

Diagnóstico de laboratorio de las micosis invasoras por hongos filamentosos en pacientes inmunodeprimidos

María Carmen Rubio^a, Antonio Rezusta^b, Joaquina Gil^a, Rafael Benito^a y María José Revillo^b

^aServicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza. España

^bServicio de Microbiología. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. España.

Las infecciones invasoras por hongos filamentosos han aumentado durante los últimos 20 años ya que la población en riesgo se ha incrementado. El diagnóstico y el tratamiento temprano son la clave para el éxito del tratamiento. Los métodos clásicos de diagnóstico microbiológico son lentos y poco sensibles. El desarrollo de nuevas técnicas como detección de antígenos, galactomanano y (1,3)β-D-glucano y de ADN representan una mejora en el diagnóstico de este tipo de infecciones.

Palabras clave: Galactomanano. Betaglucano. Aspergilosis.

Laboratory diagnosis of invasive mold infections in immunocompromised patients

Invasive mould infections have become more prevalent in the clinical setting during the past 20 years because of changes in the population at risk. Early diagnosis and prompt therapy are crucial for the successful outcome of these infections, but conventional methods for microbiological diagnosis are slow and lack sensitivity. Innovative techniques for detecting circulating fungal antigens, such as galactomannan and (1,3)β-D-glucan, and fungal genomic DNA may improve the diagnosis of fungal invasive infections.

Key words: Galactomannan. Betaglucan. Aspergillosis.

Introducción

La micología médica moderna ha adquirido, en el momento actual, un aspecto nuevo debido a la gran cantidad de especies oportunistas que pueden colonizar e infectar al hospedador inmunodeprimido. Este hecho ha originado una enorme complejidad, tanto por las variadas manifestaciones clínicas de los pacientes como por los hongos taxonómicamente diversos que pueden colonizarlo¹. Durante los últimos 20 años, los pacientes de riesgo han aumentado notablemente, e incluyen una amplia lista de condiciones

médicas: trasplantados de órgano sólido y de células progenitoras, pacientes oncológicos o en tratamiento con inmunosupresores, pacientes con sida, niños nacidos pretérmino, pacientes de edad avanzada y los sometidos a procedimientos de cirugía mayor. El diagnóstico de la infección fúngica invasora (IFI) es complicado y, para su mejora, requiere de un elevado índice de sospecha clínica y que se tengan en cuenta los factores de riesgo¹. La confirmación microbiológica de la etiología fúngica en el laboratorio es, por tanto, fundamental, para lo que hay que tener en consideración los siguientes aspectos: *a)* detección de hifas en la observación microscópica; *b)* aislamiento de varias colonias del hongo o aislamiento del mismo hongo en todas las placas sembradas; *c)* identificación del moho; *d)* confirmación del crecimiento a 37 °C²; *e)* detección de antígenos; *f)* detección de ácidos nucleicos, bien en la muestra directa o para la identificación del hongo una vez aislado, y *g)* detección de anticuerpos, aunque son poco útiles en el diagnóstico de IFI en los inmunodeprimidos.

Técnicas clásicas

Muestra para analizar

En el establecimiento del diagnóstico de IFI es fundamental la muestra. Son más adecuadas aquellas que se obtienen de lugares estériles que las de áreas adyacentes a zonas colonizadas. Hay una premisa fundamental: el diagnóstico es difícil, pues los hemocultivos, los líquidos orgánicos y los esputos son muestras con poca sensibilidad y, en algunos casos, la biopsia es el único método para realizar el diagnóstico. Los resultados son peores cuando se utiliza un hisopo para la recogida de la muestra. Para el diagnóstico pueden ser necesarias varias muestras procedentes de distintos lugares, biopsia, aspirado transtraqueal, esputo y puede ser útil la toma de uñas y lesiones de la piel en las infecciones por *Fusarium* spp.². La muestra de senos paranasales más adecuada es la obtenida por biopsia³. Se debe mencionar aquí que los medios de transporte para bacterias pueden dificultar la observación microscópica¹.

Observación microscópica

Todas las muestras deben examinarse primero macroscópicamente, para seleccionar la parte más adecuada de ésta. La detección del hongo en la observación microscópica de la muestra clínica ayuda a la interpretación del resultado del cultivo, facilita la elección de los medios adecuados para la siembra¹ y puede ser fundamental en el comienzo del tratamiento correcto, como en el caso de una

Correspondencia: Dra. C. Rubio Calvo.
Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.
Domingo Miral, s/n. 50009 Zaragoza. España.
Correo electrónico: mc Rubio@unizar.es

cigomicosis rinosinusal, o bien pueden orientar sobre el tiempo necesario de incubación, en el caso de *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii* o *Histoplasma capsulatum*.

Los métodos microscópicos son menos sensibles que el cultivo, por lo que un resultado negativo no excluye la infección y, además, pueden producirse falsos positivos¹. Sin embargo, existen algunas características en la muestra clínica que ayudan a predecir el género al que pertenecen: por ejemplo, en *Aspergillus*, se observan hifas hialinas, septadas, uniformes con una anchura de 3-6 µm y ramificadas dicotómicamente, incluso se pueden observar cabezas conidiales en lesiones cavitarias. Estas hifas no son diferenciables de las de otros hongos, como *Fusarium* o *Scedosporium*, cuyo tratamiento antifúngico es diferente. Sin embargo, *Fusarium* y *Scedosporium* son capaces de producir conidiación en el tejido^{2,4,5}. En cuanto a los cigomicetos, presentan hifas anchas entre 6-25 µm, con paredes no paralelas y escasas ramificaciones. También se observan con frecuencia células hinchadas de hasta 50 µm, hifas distorsionadas y ramificadas en ángulo recto⁶. Los hongos dematiáceos, con pigmento marrón o negro, presentan hifas de 2-6 µm, ramificadas o no, y con septos constreñidos. La presencia de cristales de oxalato en muestras respiratorias es una clave importante en el diagnóstico de sospecha de la infección por *Aspergillus*⁷.

