

embargo, en la última serie no se tomó ninguna muestra más allá de las 48 horas y solo se incluyó en el análisis el crecimiento puro de bacterias potencialmente patógenas. Los datos publicados que muestran que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium spp.*, *P. aeruginosa*, enterococos y estreptococos tienen un mayor potencial de translocación<sup>332,372</sup> están en consonancia con nuestros hallazgos y enfatizan la necesidad de considerar el IPM al evaluar los resultados microbiológicos relacionados a estas bacterias. Finalmente, un IPM más largo se asoció con un aumento en el número de *Pseudomonas spp.* cepas detectadas con técnicas moleculares. Por el contrario, un aumento de IPM no se asoció con un aumento en el número de cepas de este género en cultivos convencionales. Esto puede estar relacionado con el bajo número de bacterias translocadas, que pueden ser detectadas por herramientas moleculares, pero no por cultivo, ya que las cepas anaerobias limitan el crecimiento de especies con alto potencial de translocación<sup>372</sup>.

En nuestro estudio, los cuerpos fueron refrigerados entre el momento de la muerte y los procedimientos de autopsia. Sin embargo, no se pueden excluir algunos retrasos en la refrigeración con cuerpos expuestos a altas temperaturas. Se ha demostrado que la refrigeración reduce la autólisis<sup>373,374</sup> y la translocación bacteriana<sup>370,375</sup> y, en consecuencia, amplía el período en el que los análisis patológicos y microbiológicos *post mortem* son confiables. La inaccesibilidad a la refrigeración puede reducir el intervalo de eficiencia y, por lo tanto, dificultar la realización del examen *post mortem*.

En el tercer artículo, abordamos la caracterización de una infección fúngica prevalente entre las PVVS. En una gran serie de casi 300 autopsias, realizamos un análisis histopatológico y microbiológico exhaustivo de 17 infecciones criptocócicas fatales, 12 de Mozambique y cinco de Brasil. En Brasil se han realizado varios estudios sobre infección criptocócica<sup>376,377</sup>, pero no hay datos de Mozambique. De hecho, a pesar de ser un área altamente endémica para el VIH, una búsqueda bibliográfica no pudo encontrar informes que describieran la carga de este patógeno en este país. Por lo tanto,

hasta donde sabemos, esta es la descripción más grande basada en autopsias de infecciones criptocócicas fatales en Mozambique. Curiosamente, a pesar de ser Maputo y Manaus dos sitios de diferentes países en términos de clima e ingresos, algunos de los resultados obtenidos fueron muy similares, como la prevalencia del VIH en pacientes fallecidos (más del 60%) y la mortalidad asociada a *Cryptococcus* en pacientes VIH positivos. En este estudio, *Cryptococcus* fue responsable del 10% de las muertes entre los pacientes infectados por el VIH. Esta cifra está de acuerdo con las estimaciones actuales del 15% de las muertes relacionadas con el sida debido a MC<sup>378</sup>. Aunque el tratamiento con TAR ha llevado a una reducción importante en la mortalidad de los pacientes infectados por el VIH en el África subsahariana, en la actualidad, la muerte relacionada con el *Cryptococcus* parece mantenerse similar a las estimaciones de 2008, pudiendo tener porcentajes superiores al 50% de mortalidad cuando se trata de MC<sup>379</sup>. De acuerdo con otras series de autopsias, la criptococosis asociada al VIH se presenta frecuentemente como una infección diseminada<sup>376,377</sup>. Otros estudios han informado que hasta la mitad de las infecciones criptocócicas se detectan en pacientes infectados por el VIH que reciben TAR<sup>380</sup>. En nuestra serie, solo una cuarta parte de los casos de VIH positivos (4/16) estaban bajo TAR. Desafortunadamente, la duración del TAR solo estuvo disponible en un caso. Este caso tenía un historial de TAR de 6 años y una carga viral alta y, por lo tanto, probablemente represente una falla o abandono del tratamiento. Otras explicaciones para la infección criptocócica en pacientes que reciben un TAR adecuado incluyen el inicio reciente del tratamiento en pacientes con recuentos de CD4 muy bajos (diagnóstico tardío de VIH) y casos de síndrome inflamatorio de reconstitución inmune<sup>381</sup>, que también podrían haber estado presentes en nuestra serie. A pesar del progreso en el despliegue del TAR en el África subsahariana, cerca del 50 % de los pacientes infectados por el VIH siguen acudiendo a los centros de salud con la enfermedad avanzada por el VIH<sup>382</sup>, por lo que corren un alto riesgo de infección criptocócica y muerte. En este sentido, el antígeno criptocócico (CrAg, siglas en inglés de *Cryptococcus antigen*) puede detectarse hasta tres semanas antes del inicio de los

síntomas de la MC<sup>357</sup> y, por lo tanto, el cribado de pacientes con VIH asintomáticos seguido de un tratamiento antifúngico preventivo podría identificar a los pacientes con riesgo de desarrollar la enfermedad y contribuir a reducir la mortalidad relacionada con la MC<sup>383,384</sup>. En el presente estudio, la mayoría de los casos fallecieron dentro de la primera semana de ingreso hospitalario, lo que contrasta con otras series que reportan una media de dos semanas entre el ingreso y la muerte<sup>385</sup>. Varios factores podrían haber contribuido al rápido desenlace fatal en nuestra serie. En primer lugar, la baja frecuencia de sospecha clínica de criptococosis puede explicar la ausencia de tratamiento antifúngico prescrito en más de la mitad de los pacientes. Por otro lado, algunos pacientes pueden haberse presentado al hospital con estadios severos avanzados de infección criptocócica, considerando que siete fallecieron dentro de los tres días posteriores al ingreso (cuatro dentro de las 24 horas). El ingreso hospitalario más largo involucró a un niño que murió de meningitis por *C. gattii* unos dos meses después del ingreso hospitalario. Las infecciones por *C. gattii* son raras en niños y, como en el niño de esta serie, la infección suele ocurrir en niños previamente sanos y se presenta con afectación del SNC<sup>385</sup>. El poco conocimiento disponible sobre *C. gattii* en África subsahariana se ha obtenido de estudios realizados en Sudáfrica. Curiosamente, en nuestro estudio, cuatro de las 12 infecciones criptocócicas (25 %) de Mozambique se debieron a infecciones por *C. gattii*. Aunque las cifras son pequeñas y deben interpretarse con cautela, estos datos contrastan con hallazgos previos de Sudáfrica, donde *C. gattii* representó solo el 2,4 % de las cepas criptocócicas aisladas durante un período de dos años<sup>385</sup>. Las infecciones por *C. gattii* se informaron principalmente en huéspedes inmunocompetentes, hasta que estudios de Sudáfrica revelaron que también afecta a pacientes inmunocomprometidos<sup>386,387</sup>. Se ha informado que el tipo molecular VGI *C. gattii* es mucho más probable que afecte a pacientes inmunocompetentes que VGIV<sup>275</sup>. Sin embargo, ambos genotipos se detectaron en pacientes infectados por el VIH en nuestro estudio. Todas las cepas de *C. neoformans var. grubii* eran de tipo molecular VNI y poseían el tipo de sero-apareamiento A $\alpha$ , similar a la mayoría de las

cepas descritas en Sudáfrica. Hasta donde sabemos, este es el primer informe de *C. gattii* en Mozambique, y los tipos B $\alpha$  y C $\alpha$  detectados se han informado previamente en Sudáfrica<sup>388,389</sup>. Aunque no hay puntos de corte clínicos disponibles para *Cryptococcus*, las pruebas de susceptibilidad a los antimicóticos no sugirieron patrones de resistencia claros, y solo se encontraron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) una dilución por encima del punto de corte epidemiológico.

Se han notificado algunos informes aislados de autopsias de infecciones mortales por *C. gattii* en pacientes inmunocompetentes<sup>389</sup>, lo que puede explicarse por el hecho de que en muchos estudios no se realizó la distinción entre *C. gattii* y *C. neoformans*. Aunque los números son pequeños, la diseminación de la infección parece ser menos intensa en pacientes infectados por el VIH con *C. gattii* en comparación con *C. neoformans*. Se necesitan estudios más amplios para evaluar mejor las características histopatológicas de *C. gattii* en pacientes infectados por el VIH. Además, se deben realizar estudios basados en exámenes *post mortem* para evaluar mejor la mortalidad atribuible a patógenos específicos en países de bajos y medianos ingresos. Los datos precisos de mortalidad pueden entonces tener un impacto en las políticas de salud pública, por ejemplo, orientando los planes profilácticos y de tratamiento de enfermedades infecciosas.

Al igual que con la identificación de *C. gattii* y de diversos genotipos de criptococo, la capacidad de los estudios *post mortem* para revelar infecciones no sospechadas y emergentes quedó patente con la identificación de un caso de neumonía fatal por *A. baumannii* multirresistente. Si bien es un patógeno relevante y sobre el cual podemos encontrar una vasta literatura en estudios en Europa y Norteamérica, nuestro conocimiento sobre esta bacteria en África es más limitado. En un estudio realizado en Egipto, Kenia, Marruecos, Sudáfrica y Túnez<sup>390</sup> se encontró una alta prevalencia de *A. baumannii* MDR (este estudio incluyó muestras de Egipto, Kenia, Marruecos, Sudáfrica y Túnez)<sup>390</sup>, pero este estudio y otros no incluyeron aislamientos de Mozambique. Dos

estudios recientes<sup>391,392</sup> (uno de ellos realizado en el Hospital Central de Maputo) informaron *A. baumannii* no MDR en Mozambique, mientras que, hasta donde sabemos, el nuestro es el primer reporte en la literatura de una cepa MDR de *A. baumannii* en Mozambique. De hecho, hay pocos informes sobre la expansión de las cepas MDR de *Acinetobacter* spp. en África Oriental y África en general<sup>390</sup>. Estudios recientes del norte de África describieron tasas de MDR aún más altas de 94 % (117 de 125 aislamientos de Argelia)<sup>393</sup> y 100 % (10 de 10 aislamientos de UCI en Egipto)<sup>394</sup>. Lowings *et al.* informaron en la región de Tshwane (este de Sudáfrica y relativamente cerca de Mozambique) una alta prevalencia de aislamientos MDR de *A. baumannii* recolectados de muestras clínicas<sup>395</sup>. Todos los aislamientos de *A. baumannii* presentaron 100 % de resistencia a ampicilina, amoxicilina, cefuroxima, cefuroxima axetilo, cefoxitina, cefotaxima y nitrofurantoína. El siete por ciento de los aislamientos fueron resistentes a la amikacina. La susceptibilidad a la tigeciclina clasificada como intermedia fue del 2% de los aislados. Los aislamientos de *A. baumannii* mostraron un perfil de resistencia a antibióticos del 67 % y superior a antibióticos como ceftazidima, cefepima, imipenem, meropenem, gentamicina, ciprofloxacina y trimetoprima/sulfametoxazol. En este grupo, ninguno de los aislados fue resistente a la colistina. Se recolectaron dieciséis aislamientos de *A. baumannii* resistente a carbapenem (ABRC) en un centro de atención terciaria de 250 camas, desde enero de 2009 hasta agosto de 2010, en Kenia<sup>396</sup>. Entre los 16 aislamientos, 10 eran de siete pacientes de Kenia, tres eran de dos pacientes de Ruanda y tres eran de un paciente de Tanzania. Se identificaron dos clones distintos de ABRC: clones epidémicos ECII (de las siglas en inglés *European clone II*) y no ECII. La concomitancia de ISAb1-blaOXA-23 fue el principal mecanismo que contribuyó a la ABCR. Este es el primer informe de ECII ABCR y *A. baumannii* New Delhi metalo-b-lactamasa 1 (NDM-1) ampliamente resistente a los medicamentos en África Oriental. La CdM del paciente en este caso fue como consecuencia de una neumonía relacionada con la infección *A. baumannii* MDR. Aunque la adquisición de cepas MDR de *A. baumannii* suele ser durante la hospitalización, no pudimos identificar a ciencia cierta el

origen de esta cepa, ya que no se obtuvieron cultivos al ingreso ni durante la hospitalización del paciente. Hay datos sobre la diseminación de cepas MDR de *A. baumannii* en África Oriental, con diferentes niveles de resistencia, incluida *A. baumannii* ampliamente resistente a los medicamentos en esta región. Se deben aplicar medidas de control muy estrictas para evitar que estos genes de resistencia se propaguen más a otras especies bacterianas. El problema se debe además a las limitaciones en el diagnóstico y la falta de métodos fenotípicos estandarizados para detectar mecanismos de resistencia específicos. El conocimiento de la epidemiología local es necesario para establecer medidas de control más asertivas<sup>397</sup>.

## **Tuberculosis**

En este proyecto se abordó específicamente la mortalidad y carga de enfermedad asociada a la infección por *M. tuberculosis*. El análisis de las causas de muerte en diversos estudios en África subsahariana incluyendo nuestra serie de autopsias<sup>233, 235-237</sup> indica que la tuberculosis representa el patógeno individual que más muertes causa en el mundo (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>). Utilizamos métodos moleculares (Xpert) de alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de tuberculosis en vivos y que fueron previamente validados en muestras cadavéricas<sup>237</sup>. El objetivo no era sólo caracterizar las muertes por tuberculosis sino además revelar la carga total de la enfermedad. Este estudio, el cuarto artículo de esta tesis, que forma parte de uno de los mayores estudios de autopsias realizados en el África subsahariana, demuestra la enorme carga de TB entre niños y adultos, incluidas las muertes maternas, que mueren en un hospital de referencia en Mozambique. En más de la mitad de los adultos HIV positivos se encontraron evidencias de infección tuberculosa. Los casos en los que sólo se detectó ADN de *M. tuberculosis* probablemente representan infecciones recientes en las que todavía no se ha desarrollado una lesión histológica evidenciable en el análisis histopatológico de los tejidos. Estos resultados indican que la carga de enfermedad de TB alcanza niveles

alarmantes bastante superiores a lo que se ha reportado en estudios clínicos y epidemiológicos, muy semejantes a los resultados hallados en países africanos cercanos, los cuales han demostrado una carga de TB muy alta en autopsias. En dos estudios en Zambia y Sudáfrica, el 65 y 50% de las muertes respectivamente fueron causadas por la enfermedad tuberculosa, mayoritariamente en pacientes infectados por el VIH. En un metaanálisis, Gupta et al.<sup>398</sup> describieron que en el 91,4 % (95 % IC 85,8–97,0 %) de los casos en los que la TB estaba presente en el momento de la muerte, también era la CdM primaria. Sin embargo, en nuestro estudio, la TB sólo representó la CdM en la mitad de los casos infectados por TB. Esta discrepancia con otros estudios (una proporción considerable de enfermedad de TB que no causa la muerte) puede explicarse en gran medida por los casos adicionales con TB concomitante que fueron capturados por una evaluación patológica detallada y el uso de TB-PCR y Xpert Ultra en el algoritmo de diagnóstico. Esta herramienta molecular tiene una altísima sensibilidad y seguramente detectó casos que se habrían pasado por alto utilizando herramientas de diagnóstico tradicionales. La detección aislada de ADN de podría representar también una contaminación. Sin embargo, consideramos poco probable que se trate de una contaminación en la sala de autopsias (en cada autopsia se utilizan materiales desechables y el tiempo de exposición de las muestras de tejido a una posible contaminación aérea es limitado) o de un falso positivo de laboratorio (ya que el ADN se detectó mediante dos ensayos diferentes con dianas moleculares diferentes). Si bien el significado de la detección de ADN de tuberculosis en ausencia de lesión histológica es controvertido, estudios recientes indican que podrían existir períodos en el llamado período de latencia o infección inestable durante los cuales *M. tuberculosis* se replica a una tasa más alta, pero esta replicación permanece autocontrolada.<sup>399</sup> Nuestros resultados apoyarían un modelo en el que el espectro de la enfermedad tuberculosa es muy amplio, desde las formas tempranas de TB en las que hay pocos bacilos presentes (que no necesariamente se convertirán en la enfermedad de TB) hasta las lesiones de TB persistentes tradicionales. Posteriormente a este trabajo, nuestro

grupo realizó técnicas de tipaje molecular de alta resolución, permitiendo explorar la diversidad clonal de *M. tuberculosis* directamente en las muestras autopsicas.<sup>400</sup> Estos resultados, de manera similar a los obtenidos con la tipificación de las cepas de *Cryptococcus spp.*, subrayan la utilidad del análisis profundo de las muestras cadavéricas para la tipificación molecular de los patógenos causantes de muerte

