

620138295  
012522776  
12493737x



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
Departamento de Microbiología

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE LA PCR EN TIEMPO  
REAL Y DETECCIÓN DE GALACTOMANANO DE ASPERGILLUS, PARA EL  
DIAGNOSTICO DE LA ASPERGILOSIS INVASIVA EN PACIENTES  
ONCOHEMATOLÓGICOS**

20  
216

**MERCEDES RAMÍREZ ARCOS**

**Tesis doctoral**

SEVILLA  
2008

TD  
216

Se ha registrado esta Tesis Doctoral en el folio 165 número 341 del libro correspondiente.  
Fecha: 5-02-08

El Jefe del Departamento de

*Jose Carlos Palomares Folia*



El Dr. Jose Carlos Palomares Folia, Profesor Asociado del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla y la Dra. Estrella Martín Mazuelos, Profesora Asociada del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla

**CERTIFICAN:**

Que la tesis titulada: **"DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE LA PCR EN TIEMPO REAL Y DETECCIÓN DE GALACTOMANANO DE ASPERGILLUS, PARA EL DIAGNOSTICO DE LA ASPERGILOSIS INVASIVA EN PACIENTES ONCOHEMATOLÓGICOS"**, ha sido realizada por Mercedes Ramírez Arcos y dirigida por los que la suscriben, siendo apta para ser leída ante el Tribunal correspondiente, con la aspiración de obtener el grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Lo que se hace constar a efectos oportunos, en Sevilla a 24 de Enero de 2008.

Fdo.

*Jose Carlos Palomares*

Jose Carlos Palomares

*Estrella Martín Mazuelos*

Estrella Martín Mazuelos

## ADDENDUM

Este trabajo ha sido subvencionado por el Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid (FIS 03/0212)

Parte de los resultados obtenidos han sido publicados y presentados a congresos nacionales e internacionales:

- ❖ M Ramirez, MJ Torres, M Ruiz, JC Palomares, J Aznar y E Martin. Utilización de PCR en tiempo real para la detección e identificación de *Aspergillus* spp. 16 Reunión Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología Clínicas. Sevilla 2003.
- ❖ MJ Torres, M Ruiz, M Ramirez, E Martin, JC Palomares, y J Aznar. Utilización de PCR en tiempo real para la detección e identificación de *Candida* spp. 16 Reunión Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología Clínicas. Sevilla 2003.
- ❖ M. Ramírez, A. Aller, C. Castro, E. López, R. Claro, J.C. López, C. Martín, E. Martín-Mazuelos. Rentabilidad de la detección de Galactomanano en el diagnóstico de la aspergilosis invasiva. VII Congreso Nacional de Micología. Salamanca 2003.
- ❖ MJ Torres, C Castro, J Aznar, E Martín-Mazuelos, M Ramirez, JC Palomares. Rapid detection and identification of *Aspergillus* spp by real-time PCR. 14<sup>th</sup> European Congress Clinical of Microbiology and Infectious Diseases. Praga 2004.
- ❖ JC Palomares, M Ramirez, A Aller, MJ Torres, C Castro, E Jean-Paul, J Aznar, E. Martín-Mazuelos. Comparison between PCR and detection of antigen in whole blood samples for early diagnosis of invasive Aspergillosis. 2<sup>nd</sup> Trends in Medical Mycology. Berlin, October 2005.
- ❖ C Castro, M Ramírez, M Ruiz, A Aller, JC Palomares, J Aznar, E Martín-Mazuelos. Diagnostic use of two serologic tests for invasive candidiasis. XVI

European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Niza 2006.

- ❖ C Castro, MJ Torres, A Aller, M Ruiz, J Aznar, J Palomares, E Martín-Mazuelos. Invasive candidiasis diagnosis by real time PCR. XVI Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. París, Junio 2006.
- ❖ AI Aller, MD López Prieto, M Ramírez, G Tocón, V Rubio, JC Palomares, MJ Torres. Aplicación de las técnicas de detección de antígeno de Galactomanano y PCR en el diagnóstico de la Aspergilosis Invasiva. XIX Reunión de la Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología clínica. Córdoba 2006.
- ❖ M Ramírez, C Castro, AI Aller, M Ruiz, JC Palomares, J Aznar, E Martín-Mazuelos. Rentabilidad de la detección de Galactomanano y 1,3-b-D-glucano en el diagnóstico de la Aspergilosis invasiva. VIII Congreso Nacional de Micología. Barcelona, Octubre de 2006.
- ❖ C Castro, M Ramírez, AI Aller, V Rubio, M Ruiz, JC Palomares, J Aznar y E Martín-Mazuelos. Utilidad diagnóstica de dos técnicas serológicas en la candidiasis invasiva. VIII Congreso Nacional de Micología. Barcelona, Octubre de 2006.
- ❖ MJ Torres, A Aller, M Ramírez, C Castro, M Ruiz, JM Cisneros, I Espigado, C Hacha, J Aznar, E Martín-Mazuelos and J.C. Palomares. Detection and identification of *Aspergillus* and *Candida* spp by real-time PCR in clinical samples. 17<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Munich, April, 2007.
- ❖ C Castro, M Ramírez, MJ Torres, AI Aller, M Ruiz, J Aznar, JC Palomares, E Martín-Mazuelos. Molecular detection and identification of invasive candidiasis from clinical samples using real-time PCR. J. Clin. Microbiol. (En revisión).

- ❖ M Ramirez, C Castro, MJ Torres, AI Aller, M Ruiz, J Aznar, JC Palomares and E Martín-Mazuelos. Molecular detection and identification of *Aspergillus* spp from clinical samples using real-time PCR. *Mycoses* (En revisión)

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	33
2.1. HIPÓTESIS.....	34
2.2. OBJETIVOS.....	35
3. MATERIAL.....	36
3.1. MICROORGANISMOS.....	37
3.2. PACIENTES Y MUESTRAS CLÍNICAS.....	38
3.3. PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS.....	40
3.4. TAMPONES Y SOLUCIONES.....	42
3.5. MEDIOS DE CULTIVO.....	45
4. MÉTODOS.....	47
4.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ASPERGILLUS SPP.....	48
4.1.1 MACROSCÓPICA.....	48
4.1.2 MICROSCÓPICA.....	48
4.2. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS.....	49
4.3. EXTRACCIÓN DEL ADN CROMOSÓMICO.....	52
4.3.1 EXTRACCIÓN AUTOMÁTICA MAGNAPURE LC.....	53
4.3.2 EXTRACCIÓN MANUAL QUIAGEN MINI KIT.....	54
4.3.3 EXTRACCIÓN MANUAL ROCHE HIGH PURE PCR TEMPLATE PREPARATION KIT.....	54
4.4. CUANTIFICACIÓN DE LA ADN EXTRAÍDO.....	55
4.4.1 ADN PURO CUANTIFICADO ESPECTOFOTOMETRICAMENTE.....	55
4.4.2 DILUCIONES SERIADAS DE UN CULTIVO DE <i>A.FUMIGATUS</i> .....	56
4.4.3 SANGRE CONTAMINADA.....	56
4.5. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS.....	56
4.6. PCR EN TIEMPO REAL.....	57
4.7. DETECCIÓN DE ANTIGENO GALACTOMANANO DE ASPERGILLUS.....	61
4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	66
5. RESULTADOS.....	67
5.1 DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICA.....	68
5.1.1 SENSIBILIDAD: LÍMITE MÍNIMO DE DETECCIÓN.....	68
5.1.2.1 ADN PURO CUANTIFICADO ESPECTOFOTOMETRICAMENTE.....	68
5.1.2.2 DILUCIONES SERIADAS DE UN CULTIVO DE <i>A FUMIGATUS</i> .....	70

5.1.2.3 SANGRE CONTAMINADA.....	71
5.1.2 ESPECIFICIDAD.....	72
5.2 DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA.....	75
5.2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	78
5.2.2 GALACTOMANANO.....	80
5.2.3 PCR TIEMPO REAL.....	84
5.3 COMPARACION GALACTOMANANO / PCR TIEMPO REAL.....	86
6. DISCUSIÓN.....	89
7. CONCLUSIONES.....	104
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
9. ANEXO.....	119

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Factores de riesgo más frecuentemente asociados con el desarrollo de una Aspergilosis invasiva.....	15
<b>Tabla 2.</b> Incidencia de AI según enfermedad de base.....	16
<b>Tabla 3.</b> Comparación entre Observación directa y cultivo: ventajas e inconvenientes.....	17
<b>Tabla 4.</b> Factores de riesgo de micosis invasora en neutropénicos. Riesgo alto.....	18
<b>Tabla 5.</b> Valores de Sensibilidad y Especificidad de la técnica de Galactomanano en función de los distintos puntos de corte elegidos y el número de determinaciones.....	20
<b>Tabla 6.</b> Clasificación de los microorganismos utilizados para determinar la especificidad.....	38
<b>Tabla 7.</b> Seguimiento de los pacientes realizado tras evento de riesgo de infección fúngica invasiva.....	40
<b>Tabla 8.</b> Cebadores empleados en el estudio.....	58
<b>Tabla 9.</b> Sondas utilizadas en el estudio.....	59
<b>Tabla 10.</b> Componentes de la reacción de PCR.....	60
<b>Tabla 11.</b> Condiciones de la PCR.....	61
<b>Tabla 12.</b> Valores de Densidad Óptica e interpretación de los resultado de la técnica del Galactomanano.....	63
<b>Tabla 13.</b> Principales causas de resultados Falsos Positivos.....	65
<b>Tabla 14.</b> Principales causas de resultados Falsos Negativos.....	66
<b>Tabla 15.</b> Media y desviación estándar de los Ct (ciclo umbral) obtenidos con las células en función de la dilución de partida.....	71
<b>Tabla 16.</b> Media de los valores de Ct (ciclo umbral) obtenidos utilizando el método automático de extracción del ADN MagNAPure LC Total Nucleic Acid Isolation .....	72
<b>Tabla 17.</b> Resultados de la especificidad de la técnica.....	74