Cultivo

El cultivo es imprescindible, ya que la observación microscópica microbiológica o el corte histológico no permiten diferenciar especies de *Aspergillus* entre sí y de otros hifomicetos. Sin embargo, puede servir para orientar el cultivo. Así, en determinadas circunstancias, deben añadirse medios como agar glucosado de Sabouraud adicionado con anfotericina B, para favorecer el desarrollo de *Scedosporium prolificans*. La utilización de un medio selectivo con flucanazol favorece el aislamiento de *Aspergillus fumigatus*⁸.

Las especies de *Aspergillus* pueden aislarse a partir de la mayoría de los medios microbiológicos (agar sangre, agar chocolate, caldo infusión corazón cerebro), aunque el medio específico más usado es el agar glucosado de Sabouraud. La adición de antibióticos previene el crecimiento de bacterias en las muestras no estériles y la cicloheximida puede actuar como inhibidor de la mayoría de los hongos productores de IFI⁹. Sin embargo, no hay establecido un protocolo estándar óptimo para el procesamiento de muestras respiratorias¹⁰. La temperatura de incubación más recomendada es 28-30 °C, pero siempre debe confirmarse la capacidad de crecer a 37 °C². Hay que tener en cuenta que la atmósfera microaerófila y la incubación a 35 °C aumentan significativamente los aislamientos de *Aspergillus*¹¹.

Cuando el cultivo es positivo, no siempre representa enfermedad invasora, ya que puede tratarse de una colonización¹² o de una contaminación en el laboratorio. La observación microscópica a partir de la muestra original es de gran ayuda para el diagnóstico definitivo⁶.

Los hemocultivos son de poca utilidad en el diagnóstico de la aspergilosis invasora (AI)^{10,13} e incluso los aislamientos de *Aspergillus* en cultivo pueden no estar asociados a una verdadera AI. Por el contrario, la fusariosis diseminada cursa con hemocultivo positivo en el 40-60% de los pacientes^{14,15}.

Las especies que producen formas unicelulares en los tejidos, *Acremonium falciforme*, *Acremonium kiliense*, *Acremonium strictum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Paecilomyces lilacinus*, *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans*, *Penicillium marneffeii* y los otros hongos dimórficos térmicos, tienen mayor probabilidad de pasar a la sangre y originar hemocultivos positivos que las cepas de *Aspergillus*, las cuales, al crecer habitualmente como un ovillo sin fragmentarse, tienen menos posibilidad de diseminarse por el torrente sanguíneo.

Identificación

La identificación de género y especie del hongo productor de la IFI es crucial, ya que hay diferencias respecto a la sensibilidad a los antifúngicos³, la respuesta al tratamiento y el pronóstico de la infección. A modo de ejemplo, actualmente se están describiendo especies que, habiendo sido identificadas como *A. fumigatus*, tienen un comportamiento distinto frente a los antifúngicos, lo que puede tener implicaciones terapéuticas y epidemiológicas¹⁶. Entre las cepas identificadas como *A. fumigatus* se ha descrito *Aspergillus lentulus*, con sensibilidad disminuida a la anfotericina B, voriconazol y caspofungina, y *Aspergillus udagawae*, con sensibilidad disminuida para la anfotericina B¹⁷. Esto hecho hace que la biología molecular sea cada vez más utilizada para la identificación de la especie.

Otra característica a considerar para interpretar un aislamiento en cultivo es la temperatura de crecimiento. Así, la capacidad de crecer a 37 °C permite distinguir a los aislados de *Aspergillus* patógenos de los que no lo son (ambientales), criterio que podría extenderse a los demás oportunistas^{2,3,9}.

Entre los hongos productores de cigomicosis, el más frecuente es *Rhizopus* y *Rhizopus arrhizus* (*oryzae*) es el más prevalente de los agentes de mucormicosis; producen el 60% del total y el 90% de las rinocerebrales¹⁸. Le siguen en frecuencia *Rhizomucor* spp. y *Cunninghamella*. Esta distinción puede ser importante dado que, de nuevo, podría condicionar la diferente actividad de los antifúngicos y, en última instancia, el éxito de la terapia. Algo similar ocurre con *Pseudoallescheria boydii* (anamorfo *S. apiospermum*), que presenta una gran variedad genética, como lo demuestra la descripción de nuevas especies en este complejo. Así, se ha descrito que la especie de *Scedosporium aurantiacum* es más resistente a los antifúngicos¹⁹.