Una vez demostrada la alta carga de enfermedad y mortalidad atribuible a la enfermedad tuberculosa es de extrema importancia en el área de estudio, surgió la necesidad de desarrollar estrategias simplificadas de detección de muerte por TB. Por un lado, aunque la autopsia mínimamente invasiva ya representa un avance en cuanto a aplicabilidad en comparación con la autopsia completa, sigue siendo un proceso muy laborioso y de elevado coste económico. Por ello, exploramos el rendimiento de la herramienta molecular utilizada (Xpert) a las muestras de la autopsia mínimamente invasiva. Demostramos que el Xpert utilizado en muestras de la AMI fácilmente accesibles tales como como plasma o LCR, podría diagnosticar o descartar fácil y rápidamente la TB como CdM. Este tipo de análisis tiene un gran potencial ya que, aunque el examen histológico y microbiológico de las muestras de AMI tiene una buena sensibilidad (alrededor del 80 %) <sup>189,191,192</sup>, poder detectar de manera fiable las muertes por tuberculosis con sólo pruebas moleculares de muy fácil realización podría simplificar mucho el proceso. En este estudio, observamos que solo el 15 % de las muertes por TB se habrían pasado por alto al aplicar Xpert Ultra a muestras AMI de pulmón y SNC. Para la elección de las muestras en este sentido, tejidos como el SNC probablemente sean más fiables que el pulmón, ya que la tasa de acierto y cantidad de tejido obtenido durante la punción AMI es superior, lo cual aumentaría la probabilidad de muestrear tejido infectado.<sup>233</sup> Hasta 2/3 de las muertes por TB se habrían diagnosticado realizando Xpert Ultra en una muestra de fácil acceso como el plasma. El plasma es una muestra con un gran potencial para confirmar la TB como CdM dado su alto VPP asociado (0,90 en este contexto) y que rara vez sería positivo si el paciente no hubiera muerto de TB

(especificidad: 0,98). La realización de Xpert en LCR para detección de muertes por TB ofrece una alta especificidad y VPP similares a las obtenidas con plasma. Los resultados obtenidos con estas dos muestras probablemente reflejan que la mayoría de las muertes por TB son causadas por TB diseminada y los bacilos se liberan y se encuentran en grandes cantidades en la sangre periférica y otros compartimentos, como el líquido cefalorraquídeo. Una de las fortalezas de nuestro estudio es haber incluido una muestra muy bien caracterizada de muertes por AC y la inclusión de casos con hallazgos de TB pero que no murieron de TB. Entre las limitaciones, podemos mencionar que el tamaño de la muestra de casos con TB como CdM es limitado y esto afecta el ancho de los intervalos de confianza de nuestros indicadores de rendimiento diagnóstico. En segundo lugar, no pudimos analizar todos los casos de todos los grupos de edad incluidos, dado que no se disponía de muestras AMI para todos los casos, por lo que la prevalencia de TB como CdM no es real en esta muestra, factor que podría afectar la interpretación de VPP y VPN. Por último, la realización de cultivo para TB habría proporcionado una herramienta microbiológica adicional para caracterizar mejor esta serie de muertes, aunque no fue contemplado inicialmente por la complejidad que añadía al proyecto y las muestras fueron recogidas en un tampón inactivante que impedía su posterior procesamiento para cultivo. En conclusión, podemos proponer la realización de este método simplificado para refinar las estadísticas de mortalidad por tuberculosis en áreas de alta prevalencia de la enfermedad, especialmente en zonas donde el diagnóstico clínico presente importantes limitaciones. La clasificación clínica errónea de la TB fue muy frecuente. En >80% de la TB identificada como CdM en AC, los médicos no lograron identificar la TB como el evento que conduce a la muerte y, en general, los médicos pasaron por alto el 67% de los casos con enfermedad de TB al momento de la muerte. Por el contrario, en el 45% de los casos, los médicos establecieron incorrectamente la TB como la principal CdM o la presencia de la enfermedad de TB en el momento de la muerte.

Las discrepancias clinicopatológicas de la enfermedad de TB en el momento de la muerte se informaron anteriormente y tienen implicaciones para el manejo del paciente, así como para estimar la carga de mortalidad por TB.<sup>401,402</sup> El diagnóstico clínico no es un buen proxy de la mortalidad por TB, y contrariamente a lo que se esperaba, fue pobre tanto en los casos VIH positivos como en los VIH negativos con enfermedad tuberculosa. Por lo tanto, es probable que los resultados de las autopsias verbales sean igualmente malos o incluso peores como herramienta para cuantificar la mortalidad por TB.<sup>403,404</sup> No obstante, se necesitan más estudios que comparen las autopsias verbales con la AC para demostrar su utilidad como herramienta para evaluar la carga de mortalidad por TB. Cabe señalar que de los 36 casos con hallazgos de TB en los que los médicos especificaron la TB como un diagnóstico clínico, solo 18 comenzaron con el tratamiento anti-TB (antes o durante la admisión). Las posibles razones de esto pueden ser que cuando el paciente murió, los médicos pudieron haber reconsiderado los posibles diagnósticos del paciente y luego agregaron la TB, o que los pacientes pudieron haber estado demasiado enfermos o fallecieron muy temprano durante la admisión, por lo que no se inició el tratamiento antituberculoso. No se puede descartar la notificación deficiente del inicio del tratamiento antituberculoso.

Nuestros estudios tienen varias limitaciones. Primero, nuestras conclusiones solo pueden generalizarse a pacientes hospitalizados de entornos con características epidemiológicas similares y no representan necesariamente la contribución de la TB a toda la mortalidad basada en la población en Maputo o Mozambique. La probabilidad de ser hospitalizado depende del acceso a la atención médica, la infraestructura de salud, la gravedad de la enfermedad determinada por los trabajadores de la salud y la gravedad percibida por los pacientes y familiares, entre otros factores sociológicos y de comportamiento.

Asimismo, las discrepancias diagnósticas podrían ocurrir con menor frecuencia en los hospitales más grandes, por lo que las encontradas en este estudio (realizado en el

principal hospital de referencia del país) podrían subestimar el número de discrepancias clinicopatológicas en los establecimientos de salud generales de Mozambique. En segundo lugar, como se mencionó anteriormente, todas las muestras de órganos se analizaron histológicamente, pero no todas en su totalidad, por lo que es posible que se hayan pasado por alto algunos casos de TB concomitante. Tercero, el cultivo de TB no estaba contemplado en el diseño del estudio y este método podría haber ayudado a caracterizar mejor los hallazgos microbiológicos. Asimismo, el uso de Xpert Ultra como herramienta de cribado en todos los casos podría haber determinado un mayor número de casos confirmados y permitió estimar el rendimiento agregado del uso de esta tecnología altamente sensible. Por último, la calidad de la información clínica puede haber sido subóptima en algunos casos de pacientes hospitalizados con estado grave de la enfermedad, y su grado de conciencia podría haber provocado un sesgo de información en algunos de los resultados. Por lo tanto, a pesar de la evaluación exhaustiva de todos los registros clínicos disponibles, los pacientes o familiares podrían haber pasado por alto alguna información relevante sobre el historial médico.



## **Conclusiones**



1. La concordancia global entre la autopsia mínimamente invasiva sin información clínica y la autopsia completa para el diagnóstico de la causa de muertes maternas fue moderada (índice kappa = 0.48, 95% CI: 0.31±0.66). Los diagnósticos obtenidos con la autopsia mínimamente invasiva coincidieron con los de la autopsia completa en dos tercios de los casos (artículo 1).
2. La coincidencia diagnóstica fue mayor para las causas de muerte no obstétricas que para las obstétricas. En este último grupo de patologías, la autopsia mínimamente invasiva presenta notables limitaciones cuando la evaluación se realiza a ciegas, sin información clínica (artículo 1).
3. La autopsia mínimamente invasiva tiene potencial para convertirse en una herramienta útil para determinar las causas de muerte materna en países de baja renta (artículo 1).
4. La autopsia mínimamente invasiva realizada con posterioridad a las primeras 24 horas tras el fallecimiento sigue proporcionando información útil que permite alcanzar el diagnóstico en la mayoría de los casos. No obstante, la detección de algunos microorganismos como de Enterobacterias y Pseudomonas en estas autopsias debe hacerse con cautela (artículo 2).
5. Las muestras obtenidas durante la autopsia mínimamente invasiva permiten realizar un estudio detallado de los agentes infecciosos y caracterizar mejor así las infecciones fatales (artículos 3,4,5 y 6).
6. La criptococosis fue responsable del 10% de las muertes en pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana (artículo 3).
7. El análisis de las cepas aisladas de muestras obtenidas durante la autopsia mínimamente invasiva ha permitido identificar por primera vez *Cryptococcus gattii* en Mozambique (artículo 3).

8. La tuberculosis fue una causa frecuente de muerte en niños, adultos y muertes maternas (artículo 4).
9. Existen problemas importantes en el diagnóstico clínico y en el manejo de infecciones prevalentes como la criptococosis y la tuberculosis.
10. La incorporación de técnicas moleculares altamente sensibles en la autopsia permite identificar infecciones que de otro modo hubieran sido mal diagnosticadas (artículo 4).
11. El uso de Xpert Ultra en líquidos corporales, tales como plasma o líquido cefalorraquídeo obtenidos durante la autopsia mínimamente invasiva permiten diagnosticar de forma precisa y muy sensible la tuberculosis en áreas de alta prevalencia (artículo 5).
12. Los estudios microbiológicos han permitido detectar una infección por *Acinetobacter baumannii* multirresistente como causa de neumonía fatal, sugiriendo el estudio de infecciones nosocomiales por gérmenes multirresistentes en África subsahariana (artículo 6).

## Referencias



1. Organización Mundial de la Salud. Organización Mundial de la Salud. 2014 [cited 2021 Jan 6]. Registro civil: por qué es importante contabilizar los nacimientos y las defunciones. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/civil-registration-why-counting-births-and-deaths-is-important>
2. Organización Mundial de la Salud. WHO. 2010 [cited 2021 Feb 26]. OMS | Estadísticas y salud. Available from: <https://www.who.int/features/qa/73/es/>
3. Organización Mundial de la Salud. OMS. 2017 [cited 2021 Jan 6]. p. 1–5 Actualmente se registran las causas de muerte en casi la mitad de todas las defunciones, según datos de la OMS. Available from: <https://www.who.int/es/news/item/17-05-2017-almost-half-of-all-deaths-now-have-a-recorded-cause-who-data-show>
4. King LS, Meehan MC. A history of the autopsy. A review. *Am J Pathol* [Internet]. 1973 Nov;73(2):514–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4586127>
5. van den Tweel JG, Taylor CR. The rise and fall of the autopsy. *Virchows Arch* [Internet]. 2013 Apr 7;462(4):371–80. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00428-013-1387-3>
6. Kharoshah MAA, Zaki MK, Galeb SS, Moulana AAR, Elsebaay EA. Origin and development of forensic medicine in Egypt. *J Forensic Leg Med* [Internet]. 2011 Jan;18(1):10–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jflm.2010.11.009>
7. Temkin O. Byzantine Medicine: Tradition and Empiricism. *Dumbart Oaks Pap* [Internet]. 1962;16(1962):95. Available from: <https://www.jstor.org/stable/1291159?origin=crossref>
8. O’neill Y V. Innocent III and the evolution of anatomy. *Med Hist* [Internet]. 1976 Oct 16;20(4):429–33. Available from: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025727300031252/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025727300031252/type/journal_article)
9. Barcat JA. Autopsies: The beginnings before the end. *Medicina (B Aires)* [Internet]. 2016;76(3):187–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27295710>
10. Park K. The criminal and the saintly body: autopsy and dissection in Renaissance Italy. *Renaiss Q* [Internet]. 1994 Nov 20;47(1):1–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11639270>
11. Mavrodi A, Paraskevas G. Mondino de Luzzi: a luminous figure in the darkness of the Middle Ages. *Croat Med J* [Internet]. 2014 Feb;55(1):50–3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3944418/>
12. de Saint-Maur PP. The birth of the clinicopathological method in France: the rise of morbid anatomy in France during the first half of the nineteenth century. *Virchows Arch* [Internet]. 2012 Jan;460(1):109–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22116207>
13. Neumann PE, Neumann EE. General histological woes: Definition and classification of tissues. *Clin Anat* [Internet]. 2021 Jul 4;34(5):794–801. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ca.23741>
14. Shoja MM, Tubbs RS, Loukas M, Shokouhi G, Ardalan MR. Marie-François Xavier Bichat (1771-1802) and his contributions to the foundations of pathological anatomy and