<b>Tabla 18.</b> Clasificación de las especies de <i>Aspergillus</i> en función de la Tm (temperatura de fusión).....	76
<b>Tabla 19a.</b> Distribución por hospitales de las muestras recogidas en el estudio.....	77
<b>Tabla 19b</b> Distribución por hospitales de las media de muestras recogidas en el estudio por cada paciente según los hospitales de procedencia.....	77
<b>Tabla 20.</b> Principales características de la población de estudio.....	79
<b>Tabla 21.</b> Resultados de la media y la desviación de los distintos valores de Ct (ciclo umbral) obtenidos tanto para suero como para sangre total.....	85
<b>Tabla 22a.</b> Distribución de los resultados obtenidos mediante PCR tiempo real y Galactomanano en los pacientes con Aspergilosis Invasiva probada, probable y posible.....	89
<b>Tabla 22b.</b> Principales características clínicas de los pacientes con Aspergilosis invasiva probada, probable y posible.....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Curvas de amplificación obtenidas durante la PCR en tiempo real con diluciones de ADN purificado de <i>Aspergillus fumigatus</i> y número de ciclos necesario para que la emisión de fluorescencia empiece a aumentar.....	70
<b>Figura 2.</b> Recta de regresión obtenida con ADN purificado de <i>Aspergillus</i> . Se observa una relación lineal entre ambas variables.....	70
<b>Figura 3.</b> Curvas de amplificación obtenidas durante la PCR en tiempo real con diluciones de sangre contaminada con conidias de <i>Aspergillus fumigatus</i> y número de ciclos necesario para que la emisión de fluorescencia empiece a aumentar.....	73
<b>Figura 4.</b> Curvas de fusión de las distintas especies de <i>Aspergillus</i> .....	75
<b>Figura 5a.</b> Distribución por hospitales de las muestras recogidas en el estudio.....	78
<b>Figura 5b.</b> Distribución por hospitales de la media de muestras recogidas por cada paciente.....	78
<b>Figura 6.</b> Distribución por pacientes según de la clasificación de EORTC/IFICG.....	80
<b>Figura 7.</b> Relación entre el total de muestras obtenidas en los distintos hospitales y las muestras Galactomanano positivas.....	81
<b>Figura 8.</b> Evolución de las cifras de Galactomanano tras tratamiento antifúngico.....	83
<b>Figura 9.</b> Evolución de las cifras de Galactomanano en un caso de Aspergilosis Invasiva posible con signo del halo positivo.....	84
<b>Figura 10.</b> Curvas de disociación de los productos de amplificación obtenidos utilizando sueros de un paciente con Aspergilosis invasiva probada.....	86
<b>Figura 11.</b> Curvas de disociación de los productos de amplificación obtenidos utilizando sangre total de un paciente con Aspergilosis Invasiva probada.....	86
<b>Figura 12.</b> Distribución del porcentaje de resultados positivos obtenidos mediante la detección de Ag Galactomanano de <i>Aspergillus</i> spp y PCR en tiempo real.....	87

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores de tesis, Estrella Martín Mazuelos y José Carlos Palomares Folía, el apoyo recibido durante mis años de formación. Con ellos di mis primeros pasos en este difícil mundo de la investigación y completé mi formación en hongos y en biología molecular.

A María José Torres, por su inestimable y desinteresada ayuda. Con ella compartí muchas horas en el laboratorio pero sobre todo fue una confidente y amiga en los momentos más difíciles de mi trabajo.

A Anabel Aller, que participó activamente en la realización de esta tesis aportando los pacientes del Hospital de Jerez. Sin su colaboración y sin los consejos prácticos y su apoyo personal que siempre noté, no hubiera podido llevar a cabo esta tesis.

A todo el personal de Valme con los que compartí muchos momentos de alegría. Al resto de mis facultativos Carmen Flores, Julio Vargas, Jose Luis García, Samuel Bernal, a mis residentes: Carmen, Elena, Cecilia..., y a todos los técnicos, enfermeros y administrativas. Ellos completaron mi formación y me hicieron disfrutar de este desconocido mundo de la Microbiología. Especialmente quisiera recordar a Carmen Nogales con la que compartí buenos y malos momentos y de la que, sin saberlo, aprendí mucho.

A las "niñas del Aljarafe", Carmen Serrano y Mónica Chaves. Ellas confiaron en mi trabajo y siempre les estaré agradecida por ello. A ellas las conocí durante mis años de formación en Valme, pero no fue hasta los años posteriores en que coincidimos en

el Hospital de San Juan de Dios de Bormujos, cuando realmente descubrí a dos grandes amigas. Tampoco quería olvidarme de Manolo Sánchez, Cinta Montilla y por supuesto de Carmen Tejedor. Todos ellos me han ayudado a enriquecerme personal y laboralmente en los años posteriores a mi residencia.

Quisiera tener un recuerdo muy especial para mi familia. A mis padres, Mercedes y Juan. A pesar de que ellos no tuvieron la oportunidad de recibir estudios superiores, siempre me dieron toda la educación necesaria para poder llegar a completar los míos. Mi felicidad tras la consecución de una especialidad médica y la elaboración de esta tesis doctoral sé que es también la felicidad de ellos. Y por supuesto a mis hermanos Juan y Eva. Con ellos compartí mi infancia y mi juventud, y aun hoy nos sentamos todos juntos algún que otro domingo alrededor de un arroz picante en Granada.

Pero si hay una persona a la que tuviera que dedicar esta tesis, ese es mi marido Angelito. Con él inicié mis estudios en Medicina en Granada y continuamos nuestra formación de especialistas en Sevilla. El ha sido mi mayor apoyo en todas esas pequeñas dificultades que diariamente encontré en el trabajo y en la investigación. Juntos, consolidamos una relación internista-infectológica-microbióloga de la que tengo inolvidables recuerdos hasta la fecha profesionales y personales.

## 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha producido un aumento importante de las infecciones fúngicas, fundamentalmente producido por el aumento de población susceptible, esto es, pacientes inmunodeprimidos. Existe un amplio espectro de agentes etiológicos implicados en la producción de este tipo de infecciones, aunque *Candida albicans* sigue siendo la primera causa de infección fúngica invasora, el extendido uso de fluconazol como profilaxis en estos pacientes, ha hecho que se produzca un cambio importante en la epidemiología de estas infecciones, cobrando un mayor protagonismo las especies de *Candida* no *albicans*, algunas de las cuales presentan una resistencia intrínseca o adquirida a fluconazol, así como otras especies de hongos como es el caso de *Aspergillus* spp (1).

En las dos últimas décadas se ha producido especialmente, un incremento sustancial de los casos de aspergilosis invasiva como consecuencia de: a) la aparición de la epidemia de sida, b) el desarrollo de nuevos regímenes de tratamiento quimioterápico de tumores sólidos y neoplasias hematológicas, c) el incremento exponencial en muchos países del mundo y especialmente en el nuestro de los trasplantes de órganos, y d) la utilización de fármacos inmunosupresores cada vez mas potentes en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y de otras tan comunes como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (2,3). Algunos de estos factores aparecen recogidos en la tabla 1.

**Tabla 1.** Factores de riesgo más frecuentemente asociados con el desarrollo de una Aspergilosis invasiva.

---

Neoplasias hematológicas > neoplasias de órganos sólidos
Fases de recaída > fases de remisión
Quimioterapia antineoplásica
Transplante de progenitores hematopoyéticos
Transplante de órganos sólidos ( hígado, pulmón, corazón)
Neutropenia profunda (<100 neutrófilos/mm <sup>3</sup> durante mas de tres semanas) o prolongada (<500 neutrófilos/mm <sup>3</sup> durante mas de cinco semanas)
Enfermedad injerto contra huésped
Tratamiento con corticoides y otros inmunosupresores
Diabetes
Tratamiento antimicrobiano prolongado (profilaxis antimicrobiana y antivírica).
Infección por CMV (incluida seropositividad) o infección vírica respiratoria
Aumento de la concentración de conidios de <i>Aspergillus</i> en el ambiente: obras de construcción y remodelación, aerosoles asociados a duchas y otras instalaciones de agua.
Cirugía extensa (cardiovascular)
Grandes quemaduras (> 50% de la superficie)
Estancia en unidades de cuidados intensivos
Hemodialisis

---

La aspergilosis invasiva (AI) es una causa importante de morbimortalidad en enfermos inmunocomprometidos. El diagnóstico es difícil y la mayoría de las veces, se hace de forma tardía e incluso post-mortem, estimándose actualmente que hasta un 30% de casos de AI no se diagnostica ni se trata, siendo un hallazgo necrótico. La incidencia de AI es variable según la enfermedad de base. Como vemos en la tabla 2 el grupo de

riesgo más numeroso lo constituyen los enfermos hematológicos con un 61% de incidencia global en ellos (leucemia, linfoma, trasplante de médula ósea autólogo y alogénico...) frente al 9% en trasplante de órgano sólido, 8% en SIDA y 4% en neoplasias de órganos sólidos (4).