Métodos no basados en el cultivo

Detección de galactomanano

El galactomanano (GM) es un heteropolisacárido termolabile presente en la pared de la mayoría de las especies de *Aspergillus* y algunas especies de hialohifomicetos; es liberado al exterior de la célula fúngica cuando se produce el crecimiento de la hifa y la invasión del tejido. Actualmente, la técnica utilizada para su detección es el método ELISA doble sándwich (Platelia® *Aspergillus*, Bio-Rad, Francia), cuyo límite de detección es de 1 ng/ml. Esta prueba se realiza, fundamentalmente, en muestra de sue-

ro y de lavado broncoalveolar (LAB), y se ha incorporado como criterio de AI en el consenso de 2002 del European Organization for Research and Treatment of Cancer-Mycosis Study Group (EORTC/MSG). El índice *cutt-off* de 0,5 es el aceptado normalmente²⁰⁻²⁴.

La detección de GM de *Aspergillus* es un procedimiento útil en el diagnóstico de la AI en enfermos neutropénicos con alto riesgo de padecer micosis invasora²¹. La prueba parece ser de máximo valor en el seguimiento de pacientes oncohematológicos con neutropenia y la estrategia más apropiada es combinarlo con diagnóstico por imagen (tomografía computarizada [TC])²⁴. La detección debe realizarse durante todo el período que dura la neutropenia o el uso de corticoides como inmunosupresores, con una periodicidad de una o, mejor, 2 veces por semana, sin sustituir a otras pruebas²³⁻²⁵. La detección de GM es útil para realizar un diagnóstico temprano, iniciar el tratamiento adelantado cuando la infección es subclínica, ayudar a valorar la respuesta y orientar acerca de su duración²¹. Durante el tratamiento, en los pacientes con AI es posible detectar un aumento de las concentraciones de GM, sin que ello implique fallo terapéutico. Debe interpretarse con cautela en casos de pacientes dializados, ya que, al no pasar al dializado, se acumula, lo que no significa que la enfermedad sea progresiva²⁶.

La administración del antifúngico disminuye la sensibilidad de la prueba si la muestra de sangre se toma en el mismo día de la administración. Ésta es más alta y el pico aparece antes en muestras obtenidas de pacientes que no reciben tratamiento preventivo con antifúngicos, lo que puede obligar a modificar los criterios diagnósticos en los pacientes con tratamiento anticipado²⁷.

La sensibilidad general de la prueba de detección de GM en la AI varía del 29 al 100%, y la especificidad del 70 al 93%²³, según el punto de corte utilizado, la población estudiada, el tipo de diagnóstico de aspergilosis (probada, probable o posible), la afección (traqueobronquitis, aspergiloma)²³, los tratamientos antifúngicos distintos del fluconazol²⁰ y el grado de inmunosupresión. La sensibilidad es subóptima en los pacientes con secuestro del hongo en la lesión, en los que muestran inmunidad normal, en presencia de anticuerpos anti-GM, cuando se administra terapia antibacteriana, en los niños, en los pacientes que reciben profilaxis con antifúngicos, cuando presentan una enfermedad injerto contra huésped, y en los pacientes trasplantados de órgano sólido. Todos los resultados positivos deben comprobarse con una nueva muestra.

A pesar de la utilidad de la detección de GM, quedan varias cuestiones por aclarar: el valor del seguimiento sistemático, la frecuencia de la realización de la prueba, el papel de los falsos positivos, la importancia del tratamiento previo y, sobre todo, la correlación con el resultado clínico³. La determinación de GM 2 veces por semana debería incluirse en el seguimiento de los pacientes de alto riesgo, ya que es un criterio mayor de consenso del EORTC. Debe considerarse un resultado significativo cuando 2 muestras consecutivas son positivas (índice $\geq 0,5$), ya que hace muy probable una AI²⁵.

Respecto a la detección en otras muestras clínicas, 2 o más determinaciones positivas consecutivas (o una a partir del LAB) tienen el mismo valor que el aislamiento de *Aspergillus* de muestras de tracto respiratorio bajo o la observación de hifas en el LAB²³. La detección de GM en

LCR puede ser de utilidad en el diagnóstico de AI cerebral; incluso se puede detectar 45 días antes que el cultivo; su disminución se correlaciona con la utilización de anfotericina B intratecal y voriconazol²⁹. La sensibilidad en la orina de pacientes con AI probada es menor que en el suero. Si bien estudios iniciales mostraban buenos resultados con esta muestra, no se ha confirmado su superioridad respecto al suero. Además, en orina concentrada, la detección de GM podría dar resultados positivos en pacientes con concentración baja en sangre³⁰.

El pulmón es la puerta de entrada en la mayoría de los casos de AI y la liberación de GM se produce durante el crecimiento de las hifas, por lo que parece razonable pensar que debe detectarse en LAB. A diferencia del GM en suero, en LAB no está clara su utilidad en el diagnóstico de la AI. Sin embargo, hay datos a favor de su aplicación clínica; hay autores³¹ que sugieren un punto de corte de 0,75 y así obtienen un 100% de sensibilidad y especificidad en pacientes no tratados y controles. La sensibilidad disminuye al 92% cuando reciben tratamiento antifúngico. En todos los casos, los resultados son siempre superiores a los del cultivo, cuya sensibilidad es del 46% que, además, disminuye al 16% en los pacientes tratados. Estos autores concluyen que la utilización de GM, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cultivo puede evitar procedimientos invasivos³¹. La combinación del GM con la determinación de (1-3) β -D-glucano (BG) aumenta la especificidad a un 100% y tiene un valor predictivo positivo del 100%³².