- modern medicine. *Ann Anat.* 2008;190(5):413–20.
15. Sterne J. Mediate auscultation, the stethoscope, and the “autopsy of the living”: Medicine’s acoustic culture. *J Med Humanit.* 2001;22(2):115–36.
  16. Foucault M. *The Birth of the Clinic* [Internet]. Vol. 1999. Routledge; 2012. 1–6 p. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781135864767>
  17. Taylor CR. From anatomy to surgery to pathology: eighteenth century London and the Hunterian schools. *Virchows Arch* [Internet]. 2010 Oct 23;457(4):405–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20496081>
  18. Hajdu SI. A note from history: microscopic contributions of pioneer pathologists. *Ann Clin Lab Sci* [Internet]. 2011;41(2):201–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21844582>
  19. Hajdu SI. Pathologists who attained fame without using microscopy. *Ann Clin Lab Sci.* 2003;33(1):119–22.
  20. Ortiz-Hidalgo C. Carl von Rokitansky, the Linné of pathological anatomy. *Gac Med Mex* [Internet]. 2020 Apr 20;156(6):584–91. Available from: [http://gacetamedicademexico.com/frame\\_esp.php?id=512](http://gacetamedicademexico.com/frame_esp.php?id=512)
  21. Jay V. The Legacy of Karl Rokitansky. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2000 Mar 1;124(3):345–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10923067>
  22. Hajdu SI. A note from history: Rudolph Virchow, pathologist, armed revolutionist, politician, and anthropologist. *Ann Clin Lab Sci* [Internet]. 2005;35(2):203–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15943187>
  23. Dias N. La société d’autopsie mutuelle ou le dévouement absolu aux progrès de l’anthropologie. *Gradhiva* [Internet]. 1991;10(1):26–36. Available from: [https://www.persee.fr/doc/gradh\\_0764-8928\\_1991\\_num\\_10\\_1\\_1390](https://www.persee.fr/doc/gradh_0764-8928_1991_num_10_1_1390)
  24. Coradazzi AL, Morganti ALC, Montenegro MRG. Discrepancies between clinical diagnoses and autopsy findings. *Brazilian J Med Biol Res.* 2003;36(3):385–91.
  25. Joubert DM, Rossouw SH, Solomon C, Meyer PWA. Discrepancies between clinical diagnoses and autopsy findings: A comparative study conducted in South Africa. *South African Med J.* 2022;112(11):879–82.
  26. Bürgesser MV, Camps D, Calafat P, Diller A. Discrepancies between clinical diagnoses and autopsy findings. *Medicina (B Aires)* [Internet]. 2011;71(2):135–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21550929>
  27. Miller CR, Johnston RD, Blake BH, Aronson JF. The Role of Autopsy in Quality Assurance. *Am J Forensic Med Pathol* [Internet]. 2023 Jul 4;00(00):1–7. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/PAF.0000000000000857>
  28. Tejerina E, Esteban A, Fernández-Segoviano P, María Rodríguez-Barbero J, Gordo F, Frutos-Vivar F, et al. Clinical diagnoses and autopsy findings: discrepancies in critically ill patients. *Crit Care Med* [Internet]. 2012 Mar;40(3):842–6. Available from: <http://journals.lww.com/00003246-201203000-00019>
  29. Goldman L, Sayson R, Robbins S, Cohn LH, Bettmann M, Weisberg M. The value of the

- autopsy in three medical eras. *N Engl J Med* [Internet]. 1983 Apr 28;308(17):1000–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6835306>
30. OPS/OMS. Situación de las estadísticas vitales, de morbilidad y de recursos y servicios en salud de los países de las Américas (informe regional). 2007;167. Available from: <http://relacsis.org/v1/index.php/en/documents-relacsis/regional-plan-for-the-strengthening-of-vital-and-health-statistics-pevs/reports/qzmavt-ziajwx>
  31. Vogel G. Global health. How do you count the dead? *Science* [Internet]. 2012 Jun 15;336(6087):1372–4. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.336.6087.1372>
  32. Bassat Q, Ordi J, Vila J, Ismail MR, Carrilho C, Lacerda M, et al. Development of a post-mortem procedure to reduce the uncertainty regarding causes of death in developing countries. *Lancet Glob Heal* [Internet]. 2013 Sep;1(3):e125-6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X13700378>
  33. Menéndez C, Quintó L, Castillo P, Carrilho C, Ismail MR, Lorenzoni C, et al. Limitations to current methods to estimate cause of death: a validation study of a verbal autopsy model. *Gates open Res* [Internet]. 2020 May 28;4:55. Available from: <https://gatesopenresearch.org/articles/4-55/v1>
  34. Centers for Disease Control and Prevention. Reproductive Health | CDC. 2020 [cited 2021 Mar 16]. Infant Mortality | Maternal and Infant Health. Available from: <https://www.cdc.gov/reproductivehealth/MaternalInfantHealth/InfantMortality.htm>
  35. Sharrow D, Hug L, Liu Y, You D. Levels and trends in child mortality 2020. United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation (UN IGME). 2020.
  36. UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation. Mortality rate, under-5 (per 1,000 live births) [Internet]. [cited 2021 Mar 2]. Available from: <https://data.worldbank.org/indicator/SH.DYN.MORT?view=map>.
  37. Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2016 Dec 17;388(10063):3027–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616315938>
  38. Blencowe H, Cousens S, Jassir FB, Say L, Chou D, Mathers C, et al. National, regional, and worldwide estimates of stillbirth rates in 2015, with trends from 2000: a systematic analysis. *Lancet Glob Heal* [Internet]. 2016 Feb;4(2):e98–108. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26795602>
  39. World Health Organization. World Health Statistics. 2021 [cited 2021 Mar 15]. Child Mortality. Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/child-mortality>
  40. Gupta N, Bharti B, Singhi S, Kumar P, Thakur JS. Errors in filling WHO death certificate in children: lessons from 1251 death certificates. *J Trop Pediatr* [Internet]. 2014 Feb 1;60(1):74–8. Available from: <https://academic.oup.com/tropej/article-lookup/doi/10.1093/tropej/fmt059>
  41. Setel PW, Whiting DR, Hemed Y, Chandramohan D, Wolfson LJ, Alberti KGMM, et al. Validity of verbal autopsy procedures for determining cause of death in Tanzania. *Trop*

- Med Int Heal. 2006;11(5).
42. Fligner CL, Murray J, Roberts DJ. Synergism of verbal autopsy and diagnostic pathology autopsy for improved accuracy of mortality data. Vol. 9, Population Health Metrics. 2011.
  43. Butler D. Verbal autopsy methods questioned. Nature [Internet]. 2010 Oct 28;467(7319):1015. Available from: <https://www.nature.com/articles/4671015a>
  44. Byass P. The unequal world of health data. PLoS Med [Internet]. 2009 Nov;6(11):e1000155. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19956675>
  45. Byass P. Who needs cause-of-death data? PLoS Med [Internet]. 2007 Nov 20;4(11):e333. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18031198>
  46. World Health Organization (WHO). International Classification of Diseases, Eleventh Revision (ICD-11) [Internet]. 11th ed. World Health Organization; 2019 [cited 2021 Mar 28]. Available from: <https://icd.who.int/browse11/l-m/en>
  47. World Health Organization. WHO. 2019 [cited 2021 Feb 2]. WHO Maternal Mortality Fact Sheet. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/maternal-mortality>
  48. World Health Organization. Trends in maternal mortality 2000 to 2017: estimates by WHO, UNICEF, UNFPA, World Bank Group and the United Nations Population Division [Internet]. Geneva; 2019 [cited 2021 Mar 1]. Available from: [https://www.unfpa.org/sites/default/files/pub-pdf/Maternal\\_mortality\\_report.pdf](https://www.unfpa.org/sites/default/files/pub-pdf/Maternal_mortality_report.pdf)
  49. World Health Organization. World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals [Internet]. Geneva; 2017. 1–103 p. Available from: [https://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2017/EN\\_WHS2017\\_TOC.pdf?ua=1](https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2017/EN_WHS2017_TOC.pdf?ua=1)
  50. UNICEF. Delivery Care. 2020 [cited 2021 Mar 2]. Delivery care - UNICEF DATA. Available from: <https://data.unicef.org/topic/maternal-health/delivery-care/>
  51. Say L, Chou D, Gemmill A, Tunçalp Ö, Moller AB, Daniels J, et al. Global causes of maternal death: A WHO systematic analysis. Lancet Glob Heal. 2014;2(6):323–33.
  52. Sonderegger-Iseli K, Burger S, Muntwyler J, Salomon F. Diagnostic errors in three medical eras: a necropsy study. Lancet (London, England) [Internet]. 2000 Jun 10;355(9220):2027–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600023497>
  53. Ronsmans C, Graham WJ, Lancet Maternal Survival Series steering group. Maternal mortality: who, when, where, and why. Lancet (London, England) [Internet]. 2006 Sep 30;368(9542):1189–200. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067360669380X>
  54. Lawson GW, Keirse MJNC. Reflections on the maternal mortality millennium goal. Birth [Internet]. 2013 Jun;40(2):96–102. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/birt.12041>
  55. World Health Organization. World health statistics 2020: monitoring health for the

- SDGs, sustainable development goals [Internet]. Vol. 21. Geneva: World Health Organization; 2020. 1–77 p. Available from: <http://mpoc.org.my/malaysian-palm-oil-industry/>
56. The World Bank. World development report 1993. Investing in health. World development report 1993. Investing in health. 1993.
  57. Lopez AD, AbouZahr C, Shibuya K, Gollogly L. Keeping count: births, deaths, and causes of death. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2007 Nov 24;370(9601):1744–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18029004>
  58. Mahapatra P, Shibuya K, Lopez AD, Coullare F, Notzon FC, Rao C, et al. Civil registration systems and vital statistics: successes and missed opportunities. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2007 Nov 10;370(9599):1653–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673607613087>
  59. Sugarman J, Colvin C, Moran AC, Oxlade O. Tuberculosis in pregnancy: An estimate of the global burden of disease. *Lancet Glob Heal* [Internet]. 2014;2(12):e710–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70330-4](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70330-4)
  60. Mikkelsen L, Phillips DE, AbouZahr C, Setel PW, de Savigny D, Lozano R, et al. A global assessment of civil registration and vital statistics systems: monitoring data quality and progress. *Lancet* [Internet]. 2015 Oct 3;386(10001):1395–406. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60171-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60171-4)
  61. Mikkelsen L, Iburg KM, Adair T, Fürst T, Hegnauer M, von der Lippe E, et al. Assessing the quality of cause of death data in six high-income countries: Australia, Canada, Denmark, Germany, Japan and Switzerland. *Int J Public Health* [Internet]. 2020 Jan;65(1):17–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31932856>
  62. Shojania KG, Burton EC, McDonald KM, Goldman L. Changes in rates of autopsy-detected diagnostic errors over time: a systematic review. *JAMA* [Internet]. 2003 Jun 4;289(21):2849–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12783916>
  63. Taylor TE, Fu WJ, Carr RA, Whitten RO, Mueller JS, Fosiko NG, et al. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat Med* [Internet]. 2004 Feb 1;10(2):143–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm986>
  64. Ordi J, Ismail MR, Carrilho C, Romagosa C, Osman N, Machungo F, et al. Clinico-pathological discrepancies in the diagnosis of causes of maternal death in sub-Saharan Africa: retrospective analysis. *PLoS Med* [Internet]. 2009 Feb 24;6(2):e1000036. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19243215>
  65. Nichols EK, Byass P, Chandramohan D, Clark SJ, Flaxman AD, Jakob R, et al. The WHO 2016 verbal autopsy instrument: An international standard suitable for automated analysis by InterVA, InSilicoVA, and Tariff 2.0. *PLoS Med* [Internet]. 2018 Jan 10;15(1):e1002486. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1002486>
  66. Quigley MA, Armstrong Schellenberg JRM, Snow RW. Algorithms for verbal autopsies: a validation study in Kenyan children. *Bull World Health Organ* [Internet]. 1996;74(2):147–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8706229>
  67. World Health Organization and others. World Health Organization. 1993 [cited 2021 Apr 1]. WHO | Verbal autopsy standards: ascertaining and attributing causes of death. Available from: <https://www.who.int/healthinfo/statistics/verbalautopsystandards/en/>

68. Leitaó J, Desai N, Aleksandrowicz L, Byass P, Miasnikof P, Tollman S, et al. Comparison of physician-certified verbal autopsy with computer-coded verbal autopsy for cause of death assignment in hospitalized patients in low- and middle-income countries: systematic review. *BMC Med* [Internet]. 2014 Feb 4;12(1):22. Available from: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1741-7015-12-22.pdf>
69. UN Statistics Division. Principles and Recommendations for a Vital Statistics System [Internet]. 3rd ed. New York: United Nations; 2014. Available from: <https://unstats.un.org/unsd/demographic/standmeth/principles/M19Rev3en.pdf>
70. Yokobori Y, Obara H, Sugiura Y, Kitamura T. Gaps in the civil registration and vital statistics systems of low- and middle-income countries and the health sector's role in improving the situation. *Glob Heal Med* [Internet]. 2021 Aug 31;3(4):243–5. Available from: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/ghm/3/4/3\\_2020.01103/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/ghm/3/4/3_2020.01103/_article)
71. UN Statistics Division. Demographic and Social Statistics [Internet]. 2023 [cited 2023 May 20]. Available from: <https://unstats.un.org/unsd/demographic-social/crsv/>
72. Heitman K. Of Counts and Causes: The Emergence of the London Bills of Mortality - The Collation [Internet]. [cited 2022 Aug 3]. Available from: <https://collation.folger.edu/2018/03/counts-causes-london-bills-mortality/>
73. Brooks EG, Reed KD. Principles and Pitfalls: a Guide to Death Certification. *Clin Med Res* [Internet]. 2015 Jun;13(2):74–82; quiz 83–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26185270>
74. Mills S, Abouzahr C, Kim J, Rassekh BM, Sarpong D. Civil Registration and Vital Statistics for Monitoring the Sustainable Development Goals [Internet]. Civil Registration and Vital Statistics for Monitoring the Sustainable Development Goals. World Bank, Washington, DC; 2017. Available from: <http://hdl.handle.net/10986/27533>
75. AbouZahr C, de Savigny D, Mikkelsen L, Setel PW, Lozano R, Nichols E, et al. Civil registration and vital statistics: progress in the data revolution for counting and accountability. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2015 Oct 3;386(10001):1373–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25971224>
76. College of American Pathologists, National Association of Medical Examiners. Cause of Death and the Death Certificate [Internet]. Hanzlick R, editor. Northfield: College of American Pathologists (CAP); 2006. 245 p. Available from: <https://www.health.state.mn.us/people/vitalrecords/physician-me/docs/capcodbook.pdf>
77. Heitman K. Authority, autonomy and the first London Bills of Mortality. *Centaurus* [Internet]. 2020 May 27;62(2):275–84. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1600-0498.12305>
78. Brend WA. Bills of Mortality. *Trans Medico-Legal Soc yearÖ* [Internet]. 1907 Jan 4;MLST-5(1):140–54. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1051449X0700500108>
79. Patterson JE. Assessing the quality of vital statistics. *Am J Public Health* [Internet]. 1980 Sep 15;70(9):944–5. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.631736/full>
80. Bramanti B, Stenseth NC, Walløe L, Lei X. Plague: A Disease Which Changed the Path of