**Tabla 2.** Incidencia de Aspergilosis invasiva según enfermedad de base.

Leucemia, linfoma	29%
Transplante alogénico de M.O.	25%
Transplante autólogo de M.O.	7%
Transplante de órgano sólido	9%
SIDA	8%
Tumor de órgano sólido	4%

El diagnóstico temprano es esencial para poder instaurar un tratamiento antifúngico que conduzca al éxito (5). Las técnicas microbiológicas tradicionales (visión directa, y cultivo) son tardías y tienen una baja sensibilidad (15-20%). Además tienen un gran inconveniente como es la poca capacidad para distinguir entre colonización e infección, aspecto que resulta extremadamente importante teniendo en cuenta que la mayoría de las especies de *Aspergillus* son muy ubicuas y se encuentran como contaminantes en muchos laboratorios clínicos. En un trabajo realizado por Perfect et al (6), se muestra el riesgo de AI en enfermos con cultivo positivo de *Aspergillus* spp. observándose que en los enfermos con riesgo alto, un cultivo positivo se asocia con AI en el 50-64% de los casos, mientras que si los enfermos tienen un riesgo intermedio ambos eventos se relacionan en el 8-28% de los casos (6). Si utilizamos lavado broncoalveolar y biopsias de tejidos se pueden mejorar los resultados, pero por tratarse de procedimientos invasivos, raramente pueden ser realizados en este tipo de



pacientes debido a que son pacientes con muy mal estado general y múltiples alteraciones tales como hipoxemia, trombopenia, etc, lo que complicaría el riesgo de cualquier intervención invasiva. Las técnicas radiológicas complementan el diagnóstico, aunque no siempre se detecten lesiones nodulares en la radiología simple de tórax y tan solo sea fiable el signo del halo visualizado en la tomografía axial computarizada.

**Tabla 3.** Comparación entre Observación directa y cultivo: ventajas e inconvenientes.

	VENTAJAS	INCONVENIENTES
OBSERVACIÓN DIRECTA	Rápida, fiable y barata Capaz de diferenciar entre hongos (histología)	Falsos positivos y negativos No diferencia colonización de infección (excepto histología) Sensibilidad variable
CULTIVO	Permite el aislamiento y la identificación del hongo Pruebas de sensibilidad	Lentos Rentable en muestras invasivas Interpretación cautelosa No diferencia entre colonización e infección Hemocultivos negativos en Aspergillus (Candida solo 50%)

Asimismo, debido a que los síntomas de la AI son tardíos y muy inespecíficos, es necesario estratificar a los pacientes por grupos de riesgo siguiendo los criterios de Prentice *et al.* (7). La estratificación de los pacientes de acuerdo al riesgo de padecer AI permite mejorar los valores predictivos de las pruebas diagnósticas y la utilización racional de la profilaxis, que últimamente ha sido puesta en entredicho pues podría

tener mas riesgos que beneficios. Todos estos problemas hacen necesario disponer de técnicas muy sensibles y específicas que demuestren la existencia de una AI antes de que aparezcan los síntomas y/o signos clínicos y que permitan establecer un tratamiento precoz.

**Tabla 4 . Factores de riesgo de micosis invasiva en neutropénicos. Riesgo alto.**

<100 neutrófilos > 3 semanas
Transplante de médula ósea no relacionado
Enfermedad injerto contra huésped
Neutropenia < 500 >5 semanas
Corticosteroides >2 mg/Kg > 2 semanas
Corticosteroides >1 mg/Kg con neutropenia
AraC altas dosis
Fludarabina

Por todos estos motivos, en las últimas décadas se están desarrollando nuevas técnicas, independientes del cultivo, entre las que nosotros destacamos la detección de galactomanano de *Aspergillus* mediante ELISA, y la amplificación de ácidos nucleicos.

El galactomanano (GM) es un componente de la pared celular del género *Aspergillus*, que constituye el principal exoantígeno que se libera durante la angioinvasión. En enfermos con aspergilosis invasora, el GM puede ser detectado en suero, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pericárdico/pleural, y lavado broncoalveolar. Las concentraciones de GM en suero son fluctuantes, y aunque no se conoce su cinética con exactitud, se sabe que en su aclaramiento intervienen las células de Kupffer.

Existen en la actualidad dos técnicas comerciales para la detección de GM, la más utilizada en los laboratorios de microbiología clínica es Platelia *Aspergillus*<sup>®</sup> (BioRad, Alemania). Se trata de una técnica de ELISA doble Sandwich que utiliza un anticuerpo monoclonal EB-A2 y cuyo límite mínimo de detección está en 0,5-1ng/ml, siendo necesarias dos determinaciones consecutivas con un valor superior a este límite para considerar un resultado positivo. Hasta la fecha ha existido una gran controversia en cuanto al punto de corte que debía considerarse para informar un resultado positivo oscilando los valores entre 0,5 y 1,5ng/ml. En la actualidad se ha establecido 0,5ng/ml como valor definitivo para considerar una muestra como positiva.

Uno de los principales problemas que presenta el GM es la enorme variabilidad en los valores de sensibilidad descritos en los distintos trabajos. Como puede verse en la tabla 5 estos valores oscilan entre el 0 y 95% de sensibilidad de la técnica.

**Tabla 5.** Valores de Sensibilidad y Especificidad de la técnica de Galactomanano en función de los distintos puntos de corte elegidos y el número de determinaciones.

S (%)*	E (%)*	PUNTO DE CORTE	Nº DE DETERMINACIONES	REFERENCIA
90	84	1,5	2+	Verweij. JCM. 1995
90,6	94	1,5	2+	Sulahian. Cancer. 1996
93	95	1,0	2+	Maertens. JCM. 1999
90	98	1,0	2+	Maertens. Blood. 2001
94,4	98,8	1,0	2+	Maertens. Blood. 2002
67	98	1,5	2+	Machetti. TID. 1998
50	94	0,7	1+	Herbrecht. JCO. 2002
50	99,6	1	2+	Pinel. JCM. 2003
50	94,7	0,5	2+	Hayden. Focus on fungal Inf 03
29	99	1,5	1+	Herbrecht. JCO. 2002
43	99	1,5	-	Marr et al. 2003
0	99,4	1,5	-	Jordanides et al. 2003
0	100	1,5	-	Ferns et al. 2002
97,4	90,5	0,5	1+	Maertens et al. 2007
92,1	97,5	0,5	2+	Maertens et al. 2007
61-71	89-93	0,5-1,5	1-2+	Pfeiffer et al. 2006

\*: S: Sensibilidad; E: Especificidad

Esta enorme variabilidad en cuanto a los resultados de GM depende de una serie de factores biológicos y epidemiológicos entre los cuales se encuentran (7) :

Factores biológicos:

- ❖ Localización de la infección
- ❖ Estructura molecular de GM liberada (> 4 residuos). Paso sangre. Ag circulante
- ❖ Microambiente del sitio de infección: nutrientes, oxígeno, pH...
- ❖ Exposición previa a antifúngicos
- ❖ Especie de *Aspergillus*. Fase de crecimiento
- ❖ Nivel de inmunosupresión
- ❖ Aclaramiento renal o hepático
- ❖ Presencia de Ac contra GM
- ❖ Pretratamiento de las muestras

Factores epidemiológicos:

- ❖ Tipo de paciente
- ❖ Recogida de la muestra
- ❖ Definición de un resultado positivo
- ❖ Definición de paciente infectado
- ❖ Punto de corte
- ❖ Experiencia del laboratorio.
- ❖ Prevalencia de la enfermedad.

El GM puede ser detectado en el suero en un estadio inicial de la infección, generalmente antecede a la aparición de signos y síntomas clínicos e incluso a la aparición de anomalías radiológicas que sugieren el diagnóstico de AI. Es importante destacar que el título de GM se corresponde con la evolución clínica de la enfermedad siendo además una herramienta útil también en la monitorización de la respuesta terapéutica ya que se ha visto que el aumento de GM ( $\geq 1\text{ng/ml}$ ) sobre el valor basal en la primera semana de tratamiento predice el fallo terapéutico con una sensibilidad del 44% especificidad del 87% y un valor predictivo positivo de 94%, de

modo que sirve para modificar el tratamiento o añadir una segunda droga antifúngica con el objeto de potenciar o mejorar la eficacia del antifúngico que inicialmente se hubiera elegido (8-12).

No obstante el GM puede tener resultado falsos negativos (8-10%) debido fundamentalmente a los siguientes factores (8):

- ❖ Presencia de Ac antiAspergillus: ya que al unirse con el Ag GM, impiden la unión con el Ac monoclonal EB-A2 utilizado en la técnica
- ❖ Grado de angioinvasión: Para que el Gm sea detectado en sangre es necesario que exista angioinvasión
- ❖ Abscesos (encapsulación ) que impiden la liberación del GM
- ❖ Variabilidad en la producción y liberación de GM según especie.
- ❖ Profilaxis empírica con antifúngicos: Los antifúngicos inhiben la formación de la hifa y por tanto la liberación de GM.

Sin embargo son más importantes los resultados falsos positivos que oscilan entre un 8-14% y se deben fundamentalmente a (8):

- ❖ Población pediátrica: La presencia de residuos Galactomanano en algunos cereales que forman parte de la dieta de este tipo de pacientes podría favorecer la obtención de un resultado falso positivo, al pasar estos residuos del tubo digestivo al torrente circulatorio. (traslocación)
- ❖ Receptores de trasplante de médula ósea (TMO)
- ❖ Enfermedad injerto contra huésped (EICH)
- ❖ Tratamiento con Ciclofosfamida
- ❖ Mucositis intensa ( coexistencia con ingesta de cereales leche materna)
- ❖ Infección por *Penicillium* spp. , *Paecilomyces* spp. , *Alternaria* spp. y *Candida* spp.
- ❖ Colonización masiva intestinal por *Aspergillus*.