El mayor número de falsos positivos para la determinación de GM ocurre en los niños. Hay que tener en cuenta que se producen reacciones cruzadas con hongos miceliales, como *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium herbarum*, *Acremonium*, *Alternaria alternata*, *F. oxysporum*, *Wangiella dermatitidis* y *P. marneffeii*, y levaduras, como *Rhodotorula rubra* o *Cryptococcus neoformans*²¹. También pueden originarlas alimentos como las proteínas de soja³³ y la presencia en sangre de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Corynebacterium jeikeium*, *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli* y *Candida albicans*, además de *Bifidobacterium* (por contaminación ambiental o translocación intestinal), cuyos ácidos lipoteicoicos presentan reacción cruzada. También la administración de betalactámicos (amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, penicilina, ampicilina y ampicilina-sulbactam) dan falsos positivos³⁴⁻³⁶. Otras causas descritas como fuente de falsos positivos son la utilización de ciclofosfamida en los trasplantados hepáticos con enfermedad autoinmunitaria de base, en pacientes dializados, y en los casos de colonización por *Aspergillus*; además es posible la contaminación en el laboratorio, por lo que deben adoptarse medidas durante la realización de la técnica. Por el contrario, los factores más probables de falsos negativos son la presencia de anticuerpos anti-*Aspergillus* y el tratamiento con antifúngicos activos frente a hongos filamentosos²¹.

A modo de conclusión, en los pacientes con riesgo de aspergilosis: a) la detección de GM debería monitorizarse antes de la administración de betalactámicos; b) cualquier resultado positivo debería confirmarse bisemanalmente durante al menos 5 días²⁸, y c) a pesar de la discusión que existe sobre la utilidad del GM, debemos tener en cuenta que un incremento de 1,0 sobre el valor de base predice un fallo terapéutico y justifica el cambio de tratamiento²¹.

Detección de (1-3) β -D-glucano

El BG, sin capacidad inmunogénica, es un componente polisacárido específico de la pared de los hongos, excepto de los cigomicetos y, en menor medida, de los criptococos¹⁰. Su presencia en la sangre y en los fluidos estériles es un marcador de IFI, ya que se libera durante la infección, pero no permite identificar la especie. La prueba está basada en la capacidad del BG de poner en marcha la vía G de la cascada de la coagulación de los amebocitos del cangrejo *Limulus polyphemus* y, mediante una reacción en la que se utilizan reactivos diazo, se generan compuestos coloreados que pueden medirse por colorimetría. Es una técnica muy sensible que permite la detección de 1 pg/ml³⁷.

Se dispone de 2 pruebas comercializadas, Fungitec G[®] y Fungitell=GlucateLL[®]. La diferencia entre ambas radica en la especie de cangrejo del cual proceden los amebocitos que lo componen. Fungitec-G[®] utiliza amebocitos de *Tachypleus tridentatus* y GlucateLL[®], *L. polyphemus*. Algunos autores señalan que los amebocitos del equipo Fungitec-G[®] son más reactivos que los que utiliza el equipo GlucateLL[®]³⁷⁻³⁹.

Dada la mayor experiencia en la utilización de este marcador en Japón, el punto de corte para Fungitec G[®] se ha establecido en ese país en 20 pg/ml⁴⁰. Sin embargo, en Europa, al haberse comercializado más recientemente, todavía no se ha determinado este parámetro³⁹.

Estos reactivos tienen buena sensibilidad y especificidad para detectar la IFI, incluyendo patógenos como *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Saccharomyces* spp., *Trichosporon* spp. y *Acremonium* spp.⁴⁰ en los pacientes con síndrome mielodisplásico o con leucemia mieloide. La sensibilidad de esta prueba va del 55 al 100% y la especificidad del 52 al 100%. Estas variaciones dependen del reactivo utilizado, de la población de estudio y de los puntos de corte establecidos^{32,37,39-43}. Se ha descrito que Fungitec G[®] presenta una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo (VPP) del 59% y valor predictivo negativo (VPN) del 97%, con una eficacia global del 85%³⁷.

Utilizando GlucateLL[®] con 120 pg/ml como punto de corte, la sensibilidad es del 87,5%, la especificidad del 89,6%, el VPP del 70% y el VPN del 96,3%. Se ha observado que los resultados positivos de esta prueba pueden preceder a la aparición de fiebre, a los signos clínicos y a las anomalías en la tomografía de alta resolución entre 1 y 21 días³². En pacientes con leucemia mieloide aguda o síndrome mielodisplásico que presentan IFI probada o probable (punto de corte de 60 pg/ml) y a los que se les está administrando profilaxis antifúngica, GlucateLL[®] presenta una sensibilidad entre el 60-100% y una especificidad del 90-96%, con un VPP del 43-57% y un VPN del 97 al 100%, según se exija 1 o 2 determinaciones positivas seriadas para considerarlo verdadero positivo. La realización de 2 determinaciones semanales, en vez de una, mejora la sensibilidad diagnóstica³⁹.

Ambas pruebas comerciales de BG pueden presentar falsos positivos en pacientes con infecciones bacterianas concomitantes (bacteriemia por *E. coli*), con cirrosis, en pacientes hemodializados con filtros de membranas de acetato de celulosa, cuando se utilizan determinadas gasas de algodón o esponjas en cirugía y en el tratamiento con albúmina, inmunoglobulinas, algunos anticancerosos y antibióticos como las sulfamidas^{10,32}.

Un hecho interesante en la cinética del BG, en el caso de falsos positivos, es que sus valores en sangre se elevan y caen rápidamente en ausencia de tratamiento antifúngico. Es muy útil para la monitorización del tratamiento, ya que las concentraciones descienden cuando hay una buena respuesta al tratamiento.