- Human Civilization. Yang R, Anisimov A, editors. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2016;918:1–26. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-94-024-0890-4\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-94-024-0890-4_1)
81. Prentice MB, Rahalison L. Plague. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2007 Apr 7;369(9568):1196–207. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17416264>
  82. Riedel S. Plague: from natural disease to bioterrorism. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* [Internet]. 2005 Apr 11;18(2):116–24. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08998280.2005.11928049>
  83. Tognotti E. Lessons from the history of quarantine, from plague to influenza A. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2013 Feb;19(2):254–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3559034/pdf/12-0312.pdf>
  84. Boyce N. Bills of Mortality: tracking disease in early modern London. *Lancet* [Internet]. 2020;395(10231):1186–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30725-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30725-X)
  85. Smith RS. Barcelona “Bills of Mortality” and Population. *J Polit Econ* [Internet]. 1936;44(1):84–93. Available from: <http://www.jstor.org/stable/1823236>
  86. Morabia A. Observations Made Upon the Bills of Mortality. *BMJ* [Internet]. 2013 Jan 7;346(jan07 4):e8640–e8640. Available from: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.e8640>
  87. Welford MR, Bossak BH. Validation of inverse seasonal peak mortality in medieval plagues, including the Black Death, in comparison to modern *Yersinia pestis*-variant diseases. Carter DA, editor. *PLoS One* [Internet]. 2009 Dec 22;4(12):e8401. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0008401>
  88. Davis GG. Mind your manners. Part I: History of death certification and manner of death classification. *Am J Forensic Med Pathol* [Internet]. 1997 Sep;18(3):219–23. Available from: <http://journals.lww.com/00000433-199709000-00001>
  89. Choi BCK. The past, present, and future of public health surveillance. *Scientifica* (Cairo) [Internet]. 2012;2012:1–26. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2012/875253/>
  90. World Health Organization. Vol. 00, World Health Organization. 2006 [cited 2022 Aug 4]. p. 4–13 History of the development of the ICD. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/history-of-the-development-of-the-icd>
  91. National Center for Health Statistics (U.S.). Physician’s handbook on medical certification of death [Internet]. CDC. 2003. Available from: [http://www.cdc.gov/nchs/data/misc/hb\\_cod.pdf%5Cnpapers3://publication/uuid/93E811C7-82FB-4DA3-B7C3-139F0B316B5B](http://www.cdc.gov/nchs/data/misc/hb_cod.pdf%5Cnpapers3://publication/uuid/93E811C7-82FB-4DA3-B7C3-139F0B316B5B)
  92. Curtin SC, Tolson GC, Arias E, Anderson RN. Funeral directors’ handbook on death registration and fetal death reporting : 2019 revision [Internet]. Hyattsville,: National Center for Health Statistics; 2019. iii–56. Available from: <https://www.cdc.gov/nchs/data/nvss/handbook/2019-Funeral-Directors-Handbook-508.pdf>
  93. National Center for Health Statistics (U.S.). Medical Examiner’s and Coroners’ Handbook

- on Death Registration and Fetal Death Reporting [Internet]. Department of Health and Human Services. Hyattsville; 2003. i–130. Available from: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/6636>
94. Office for National Statistics. Guidance for doctors completing Medical Certificates of Cause of Death in England and Wales [Internet]. 2020. Available from: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/877302/guidance-for-doctors-completing-medical-certificates-of-cause-of-death-covid-19.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/877302/guidance-for-doctors-completing-medical-certificates-of-cause-of-death-covid-19.pdf)
  95. Jefatura del Estado. Ley 20/2011, de 21 de julio, del Registro Civil. Documento consolidado BOE-A-2011-12628 [Internet]. 2011. Available from: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2011-12628>
  96. Wexelman BA, Eden E, Rose KM. Survey of New York City resident physicians on cause-of-death reporting, 2010. *Prev Chronic Dis* [Internet]. 2013 May 9;10(3):E76. Available from: [http://www.cdc.gov/pcd/issues/2013/12\\_0288.htm](http://www.cdc.gov/pcd/issues/2013/12_0288.htm)
  97. Fox CS, Evans JC, Larson MG, Lloyd-Jones DM, O'Donnell CJ, Sorlie PD, et al. A comparison of death certificate out-of-hospital coronary heart disease death with physician-adjudicated sudden cardiac death. *Am J Cardiol* [Internet]. 2005 Apr 1;95(7):856–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002914905000093>
  98. Pagidipati NJ, Gaziano TA. Estimating deaths from cardiovascular disease: a review of global methodologies of mortality measurement. *Circulation* [Internet]. 2013 Feb 12;127(6):749–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23401116>
  99. Institute of Medicine. *A Nationwide Framework for Surveillance of Cardiovascular and Chronic Lung Diseases* [Internet]. Washington, D.C.: National Academies Press; 2011. 1–186 p. Available from: <http://www.nap.edu/catalog/13145>
  100. McGinnis JM, Foege WH. Actual causes of death in the United States. *JAMA* [Internet]. 1993 Nov 10;270(18):2207–12. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.291.10.1238>
  101. van Zanden JL, Baten J, Mira d'Ercole M, Rijpma A, Timmer MP, editors. *How Was Life?* [Internet]. How Was Life? OECD; 2014. Available from: [https://www.oecd-ilibrary.org/economics/how-was-life\\_9789264214262-en](https://www.oecd-ilibrary.org/economics/how-was-life_9789264214262-en)
  102. Mikkelsen L, Phillips DE, AbouZahr C, Setel PW, de Savigny D, Lozano R, et al. A global assessment of civil registration and vital statistics systems: monitoring data quality and progress. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2015 Oct 3;386(10001):1395–406. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60171-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60171-4)
  103. Organization WH. *Strengthening civil registration and vital statistics for births, deaths and causes of death: resource kit* [Internet]. Génova: World Health Organization; 2013. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78917>
  104. Mahapatra P, Shibuya K, Lopez AD, Coullare F, Notzon FC, Rao C, et al. Civil registration systems and vital statistics: successes and missed opportunities. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2007 Nov 10;370(9599):1653–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18029006>
  105. Phillips DE, AbouZahr C, Lopez AD, Mikkelsen L, de Savigny D, Lozano R, et al. Are well

- functioning civil registration and vital statistics systems associated with better health outcomes? *Lancet* (London, England) [Internet]. 2015 Oct 3;386(10001):1386–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25971222>
106. Gaete-Darbó A. Appraisal of vital statistics in Latin America. *Milbank Mem Fund Q* [Internet]. 1964 Apr;42(2):86–117. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5889230>
  107. Perry W, Jenkins M V. Plasma gamma glutamyltransferase levels during rifampicin therapy for tuberculosis. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* [Internet]. 1987 Jan 18;25(1):7–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2881896>
  108. Shibuya K, Scheele S, Boerma T. Health statistics: time to get serious. *Bull World Health Organ* [Internet]. 2005 Oct;83(10):722. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16283042>
  109. Ruzicka LT, Lopez AD. The use of cause-of-death statistics for health situation assessment: national and international experiences. *World Health Stat Q* [Internet]. 1990;43(4):249–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2293493>
  110. United Nations. Report on the status of civil registration and vital statistics in Africa: outcome of the Africa programme on accelerated improvement of civil registration and vital statistics systems monitoring framework [Internet]. Addis Ababa; 2017. Available from: <https://hdl.handle.net/10855/24047>
  111. Cairo: Eastern Mediterranean Regional Office of the World Health Organization. Regional strategy for the improvement of civil registration and vital statistics systems [Internet]. Cairo; 2013. Available from: [http://applications.emro.who.int/docs/RC\\_Techn\\_paper\\_2013\\_10\\_15084\\_EN.pdf?ua=1](http://applications.emro.who.int/docs/RC_Techn_paper_2013_10_15084_EN.pdf?ua=1)
  112. Rampatige R, Mikkelsen L, Hernandez B, Riley I, Lopez AD. Hospital cause-of-death statistics: what should we make of them? *Bull World Health Organ* [Internet]. 2014 Jan 1;92(1):3-3A. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3865553/pdf/BLT.13.134106.pdf/>
  113. Rao C, Lopez AD, Yang G, Begg S, Ma J. Evaluating national cause-of-death statistics: principles and application to the case of China. *Bull World Health Organ* [Internet]. 2005 Aug;83(8):618–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16184281>
  114. Burger EH, Groenewald P, Bradshaw D, Ward AM, Yudkin PL, Volmink J. Validation study of cause of death statistics in Cape Town, South Africa, found poor agreement. *J Clin Epidemiol* [Internet]. 2012 Mar;65(3):309–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclinepi.2011.08.007>
  115. Carter K, Hufanga S, Rao C, Akauola S, Lopez AD, Rampatige R, et al. Causes of death in Tonga: Quality of certification and implications for statistics. *Popul Health Metr* [Internet]. 2012;10(1):4. Available from: <http://www.pophealthmetrics.com/content/10/1/4>
  116. González Medina, Alejandro Martínez Natera O. Concordance between death certificate and anatomopathological diagnosis by necropsy in the Hospital Central Militar. *Rev Sanid Milit*. 2001;55(3):95–101.
  117. Hernández B, Ramírez-Villalobos D, Romero M, Gómez S, Atkinson C, Lozano R.

- Assessing quality of medical death certification: Concordance between gold standard diagnosis and underlying cause of death in selected Mexican hospitals. *Popul Health Metr* [Internet]. 2011 Aug 4;9(1):38. Available from: <http://www.pophealthmetrics.com/content/9/1/38>
118. Rao C, Yang G, Hu J, Ma J, Xia W, Lopez AD. Validation of cause-of-death statistics in urban China. *Int J Epidemiol* [Internet]. 2007 Jun 1;36(3):642–51. Available from: <https://academic.oup.com/ije/article-lookup/doi/10.1093/ije/dym003>
  119. Pattaraarchachai J, Rao C, Polprasert W, Porapakkham Y, Pao-In W, Singwerathum N, et al. Cause-specific mortality patterns among hospital deaths in Thailand: validating routine death certification. *Popul Health Metr* [Internet]. 2010 May 18;8(1):12. Available from: <https://pophealthmetrics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1478-7954-8-12>
  120. Shojania KG, Burton EC, McDonald KM, Goldman L. Changes in Rates of Autopsy-Detected Diagnostic Errors Over Time. *JAMA* [Internet]. 2003 Jun 4;289(21):2849. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12783916>
  121. Hazard RH, Chowdhury HR, Adair T, Ansar A, Quaiyum Rahman AM, Alam S, et al. The quality of medical death certification of cause of death in hospitals in rural Bangladesh: impact of introducing the International Form of Medical Certificate of Cause of Death. *BMC Health Serv Res* [Internet]. 2017 Oct 2;17(1):688. Available from: <http://bmchealthservres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12913-017-2628-y>
  122. World Health Organization. Lay reporting of health information [Internet]. 1978 [cited 2022 Aug 6]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40314>
  123. Thomas LM, D’Ambruoso L, Balabanova D. Verbal autopsy in health policy and systems: a literature review. *BMJ Glob Heal* [Internet]. 2018 May 3;3(2):e000639. Available from: <https://gh.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjgh-2017-000639>
  124. World Health Organization. Vol. 220, World Health Organization. 1999 [cited 2022 Aug 8]. p. 83 A Standard verbal autopsy method for investigating causes of death in infants and children / by Martha Anker ... [et al.]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66081>
  125. Campbell O, Ronsmans C, World Health Organization, et al. World Health Organization. 1995. Verbal autopsies for maternal deaths: World Health Organization workshop, London, 10–13 January 1994. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/61029/WHO\\_FHE\\_MSM\\_95.15.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/61029/WHO_FHE_MSM_95.15.pdf)
  126. Yang G, Rao C, Ma J, Wang L, Wan X, Dubrovsky G, et al. Validation of verbal autopsy procedures for adult deaths in China. *Int J Epidemiol* [Internet]. 2006 Jun 1;35(3):741–8. Available from: <http://academic.oup.com/ije/article/35/3/741/735507/Validation-of-verbal-autopsy-procedures-for-adult>
  127. Ministry of Health United Republic of Tanzania. The policy implications of adult morbidity and mortality Vol 3: field operations and validation studies. 2004.
  128. World Health Organization. Verbal autopsy standards: ascertaining and attributing causes of death. World Health Organization. Geneva; 2007.
  129. World Health Organization. Verbal autopsy standards: ascertaining and attributing causes of death tool [Internet]. 2016. Available from:

- <https://www.who.int/standards/classifications/other-classifications/verbal-autopsy-standards-ascertaining-and-attributing-causes-of-death-tool>
130. World Health Organization. Verbal autopsy standards: ascertaining and attributing causes of death tool [Internet]. 2014. Available from: <https://www.who.int/standards/classifications/other-classifications/verbal-autopsy-standards-ascertaining-and-attributing-causes-of-death-tool>
  131. World Health Organization. Verbal autopsy standards: ascertaining and attributing causes of death tool [Internet]. 2012. Available from: <https://www.who.int/standards/classifications/other-classifications/verbal-autopsy-standards-ascertaining-and-attributing-causes-of-death-tool>
  132. Chandramohan D, Fottrell E, Leitao J, Nichols E, Clark SJ, Alsokhn C, et al. Estimating causes of death where there is no medical certification: evolution and state of the art of verbal autopsy. *Glob Health Action* [Internet]. 2021 Oct 26;14(sup1):1982486. Available from: <https://doi.org/10.1080/16549716.2021.1982486>
  133. Byass P, Herbst K, Fottrell E, Ali MM, Odhiambo F, Amek N, et al. Comparing verbal autopsy cause of death findings as determined by physician coding and probabilistic modelling: a public health analysis of 54 000 deaths in Africa and Asia. *J Glob Health* [Internet]. 2015 Jun;5(1):010402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25734004>
  134. AbouZahr C, de Savigny D, Mikkelsen L, Setel PW, Lozano R, Lopez AD. Towards universal civil registration and vital statistics systems: the time is now. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2015 Oct 3;386(10001):1407–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25971217>
  135. World Health Organization. Verbal autopsy standards: the 2014 WHO verbal autopsy instrument [Internet]. 2014. Available from: <http://www.who.int/healthinfo/statistics/verbalautopsystandards/en/index1.html>
  136. McCormick TH, Li ZR, Calvert C, Crampin AC, Kahn K, Clark SJ. Probabilistic Cause-of-death Assignment using Verbal Autopsies. *J Am Stat Assoc* [Internet]. 2016 Jul 2;111(515):1036–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/01621459.2016.1152191>
  137. Byass P, Hussain-Alkhateeb L, D’Ambruoso L, Clark S, Davies J, Fottrell E, et al. An integrated approach to processing WHO-2016 verbal autopsy data: the InterVA-5 model. *BMC Med* [Internet]. 2019 May 30;17(1):102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31146736>
  138. Serina P, Riley I, Stewart A, James SL, Flaxman AD, Lozano R, et al. Improving performance of the Tariff Method for assigning causes of death to verbal autopsies. *BMC Med* [Internet]. 2015;13(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-015-0527-9>
  139. Arasu VA, Habel LA, Achacoso NS, Buist DSM, Cord JB, Esserman LJ, et al. Comparison of Mammography AI Algorithms with a Clinical Risk Model for 5-year Breast Cancer Risk Prediction: An Observational Study. *Radiology* [Internet]. 2023 Jun 21 [cited 2022 Aug 13];307(5):e222733. Available from: <https://arxiv.org/abs/1802.07807v1>
  140. Clark SJ, Bratschi MW, Setel P, Abouzahr C, Li Z, McCormick T, et al. Verbal Autopsy in