- ❖ Bacteriemias, transfusiones, tratamiento con Piperacilina-tazobactam y/o Amoxicilina-clavulánico.

Por otro lado, el desarrollo de las técnicas de biología molecular, ha servido de base para la aparición de innumerables métodos de diagnóstico microbiológico frente a muy diversos microorganismos. En la actualidad, en alguno de ellos se ha convertido incluso en la técnica de referencia para su diagnóstico, especialmente en virología. También en micología se han comenzado a desarrollar métodos de detección e identificación aplicables al diagnóstico de las infecciones fúngicas. Concretamente para el diagnóstico de las infección fúngica invasiva (IFI), existen en la actualidad diferentes métodos microbiológicos no basados en el cultivo. Nos referimos especialmente a la detección de antígenos o de los ácidos nucleicos amplificados de los agentes etiológicos. Se ha comprobado con diversos estudios (16, 21) que estos métodos funcionan adecuadamente, pero necesitan aún, ser incorporados en su uso rutinario en la práctica clínica para el diagnóstico de IFI, mediante la demostración en estudios prospectivos de su capacidad diagnóstica precoz, con el objeto de instaurar el tratamiento antifúngico en los estadios iniciales de la enfermedad.

Las técnicas de amplificación y detección del ADN de los microorganismos patógenos en muestras clínicas, incluido el ADN fúngico, presentan una serie de problemas que comienzan con la extracción eficaz y segura de dicho ácido nucleico. Por ello, el empleo de sistemas automáticos de extracción cerrados (evitará las contaminaciones cruzadas) y esterilizables (descontaminación de todas las superficies internas y de los reactivos a usar, mediante luz UV que inactiva las esporas que puedan contaminar los reactivos), suponen un avance decisivo en el diagnóstico microbiológico clínico. Además, la automatización evita errores de manipulación y al ser cerrado, no existe posibilidad de contaminación desde el exterior. Tanto el ADN extraído como los

reactivos son depositados y mezclados en los capilares finales a usar en la amplificación del ADN.

Una vez obtenido éste, un método rápido de amplificación mediante PCR cuantitativo en tiempo real, para la detección del ADN de especies fúngicas permite su análisis en menos de 1 hora. El método combina en un solo tubo la amplificación mediante PCR y la detección del amplicón mediante sondas específicas del mismo, lo que permite su detección y cuantificación a la vez que se realiza la amplificación, disminuyendo a la vez las posibilidades de contaminación por manipulación postamplificación (16). La sensibilidad lograda mediante la combinación de estos métodos ha demostrado ser de hasta 100 fg de ADN fúngico/ml de sangre lo que equivaldría a 1 espora/ml, con una sensibilidad del 100% en pacientes con IFI probada cuando se realizan 2 o más determinaciones por paciente, adelantándose en más de 2 días a la aparición de los primeros síntomas clínicos (16, 17). Por otro lado al ser un método cuantitativo, permitirá realizar la monitorización del tratamiento una vez instaurado, al poder determinar el descenso de la concentración del ADN en las muestras cuando el tratamiento sea eficaz, tal y como se realiza actualmente con infecciones por citomegalovirus o por virus de la inmunodeficiencia humana. La utilización de estos sistemas cerrados, permitirá asimismo, estandarizar los métodos diagnósticos moleculares, que hasta ahora era una de sus principales desventajas, limitando su uso extendido en la práctica clínica.

El instrumento LightCycler™ consta de un termociclador unido a un sistema de detección de fluorescencia. Con este instrumento se reduce el tiempo de amplificación debido a que los ciclos de PCR son más rápidos, gracias a que los cambios de temperatura de cada una de las fases de la reacción se producen por flujos de aire. A esto se suma el hecho de que las reacciones de amplificación se llevan a cabo en capilares, con lo que la relación superficie/volumen se ve aumentada y se facilita así la



transferencia de calor. Todo esto hace que se pueda realizar una PCR de 30 ciclos en 20 minutos (17).

El sistema de detección de fluorescencia que tiene incorporado es una unidad óptica que posee tres canales de lectura diferentes, denominados F1, F2 y F3, respectivamente. El canal F1 mide la fluorescencia emitida a 530 nm, el canal F2 a 640 nm y el canal F3 a 705nm. Esto va a permitir el uso de diferentes moléculas fluorescentes para la monitorización del proceso de amplificación. La interpretación de los resultados obtenidos es posible gracias a un programa informático que acompaña al sistema.

Las sondas FRET, utilizadas para la monitorización de la reacción, son parejas de sondas (oligonucleótidos) diseñadas para unirse de forma específica al ADN de la muestra en estudio en orientación cabeza-cola (5' 3') y próximas la una de la otra. Una de las sondas denominada "sonda anchor" (sonda de anclaje o fijación), está marcada con una molécula donadora de fluorescencia (fluoresceína) en su extremo 3', mientras que la otra sonda, denominada "sonda sensor" (sonda sensora), está marcada en su extremo 5' con una molécula susceptible de ser excitada por el fluoróforo de la sonda anchor (LC Red 640).

Cuando las sondas FRET se unen de forma específica con su secuencia diana en el ADN molde, tiene lugar un proceso de transferencia de energía; por interacciones dipolo-dipolo, desde la molécula de la sonda anchor, excitada por una fuente de luz externa, hasta el aceptor de la molécula de la sonda sensor. Esta molécula emite a su vez una señal de fluorescencia a una longitud de onda diferente a la de la excitación, que es leída por el instrumento LightCycler™. Las medidas de fluorescencia se realizan en el canal F2/F1, esta medida minimiza la aparición de ruido de fondo en la amplificación, lo cual mejora la especificidad de la técnica.

Este proceso de transferencia de energía es posible solo si la distancia a la que se encuentran ambas sondas es de 1-5 nucleótidos, para que al menos el 50% de la energía se transfiera y se produzca una señal visible. Esto va a ocurrir sólo en caso de que las sondas se unan de forma específica a la secuencia homóloga del ADN molde.

Durante la fase de fusión o disociación, todo el ADN amplificado se encuentra en forma de doble cadena y la emisión de fluorescencia es máxima. Pero a lo largo del proceso se produce un lento aumento de la temperatura (0,05-0,2° C/s), de manera que la sonda sensor se va a ir separando de su secuencia diana y la emisión de fluorescencia va a ir disminuyendo. La monitorización de este descenso va a permitir establecer la temperatura a la cual la mitad del ADN amplificado está desnaturalizado, debido a que en ese momento se detecta un descenso brusco de la temperatura. Esa temperatura, conocida como temperatura de fusión o de disociación ( $T_m$ ), es constante para cada una de las parejas de sondas cuando se unen de forma específica a su secuencia diana en el ADN molde de una cepa silvestre.

En el diseño de las sondas FRET hay que tener en cuenta una serie de condiciones (18):

- ❖ Las sondas deben colocarse cerca de extremo 3' del amplicón, de esta manera la Taq polimerasa tarda mas en desplazarlas de su localización durante la fase de elongación, y permite que la emisión de fluorescencia tenga lugar durante mayor tiempo.
- ❖ Como secuencia diana de las sondas, se debe elegir una zona que tenga "secuencias balanceadas", es decir, que tenga una distribución proporcional de las cuatro bases, y que, además, no sea monótona ni repetitiva, para evitar que las sondas hibriden

en fragmentos no deseados de la secuencia de ADN. También se ha de evitar que tenga regiones complementarias que puedan formar bucles y la hagan menos accesibles a la hibridación.

- ❖ De la misma manera que en la secuencia diana, en el diseño de las sondas también se ha de evitar que sean complementarias, para impedir la formación de bucles que impedirían el avance de la Taq polimerasa. Además si las sondas hibridan entre sí, pueden producir una señal constante, independiente de la cantidad de producto formado, generando ruido de fondo que puede interferir en la interpretación final de los resultados. Tampoco deben contener secuencias monótonas o repetitivas.
- ❖ Las sondas no deben hibridar con los cebadores, para evitar la formación de dímeros sonda-cebador.
- ❖ La sonda marcada en el extremo 5' con el aceptor de fluorescencia, sonda sensor, debe fosforilarse en el extremo 3' para que no se produzca su elongación durante la fase de amplificación.
- ❖ Las temperaturas de disociación ( $T_m$ ) de las sondas deben ser mayores que las de los cebadores, ya que al hibridar las sondas con la secuencia diana compiten con éstos en la unión al ADN, pero como están presentes en mayor concentración que las sondas, se unen más rápidamente. Además, cuando los cebadores se unen a la secuencia diana y comienza la elongación, la Taq polimerasa desplaza las sondas y se pierde la

señal de fluorescencia. Para evitar esto, se incrementan las  $T_m$  de las sondas, de forma que aumenta el tiempo durante el cual permanecen unidas a la secuencia diana antes de ser desplazadas.

A pesar de todo lo referido, aunque los métodos microbiológicos que utilizan sistemas no basados en el cultivo han demostrado ser técnicas potentes, hasta hoy, no existen estudios definitivos sobre su impacto en el cuidado y la supervivencia de los pacientes. Creemos por tanto necesario realizar un estudio sistemático y prospectivo de los pacientes con elevado riesgo de padecer una IFI, incorporando una combinación de estas pruebas (PCR en tiempo real junto a la detección de antígenos) de una forma sistemática con obtención de muestras de una forma regular, al menos dos veces por semana, además de la microscopía y del cultivo convencionales, durante el periodo de máximo riesgo y posteriormente, durante el tratamiento si este es necesario, para comparar su impacto sobre: a) la reducción del tiempo necesario para el diagnóstico de pacientes con IFI; b) disminución del número de pacientes que reciban terapia antifúngica innecesaria; c) elección del tratamiento en función de la especie de hongo detectada (algunas especies son resistentes al tratamiento : *Aspergillus terreus* a la anfotericina B o *Aspergillus* spp. a fluconazol); d) monitorización de la respuesta durante el tratamiento y duración óptima del mismo; y e) la supervivencia de aquellos que desarrollen la infección.

#### DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO DE LAS IFIs

El diagnóstico microbiológico tradicional de la aspergilosis depende de la presentación clínica y se basa en la sospecha clínica y la posterior confirmación microbiológica y anatomopatológica. En enfermos con aspergilosis invasora pulmonar el examen directo del esputo suele ser negativo, siendo positivo por el contrario, el examen microscópico del lavado broncoalveolar (22).

El examen directo con KOH, calcoflúor o tinción de Gram permite un diagnóstico presuntivo rápido. El examen de tejidos obtenidos por biopsia teñidos con PAS o plata-metanamina permite visualizar filamentos septados con ramificaciones en ángulo recto. No obstante esto no es específico de *Aspergillus* spp ya que otros patógenos fúngicos como *Fusarium* spp, y *Scedosporium* spp son indistinguibles morfológicamente. Una mayor especificidad puede conseguirse mediante técnicas inmunohistoquímicas, combinando calcoflúor y anticuerpos específicos (23).

El aislamiento de *Aspergillus* en cultivo es un método sensible para detectar la infección y permite la identificación de la especie infectante y la realización de pruebas de sensibilidad *in vitro* a los distintos antifúngicos. *Aspergillus* no es exigente en sus requerimientos nutritivos pero si se sospecha infección por este género no debe utilizarse un medio de cultivo con cicloheximida ya que esta inhibe el crecimiento de este hongo. Aunque generalmente las especies patógenas humanas son capaces de crecer por encima de 37°C, los medios de cultivo deben ser incubados a 25-37°C durante 4 semanas y a ser posible, utilizando tubos en lugar de placas, ya que la deshidratación de los mismos después de cuatro semanas es menor. El medio de cultivo mas utilizado para diferenciar las distintas especies es el agar Czapeck-Dox (24).

Dado que *Aspergillus* es un contaminante frecuente, el cultivo tiene una especificidad variable, pues no permite poder discriminar entre colonización e invasión ni descartar que pueda tratarse de una contaminación, ya que el aislamiento de *Aspergillus* de una muestra de esputo, una de las que se procesan con mas frecuencia, puede ser consecuencia de la inhalación de conidias y no de una infección pulmonar. El valor predictivo aumenta si se obtienen cultivos con múltiples colonias o se aísla repetidamente la misma especie en varios esputos seriados (25). Algunos estudios

han demostrado que hasta el 20% de los cultivos de esputo pueden ser falsos positivos en receptores de un trasplante de médula ósea, siendo el porcentaje mas alto cuando se trata de receptores de trasplante de órgano sólido (26,27). No obstante, el valor predictivo del cultivo depende en gran medida de los factores de riesgo del paciente. Siguiendo la clasificación de Perfect *et al* (6) en los enfermos con riesgo alto, un cultivo positivo se asocia con aspergilosis invasora en el 50-64% de los casos, mientras que en los enfermos con riesgo intermedio la incidencia de aspergilosis invasora desciende al 8-28%. La rentabilidad de las muestras microbiológicas es mayor si se obtienen mediante broncoscopio (aspirados y cepillados bronquiales, lavado broncoalveolar) situándose en torno al 50%, pero si se trata de un receptor de trasplante de médula ósea el valor predictivo aumenta a un 70-80% (7). La obtención de biopsias mediante agujas guiadas radiológicamente es un procedimiento diagnóstico muy rentable, en general desprovisto de complicaciones, aunque pueden obtenerse resultados falsos negativos si no se toma el tejido invadido por el micelio (28).

Siempre que sea posible, la identificación de los aislamientos fúngicos debe de realizarse a nivel de especie, ya que esta información puede ser muy importante para orientar el tratamiento antifúngico hasta que se dispongan de los resultados de sensibilidad *in vitro*. Así por ejemplo *A. terreus* se muestra resistente de forma intrínseca a Anfotericina B una de las opciones de tratamiento de la AI aunque no de primera elección. Además el uso correcto de los antifúngicos, limita la aparición de resistencias, ofreciendo un mayor beneficio terapéutico para el paciente.

Debido a los problemas de especificidad del cultivo, es necesario complementar el diagnóstico de AI con la técnica de referencia que es la histología la cual permite establecer de forma probada en pacientes con cáncer e inmunodeprimidos la existencia de micosis invasora por hongo filamentoso según los criterios de la EORTC

y el *Mycoses Study Group* de la NIAD (29). Sin embargo, en los pacientes con cáncer hematológico este tipo de pruebas ( biopsia pulmonar, lavados broncoalveolares..) están contraindicados, ya que habitualmente son pacientes con mal estado general, trombopenia e hipoxemia lo cual hace muy difícil la realización de este tipo de pruebas mas invasivas.

Uno de los problemas más importantes que presenta el cultivo es que se hace positivo de forma tardía, así pues, las aspergilemias representan del 0,5 al 2% de las fungemias y son consecuencia de la invasión tisular (5). Se estima que solo el 10% de las aspergilemias son significativas, debiéndose a contaminaciones en el 90% de los casos. En los pacientes con cáncer hematológico, la aspergilemia verdadera es de aparición tardía (precede solo en un día al *exitus* o se evidencia en la necropsia), incluso en pacientes con alto riesgo de padecer AI. El aislamiento de *A. terreus* en hemocultivo hace mas probable que la aspergilemia sea verdadera (30).

La detección de anticuerpos mediante distintas técnicas serológicas ha demostrado ser útil en le diagnóstico de aspergiloma y de aspergilosis alérgica pero su utilidad es muy limitada en el caso de AI debido a su baja sensibilidad (28).

*A.fumigatus* tiene más de 100 componentes antigénicos, de los cuales los de mayor utilidad diagnóstica en pacientes con AI son el Galactomanano y el (1-3)- $\beta$ -D-glucano. El (1-3)- $\beta$ -D-glucano es un componente de la pared celular de *Aspergillus* y otros hongos como *Candida* y *Pneumocystis jirovecii* que puede ser detectado utilizando pruebas comerciales (Fungitec G, Seikagaku Corporation, Japon, Wako-WB 003, Wako Chemocal, Alemania). La detección de (1-3)- $\beta$ -D-glucano presenta una sensibilidad en torno al 90%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 59%, un valor predictivo negativo del 97% y una eficacia global del 85%. Los falsos positivos se asocian a enfermos con fallo renal que reciben hemodiálisis con aparatos

con membranas de celulosa, pacientes en tratamiento intravenosos con albumina, inmunoglobulinas, sulfamidas y anticancerosos y aquellos pacientes expuestos a intervenciones quirúrgicas con gasas u otros materiales que contenga glucanos (31). Algunos estreptococos tiene la capacidad de producir glucano y se han descrito falsos positivos en pacientes con bacteriemia por *S. mitis* (32). Por otro lado ya ha sido comentado anteriormente los aspectos más interesantes relacionados con la detección de Galactomanano así como la de ácidos nucleicos de *Aspergillus* en este tipo de pacientes.

Por tanto podemos concluir que uno de los mayores retos para el diagnóstico micológico es la velocidad con la que se llegue a identificar el agente causal de la infección ya que de esta manera, se podrá instaurar un tratamiento antifúngico de forma precoz pudiéndose llegar al concepto de terapia anticipada como ya ocurriera con el CMV en los pacientes transplantados. Por este motivo nos disponemos a evaluar la rentabilidad de las técnicas de detección de antígenos y ácidos nucleicos de *Aspergillus* en el diagnóstico precoz de la AI en pacientes oncohematológicos.



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 2.1. HIPÓTESIS

1. El diagnóstico de la infección fúngica invasiva por su elevada morbimortalidad, requiere de un sistema de diagnóstico rápido y eficaz.
2. La amplificación de ADN fúngico cuantitativa junto con la determinación de los niveles de galactomanano en la sangre del paciente, permitirán realizar un diagnóstico de las infecciones fúngicas invasivas (IFI) mas certero – aumentando su sensibilidad y especificidad- y rápido – realizado en menos de 24 horas- que los métodos convencionales usados en la actualidad.
3. A pesar de todo lo referido, aunque los métodos microbiológicos fundamentados en sistemas no basados en el cultivo han demostrado ser técnicas potentes, hasta hoy, no existen estudios definitivos sobre su impacto en el cuidado y supervivencia de los pacientes. Creemos, por tanto, necesario realizar un estudio sistemático de los pacientes con elevado riesgo de padecer una IFI, incorporando la PCR en tiempo real más detección de galactomanano de una forma sistemática, además de la microscopía y el cultivo. La conjunción de todos estos parámetros analíticos, junto con los datos clínicos, deberían mejorar la supervivencia de los pacientes con sospecha de IFI, así como, disminuir la morbimortalidad asociada.

## 2.2. OBJETIVOS

Mejorar la morbilidad y mortalidad de las IFI en pacientes inmunodeprimidos mediante los siguientes mecanismos:

1. Acortar el tiempo necesario para realizar el diagnóstico precoz y seguro de IFI en pacientes inmunodeprimidos y de forma complementaria, aumentar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico con respecto a las técnicas convencionales
2. Instaurar precozmente el tratamiento antifúngico específico a los pacientes con IFI y evitar tratamientos empíricos innecesarios a los pacientes no afectados por una infección fúngica.
3. Monitorizar el tratamiento antifúngico para conocer la respuesta al tratamiento desarrollada por el paciente y realizar los cambios necesarios de forma precoz.