Ostrosky-Zeichner et al⁴², en un estudio multicéntrico realizado en 2002, establecen que el punto de corte idóneo puede oscilar entre 60 y 80 pg/ml, y que los resultados son óptimos cuando se estudian 2 muestras por semana. Según Kawazu et al⁴³, el BG es menos sensible, posee peor reproducibilidad y se positiviza más tarde que la prueba GM⁴³ en la AI. Sin embargo, otros autores³² comentan que el BG se positiviza antes que el antígeno GM. La combinación de GM y BG mejora la sensibilidad y especificidad de ambas pruebas por separado y pueden considerarse muy útiles como estrategia preventiva en los pacientes neutropénicos hematológicos con alto riesgo de presentar una IFI. Debido a que en los pacientes inmunocomprometidos las infecciones mixtas están aumentando en frecuencia (cigomicetos y *Aspergillus*, *Fusarium* y *Aspergillus*, *Candida* y *Aspergillus*), la estrategia de basar el diagnóstico en una sola prueba, como la detección de GM, puede conllevar a un tratamiento inadecuado.

Podemos concluir que la detección de BG y GM son pruebas útiles para el diagnóstico de AI en pacientes hematológicos de alto riesgo. Los resultados positivos de BG deben confirmarse mediante la detección de GM y, cuando sea posible, por PCR, para identificar el tipo de IFI y así minimizar la posibilidad de falsos positivos.

Detección de ADN fúngico

Desde principios de los años noventa, se han desarrollado diferentes métodos para la detección de ADN fúngico mediante hibridación y amplificación de ácidos nucleicos. La primera permite un diagnóstico muy específico, pero relativamente poco sensible en comparación con otras técnicas de biología molecular, especialmente la amplificación de ácidos nucleicos. En la actualidad, disponemos de bastantes publicaciones sobre el valor de la PCR para el diagnóstico de las micosis sistémicas. Los genes diana utilizados son variados, si bien el más usado es la subunidad ribosomal 18S, lo que permite la detección de un amplio rango de hongos con un alto grado de sensibilidad, en torno a 1-10 fg/ml⁴¹.

Se pueden detectar secuencias de ADN específicas de género, e incluso de especie, o bien comunes a todos los hongos. La técnica más prometedora es la que utiliza sondas específicas marcadas con sustancias fluorescentes y PCR en tiempo real (PCR-TR), ya que disminuye la manipulación, la contaminación, el tiempo de realización y permite la cuantificación e identificación del género y la especie, según la sonda utilizada⁴⁴⁻⁴⁷. Así, un método adecuado para la detección de ADN de *Aspergillus* es el publicado por Kami et al⁴⁸, que utilizan unos iniciadores panfúngicos y una sonda específica de *Aspergillus* diseñada para utilizar mediante PCR-TR (Taqman) y que detecta entre 10 y 20 conidias. Otro método también útil utiliza iniciadores y sondas específicos de *Aspergillus* spp., con un límite de detección de 10 conidias/ml, mediante una plataforma PCR-TR (Taqman). Las técnicas PCR-TR también poseen una gran sensibilidad y permiten detectar cantidades mínimas de ADN fúngico, del orden de 1-10 fg,

equivalente a 1-5 UFC/ml de sangre, lo que hace que sea unas 20 veces más sensible que el cultivo²².

Dependiendo de los genes diana utilizados, la especificidad varía del 85 al 100%, a pesar de una falta de acuerdo en determinar el punto de corte de positividad. La sensibilidad del ensayo (29-100%) puede afectarse por varios factores, entre los que destacan la calidad de los iniciadores, la eficacia de la extracción, el tipo de PCR utilizada (PCR clásica, anidada o a tiempo real), el tamaño de la población estudiada, el tipo de infección (probada, probable, posible), el paciente de alto riesgo y la muestra utilizada (plasma, sangre, suero, LBA)^{43,48,49}.

Aunque se puede detectar ADN fúngico en todas las muestras clínicas, la muestra más adecuada para realizar el ensayo está todavía por determinar. Algunos autores prefieren sangre y otros, plasma o suero, e incluso LBA. Buchheidt et al⁵⁰ ponen de manifiesto que el LBA posee mayor sensibilidad y especificidad que la sangre. Sin embargo, para otros autores, aunque el uso del LBA mejora la sensibilidad de la PCR, la especificidad disminuye, ya que en un 25% de los LBA de personas sanas se obtienen PCR positivas como consecuencia de la inhalación de esporas de *Aspergillus* spp. presentes en el aire. La cuantificación de la PCR-TR puede ayudar a diferenciar estas situaciones⁴⁷. En muestras de sangre este hecho es menos frecuente, aunque hay autores que han puesto de manifiesto que algunos tubos tipo *vacutainer* con citrato y EDTA estaban contaminados con *Aspergillus*^{47,49}.

La dificultad en la obtención del LBA en determinados pacientes hace que la muestra idónea sea la sangre. El suero o el plasma son muestras apropiadas, pero debemos saber que en ellas solamente se detecta el ADN libre, ya que las hifas o fragmentos fúngicos intracelulares o rodeados de plaquetas se eliminan con la formación del coágulo o con la centrifugación. White y Barnes⁴⁹ recomiendan la utilización de sangre con EDTA, ya que al detectar ADN libre circulante y fragmentos fúngicos intracelulares minimiza las posibles variaciones. Por el contrario, otros autores recomiendan suero en vez de sangre, o plasma para evitar cualquier efecto inhibitorio por parte de los anticoagulantes. Sin embargo, White y Barnes⁴⁹ han demostrado que la inhibición de la PCR se limitaría a los pacientes que reciben heparina como consecuencia de una cirugía cardíaca.