- Civil Registration and Vital Statistics: The Symptom-Cause Information Archive. 2019.
141. De Savigny D, Renggli S, Cobos D, Collinson M, Sankoh O. Maximizing Synergies between Health Observatories and CRVS: Guidance for INDEPTH HDSS Sites and CRVS Stakeholders for the INDEPTH Network and the Bloomberg Data for Health Initiative [Internet]. 2018. Available from: [www.indepth-network.org](http://www.indepth-network.org)
  142. de Savigny D, Riley I, Chandramohan D, Odhiambo F, Nichols E, Notzon S, et al. Integrating community-based verbal autopsy into civil registration and vital statistics (CRVS): system-level considerations. *Glob Health Action* [Internet]. 2017;10(1):1272882. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28137194>
  143. Adair T, Rajasekhar M, Bo KS, Hart J, Kwa V, Mukut MAA, et al. Where there is no hospital: improving the notification of community deaths. *BMC Med* [Internet]. 2020 Mar 9;18(1):65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32146904>
  144. Blanco A, Perez A, Casillas A, Cobos D. Extracting Cause of Death From Verbal Autopsy With Deep Learning Interpretable Methods. *IEEE J Biomed Heal informatics* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2023 Jan 9];25(4):1315–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32749982/>
  145. Byass P, Kahn K, Fottrell E, Collinson MA, Tollman SM. Moving from data on deaths to public health policy in Agincourt, South Africa: approaches to analysing and understanding verbal autopsy findings. Mathers C, editor. *PLoS Med* [Internet]. 2010 Aug 17;7(8):e1000325. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1000325>
  146. Bauni E, Ndila C, Mochamah G, Nyutu G, Matata L, Ondieki C, et al. Validating physician-certified verbal autopsy and probabilistic modeling (InterVA) approaches to verbal autopsy interpretation using hospital causes of adult deaths. *Popul Health Metr* [Internet]. 2011 Aug 5;9(1):49. Available from: <http://www.pophealthmetrics.com/content/9/1/49>
  147. Tensou B, Araya T, Telake DS, Byass P, Berhane Y, Kebebew T, et al. Evaluating the InterVA model for determining AIDS mortality from verbal autopsies in the adult population of Addis Ababa. *Trop Med Int Heal* [Internet]. 2010 Feb;15(5):547–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20214760>
  148. Hill RB, Anderson RE. The recent history of the autopsy. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 1996 Aug;120(8):702–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8718895>
  149. Ferrara SD, Cecchetto G, Cecchi R, Favretto D, Grabherr S, Ishikawa T, et al. Back to the Future - Part 2. Post-mortem assessment and evolutionary role of the bio-medicolegal sciences. *Int J Legal Med* [Internet]. 2017 Jul;131(4):1085–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28444439>
  150. Cecchetto G, Bajanowski T, Cecchi R, Favretto D, Grabherr S, Ishikawa T, et al. Back to the Future - Part 1. The medico-legal autopsy from ancient civilization to the post-genomic era. *Int J Legal Med* [Internet]. 2017 Jul;131(4):1069–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28439696>
  151. Xiao J, Krueger GRF, Buja LM, Covinsky M. The impact of declining clinical autopsy: need for revised healthcare policy. *Am J Med Sci* [Internet]. 2009 Jan;337(1):41–6. Available

- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19155753>
152. van den Tweel JG, Wittekind C. The medical autopsy as quality assurance tool in clinical medicine: dreams and realities. *Virchows Arch* [Internet]. 2016 Jan 28;468(1):75–81. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00428-015-1833-5>
  153. Turnbull A, Osborn M, Nicholas N. Hospital autopsy: Endangered or extinct? *J Clin Pathol* [Internet]. 2015 Aug;68(8):601–4. Available from: <http://jcp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jclinpath-2014-202700>
  154. Global Tuberculosis Programme. *Global tuberculosis report 2020*. Geneva; 2020.
  155. World Health Organization. Genève, Switzerland. 2020 [cited 2021 Aug 26]. *Weekly epidemiological update - 29 December 2020*. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update---29-december-2020>
  156. DeWeerd S. Vaccines: An age-old problem. *Nature* [Internet]. 2013 Oct 10;502(7470):S8-9. Available from: <https://www.nature.com/articles/502S8a>
  157. Fauci AS, Eisinger RW. Reimagining the Research Approach to Tuberculosis†. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2018 Mar;98(3):650–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29363452>
  158. Huang L, Russell DG. Protective immunity against tuberculosis: what does it look like and how do we find it? *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2017 Oct;48:44–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2017.08.001>
  159. Andersen P, Woodworth JS. Tuberculosis vaccines - rethinking the current paradigm. *Trends Immunol* [Internet]. 2014;35(8):387–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2014.04.006>
  160. Nunes-Alves C, Booty MG, Carpenter SM, Jayaraman P, Rothchild AC, Behar SM. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2014 Apr 3;12(4):289–99. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro3230>
  161. Hill RB, Anderson RE. *The autopsy: medical practice and public policy*. Stoneham, MA: Butterworths; 1988. 294 p.
  162. Slavin G, Kirkham N, Underwood J, Holt J. *The autopsy and audit. Report of the Joint Working Party of the Royal College of Pathologists, The Royal College of Physicians of London and the Royal College of Surgeons of England*. London: The Royal College of Pathologists; 1991.
  163. Hamza A. Declining rate of autopsies: implications for anatomic pathology residents. *Autops case reports* [Internet]. 2017;7(4):1–2. Available from: <http://autopsyandcasereports.org/article/doi/10.4322/acr.2017.036>
  164. Veress B, Alafuzoff I. A retrospective analysis of clinical diagnoses and autopsy findings in 3,042 cases during two different time periods. *Hum Pathol* [Internet]. 1994 Feb;25(2):140–5. Available from: [https://ac-els-cdn-com.ezproxy.library.ubc.ca/0046817794902690/1-s2.0-0046817794902690-main.pdf?\\_tid=a21d75f7-9540-41d1-b3d2-049e11357e33&acdnat=1524844810\\_63587e290c4d6f65b1ea5bc33f74da84](https://ac-els-cdn-com.ezproxy.library.ubc.ca/0046817794902690/1-s2.0-0046817794902690-main.pdf?_tid=a21d75f7-9540-41d1-b3d2-049e11357e33&acdnat=1524844810_63587e290c4d6f65b1ea5bc33f74da84)

165. Alafuzoff I, Veress B. The selection for post-mortem examination: a retrospective analysis of 74 deceased surgical cases. *Qual Assur Heal care* [Internet]. 1993 Dec 1;5(4):345–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8018894>
166. Shanks JH, McCluggage G, Anderson NH, Toner PG. Value of the necropsy in perioperative deaths. *J Clin Pathol*. 1990;43(3):193–5.
167. Adair T. Who dies where? Estimating the percentage of deaths that occur at home. *BMJ Glob Heal* [Internet]. 2021 Sep;6(9):e006766. Available from: <https://gh.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjgh-2021-006766>
168. Ugiagbe EE, Osifo OD. Postmortem examinations on deceased neonates: a rarely utilized procedure in an African referral center. *Pediatr Dev Pathol* [Internet]. 2012 Jan 1;15(1):1–4. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.2350/10-12-0952-OA.1>
169. Ismail MR, Noormahomed E V., Lawicki S, Eichbaum Q. Survey of Clinical and Anatomic Pathology Laboratory Infrastructure in Mozambique. *Am J Clin Pathol*. 2021;156(5):810–7.
170. Gray IP, Carter JY. An evaluation of clinical laboratory services in sub-Saharan Africa. *Ex africa semper aliquid novi?* *Clin Chim Acta* [Internet]. 1997 Nov 6;267(1):103–28. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898197001800>
171. Lishimpi K, Chintu C, Lucas S, Mudenda V, Kaluwaji J, Story A, et al. Necropsies in African children: consent dilemmas for parents and guardians. *Arch Dis Child* [Internet]. 2001 Jun 1;84(6):463–7. Available from: <https://adc.bmj.com/lookup/doi/10.1136/adc.84.6.463>
172. Bunei M, Muturi P, Otiato F, Njuguna HN, Emukule GO, Otieno NA, et al. Factors Influencing Acceptance of Post-Mortem Examination of Children at a Tertiary Care Hospital in Nairobi, Kenya. *Ann Glob Heal* [Internet]. 2019 Jul 3;85(1):1–8. Available from: <https://annalsofglobalhealth.org/articles/10.5334/aogh.2482>
173. Yawson AE, Tette E, Tettey Y. Through the lens of the clinician: autopsy services and utilization in a large teaching hospital in Ghana. *BMC Res Notes* [Internet]. 2014 Dec 23;7(1):943. Available from: <http://bmcrenotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-7-943>
174. Bassat Q, Castillo P, Alonso PL, Ordi J, Menéndez C. Resuscitating the Dying Autopsy. *PLoS Med* [Internet]. 2016 Jan 12;13(1):e1001927. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1001927>
175. Nichols EK, Byass P, Chandramohan D, Clark SJ, Flaxman AD, Jakob R, et al. The WHO 2016 verbal autopsy instrument: An international standard suitable for automated analysis by InterVA, InSilicoVA, and Tariff 2.0. *PLoS Med*. 2018;15(1):1–9.
176. Fernandes F, Castillo P, Bassat Q, Quintó L, Hurtado JC, Martínez MJ, et al. Contribution of the clinical information to the accuracy of the minimally invasive and the complete diagnostic autopsy. *Hum Pathol* [Internet]. 2019 Mar;85:184–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.10.037>
177. Castillo P, Ussene E, Ismail MR, Jordao D, Lovane L, Carrilho C, et al. Pathological Methods Applied to the Investigation of Causes of Death in Developing Countries: Minimally Invasive Autopsy Approach. Cappello F, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jun

- 30;10(6):e0132057. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0132057>
178. Maixenchs M, Anselmo R, Zielinski-Gutiérrez E, Odhiambo FO, Akello C, Ondire M, et al. Willingness to Know the Cause of Death and Hypothetical Acceptability of the Minimally Invasive Autopsy in Six Diverse African and Asian Settings: A Mixed Methods Socio-Behavioural Study. Byass P, editor. *PLoS Med* [Internet]. 2016 Nov 22;13(11):e1002172. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1002172>
  179. Wright JR. Sins of our fathers: two of The Four Doctors and their roles in the development of techniques to permit covert autopsies. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2009 Dec 1;133(12):1969–74. Available from: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/133/12/1969/460658/Sins-of-Our-Fathers-Two-of-The-Four-Doctors-and>
  180. Mejía Rodríguez P. De ratones, vacunas y hombres: el programa de fiebre amarilla de la Fundación Rockefeller en Colombia, 1932-1948. *Dynamis* [Internet]. 2004;24:119–55. Available from: <https://raco.cat/index.php/Dynamis/article/view/113910>.
  181. Weustink AC, Hunink MGM, van Dijke CF, Renken NS, Krestin GP, Oosterhuis JW. Minimally invasive autopsy: an alternative to conventional autopsy? *Radiology* [Internet]. 2009 Mar;250(3):897–904. Available from: <http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.2503080421>
  182. Paganelli CR, Goco NJ, McClure EM, Banke KK, Blau DM, Breiman RF, et al. The evolution of minimally invasive tissue sampling in postmortem examination: a narrative review. *Glob Health Action* [Internet]. 2020;13(1). Available from: <https://doi.org/10.1080/16549716.2020.1792682>
  183. Joseph TI, Girish KL, Sathyan P, Kiran MS, Vidya S. Virtopsy: An integration of forensic science and imageology. *J Forensic Dent Sci* [Internet]. 2017;9(3):111–4. Available from: <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijfmt&volume=13&issue=3&article=004>
  184. Underwood JC, Slater DN, Parsons MA. The needle necropsy. *Br Med J (Clin Res Ed)* [Internet]. 1983 May 21;286(6378):1632–4. Available from: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.286.6382.1974-a>
  185. Baumgart KW, Cook M, Quin J, Painter D, Gatenby PA, Garsia RJ. The limited (needle biopsy) autopsy and the acquired immunodeficiency syndrome. *Pathology* [Internet]. 1994 Apr;26(2):141–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8090586>
  186. Celiloğlu ÖS, Celiloğlu C, Kurnaz E, Özdemir R, Karadağ A. Diagnostic contribution of postmortem needle biopsies in neonates. *Turk Patoloji Derg* [Internet]. 2013;29(2):122–6. Available from: <http://www.turkpath.org/doi.php?doi=10.5146/tjpath.2013.01162>
  187. Cox JA, Lukande RL, Kalungi S, Van Marck E, Van de Vijver K, Kambugu A, et al. Needle autopsy to establish the cause of death in HIV-infected hospitalized adults in Uganda: a comparison to complete autopsy. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2014 Oct 1;67(2):169–76. Available from: <https://journals.lww.com/00126334-201410010-00009>
  188. Cox JA, Lukande RL, Kalungi S, Van de Vijver K, Van Marck E, Nelson AM, et al. Practice of percutaneous needle autopsy; a descriptive study reporting experiences from Uganda. *BMC Clin Pathol* [Internet]. 2014 Dec 3;14(1):44. Available from: <https://bmcclinpathol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6890-14-44>

189. Castillo P, Martínez MJ, Ussene E, Jordao D, Lovane L, Ismail MR, et al. Validity of a Minimally Invasive Autopsy for Cause of Death Determination in Adults in Mozambique: An Observational Study. Byass P, editor. *PLoS Med* [Internet]. 2016 Nov 22;13(11):e1002171. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1002171>
190. Martínez MJ, Massora S, Mandomando I, Ussene E, Jordao D, Lovane L, et al. Infectious cause of death determination using minimally invasive autopsies in developing countries. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2016 Jan;84(1):80–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.002>
191. Menendez C, Castillo P, Martínez MJ, Jordao D, Lovane L, Ismail MR, et al. Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in stillborn babies and neonates in Mozambique: An observational study. Byass P, editor. *PLoS Med* [Internet]. 2017 Jun 20;14(6):e1002318. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1002318>
192. Bassat Q, Castillo P, Martínez MJ, Jordao D, Lovane L, Hurtado JC, et al. Validity of a minimally invasive autopsy tool for cause of death determination in pediatric deaths in Mozambique: An observational study. *PLoS Med*. 2017;14(6).
193. Byass P. Minimally Invasive Autopsy: A New Paradigm for Understanding Global Health? *PLoS Med* [Internet]. 2016 Nov;13(11):e1002173. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27875535>
194. Farag TH, Koplan JP, Breiman RF, Madhi SA, Heaton PM, Mundel T, et al. Precisely Tracking Childhood Death. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2017 Jul;97(1):3–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28719334>
195. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med* [Internet]. 2006 Nov;100(11):1862–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949809>
196. Donoghue HD. Paleomicrobiology of Human Tuberculosis. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2016 Aug;4(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27726782>
197. Dubos RJ, Dubos J. *The white plague: tuberculosis, man, and society*. 1st editio. Boston: Little, Brown and Company; 1952. 277 p.
198. Landers J. *Death and the Metropolis* [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press; 1993. Available from: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/9780511895494/type/book>
199. Vynnycky E, Fine PEM. Interpreting the decline in tuberculosis: the role of secular trends in effective contact. *Int J Epidemiol* [Internet]. 1999 Apr 1 [cited 2021 Jun 16];28(2):327–34. Available from: <https://academic.oup.com/ije/article/28/2/327/655249>
200. Fitzgerald DW, Sterling TR, Haas DW. *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bennett J, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 9th Edition* [Internet]. 9th ed. Elsevier; 2019 [cited 2021 Jun 1]. p. 2985–3021. Available from: <https://www.elsevier.com/books/mandell-douglas-and-bennetts-principles-and-practice-of-infectious-diseases/bennett/978-0-323-48255-4>
201. Gagneux S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol* 2018 164 [Internet]. 2018 Feb 19 [cited 2021 Aug 3];16(4):202–13. Available from:

- <https://www-nature-com.sire.ub.edu/articles/nrmicro.2018.8>
202. Evans JT, Smith EG, Banerjee A, Smith RM, Dale J, Innes JA, et al. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* [Internet]. 2007;369(9569):1270–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60598-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60598-4)
  203. Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2007 May;7(5):328–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17448936>
  204. Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Oct 1;45(10):1176–82. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000477>
  205. UNAIDS. UNAIDS [online]. 2020 [cited 2021 Jan 6]. p. 2021 Global HIV & AIDS statistics. World AIDS day 2020 fact sheet. Available from: [https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet%0Ahttps://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/UNAIDS\\_FactSheet\\_en.pdf](https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet%0Ahttps://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf)
  206. WHO. Maternal deaths. [Internet]. [cited 2021 Mar 28]. Available from: <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/4622>
  207. Snow KJ, Bekker A, Huang G.K., Graham SM. Tuberculosis in pregnant women and neonates: A meta-review of current evidence [Internet]. Vol. 36, Paediatric Respiratory Reviews. *Paediatr Respir Rev*; 2020 [cited 2021 Aug 4]. p. 27–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32144052/>
  208. Sugarman J, Colvin C, Moran AC, Oxlade O. Tuberculosis in pregnancy: an estimate of the global burden of disease. *Lancet Glob Heal* [Internet]. 2014 Dec;2(12):e710–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X14703304>
  209. Roulson J, Benbow EW, Hasleton PS. Discrepancies between clinical and autopsy diagnosis and the value of post mortem histology; a meta-analysis and review. *Histopathology* [Internet]. 2005 Dec 22;47(6):551–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2559.2005.02243.x>
  210. d’Arminio Monforte A, Vago L, Gori A, Antinori S, Franzetti F, Antonacci CM, et al. Clinical diagnosis of mycobacterial diseases versus autopsy findings in 350 patients with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 1996 Jun;15(6):453–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01691311>
  211. Stevanovic G, Tucakovic G, Dotlic R, Kanjuh V. Correlation of clinical diagnoses with autopsy findings: a retrospective study of 2,145 consecutive autopsies. *Hum Pathol* [Internet]. 1986 Dec;17(12):1225–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817786805640>
  212. Ordi J, Ismail MR, Carrilho C, Romagosa C, Osman N, Machungo F, et al. Clinico-pathological discrepancies in the diagnosis of causes of maternal death in sub-Saharan Africa: Retrospective analysis. *PLoS Med*. 2009;6(2):0174–80.
  213. Juul A. Clinically undiagnosed active tuberculosis. Experience from an autopsy material.