### 3. MATERIAL

### 3.1 MICROORGANISMOS

Para la puesta a punto de las técnicas de extracción y amplificación de ADN se emplearon las siguientes cepas de colección de hongos filamentosos y levaduras pertenecientes a las cepas de control de calidad del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): *Aspergillus flavus* (ATCC 204304), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 13070), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019)) así como cepas procedentes de distintas muestras clínicas. Para determinar la especificidad de la técnica se emplearon otras especies patógenas y no patógenas de hongos y bacterias.

**Tabla 6: Clasificación de los microorganismos utilizados para determinar la especificidad.**

<i>Microsporium canis</i>	<i>Fusarium</i> spp
<i>Microsporium gypseum</i>	<i>Acremonium</i> spp
<i>Trichophytum rubrum</i>	<i>Penicillium</i> spp
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Rhodotorula</i> spp
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Aeromonas</i> spp
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de los hongos fue agar Sabouraud dextrosa (bioMérieux, Francia) para levaduras y agar patata dextrosa (bioMérieux) para los filamentosos, preparados según las instrucciones del fabricante. Para la preparación del inóculo se utilizaron subcultivos de 7 días a 35°C en el caso de *Aspergillus* spp, mientras que para *Candida* spp se utilizaron subcultivos de 24 horas de incubación a 37°C. Posteriormente se preparó el inóculo ajustado mediante espectrofotómetro a un rango de densidad óptica entre 0,09-0,11 a 530nm. La concentración de esporas viables en este inóculo oscila entre  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL (CLSI documento M38-A) (33). Partiendo de este primer inóculo se realizaron

diluciones seriadas en base 10 para poder determinar el límite mínimo de detección de ADN.

Para las bacterias se utilizó agar sangre (bioMérieux) para todos los cocos Gram positivos, agar MacConkey (bioMérieux) para los bacilos Gram negativos excepto *Yersinia spp* y *Aeromona spp* para los cuales se utilizó el medio selectivo *Yersinia* CIN agar (bioMérieux) el cual nos permite el aislamiento de ambos microorganismos. Se observó crecimiento de todos los microorganismos después de 24 horas de incubación a 37°C.

### 3.2. PACIENTES Y MUESTRAS CLÍNICAS

#### Pacientes:

Se incluyen en el estudio todos los pacientes ingresados en las Unidades de Hematología de los Hospitales Universitarios Virgen de Valme y Virgen del Rocío de Sevilla y en el Hospital del SAS de Jerez, que sufrían algún tipo de evento de riesgo de ser colonizados por hongos y concurrían en ellos factores de riesgo para desarrollar una IFI. Para la clasificación de los pacientes se utilizaron los criterios de Infección fúngica invasora propuestos por el Grupo de Colaboración en Infecciones Fúngicas Invasoras (IFICG) de la Organización Europea para Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC) en cooperación con los miembros del Grupo de Estudio de Micosis (MSG) del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID) del National Institute of Health (29).

#### Pacientes con Eventos de riesgo:

- Enfermos hematológicos con transplante alogénico de progenitores hematopoyéticos y pacientes con leucemia aguda que presentaron:
  - Síndrome febril y neutropenia postquimioterapia sin respuesta al tratamiento antimicrobiano convencional.

- o Neumonía.

Grupo control:

- Pacientes aparentemente sanos, sin colonización conocida por hongos (ningún cultivo positivo para *Aspergillus*, boca, oído, genitales, piel)

Muestras:

Se tomaron muestras de sangre total de los pacientes incluidos en el estudio en el momento de su inclusión y 2 veces por semana, para cultivo, determinación de niveles de galactomanano y PCR.

**Tabla 7: Seguimiento de los pacientes realizado tras evento de riesgo de infección fúngica invasiva.**

Determinación	Ingreso	72 h	28 sem.		38 sem.		48 sem.		Semana N	
Galactomanano	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cultivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Se tomaron otras muestras clínicas para cultivo y PCR si el paciente mostró síntomas de infección localizada, por ejemplo lavado broncoalveolar (LBA) en caso de sospecha de aspergilosis pulmonar.

Las muestras clínicas tales como hemocultivos, lavados broncoalveolares (LBA), aspirados bronquiales (AB) y otros considerados necesarios en cada paciente, se procesaron para el cultivo e identificación de las especies fúngicas de acuerdo con los procedimientos convencionales.

Todos los pacientes fueron informados de la realización del estudio y se les proporcionó el documento de consentimiento informado para su aprobación.

### 3.3 PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

Aceite mineral (Perking Elmer 186-2302).

Acetato de sodio (Merck 6568).

Ácido glacial acético (Difco A-6283).

Ácido bórico (Pharmacia Biotech 17-1322-01).

Ácido clorhídrico concentrado (Panreac 181345).

Agar-agar (Difco 0140-01).

Agarosa (Bethesda Research 5510UB).

Agarosa (Bio-Rad 162-0017).

Agua destilada (Grifols 130722)

Alcohol isoamílico (Merk 979).

ARNasa (Promega 0890).

Azul de Evans (Panreac 23860)

Azul de Bromofenol (Amershan Pharmacia Biotech 17-1329-01).

Azul de Lactofenol (Merck 13741)

Bacto-Agar (Difco 0140-01).

Bromuro de Etidio (Roche Molecular Biochemicals 200 271).

Calcofluor White M2R (Sigma)

Capilares LightCycler (Roche Molecular Biochemicals 1 909 339).

Citrato de amonio (Sigma L-1256).

Citrato de hierro (TII) (Sigma M-4357)

Cloroformo (Merk 2445).

Cloruro amónico (Merk 8528743).

Cloruro magnésico (Merk 105832)

Cloruro potásico (Merk 32936).

Cloruro sódico (Panreac 131659).

Chelex-100 Resin (BioRad Laboratories 143-2832).

Cristal violeta (Difco 3329-75).

CTAB o Bromuro de N-Cetil- N, N, N-trimetilamonio (Sigma M-7635).

Dextrosa (Sigma D-1390).

dNTP Desoxinucleótidos trifosfato (10 mM) (Amershan Pharmacia Biotech US77118).

EDTA-Na<sub>2</sub> o Ácido etilendiaminotetracético disódico (Sigma E-5134).



Etanol absoluto 98% (Difco E-7148).  
Extracto de levadura (Oxoid L-21).  
Extracto de ternera (Difco 0126-01).  
Fenol (Panreac 131322).  
Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (Sigma P-3803).  
Fosfato dipotásico (Sigma P-3786).  
Fosfato disódico hidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Sigma S-0876).  
Fosfato potásico dihidratado (KH<sub>2</sub>P<sub>04</sub>) (Sigma P-5504).  
Fosfato sódico (Merk 957576).  
Glicerol (Difco 68778).  
Glucosa (Panreac 141341).  
Hidróxido sódico (Panreac 131687).  
Hidróxido potásico (Panreac 1310583).  
Isopropanol (Difco 1-9516).  
Kit LC DNA Master SYBR@ Green 1 (Roche Molecular Biochemicals 2158-817).  
Kit LC DNA Master Hyb Probes (Roche Molecular Biochemicals 2 58825).  
Lactosa (Difco L-8773).  
Lauril sulfato sódico (SDS) (Sigma L5750).  
Lisostafina (Sigma L-0761).  
Lisozima clorhídrica (Roche Molecular Biochemicals 1 585 657).  
Liticasa (Sigma L-2524).  
Lugol (Difco L-5776).  
MgCl<sub>2</sub> (Sigma M-8266).  
Patrón de peso molecular BPL-I00 (Amershan Pharmacia Biotech 27 4001-01).  
Peptona (Difco P-5905).  
Proteinasa K (Roche Molecular Biochemicals 745723). }  
Proteasa peptona (Difco 0122-01).  
Rojo fenol (Sigma P-4758).  
Sacarosa (Difco 0176-17).  
Safranina (Difco 3332-75).  
Sulfato de magnesio (Merck 5886).  
Sulfato de manganeso (Difco M-8179).  
Taq ADN polimerasa (Difco D-1806).  
Tampón fosfato pH 6,8 15M (bioMérieux).  
Trizma base o Tris-base (Sigma T-8404).  
Tris-Clorhídrico (Roche Molecular Biochemicals 812846).  
Triton-X (Sigma T-6878).

Tween@ 80 (Difco P-4780)

Xylene Cyanole FF (BioRad Laboratories 161-0423).

### 3.4 TAMPONES Y SOLUCIONES

#### 3.4.1 Soluciones para la extracción del ADN cromosómico:

❖ Tampón de lisis de eritrocitos (RCBS) Tris 10 mM a pH:7,6,  $Cl_2Mg$  5mM, NaCl

10mM<sup>20</sup>

- Tris 1M .....10mL
- $Cl_2Mg$  1M .....5mL
- NaCl 5M.....2mL
- 

❖ Completar con agua hasta 1 litro

❖ Solución de Tris-HCl a pH 8

- Tris 121,1 g
- Agua destilada base 800ml

Ajustar el pH a 8 con HCl concentrado si necesario.

Esterilizar en autoclave.

❖ Solución de Cloruro Sódico (NaCl) 5M:

NaCl 29,2 g

Agua destilada 100ml

Autoclavar y guardar a temperatura ambiente

❖ Solución de Proteinasa K ( 10 mg/ ml) :

Proteinasa K 10 mg

Agua destilada 1ml

Guardar en pequeñas alícuotas a  $-20^{\circ}C$

## ❖ Tampón fosfato salino (PBS):

Cloruro sódico 8 g

Cloruro potásico 0,2 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,44 g

$\text{KH}_2\text{HPO}_4$  0,24 g

Agua destilada 800ml

Ajustar el pH a 7,4 con HCl si necesario

Ajustar el volumen hasta 1000 ml con agua destilada.