La PCR en sangre parece ser lo bastante sensible para la detección temprana de la AI, así como para el seguimiento de la respuesta al tratamiento. La PCR a partir del LAB es menos eficaz en el diagnóstico rápido de la AI, en comparación con la PCR realizada usando plasma o suero, debido al mayor número de falsos positivos y a que la del LAB se realiza en estados avanzados de la enfermedad. El uso de procedimientos automatizados disminuye el trabajo, el riesgo de contaminación y la pérdida de ADN, y mejora la comparación interlaboratorios.

Actualmente, se conoce poco sobre el origen y la cinética del paso del ADN fúngico a la sangre. Se ha sugerido que la respuesta del hospedador impediría la liberación del ADN desde el lugar anatómico donde asienta la infección al torrente circulatorio, cuando el grado de angiointervención es bajo. Tampoco conocemos cómo circula por la sangre y cómo se metaboliza o cómo desaparece de ella, hechos esenciales para el esquema temporal de la obtención adecuada de las muestras.

Uno de los mayores retos es la interpretación de los resultados en el contexto clínico. La bibliografía científica, en general, hace referencia a una buena sensibilidad, superior al 92%, y a un VPN mayor del 90%. La mayoría de los ensayos muestra una buena especificidad, pero el VPP estaría afectado por el escaso número de casos de AI probada o probable incluidos y, en esta situación, un solo resultado falso positivo ejercería un gran impacto en el valor predictivo positivo. Para la interpretación de los resultados de la PCR, es necesario disponer de toda la información clínica posible, ya que variables como el tratamiento antifúngico pueden disminuir la carga fúngica por debajo del umbral de detección de la PCR lo que, combinado con la pérdida aceptada de ADN en el paso de extracción, puede conllevar un resultado falsamente negativo. La utilización de métodos de extracción más eficaces puede minimizar este efecto. Otra posibilidad sería utilizar más volumen de muestra, teniendo siempre presente la posible introducción de más inhibidores.

También la naturaleza de la infección puede influir en los resultados. Según el tipo y estado de la enfermedad, la carga fúngica puede ser baja y dar lugar a resultados negativos. El grado de invasión tisular es importante y las situaciones menos invasoras, como el aspergiloma, dan resultados positivos con menos frecuencia que los casos de AI pulmonar. En la actualidad, se requieren 2 muestras positivas para eliminar los falsos positivos por contaminación, pero hay una gran variedad de otros factores que afectan a los resultados. Por ello, Halliday et al⁴⁴ han propuesto para los pacientes oncohematológicos, con el fin de reducir el coste de la terapia empírica, que los resultados positivos obtenidos mediante PCR de forma intermitente, durante 2 semanas, se consideren significativos.

Otra situación complicada de interpretar es cuando un replicado es positivo y el otro negativo. Generalmente, el resultado positivo se considera contaminación y el resultado dado es como PCR negativa. Sin embargo, Millon et al⁴⁶ han puesto de manifiesto que la cantidad de ADN de *Aspergillus* detectado en las muestras positivas puede ser muy baja, por lo que la reproducibilidad de la PCR sería subóptima. También es posible que los pacientes con PCR positivas de forma intermitente, o con resultados no reproducibles, se encuentren en los estados iniciales de la enfermedad o con una carga fúngica baja debida al tratamiento o al tipo de enfermedad, aunque la contaminación y la colonización también pueden ser las causantes de esta variabilidad. Sea como fuere, no debemos olvidar que un resultado de PCR positivo puede representar el estado inicial de la enfermedad no detectado por otras técnicas. La cuestión clave que se plantea es la siguiente: los falsos positivos, ¿son realmente falsos positivos? Una respuesta adecuada es que pueden ser formas subclínicas abortadas por el tratamiento o por la recuperación de la neutropenia, o incluso que es ADN fúngico liberado a partir de los macrófagos⁵¹.

Es difícil diferenciar un falso positivo de un verdadero positivo temprano dado que la PCR es un método muy sensible. Además, no hay criterios diagnósticos consensuados, o no son adecuados, ya que no parece correcto usar métodos utilizados raramente *ante mortem*, como es la histopatología, o técnicas con resultados transitorios, como la TC, o menos sensibles, como el hemocultivo para hacer comparaciones con la PCR. Sin embargo, la PCR es útil

en la exclusión de AI y de otras IFI en pacientes gravemente inmunocomprometidos; los métodos basados en la detección de ADN pueden utilizarse en el diagnóstico de la AI y, aunque su valor diagnóstico está todavía por determinar, puede ser una alternativa en el futuro próximo, tanto para el diagnóstico como para monitorización del tratamiento.

Todos estos factores hacen que, en la actualidad, los resultados de la PCR no se incluyan como criterio de IFI en las pautas establecidas por la EORTC-MSG⁴⁹. Tampoco está claro si la detección de ADN es más sensible que la de GM en el diagnóstico de la AI, ya que hay publicados resultados contradictorios. En estudios en humanos hay controversia sobre la superioridad de la PCR respecto al GM. Algunos consideran el GM más sensible que la PCR y otros que esta última es superior. Algo sí parece claro, y es la superioridad de la PCR en presencia de un tratamiento antifúngico⁵². Todo ello depende del punto de corte elegido para el GM, el tipo de PCR utilizado y la muestra e, incluso, la cantidad de muestra analizada.