- Acta Med Scand [Internet]. 1977;202(3):225–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/910640>
214. Cameron HM, McGoogan E. A prospective study of 1152 hospital autopsies: II. Analysis of inaccuracies in clinical diagnoses and their significance. *J Pathol* [Internet]. 1981 Apr;133(4):285–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7241268>
  215. Sarode VR, Datta BN, Banerjee AK, Banerjee CK, Joshi K, Bhusnurmath B, et al. Autopsy findings and clinical diagnoses: a review of 1,000 cases. *Hum Pathol* [Internet]. 1993 Feb;24(2):194–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0046817793903006>
  216. World Health Organization. End TB Strategy [Internet]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Geneva; 2015 Dec. Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/the-end-tb-strategy>
  217. World Health Organization. WHO policy on collaborative TB / HIV activities Guidelines for national programmes and other stakeholders. Vol. 330, World Health Organization. 2012.
  218. Fukunaga R, Glaziou P, Harris JB, Date A, Floyd K, Kasaeva T. Epidemiology of Tuberculosis and Progress Toward Meeting Global Targets - Worldwide, 2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2021 Mar 26 [cited 2021 Aug 25];70(12):427–30. Available from: </pmc/articles/PMC7993552/>
  219. Uplekar M, Weil D, Lonnroth K, Jaramillo E, Lienhardt C, Dias HM, et al. WHO's new End TB Strategy. *Lancet* [Internet]. 2015 May 2;385(9979):1799–801. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673615605700>
  220. García-Basteiro AL, Brew J, Williams B, Borgdorff M, Cobelens F. What is the true tuberculosis mortality burden? Differences in estimates by the World Health Organization and the Global Burden of Disease study. *Int J Epidemiol* [Internet]. 2018;47(5):1549–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30010785>
  221. Firacative C. Invasive fungal disease in humans: are we aware of the real impact? *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2020;115(9):e200430. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33053052>
  222. Nathan CL, Emmert BE, Nelson E, Berger JR. CNS fungal infections: A review. *J Neurol Sci* [Internet]. 2021 Mar 15;422(November 2020):117325. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2021.117325>
  223. Sharma RR. Fungal infections of the nervous system : Current perspective and controversies in management. *Int J Surg* [Internet]. 2010;8(8):591–601. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijsu.2010.07.293>
  224. Charalambous LT, Premji A, Tybout C, Hunt A, Cutshaw D, Elsamadicy AA, et al. Prevalence, healthcare resource utilization and overall burden of fungal meningitis in the United States. *J Med Microbiol* [Internet]. 2018 Feb;67(2):215–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29244019>
  225. Voelz K, May RC. Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryot Cell* [Internet]. 2010 Jun;9(6):835–46. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/EC.00039-10>

226. Mitchell TG, Castañeda E, Nielsen K, Wanke B, Lazéra MS. Environmental Niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A, editors. *Cryptococcus* [Internet]. Washington, DC, USA: ASM Press; 2014. p. 235–59. Available from: <https://doi.org/10.1128/9781555816858.ch18>
227. Chang CC, Sorrell TC, Chen SCA. Pulmonary Cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med* [Internet]. 2015 Oct;36(5):681–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26398535>
228. Srikanta D, Santiago-Tirado FH, Doering TL. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast* [Internet]. 2014 Feb;31(2):47–60. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.2997>
229. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010 Feb 1;50(3):291–322. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/50/3/291/392360>
230. Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* [Internet]. 2002 Nov;51(4):804–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.2307/1555045>
231. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Public Health Image Library (PHIL) [Internet]. [cited 2021 Jun 5]. Available from: <https://phil.cdc.gov/default.aspx>
232. Sampaio A, Sampaio JP, Leão C. Dynamics of yeast populations recovered from decaying leaves in a nonpolluted stream: A 2-year study on the effects of leaf litter type and decomposition time. *FEMS Yeast Res.* 2007;7(4):595–603.
233. Springer DJ, Billmyre RB, Filler EE, Voelz K, Pursall R, Mieczkowski PA, et al. *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. Rappleye CA, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2014 Aug 21;10(8):e1004285. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004285>
234. Chowdhary A, Rhandhawa HS, Prakash A, Meis JF. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 2012 Feb;38(1):1–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133016>
235. De García V, Brizzio S, Libkind D, Buzzini P, Van Broock M. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiol Ecol.* 2007;59(2):331–41.
236. Russo G, Libkind D, Sampaio JP, Van Broock MR. Yeast diversity in the acidic Rio Agriol-Lake Cavihue volcanic environment (Patagonia, Argentina). *FEMS Microbiol Ecol.* 2008;65(3):415–24.
237. Ergin C, Ilkit M, Kaftanoglu O. Detection of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Nachweis von Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in Stocken der Honigbiene (*Apis mellifera*). *Mycoses.* 2004;47(9–10):431–4.
238. Baroni FDA, Paula CR, Da Silva ÉG, Viani FC, Rivera ING, De Oliveira MTB, et al.

- Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006;48(2):71–5.
239. Vimercati L, Hamsher S, Schubert Z, Schmidt SK. Growth of high-elevation *Cryptococcus* sp. during extreme freeze–thaw cycles. *Extremophiles*. 2016;20(5):579–88.
240. May RC, Stone NRH, Wiesner DL, Bicanic T, Nielsen K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2016 Feb 21;14(2):106–17. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2015.6>
241. Litvintseva AP, Carbone I, Rossouw J, Thakur R, Govender NP, Mitchell TG. Evidence that the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* may have evolved in Africa. Nielsen K, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 May 11;6(5):e19688. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0019688>
242. Criseo G, Gallo M, Pernice A. Killer activity at different pHs against *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype A by environmental yeast isolates. *Mycoses* [Internet]. 1999;42(11–12):601–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10680435>
243. Bosch C, Bhana Z, Toplis B, Volschenk H, Botha A. Transcriptomic response of *Cryptococcus neoformans* to ecologically relevant nitrogen concentrations. *FEMS Yeast Res* [Internet]. 2021 May 10;21(4):1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33893798>
244. Kielstein, Hotzel, Schmalreck, Khaschabi, Glawischnig. Occurrence of *Cryptococcus* spp. in excreta of pigeons and pet birds. *Mycoses* [Internet]. 2000 Mar;43(1–2):7–15. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1439-0507.2000.00534.x>
245. Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. Decayed wood of *Syzygium cumini* and *Ficus religiosa* living trees in Delhi/New Delhi metropolitan area as natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* [Internet]. 2003 Jun;41(3):199–209. Available from: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/369378031000137251>
246. Randhawa HS, Kowshik T, Preeti Sinha K, Chowdhary A, Khan ZU, Yan Z, et al. Distribution of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in decayed trunk wood of *Syzygium cumini* trees in north-western India. *Med Mycol* [Internet]. 2006 Nov;44(7):623–30. Available from: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/13693780600860946>
247. Khayhan K, Hagen F, Norkaew T, Puengchan T, Boekhout T, Sriburee P. Isolation of *Cryptococcus gattii* from a *Castanopsis argyrophylla* tree hollow (Mai-Kaw), Chiang Mai, Thailand. *Mycopathologia* [Internet]. 2017 Apr 6;182(3–4):365–70. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11046-016-0067-7>
248. Mseddi F, Sellami A, Jarboui MA, Sellami H, Makni F, Ayadi A. First environmental isolations of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Tunisia and review of published studies on environmental isolations in Africa. *Mycopathologia* [Internet]. 2011 May 1;171(5):355–60. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11046-010-9381-7>
249. Jenney A, Pandithage K, Fisher DA, Currie BJ. *Cryptococcus* infection in tropical Australia. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2004 Aug;42(8):3865–8. Available from:

- <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.42.8.3865-3868.2004>
250. Springer DJ, Phadke S, Billmyre B, Heitman J. *Cryptococcus gattii*, no longer an accidental pathogen? *Curr Fungal Infect Rep* [Internet]. 2012 Dec;6(4):245–56. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
  251. MacDougall L, Kidd SE, Galanis E, Mak S, Leslie MJ, Cieslak PR, et al. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2007 Jan;13(1):42–50. Available from: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/1/06-0827\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/1/06-0827_article.htm)
  252. Zhao Y, Lin J, Fan Y, Lin X. Life Cycle of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2019 Sep 8;73(1):17–42. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-020518-120210>
  253. Kwon-Chung KJ. A new genus, *filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* [Internet]. 1975 May 24;67(6):1197–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/765816>
  254. Kwon-Chung KJ, Popkin TJ. Ultrastructure of septal complex in *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*). *J Bacteriol* [Internet]. 1976 Apr;126(1):524–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/770437>
  255. Malik R, Krockenberger MB, O’Brien CR, Carter DA, Meyer W, Canfield PJ. Veterinary Insights into Cryptococcosis Caused by *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A, editors. *Cryptococcus* [Internet]. 1st ed. Washington, DC, USA: ASM Press; 2014. p. 489–504. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1128/9781555816858.ch36>
  256. Secombe CJ, Lester GD, Krockenberger MB. Equine Pulmonary Cryptococcosis: A Comparative Literature Review and Evaluation of Fluconazole Monotherapy. *Mycopathologia*. 2017;182(3–4):413–23.
  257. Florek M, Nawrot U, Korzeniowska-Kowal A, Włodarczyk K, Wzorek A, Woźniak-Biel A, et al. An analysis of the population of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from animals in Poland, in the years 2015–2019. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86169-3>
  258. Danesi P, Falcaro C, Schmetzmann LJ, de Miranda LHM, Krockenberger M, Malik R. *Cryptococcus* in Wildlife and Free-Living Mammals. *J fungi (Basel, Switzerland)* [Internet]. 2021 Jan 6;7(1):1–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33419125>
  259. Riet-Correa F, Krockenberger M, Dantas AFM, Oliveira DM. Bovine cryptococcal meningoencephalitis. *J Vet Diagn Invest* [Internet]. 2011 Sep 9;23(5):1056–60. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638711416624>
  260. Malik R, Krockenberger MB, Cross G, Doneley R, Madill DN, Black D, et al. Avian cryptococcosis. *Med Mycol* [Internet]. 2003 Apr;41(2):115–24. Available from: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/mmy.41.2.115.124>
  261. Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection* [Internet]. 2007 Apr;35(2):51–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s15010-007-6142-8>

262. Hadano Y, Yoshii H, Hayashi M, Oono H, Tanaka R. A Rare Case Report of Central Line-associated Bloodstream Infection Caused by *Cryptococcus arboriformis*. Intern Med [Internet]. 2015;54(9):1141–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25948365>
263. Bernal-Martinez L, Gomez-Lopez A, Castelli M V., Mesa-Arango AC, Zaragoza O, Rodriguez-Tudela JL, et al. Susceptibility profile of clinical isolates of non-Cryptococcus neoformans/non-Cryptococcus gattii Cryptococcus species and literature review. Med Mycol [Internet]. 2010 Feb;48(1):90–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19235546>
264. Conde-Pereira C, Rodas-Rodríguez L, Díaz-Paz M, Palacios-Rivera H, Firacative C, Meyer W, et al. Fatal Case of Polymicrobial Meningitis Caused by *Cryptococcus liquefaciens* and *Mycobacterium tuberculosis* Complex in a Human Immunodeficiency Virus-Infected Patient. J Clin Microbiol [Internet]. 2015 Aug;53(8):2753–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26019205>
265. Montoya MC, Magwene PM, Perfect JR. Associations between *Cryptococcus* Genotypes, Phenotypes, and Clinical Parameters of Human Disease: A Review. J fungi (Basel, Switzerland) [Internet]. 2021 Mar 30;7(4):260. Available from: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/4/260>
266. EVANS EE. An immunologic comparison of 12 strains of *Cryptococcus neoformans* (*Torula histolytica*). Proc Soc Exp Biol Med [Internet]. 1949 Aug;71(4):644–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18148185>
267. Wilson DE, Bennett JE, Bailey JW. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. Proc Soc Exp Biol Med [Internet]. 1968 Mar 1;127(3):820–3. Available from: <http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-127-32812>
268. Kwon-Chung KJ. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. Mycologia [Internet]. 1976 Jul 12;68(4):943–6. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00275514.1976.12019972>
269. D'Souza CA, Kronstad JW, Taylor G, Warren R, Yuen M, Hu G, et al. Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. MBio [Internet]. 2011;2(1):e00342-10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21304167>
270. Xu J, Vilgalys R, Mitchell TG. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Mol Ecol [Internet]. 2000 Oct;9(10):1471–81. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-294x.2000.01021.x>
271. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Rhodes JC. Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs. Antonie Van Leeuwenhoek [Internet]. 1982;48(1):25–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7046630>
272. Hagen F, Lumbsch HT, Arsic Arsenijevic V, Badali H, Bertout S, Billmyre RB, et al. Importance of Resolving Fungal Nomenclature: the Case of Multiple Pathogenic Species in the *Cryptococcus* Genus. Lorenz M, editor. mSphere [Internet]. 2017 Aug 30;2(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28875175>
273. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, et al. The

- Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. Lorenz M, editor. *mSphere* [Internet]. 2017 Feb 22;2(1):1–7. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00357-16>
274. Herkert PF, Hagen F, Pinheiro RL, Muro MD, Meis JF, Queiroz-Telles F. Ecoepidemiology of *Cryptococcus gattii* in Developing Countries. *J fungi (Basel, Switzerland)* [Internet]. 2017 Nov 3;3(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371578>
275. Chen SCA, Meyer W, Sorrell TC. *Cryptococcus gattii* infections. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2014 Oct;27(4):980–1024. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278580>
276. Lockhart SR, McCotter OZ, Chiller TM. Emerging Fungal Infections in the Pacific Northwest: The Unrecognized Burden and Geographic Range of *Cryptococcus gattii* and *Coccidioides immitis*. Scheld WM, Hughes JM, Whitley RJ, editors. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2016 Jun 6;4(3):375–384. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27337452>
277. Byrnes EJ, Li W, Lewit Y, Ma H, Voelz K, Ren P, et al. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS Pathog* [Internet]. 2010 Apr 22;6(4):e1000850. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421942>
278. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017;17(8):873–81. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8)
279. Jarvis JN, Meintjes G, Williams A, Brown Y, Crede T, Harrison TS. Adult meningitis in a setting of high HIV and TB prevalence: findings from 4961 suspected cases. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2010 Mar 15;10(1):67. Available from: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-10-67>
280. Siddiqi OK, Ghebremichael M, Dang X, Atadzhanov M, Kaonga P, Khoury MN, et al. Molecular Diagnosis of Central Nervous System Opportunistic Infections in HIV-Infected Zambian Adults. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2014 Jun 15;58(12):1771–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24668125>
281. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* [Internet]. 2009 Feb 20;23(4):525–30. Available from: <https://journals.lww.com/00002030-200902200-00012>
282. Kozubowski L, Heitman J. Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2012 Jan;36(1):78–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19620339>
283. Zaragoza O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence* [Internet]. 2019;10(1):490–501. Available from: <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1614383>
284. Bielska E, May RC. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? *FEMS Yeast Res* [Internet]. 2016 Feb;16(1):fov106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26614308>
285. Temfack E, Boyer-Chammard T, Lawrence D, Delliere S, Loyse A, Lanternier F, et al. New

- Insights Into Cryptococcus Spp. Biology and Cryptococcal Meningitis. *Curr Neurol Neurosci Rep* [Internet]. 2019 Oct 31;19(10):81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31673881>
286. Markowitz GS, Concepcion L, Factor SM, Borczuk AC. Autopsy patterns of disease among subgroups of an inner-city Bronx AIDS population. Vol. 13, *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 1996. p. 48–54.
287. Lee SC, Dickson DW, Casadevall A. Pathology of cryptococcal meningoencephalitis: analysis of 27 patients with pathogenetic implications. *Hum Pathol* [Internet]. 1996 Aug;27(8):839–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817796904591>
288. Salkowski CA, Balish E. Role of natural killer cells in resistance to systemic cryptococcosis. *J Leukoc Biol* [Internet]. 1991 Aug;50(2):151–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2072032>
289. Huffnagle GB, Traynor TR, McDonald RA, Olszewski MA, Lindell DM, Herring AC, et al. Leukocyte recruitment during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Immunopharmacology* [Internet]. 2000 Jul 25;48(3):231–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19620339>
290. Goldman DL, Khine H, Abadi J, Lindenberg DJ, Pirofski La, Niang R, et al. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics* [Internet]. 2001 May;107(5):E66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331716>
291. BAKER RD, HAUGEN RK. Tissue changes and tissue diagnosis in cryptococcosis; a study of 26 cases. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1955 Jan;25(1):14–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14349908>
292. Baker RD. The primary pulmonary lymph node complex of cryptococcosis. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1976 Jan;65(1):83–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1246992>
293. Fisher KM, Montrieff T, Ramzy M, Koyfman A, Long B. Cryptococcal meningitis: a review for emergency clinicians. *Intern Emerg Med* [Internet]. 2021 Jun;16(4):1031–42. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11739-020-02619-2>
294. Asadi Gharabaghi M, Allameh SF. Primary pulmonary cryptococcosis. *BMJ Case Rep* [Internet]. 2014 Apr 1;2014. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24692384>
295. Pappas PG, Perfect JR, Cloud GA, Larsen RA, Pankey GA, Lancaster DJ, et al. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2001 Sep 1;33(5):690–9. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/322597>
296. Chang WC, Tzao C, Hsu HH, Lee SC, Huang KL, Tung HJ, et al. Pulmonary cryptococcosis: comparison of clinical and radiographic characteristics in immunocompetent and immunocompromised patients. *Chest* [Internet]. 2006 Feb;129(2):333–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16478849>
297. Menon A, Rajamani R. Giant “cryptococcoma” of the lung. *Br J Dis Chest* [Internet]. 1976 Oct;70(4):269–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/990165>

298. Mitchell DH, Sorrell TC. Pancoast's Syndrome Due to Pulmonary Infection with *Cryptococcus neoformans* Variety *gattii*. *Clin Infect Dis* [Internet]. 1992 May 1;14(5):1142–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1600018>
299. Starr JC, Che H, Montgomery J. Cryptococcal pneumonia simulating chronic eosinophilic pneumonia. *South Med J* [Internet]. 1995 Aug;88(8):845–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7631212>
300. Mitsuoka S. An unique case of primary pulmonary cryptococcosis with extensive chest wall invasion. *Thorax* [Internet]. 2005 Jan 1;60(1):86–86. Available from: <https://thorax.bmj.com/lookup/doi/10.1136/thx.2004.031658>
301. Perfect JR. Cryptococcosis (*Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*). In: Bennett J, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* [Internet]. 9th ed. Elsevier; 2019. p. 3146–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20121000756>
302. Murakawa GJ, Kerschmann R, Berger T. Cutaneous *Cryptococcus* infection and AIDS. Report of 12 cases and review of the literature. *Arch Dermatol* [Internet]. 1996 May 1;132(5):545–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8624151>
303. Rex JH, Larsen RA, Dismukes WE, Cloud GA, Bennett JE. Catastrophic visual loss due to *Cryptococcus neoformans* meningitis. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 1993 Jul;72(4):207–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8341139>
304. Graybill JR, Sobel J, Saag M, van Der Horst C, Powderly W, Cloud G, et al. Diagnosis and management of increased intracranial pressure in patients with AIDS and cryptococcal meningitis. The NIAID Mycoses Study Group and AIDS Cooperative Treatment Groups. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2000 Jan 1;30(1):47–54. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/313603>
305. Li Y, Fang L, Chang FQ, Xu FZ, Zhang YB. *Cryptococcus* infection with asymptomatic diffuse pulmonary disease in an immunocompetent patient: A case report. *World J Clin cases* [Internet]. 2021 Apr 16;9(11):2619–26. Available from: <https://www.wjgnet.com/2307-8960/full/v9/i11/2619.htm>
306. Visnegarwala F, Graviss EA, Lacke CE, Dural AT, Johnson PC, Atmar RL, et al. Acute respiratory failure associated with cryptococcosis in patients with AIDS: analysis of predictive factors. *Clin Infect Dis* [Internet]. 1998 Nov;27(5):1231–7. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/514984>
307. Zhang Y, Li N, Zhang Y, Li H, Chen X, Wang S, et al. Clinical analysis of 76 patients pathologically diagnosed with pulmonary cryptococcosis. *Eur Respir J* [Internet]. 2012 Nov;40(5):1191–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22408204>
308. Kohno S, Kakeya H, Izumikawa K, Miyazaki T, Yamamoto Y, Yanagihara K, et al. Clinical features of pulmonary cryptococcosis in non-HIV patients in Japan. *J Infect Chemother* [Internet]. 2015 Jan;21(1):23–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2014.08.025>
309. Ye F, Xie J xing, Zeng Q si, Chen G qin, Zhong S qing, Zhong N shan. Retrospective analysis of 76 immunocompetent patients with primary pulmonary cryptococcosis. *Lung* [Internet]. 2012 Jun;190(3):339–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22246551>

310. Song KD, Lee KS, Chung MP, Kwon OJ, Kim TS, Yi CA, et al. Pulmonary cryptococcosis: imaging findings in 23 non-AIDS patients. *Korean J Radiol* [Internet]. 2010;11(4):407–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592924>
311. Chu H qing, Li H ping, He G jun. Analysis of 23 cases of pulmonary cryptococcosis. *Chin Med J (Engl)* [Internet]. 2004 Sep;117(9):1425–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377442>
312. Chen SCA, Korman TM, Slavin MA, Marriott D, Byth K, Bak N, et al. Antifungal therapy and management of complications of cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2013 Aug 15;57(4):543–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23697747>
313. Franco-Paredes C, Womack T, Bohlmeier T, Sellers B, Hays A, Patel K, et al. Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2015 Mar;15(3):348–55. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70945-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70945-4)
314. Leenders ACAP, Reiss P, Portegies P, Clezy K, Hop WCJ, Hoy J, et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome) compared with amphotericin B both followed by oral fluconazole in the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis. *AIDS* [Internet]. 1997 Oct;11(12):1463–71. Available from: <http://journals.lww.com/00002030-199712000-00010>
315. Hamill RJ, Sobel JD, El-Sadr W, Johnson PC, Graybill JR, Javaly K, et al. Comparison of 2 doses of liposomal amphotericin B and conventional amphotericin B deoxycholate for treatment of AIDS-associated acute cryptococcal meningitis: a randomized, double-blind clinical trial of efficacy and safety. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010 Jul 15;51(2):225–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20536366>
316. Achard C, Phulpin E. L'envahissement des organes par les microbes pendant l'agonie et après la mort. *Arch Med Exp* [Internet]. 1895; Available from: <https://www.biusante.parisdescartes.fr/histmed/medica/page?100000x1895xartorig&p=120>
317. Knapp VJ. Postmortems and the growth of modern medical knowledge in 19th century Europe. *J Okla State Med Assoc* [Internet]. 1983 Mar;76(3):73–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6341523>
318. Riedel S. The value of postmortem microbiology cultures. Doern G V., editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2014 Apr;52(4):1028–33. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.03102-13>
319. Javan GT, Finley SJ. What is the “thanatomicrobiome” and what is its relevance to forensic investigations? In: Ralebitso Senior TK, editor. *Forensic Ecogenomics: The Application of Microbial Ecology Analyses in Forensic Contexts* [Internet]. 1st ed. Elsevier Inc.; 2018. p. 133–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809360-3.00006-0>
320. Fredette JW. Bacteremias in the agonal period. *J Lab Clin Med*. 1916;2:180–92.
321. Ridgway EJ, Subramanian BM, Raza M. Clinical microbiology and virology in the context of the autopsy. In: Carter DO, Tomberlin JK, Benbow ME, Metcalf JL, editors. *Forensic Microbiology* [Internet]. 1st. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2017. p. 146–91.

Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781119062585>

322. Giordano AS, Barnes AR. Studies in postmortem bacteriology: Value and importance of cultures made postmortem. *J Lab Clin Med*. 1922 Jun;7(9):538–46.
323. Koneman EW, Davis MA. Postmortem bacteriology. 3. Clinical significance of microorganisms recovered at autopsy. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1974 Jan 5;61(1):28–40. Available from: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.1.5487.611>
324. Smith RF, Linares HA, Jorgensen JH. Bacteremia and postmortem microbiology in burned children. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1975 Apr 1;63(4):502–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/804250>
325. Saegeman V, Verhaegen J, Lismont D, Verduyck B, De Rijdt T, Ectors N. Influence of postmortem time on the outcome of blood cultures among cadaveric tissue donors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2009 Feb 16;28(2):161–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18709393>
326. Carpenter HM, Wilkins RM. Autopsy bacteriology: review of 2033 cases. *Arch Pathol* [Internet]. 1964 Jan 1;77(5):73–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14066060>
327. Kellerman GD, Waterman NG, Scharefenberger LF. Demonstration in vitro of postmortem bacterial transmigration. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1976 Nov;66(5):911–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/790938>
328. Burn CG. Experimental Studies of Postmortem Bacterial Invasion in Animals. *J Infect Dis* [Internet]. 1934 May 1;54(3):388–94. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/54.3.388>
329. Wilson SJ, Wilson ML, Reller LB. Diagnostic utility of postmortem blood cultures. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 1993 Oct;117(10):986–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8215840>
330. Hove M, Pencil SD. Effect of postmortem sampling technique on the clinical significance of autopsy blood cultures. *Hum Pathol* [Internet]. 1998 Feb;29(2):137–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9490272>
331. Goldwater PN. Sterile site infection at autopsy in sudden unexpected deaths in infancy. *Arch Dis Child* [Internet]. 2009 Apr;94(4):303–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794179>
332. Lobmaier IVK, Vege A, Gaustad P, Rognum TO. Bacteriological investigation--significance of time lapse after death. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2009 Oct 6;28(10):1191–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-009-0762-0>
333. Prtak L, Al-Adnani M, Fenton P, Kudesia G, Cohen MC. Contribution of bacteriology and virology in sudden unexpected death in infancy. *Arch Dis Child* [Internet]. 2010 May;95(5):371–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457701>
334. Weber MA, Hartley JC, Brooke I, Lock PE, Klein NJ, Malone M, et al. Post-mortem interval and bacteriological culture yield in sudden unexpected death in infancy (SUDI). *Forensic Sci Int* [Internet]. 2010 May 20;198(1–3):121–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226606>

335. Tuomisto S, Karhunen PJ, Vuento R, Aittoniemi J, Pessi T. Evaluation of postmortem bacterial migration using culturing and real-time quantitative PCR. *J Forensic Sci* [Internet]. 2013 Jul;58(4):910–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23550887>
336. O'Toole WF, Saxena HM, Golden A, Ritts RE. Studies of postmortem microbiology using sterile autopsy technique. *Arch Pathol* [Internet]. 1965 Nov;80(5):540–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5844413>
337. Roberts FJ. A review of postmortem bacteriological cultures. *Can Med Assoc J* [Internet]. 1969 Jan 11;100(2):70–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4883506>
338. Wilson WR, Dolan CT, Washington JA, Brown AL, Ritts RE. Clinical significance of postmortem cultures. *Arch Pathol* [Internet]. 1972 Sep;94(3):244–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4559403>
339. Minckler TM, Newell GR, O'Toole WF, Niwayama G, Levine PH. Microbiology experience in collection of human tissue. *Am J Clin Pathol*. 1966 Jan;45(1):85–92.
340. de Jongh DS, Loftis JW, Green GS, Shively JA, Minckler TM. Postmortem bacteriology: a practical method for routine use. *Am J Clin Pathol*. 1968 Mar;49(3):424–8.
341. Moar JJ, Miller SD. The value of autopsy bacteriology. A case report and review of techniques. *South African Med J*. 1984 Aug;66(5):192–3.
342. du Moulin GC, Paterson DG. Clinical relevance of postmortem microbiologic examination: a review. *Hum Pathol*. 1985 Jun;16(6):539–48.
343. UNICEF. UNICEF, Childinfo. A global overview of maternal mortality. 2012.
344. Bailey PE, Keyes E, Moran AC, Singh K, Chavane L, Chilundo B. The triple threat of pregnancy, HIV infection and malaria: Reported causes of maternal mortality in two nationwide health facility assessments in Mozambique, 2007 and 2012. *BMC Pregnancy Childbirth* [Internet]. 2015;15(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12884-015-0725-7>
345. Menéndez C, Romagosa C, Ismail MR, Carrilho C, Saute F, Osman N, et al. An autopsy study of maternal mortality in Mozambique: the contribution of infectious diseases. Wright L, editor. *PLoS Med* [Internet]. 2008 Feb 19;5(2):e44. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.0050044>
346. Douglass LH. POSTPARTUM HEMORRHAGE. *South Med J* [Internet]. 1937 Jun;30(6):639–42. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00007611-193706000-00017>
347. Murray CJL, Ortblad KF, Guinovart C, Lim SS, Wolock TM, Roberts DA, et al. Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2014 Sep 13;384(9947):1005–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25059949>
348. Alkema L, Chou D, Hogan D, Zhang S, Moller AB, Gemmill A, et al. Global, regional, and national levels and trends in maternal mortality between 1990 and 2015, with scenario-