Esterilizar en autoclave.

Conservar a temperatura ambiente.

## ❖ Solución de Etanol al 70% (v/v):

Etanol absoluto 98% 70 ml

Agua destilada 30 ml

Guardar a  $-20^\circ\text{C}$ .

❖ Solución de Liticasa 10X ( $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (10 mL)

10mg de liticas (sigma)

1 ml de tampón de fosfato potásico 1M, pH 7,5

0,2 ml NaCl 5M

5 ml de glicerol

Completar hasta 10 ml con agua destilada

Guardar a  $-20^\circ\text{C}$

### 3.4.2 Soluciones para el aislamiento e identificación de microorganismos

## ❖ Blanco de calcofluor:

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN:

❖ Calcoflúor (0,05 g), azul de Evans (0,02 g), agua destilada (50ml)

- ❖ Mezclar y calentar suavemente (añadir unas gotas de NaOH al 50% para obtener la total disolución)
- ❖ Almacenar temperatura ambiente en oscuridad.

#### REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

- ❖ Colocar la muestra en un porta
- ❖ Añadir una gota de calcofluor
- ❖ Añadir una gota de KOH al 20%
- ❖ Cubrir con un cubre
- ❖ Calentar suavemente el porta.
- ❖ Observar al microscopio de fluorescencia a 420 nm a bajo aumento (10X y 40X). En caso de frotis fijados, es conveniente teñir durante 3 minutos, lavar con agua y montar, de esta forma se reducen la coloración de fondo y los artefactos.
- ❖ Azul de lactofenol:

#### COMPONENTES PRINCIPALES DEL PRODUCTO:

- ❖ C.I. 4278.....1g/l
- ❖ C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH.....204g/l
- ❖ CH<sub>3</sub>CH (OH)COOH.....247g/l
- ❖ CH<sub>3</sub>(OH)CH(OH)CH<sub>2</sub>(OH).....502g/l

#### REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

- ❖ Con un trozo de papel celo pegado a un asa estéril se recoge la muestra del hongo sembrado en el agar.
- ❖ Añadir una gota de azul de lactofenol sobre el porta.
- ❖ Colocar la muestra ( el papel celo) en un porta.
- ❖ Cubrir con un cubre.

- ❖ Observar al microscopio.

### 3.5 MEDIOS DE CULTIVO

#### 3.5.1 Sabouraud dextrosa agar (SDA) (bioMérieux)

Dextrosa.....	40g
Peptona.....	10g
Agar.....	15g
Agua destilada.....	1000ml

Ajustar pH a 5,6.

Disolver los ingredientes mediante ebullición, autoclavar 10 minutos a una atmósfera de presión (121°C) y dispensar en las placas con el espesor suficiente para evitar su desecación.

#### 3.5.2 Patata dextrosa agar: (PDA) (bioMérieux)

Patata .....	200g
Dextrosa.....	10g
Agar.....	18g
Agua destilada.....	1000ml

Ajustar pH a 5,6.

Disolver bien todos los ingredientes en un litro y autoclavar 10 minutos a una atmósfera de presión (121°C) y dispensar en las placas con el espesor suficiente para evitar su desecación.

#### 3.5.3 Agar sangre (bioMérieux)

Sangre desfibrinada estéril.....	5mL
Agar nutritivo (modificado).....	100mL

#### 3.5.4 Agar MacConkey (bioMérieux)

Agar MacConkey.....50g

Agua destilada.....1000mL

Se disuelve el polvo en agua calentando y agitando.

Ajustar a un pH: 7.

Esterilizar a 121°C durante 20 minutos.

Dejar enfriar hasta 50°C y repartir en placas de Petri de 10 cm de diámetro.

### 3.5.5 Yersinia CIN agar (bioMérieux)

Yersinia selective agar.....59,5gr

Agua destilada.....1000mL

Calentar hasta llegar al punto de ebullición para disolver por completo.

Ajustar pH a 7,4.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Enfriar hasta 45°C.

Añadir 10 ml de yersinia supplement CIN rehidratado (Cefsulodin, irgasan, novobiocina).

Mezclar y repartir en placas de Petri de 10 cm de diámetro.

3.5.6. Viales que contienen 1mL de agua destilada estéril, donde se introduce un trozo de agar que contiene el hongo filamentoso. Se conservan a temperatura ambiente (para los hongos filamentosos).

3.5.7 Microbank system (Prolab Diagnostics, Austin, Tex): Viales que contienen 25 bolitas porosas y perforadas que están incluidas en un líquido crioconservante (para bacterias y hongos levaduriformes).

## 4. MÉTODOS

#### 4.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ASPERGILLUS SPP

La obtención de muestras clínicas se realizó siguiendo las normas de recogida y transporte de muestra vigentes en cada centro. La inoculación de las muestras para el aislamiento de *Aspergillus* spp se realizó mediante métodos microbiológicos convencionales, realizando técnicas de tinción y cultivo en los medios de cultivo recomendados: Sabouraud Dextrosa Agar y Patata Dextrosa Agar (bioMèrieux)

La conservación de todos los hongos filamentosos se realizó a temperatura ambiente en agua destilada estéril, mientras que el resto de microorganismos (bacterias y hongos levaduriformes) se conservaron congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  en los sistemas Microbank system (Prolab Diagnostics, Austin, Tex).

Cuando el crecimiento detectado sobre la placa corresponde a un hongo filamentoso, la identificación se hace mediante (41):

4.1.1. Examen macroscópico de la colonia: forma, color, textura, velocidad de crecimiento y reverso.

4.1.2. Examen microscópico: Si el hongo tiene abundantes formas de reproducción se emplea la técnica de "scotch" o papel de celofán, que consiste en tocar la superficie de la colonia con la cinta adhesiva y colocarla sobre un porta, en el que se ha depositado una gota de azul de lactofenol y observar al microscopio. La visión al microscopio se puede mejorar, si se añade una gota de azul de lactofenol sobre le celofán y se deposita un cubre sobre ella.

Cuando no se puede conseguir una buena observación de las formas de reproducción por las técnicas anteriores, es necesario hacer un micro o laminocultivo. Esta técnica consiste en depositar sobre un porta un trozo del medio de Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) de  $1\text{cm}^2$  de superficie aproximadamente, en cuyos extremos se inocula en



hongo que queremos identificar (en profundidad). Posteriormente se coloca un cubre encima y se incuba en cámara húmeda a 25°C hasta observar crecimiento; entonces se toma el cubre, que es donde se han depositado las formas de reproducción, y se coloca sobre un porta que lleva una gota de azul de lactofenol y se observa al microscopio.

Los criterios de identificación son fundamentalmente morfológicos basados en la presencia de estructuras de reproducción sexual, estructuras de reproducción asexual y características especiales de las hifas que se pueden consultar en los distintos atlas de micología.

#### **4.2 RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS**

Todas las muestras iban acompañadas de su correspondiente formulario de recogida de datos (anexo 1). Estos datos básicos incluyen los datos demográficos del paciente así como la presencia o ausencia de los principales factores de riesgo para la adquisición de una IFI, datos microbiológicos de interés etc. Posteriormente los datos de cada paciente pudieron ser ampliados consultando sus historias clínicas en cada uno de los centros hospitalarios. Todos los pacientes fueron clasificados dentro del grupo de AI probada, probable o posible según los criterios de la EORTC y NIAID (29):

#### **❖ INFECCIÓN FÚNGICA INVASORA PROBADA POR *ASPERGILLUS* SPP.**

##### **INVASIÓN TISULAR:**

- o Presencia histo-citopatológica de hifas tabicadas procedentes de aspiración con aguja o biopsia con evidencia (microscópica o por imagen) de daño tisular asociado
- o Cultivo positivo de *Aspergillus* spp. procedente de una muestra (obtenida por procedimiento estéril) de una localización habitualmente

estéril donde existen datos clínicos o radiológicos compatibles  
(excluyendo orina y mucosas)

❖ **INFECCIÓN FÚNGICA INVASORA PROBABLE POR *ASPERGILLUS* SPP. :**

- Deben cumplirse al menos un criterio de la sección de factores del huésped + un criterio microbiológico + un criterio clínico mayor ( o dos criterios clínicos menores ) compatibles con infección.