Alternativas de diagnóstico en el futuro

Detección de metabolitos

Aspergillus produce una serie de enzimas y metabolitos secundarios en el crecimiento de las hifas que pueden usarse como marcadores de diagnóstico. Entre ellos, figura la detección de gliotoxina, metabolito con propiedades inmunomoduladoras que se puede detectar en suero. Se ha descrito que *Aspergillus flavus* y *Aspergillus terreus* producen menos glucotoxina que *A. fumigatus*. Por el momento, es necesario conocer mejor la cinética y el papel patógeno antes de utilizar esta prueba como marcador en el diagnóstico temprano de la AI⁵³. Otro compuesto cuya detección se está investigando es el pentilfurano, como es el caso de pacientes con fibrosis quística y aislamiento de *A. fumigatus* de muestras respiratorias, en los que se ha detectado este compuesto orgánico volátil específico¹⁰.

Detección de anticuerpos

La experiencia en este campo también es muy limitada. En pacientes gravemente inmunodeprimidos, mediante la utilización de antígenos recombinantes de *Aspergillus*, Sarfati et al⁵⁴ han detectado anticuerpos en el 50% de los pacientes con AI, incluso en pacientes con neutropenia grave.

Biochips

Una de estas estrategias, que ya se está utilizando en campos diferentes de la medicina, es la aplicación de *biochips*. Éstos se basan en la hibridación de fragmentos de ácidos nucleicos, presentes en la muestra clínica, con oligonucleótidos fijados en un soporte de vidrio. Entre los oligonucleótidos pueden encontrarse secuencias específicas para la identificación de hongos patógenos, para la detección de mutaciones que confieran resistencia o de factores de virulencia⁵⁵. Por el momento, se trata de técnicas de investigación pero, dada su gran versatilidad, podrían constituir una valiosa herramienta diagnóstica futura.

Otras técnicas genómicas

La aplicación de las técnicas genómicas representa uno de los avances más excitantes en el campo de la micología en los últimos años. La secuenciación de diversos genomas fúngicos y la utilización de técnicas posgenómicas prometen revolucionar los estudios de patogenia en las infecciones fúngicas y desarrollar técnicas diagnósticas⁵⁶.

Bibliografía

- Pfaller MA, McGinnis MR. The laboratory and clinical mycology. En: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. Clinical Mycology. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2003. p. 67-79.
- Sigler L, Verweij PE. *Aspergillus*, *Fusarium*, and other opportunistic moniliae. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of clinical microbiology. Vol. 2. 8th ed. Washington: ASM Press; 2003. p. 1726-60.
- Patterson TF. *Aspergillus* species. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. Vol 2. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005. p. 2958-73.
- Francis PS, Walsh TJ. Fungal infection in the respiratory tract. En: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. Clinical mycology. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2003. p. 509-38.
- Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. Clin Infect Dis. 2006;43:S3-S14.
- Dromer F, McGinnis MR. Zygomycosis. En: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. Clinical mycology. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2003. p. 273-96.
- Boscak AR, Surampudi RK, Geyer SJ. Birefringent crystals in a pulmonary specimen. Clin Infect Dis. 2002;34:551-2.
- Randhawa HS, Chowdhary A, Preeti Sinha K, Kowshik T, Vijayan VK. Evaluation of peptone glucose fluconazole agar as a selective medium for rapid and enhanced isolation of *Aspergillus fumigatus* from the respiratory tract of bronchopulmonary aspergillosis patients colonized by *Candida albicans*. Med Mycol. 2006;44:343-8.
- Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infect Dis. 2005;5:609-22.
- Chamilos G, Kontoyiannis DP. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. Med Mycol. 2006;44:163-72.
- Tarrand JJ, Han XY, Kontoyiannis DP, May GS. *Aspergillus* hyphae in infected tissue: evidence of physiologic adaptation and effect on culture recovery. J Clin Microbiol. 2005;43:382-6.
- Ascioglu S, Rex JH, De Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. Clin Infect Dis. 2002;34:7-14.
- Samuel R, Truant AL, Duch B. Infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. Cumitech 42. Washington DC: ASM Press; 2005.
- Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clin Microbiol Infect. 2004;10 Suppl 1:48-66.
- Nucci M, Anaissie E. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. Clin Infect Dis. 2002;35:909-20.
- Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. Eukaryot Cell. 2006;5:1705-12.
- Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. Eukaryot Cell. 2005;4:625-32.
- Richardson MD, Koukila-Kähkölä P, Shankland GS. *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Absidia* and other agents of systemic and subcutaneous zygomycoses. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of clinical microbiology. Vol. 2. 8th ed. Washington: ASM Press; 2003. p. 1761-80.
- Gilgado F, Serena C, Cano J, Gene J, Guarro J. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:4211-3.
- Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. Clin Infect Dis. 2005;40:1762-9.
- Maertens J, Theunissen K, Lodewyck T, Lagrou K, Eldere JV. Advances in the serological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections in patients with haematological disorders. Mycoses. 2007;50 Suppl 1:2-17.
- Del Palacio A, Cuétara MS, Pontón J. El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. Rev Iberoam Micol. 2003;20:90-8.