- based projections to 2030: a systematic analysis by the UN Maternal Mortality Estimation Inter-Agency Group. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2016 Jan 30;387(10017):462–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26584737>
349. Black R, Laxminarayan R, Temmerman M, Walker N. *Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 2): Reproductive, Maternal, Newborn, and Child Health* [Internet]. Third Edit. Black RE, Laxminarayan R, Temmerman M, Walker N, editors. *Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 2): Reproductive, Maternal, Newborn, and Child Health*. Washington (DC): Washington, DC: World Bank; 2016 [cited 2022 Aug 4]. Available from: <http://hdl.handle.net/10986/23833>
350. Lathrop E, Jamieson DJ, Danel I. HIV and maternal mortality. *Int J Gynaecol Obstet* [Internet]. 2014 Nov;127(2):213–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.ijgo.2014.05.024>
351. Singh K, Moran A, Story W, Bailey P, Chavane L. Acknowledging HIV and malaria as major causes of maternal mortality in Mozambique. *Int J Gynecol Obstet*. 2014;127(1):35–40.
352. Joint United Nations Programme on HIV/aids. UNAIDS. UNAIDS data 2021. Geneva; 2021.
353. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoah K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2022 Aug 4];7(2):93–104. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S147330990770021X/fulltext>
354. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet*. 2006;367(9516):1066–74.
355. Grange J, Adhikari M, Ahmed Y, Mwaba P, Dheda K, Hoelscher M, et al. Tuberculosis in association with HIV/AIDS emerges as a major nonobstetric cause of maternal mortality in Sub-Saharan Africa. *Int J Gynecol Obstet* [Internet]. 2010 Mar;108(3):181–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20070964>
356. Parkes-Ratanshi R, Achan B, Kwizera R, Kambugu A, Meya D, Denning DW. Cryptococcal disease and the burden of other fungal diseases in Uganda; Where are the knowledge gaps and how can we fill them? *Mycoses* [Internet]. 2015 Oct;58 Suppl 5:85–93. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/myc.12387>
357. French N, Gray K, Watera C, Nakiyingi J, Lugada E, Moore M, et al. Cryptococcal infection in a cohort of HIV-1-infected Ugandan adults. *AIDS* [Internet]. 2002 May 3;16(7):1031–8. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=2002172750>
358. Sibanda EL, Weller I V.D., Hakim JG, Cowan FM. The magnitude of loss to follow-up of HIV-exposed infants along the prevention of mother-to-child HIV transmission continuum of care: A systematic review and meta-analysis. *Aids*. 2013;27(17):2787–97.
359. Pastick KA, Nalintya E, Tugume L, Ssebambulidde K, Stephens N, Evans EE, et al. Cryptococcosis in pregnancy and the postpartum period: Case series and systematic review with recommendations for management. *Med Mycol* [Internet]. 2020 Apr

- 1;58(3):282–92. Available from:  
<https://academic.oup.com/mmy/article/58/3/282/5549534>
360. Singh N, Perfect JR. Immune reconstitution syndrome and exacerbation of infections after pregnancy. *Clin Infect Dis*. 2007;45(9):1192–9.
361. Ely EW, Peacock JE, Haponik EF, Washburn RG. Cryptococcal pneumonia complicating pregnancy. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 1998 May;77(3):153–67. Available from: <http://journals.lww.com/00005792-199805000-00001>
362. Nayak SU, Talwani R, Gilliam B, Taylor G, Ghosh M. Cryptococcal meningitis in an HIV-positive pregnant woman. *J Int Assoc Physicians AIDS Care*. 2011;10(2):79–82.
363. Geelhoed DW, Visser LE, Asare K, Schagen van Leeuwen JH, van Roosmalen J. Trends in maternal mortality: a 13-year hospital-based study in rural Ghana. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2003 Apr 25;107(2):135–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648857>
364. Riley ID, Hazard RH, Joshi R, Chowdhury HR, Lopez AD. Monitoring progress in reducing maternal mortality using verbal autopsy methods in vital registration systems: what can we conclude about specific causes of maternal death? *BMC Med* [Internet]. 2019 Jun 3;17(1):104. Available from: <https://bmcmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-019-1343-4>
365. Morris JA, Harrison LM, Partridge SM. Practical and theoretical aspects of postmortem bacteriology. *Curr Diagnostic Pathol* [Internet]. 2007 Feb;13(1):65–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096860530600086X>
366. Fehling M, Nelson BD, Venkatapuram S. Limitations of the Millennium Development Goals: A literature review. *Glob Public Health* [Internet]. 2013;8(10):1109–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/17441692.2013.845676>
367. Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2007 Apr;22(4):464–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17376034>
368. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* [Internet]. 2012 May 9;486(7402):222–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22699611>
369. Caplan MJ, Koontz FP. *Cumitech 35, Postmortem Microbiology*. 1st ed. McCurdy BW, editor. Washington DC: American Society for Microbiology; 2001. 37 p.
370. Morris JA, Harrison LM, Partridge SM. Postmortem bacteriology: a re-evaluation. *J Clin Pathol* [Internet]. 2006 Jan 1;59(1):1–9. Available from: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.2005.028183>
371. Laffineur G, Lescut D, Vincent P, Quandalle P, Wurtz A, Colombel JF. [Bacterial translocation in Crohn disease]. *Gastroenterol Clin Biol* [Internet]. 1992 Sep;16(10):777–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1478405>
372. Laffineur G, Lescut D, Vincent P, Quandalle P, Wurtz A, Colombel JF. Bacterial translocation in Crohn disease. *Gastroenterol Clin Biol* [Internet]. 1992 [cited 2022 Aug 4];16(10):777–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1478405/>

373. Palmiere C, Egger C, Prod'Hom G, Greub G. Bacterial Translocation and Sample Contamination in Postmortem Microbiological Analyses. *J Forensic Sci* [Internet]. 2016 Mar;61(2):367–74. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1556-4029.12991>
374. Cocariu EA ndr., Mageriu V, Stăniceanu F, Bastian A, Socoliuc C, Zurac S. Correlations Between the Autolytic Changes and Postmortem Interval in Refrigerated Cadavers. *Rom J Intern Med* [Internet]. 2016;54(2):105–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27352439>
375. George J, Van Wettere AJ, Michaels BB, Crain D, Lewbart GA. Histopathologic evaluation of postmortem autolytic changes in bluegill (*Lepomis macrochirus*) and crappie (*Pomoxis anularis*) at varied time intervals and storage temperatures. *PeerJ* [Internet]. 2016;4(4):e1943. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27114885>
376. Torres RG, Etchebehere RM, Adad SJ, Micheletti AR, Ribeiro B de M, Silva LEA, et al. Cryptococcosis in Acquired Immunodeficiency Syndrome Patients Clinically Confirmed and/or Diagnosed at Necropsy in a Teaching Hospital in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2016 Oct 5;95(4):781–5. Available from: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.16-0148>
377. Klock C, Cerski M, Goldani LZ. Histopathological aspects of neurocryptococcosis in HIV-infected patients: autopsy report of 45 patients. *Int J Surg Pathol* [Internet]. 2009 Dec 8;17(6):444–8. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1066896908320550>
378. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017 Aug;17(8):873–81. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8)
379. Tenforde MW, Gertz AM, Lawrence DS, Wills NK, Guthrie BL, Farquhar C, et al. Mortality from HIV-associated meningitis in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *J Int AIDS Soc* [Internet]. 2020 Jan;23(1):e25416. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jia2.25416>
380. Rhein J, Morawski BM, Hullsiek KH, Nabeta HW, Kiggundu R, Tugume L, et al. Efficacy of adjunctive sertraline for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: an open-label dose-ranging study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016 Jul;16(7):809–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26971081>
381. Scriven JE, Lalloo DG, Meintjes G. Changing epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in sub-Saharan Africa. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016;16(8):891–2. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30145-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30145-1)
382. IeDEA and ART Cohort Collaborations, Avila D, Althoff KN, Mugglin C, Wools-Kaloustian K, Koller M, et al. Immunodeficiency at the start of combination antiretroviral therapy in low-, middle-, and high-income countries. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2014 Jan 1;65(1):e8-16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24419071>
383. Meya DB, Manabe YC, Castelnuovo B, Cook BA, Elbireer AM, Kambugu A, et al. Cost-Effectiveness of Serum Cryptococcal Antigen Screening to Prevent Deaths among HIV-

- Infected Persons with a CD4 + Cell Count  $\leq$ 100 Cells/ $\mu$ L Who Start HIV Therapy in Resource-Limited Settings. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010 Aug 15;51(4):448–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20597693>
384. Vidal JE, Boulware DR. LATERAL FLOW ASSAY FOR CRYPTOCOCCAL ANTIGEN: AN IMPORTANT ADVANCE TO IMPROVE THE CONTINUUM OF HIV CARE AND REDUCE CRYPTOCOCCAL MENINGITIS-RELATED MORTALITY. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2015 Sep;57 Suppl 1(Suppl 19):38–45. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652015000800038&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652015000800038&lng=en&tlng=en)
385. Jarvis JN, Bicanic T, Loyse A, Namarika D, Jackson A, Nussbaum JC, et al. Determinants of Mortality in a Combined Cohort of 501 Patients With HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: Implications for Improving Outcomes. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2014 Mar 1;58(5):736–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24319084>
386. Karstaedt AS, Crewe-Brown HH, Dromer F. Cryptococcal meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, in AIDS patients in Soweto, South Africa. *Med Mycol* [Internet]. 2002 Feb;40(1):7–11. Available from: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/mmy.40.1.7.11>
387. Litvintseva AP, Thakur R, Reller LB, Mitchell TG. Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. *J Infect Dis* [Internet]. 2005 Sep 1;192(5):888–92. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/432486>
388. Van Wyk M, Govender NP, Mitchell TG, Litvintseva AP, GERMS-SA. Multilocus sequence typing of serially collected isolates of *Cryptococcus* from HIV-infected patients in South Africa. Land GA, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2014 Jun;52(6):1921–31. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.03177-13>
389. Miglia KJ, Govender NP, Rossouw J, Meiring S, Mitchell TG, Vasaikar S, et al. Analyses of pediatric isolates of *Cryptococcus neoformans* from South Africa. *J Clin Microbiol*. 2011;49(1):307–14.
390. Falagas ME, Karveli EA, Siempos II, Vardakas KZ. *Acinetobacter* infections: a growing threat for critically ill patients. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2008 Aug;136(8):1009–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17892629>
391. Le Doare K, Bielicki J, Heath PT, Sharland M. Systematic Review of Antibiotic Resistance Rates Among Gram-Negative Bacteria in Children With Sepsis in Resource-Limited Countries. *J Pediatric Infect Dis Soc* [Internet]. 2015 Mar;4(1):11–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26407352>
392. Preziosi M, Zimba TF, Lee K, Tomas M, Kinlin S, Nhatave-Paiva C, et al. A prospective observational study of bacteraemia in adults admitted to an urban Mozambican hospital. *S Afr Med J* [Internet]. 2015 Apr 8;105(5):370–4. Available from: <http://www.samj.org.za/index.php/samj/article/view/8780>
393. Khorsi K, Messai Y, Hamidi M, Ammari H, Bakour R. High prevalence of multidrug-resistance in *Acinetobacter baumannii* and dissemination of carbapenemase-encoding genes blaOXA-23-like, blaOXA-24-like and blaNDM-1 in Algiers hospitals. *Asian Pac J Trop Med* [Internet]. 2015 Jun;8(6):438–46. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1995764515000516>

394. Nageeb W, Kamel M, Zakaria S, Metwally L. Phenotypic characterization of *Acinetobacter baumannii* isolates from intensive care units at a tertiary-care hospital in Egypt. *East Mediterr Health J* [Internet]. 2014 Apr 3;20(3):203–11. Available from: [http://applications.emro.who.int/emhij/v20/03/EMHJ\\_2014\\_20\\_3\\_203\\_211.pdf](http://applications.emro.who.int/emhij/v20/03/EMHJ_2014_20_3_203_211.pdf)
395. Lowings M, Ehlers MM, Dreyer AW, Kock MM. High prevalence of oxacillinases in clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from the Tshwane region, South Africa - an update. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2015 Nov 14;15(1):521. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-1246-8>
396. Revathi G, Siu LK, Lu PL, Huang LY. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in East Africa. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2013 Dec;17(12):e1255-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2013.07.016>
397. Rynga D, Shariff M, Deb M. Phenotypic and molecular characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* isolated from Delhi, India. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015;14(1):1–8.
398. Gupta RK, Lucas SB, Fielding KL, Lawn SD. Prevalence of tuberculosis in post-mortem studies of HIV-infected adults and children in resource-limited settings. *AIDS* [Internet]. 2015 Sep 24;29(15):1987–2002. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26266773>
399. Esmail H, Barry CE, Young DB, Wilkinson RJ. The ongoing challenge of latent tuberculosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 2014;369(1645):20130437. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24821923>
400. Rodríguez-Grande C, Hurtado JC, Rodríguez-Maus S, Casas I, Castillo P, Navarro M, et al. High within-host diversity found from direct genotyping on post-mortem tuberculosis specimens in a high-burden setting. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2021 Oct;27(10):1518.e5-1518.e9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X2100286X>
401. Korenromp EL, Bierrenbach AL, Williams BG, Dye C. The measurement and estimation of tuberculosis mortality. *Int J Tuberc Lung Dis* [Internet]. 2009 Mar;13(3):283–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19275787>
402. Bates M, Mudenda V, Shibemba A, Kaluwaji J, Tembo J, Kabwe M, et al. Burden of tuberculosis at post mortem in inpatients at a tertiary referral centre in sub-Saharan Africa: a prospective descriptive autopsy study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2015 May;15(5):544–51. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70058-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70058-7)
403. Maraba N, Karat AS, McCarthy K, Churchyard GJ, Charalambous S, Kahn K, et al. Verbal autopsy-assigned causes of death among adults being investigated for TB in South Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2016 Sep;110(9):510–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27794093>
404. Karat AS, Tlali M, Fielding KL, Charalambous S, Chihota VN, Churchyard GJ, et al. Measuring mortality due to HIV-associated tuberculosis among adults in South Africa: Comparing verbal autopsy, minimally-invasive autopsy, and research data. Isaakidis P, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Mar 23;12(3):e0174097. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28334030>