23. Maertens J, Theunissen K, Deeren D, Meersseman W, Van Eldere J. Defining a case of invasive aspergillosis by serum galactomannan. *Med Mycol.* 2006;44 Supl 1:173-8.
24. Verweij PE, Mennink-Kersten MA. Issues with galactomannan testing. *Med Mycol.* 2006;44 Supl 1:179-83.
25. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, Van Eldere J, Boogaerts M. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood.* 2001;97:1604-10.
26. El Saleeby CM, Allison KJ, Knapp KM, Walsh TJ, Hayden RT. Discordant rise in galactomannan antigenemia in a patient with resolving aspergillosis, renal failure, and ongoing hemodialysis. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3560-3.
27. Marr KA, Leisenring W. Design issues in studies evaluating diagnostic tests for aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 2005;41 Supl 6:S381-6.
28. Aubry A, Porcher R, Bottero J, Touratier S, Leblanc T, Brethon B, et al. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with β -Lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol.* 2006;44:389-94.
29. Verweij PE, Brinkman K, Kremer HP, Kullberg BJ, Meis JF. *Aspergillus* meningitis: diagnosis by non-culture-based microbiological methods and management. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1186-9.
30. Klont RR, Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Utility of *Aspergillus* antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis.* 2004;39:1467-74.
31. Francesconi A, Kasai M, Petraitiene R, Petraitis V, Kelaher AM, Schaufele R, et al. Characterization and comparison of galactomannan enzyme immunoassay and quantitative real-time PCR assay for detection of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluid from experimental invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2475-80.
32. Pazos C, Pontón J, Del Palacio A. Contribution of (1 α 3-der)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol.* 2005;43:299-305.
33. Murashige N, Kami M, Kishi Y, Fujisaki G, Tanosaki R. False-positive results of *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assays for a patient with gastrointestinal graft-versus-host disease taking a nutrient containing soybean protein. *Clin Infect Dis.* 2005;40:333-4.
34. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Klont RR, Warris A, Gavini F, Op den Camp HJ, et al. Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive Platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3925-31.
35. Bart-Delabesse E, Basile M, Al Jijakli A, Souville D, Gay F, Philippe B, et al. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigenemia to determine biological and clinical implications of beta-lactam treatments. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5214-20.
36. Metan G, Durusu M, Uzun O. False positivity for *Aspergillus* antigenemia with amoxicillin-clavulanic acid. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2548-9.
37. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A, Iwasaki H, et al. Plasma (1 α 3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet.* 1995;345:17-20.
38. Hossain MA, Miyazaki T, Mitsutake K, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, et al. Comparison between Wako-WB003 and Fungitec G tests for detection of (1 α 3)-beta-D-glucan in systemic mycosis. *J Clin Lab Anal.* 1997;11:73-7.
39. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. 2004;39:199-205.
40. Yoshida M. Usefulness of determination of beta-D-glucan in the diagnosis of deep mycosis -experience in Japan. *Med Mycol.* 2006;44 Sup 1:185-9.
41. Alexander BD. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. *Transpl Infect Dis.* 2002;4 Supl 13:32-7.
42. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1 α 3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis.* 2005;41:654-9.
43. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, et al. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1 α 3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2733-41.
44. Halliday C, Hoile R, Sorrell T, James G, Yadav S, Shaw P, et al. Role of prospective screening of blood for invasive aspergillosis by polymerase chain reaction in febrile neutropenic recipients of haematopoietic stem cell transplants and patients with acute leukaemia. *Br J Haematol.* 2006;132:478-86.
45. Scotter JM, Chambers ST. Comparison of galactomannan detection, PCR-enzyme-linked immunosorbent assay, and real-time PCR for diagnosis of invasive aspergillosis in a neutropenic rat model and effect of caspofungin acetate. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12:1322-7.
46. Millon L, Piarroux R, Deconinck E, Bulabois CE, Grenouillet F, Rohrlach P, et al. Use of real-time PCR to process the first galactomannan-positive serum sample in diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5097-101.
47. White PL, Linton CJ, Perry MD, Johnson EM, Barnes RA. The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. *Clin Infect Dis.* 2006;42:487-9.
48. Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, et al. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 2001;33:1504-12.
49. White PL, Barnes RA. *Aspergillus* PCR-platforms, strengths and weaknesses. *Med Mycol.* 2006;44 Supl:S191-8.
50. Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Ritter J, Suedhoff T, Baldus M, et al. Detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients by means of 2-step polymerase chain reaction: clinical results. *Clin Infect Dis.* 2001;33:428-35.
51. Lass-Flörl C, Aigner J, Gunsilius E, Petzer A, Nachbaur D, Gastl G, et al. Screening for *Aspergillus* spp. using polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with hematological malignancies. *Br J Haematol.* 2001;113:180-4.
52. Becker MJ, De Marie S, Willemse D, Verbrugh HA, Bakker-Woudenberg IA. Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1434-8.
53. Lewis RE, Wiederhold NP, Lionakis MS, Prince RA, Kontoyiannis DP. Frequency and species distribution of gliotoxin-producing *Aspergillus* isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center. *J Clin Microbiol.* 2005;43:6120-2.
54. Sarfati J, Monod M, Recco P, Sulahian A, Pinel C, Candolfi E, et al. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;55:279-91.
55. Fodor SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, et al. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature.* 1993;364:555-6.
56. Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. Use of genome information for the study of the pathogenesis of fungal infections and the development of diagnostic tools. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22:238-41.