❖ **INFECCIÓN FÚNGICA INVASORA POSIBLE POR *ASPERGILLUS* SPP. :**

- Deben cumplirse al menos un criterio de la sección de factores del huésped + un criterio microbiológico o un criterio clínico mayor ( o dos criterios clínicos menores ) compatibles con infección

**FACTORES DEL HUESPED**

- ❖ Neutropenia  $<500$  neutrófilos/mm<sup>3</sup>  $>10$  días.
- ❖ Fiebres persistente ( $>96$ h) refractaria a antibiótico de amplio espectro en pacientes de alto riesgo.
- ❖ Temperatura  $>38^{\circ}$  C o  $<36^{\circ}$  C y alguno de los factores predisponentes:
  - Neutropenia ( $>10$  días) en los 60 días anteriores.
  - Uso de inmunosupresores en los 30 últimos días.
  - Infección fúngica invasora ( probada o posible) durante un episodio neutropénico previo.
  - Coexistencia de SIDA sintomático.
- ❖ Signos y síntomas de enfermedad injerto contra huésped severa (grado  $\geq 2$ ) o enfermedad extensa crónica)

- ❖ Uso prolongado ( $\geq 3$  semanas) de corticosteroides en los 60 días previos

#### CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS

- ❖ Cultivo positivo para *Aspergillus* spp. a partir de esputo o LBA
- ❖ Cultivo positivo o citología o microscopía directa positiva para *Aspergillus* spp. de aspirado sinusal, esputo o LBA
- ❖ Antígeno de *Aspergillus* spp. positivo en muestras de LBA, LCR o dos o más muestras de sangre
- ❖ Citología o microscopía directa positiva para *Aspergillus* spp. en muestras habitualmente estériles

#### CRITERIOS CLINICOS

- ❖ INFECCIÓN VÍAS RESPIRATORIAS INFERIORES:
  - CRITERIOS MAYORES
    - Cualquiera de los siguientes hallazgos de la tomografía axial computarizada: signo del halo, signo del aire creciente ( o signo de la media luna) o cavitación sin área de consolidación excluyendo *Mycobacterium*, *Legionella* o *Nocardia* spp.
  - CRITERIOS MENORES
    - Síntomas ( tos, dolor torácico, hemoptisis, disnea), roce pleural, nueva infiltración, derrame pleural.
- ❖ INFECCIÓN RINOSINUSAL:
  - CRITERIOS MAYORES
    - Evidencia radiológica de invasión ( erosión, extensión por contigüidad, destrucción de la base del cráneo)
  - CRITERIOS MENORES

- Síntomas ( rinorrea, congestión), ulceración de la mucosa nasal o epistaxis, tumefacción periorbitaria, dolor maxilar, lesiones necróticas o perforación del paladar duro.

❖ INFECCIÓN DEL SNC:

○ CRITERIOS MAYORES

- Evidencia radiológica ( mastoiditis u otros focos parameningeos, empiema extradural, lesión sólida en parénquima cerebral o médula espinal).

○ CRITERIOS MENORES

- Síntomas y signos neurológicos focales ( crisis focales, hemiparesia y paresia de nervios craneales), irritación meníngea; anomalías en la bioquímica del LCR (siempre que los cultivos y hallazgos microscópicos sean negativos para otros patógenos y células malignas).

❖ INFECCIÓN FÚNGICA DISEMINADA:

- Lesiones cutáneas papulares o nodulares sin otra causa.
- Hallazgos intraoculares sugestivos de coriorretinitis o endoftalmitis hematógena (29).

### 4.3 EXTRACCIÓN DEL ADN CROMOSÓMICO

#### Métodos de extracción y purificación del ADN:

Para la extracción y purificación del ADN se ensayaron varios sistemas comerciales tanto manuales como automatizados. Se realizó una suspensión en 1 ml de agua destilada estéril con conidias del *Aspergillus* que posteriormente fueron divididas en alícuotas de 400  $\mu$ l a las que se añaden 10  $\mu$ l de liticasa. Después de homogeneizar bien, se incubó a 37°C durante 30 minutos. De aquí separaremos 200  $\mu$ l para

extracción manual y otros 200  $\mu$ l para extracción automática con el sistema Magnapure (Roche). Los 200  $\mu$ l restantes se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  por si fuera necesaria su posterior utilización.

#### 4.3.1 EXTRACCIÓN AUTOMÁTICA MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit:

El sistema “MagNA Pure LC Instrument” es un sistema automático que permite la extracción rápida del ADN purificado de una gran variedad de muestras clínicas como son el suero, plasma o sangre total. El protocolo de extracción consta de los siguientes pasos:

1. La adición de Lysis/Binding Buffer produce una lisis completa de las muestras por desnaturalización de las proteínas. El ADN es liberado y estabilizado.
2. La Proteinasa K digiere las proteínas presentes en las muestras.
3. Los ácidos nucleicos se unen a la superficie de las partículas de Magnesio (MGPs) favorecidos por la elevada carga iónica del ( Lysis/Binding Buffer).
4. El tampón de lavado I permite la eliminación de sustancias tales como nucleasas, membranas celulares, y productos como la heparina o hemoglobina que podría inhibir la PCR.
5. El tampón de lavado II permite la eliminación de impurezas tales como restos celulares y disminuye la concentración de sales.
6. El tampón de lavado III reduce la concentración de sal.
7. Finalmente el ADN es eluido en tampón de elución precalentado en un baño a  $70^{\circ}\text{C}$ .

La contaminación cruzada es mínima gracias a la escasa manipulación de las muestras y a que posee un sistema de descontaminación mediante rayos UV y filtros HEPA.

4.3.2 EXTRACCIÓN MANUAL QIAamp® DNA mini kit: Este sistema se utilizó para la extracción de ADN cromosómico de *Aspergillus* spp, tanto a partir de cultivos puros como de las muestras clínicas. El procedimiento desarrollado por el laboratorio realiza un tratamiento enzimático de la pared fúngica para aumentar el rendimiento de la extracción. Se siguió el protocolo proporcionado que consiste básicamente en:

1. Añadir 20 µl de proteinasa K a los 200 µl de la muestra
2. Incubar a 56°C durante 10 minutos
3. Añadir 200 µl del tampón AL
4. Incubar a 70°C durante 10 minutos
5. Añadir 200 µl de etanol
6. Homogenizar la mezcla mediante vortex y transferirla a una columna
7. Centrifugar la columna a 8000 rpm durante 1 minuto
8. Descartar el filtrado. El ADN queda adsorbido en la membrana de la columna donde es lavado por dos veces utilizando las soluciones AW1 y AW2 de manera sucesiva a través de la columna.
9. Finalmente eluir el ADN en 200 µl de agua destilada estéril
10. Conservar a – 20°C hasta su utilización.

4.3.3 EXTRACCIÓN MANUAL High Pure PCR Template Preparation Kit: Al igual que en el anterior método de extracción manual, este procedimiento realiza un tratamiento enzimático de la pared fúngica para aumentar el rendimiento de la extracción. Se siguió el protocolo proporcionado que consiste básicamente en:

1. Añadir 200µl de Binding Buffer
2. Añadir 40µl de Proteinasa K
3. Mezclar e incubar a 72°C durante 10´
4. Añadir 100µl de Isopropanol
5. Homogenizar la mezcla mediante vortex y transferirla a una columna

6. Centrifugar la columna a 8000 rpm durante 1 minuto
7. Descartar el filtrado. El ADN queda adsorbido en la membrana de la columna donde es lavado por dos veces utilizando las soluciones REMOVAL BUFFER y WASH BUFFER de manera sucesiva a través de la columna.
8. Añadir 200µl de Elution buffer previamente calentado a 70°C
9. Congelar a 2-8°C

#### 4.4. CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAIDO

4.4.1 ADN PURO CUANTIFICADO ESPECTOFOTOMETRICAMENTE: A partir de una placa de Sabouraud dextrosa agar, con un cultivo puro de *A fumigatus*, se extrajo el ADN con el método descrito en el apartado 4.3.2. EL ADN purificado se cuantificó utilizando un espectrofotómetro ( GeneQuant™ Amersham Pharmacia Biotech) que realiza dos medidas a diferentes longitudes de onda , una a 260 nm y otra a 280 nm, la relación ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) entre estas medidas indica el grado de pureza del ADN extraído, de tal forma que para que el ADN se considere puro, este valor debe estar entre 1,8-2. A partir de la lectura a la longitud de onda de 260nm se calcula la concentración de ADN, por la siguiente relación (34):

1 unidad de absorbancia a 260 nm = 50 µg/ ml ADN doble cadena.

Una vez obtenida la concentración de ADN de cada una de las muestras, se realizaron diluciones seriadas en PBS 1x de las mismas, ajustando la concentración a 1 µg/ ml. A partir de esas diluciones se realiza una PCR. La cuantificación se realiza monitorizando en tiempo real el momento exacto en el que la fase logarítmica lineal de la amplificación se puede distinguir de la línea base (crossing point o Ct).

4.4.2 DILUCIONES SERIADAS DE UN CULTIVO DE *A. fumigatus*: Del mismo modo, se realizó una dilución de *Aspergillus* spp ajustada al 0,5 de MacFarland, a partir de un subcultivo en una placa de patata dextrosa agar, tras 7 días de incubación a 35°C en cámara húmeda. A partir de ese inóculo inicial, se realizaron diluciones dobles seriadas desde  $10^6$  a 1 y de cada dilución se realizó la siembra en recuento de 100  $\mu$ L, en placa de sabouraud dextrosa agar para poder estimar el número de UFC/  $\mu$ L después de 24/48h de incubación a 35°C en cámara húmeda. De cada una de las diluciones obtenidas se realizó la extracción del ADN por el método descrito en el apartado 4.3.2. Una vez obtenido el ADN de cada dilución se realiza la PCR en todas las diluciones extraídas.

4.4.4 SANGRE CONTAMINADA: Se realizó una extracción de 6ml de sangre a voluntarios sanos. Posteriormente esa sangre se mezcló con las diluciones seriadas del cultivo puro de *A. fumigatus* y se procedió al lavado de la sangre y la extracción del ADN siguiendo el protocolo que comentamos seguidamente para las muestras clínicas.

#### **4.5. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS**

En el caso de las muestras clínicas (sangre total) es necesario un pretratamiento de las misma que se realiza de la siguiente forma:

1. Añadir 500 $\mu$ L de sangre y 2,5mL de tampón RCBS.
2. Mezclar bien agitando con la mano durante 10 minutos.
3. Mantener durante 15 minutos en frigorífico.
4. Centrifugar durante 10 minutos a 14000 r.p.m.
5. Lavar hasta que quede un botón de células sin restos de hemoglobina en el fondo del tubo.
6. Añadir 600 $\mu$ L de sorbitol.



7. Añadir 15µL de proteinasa K (20mg/ml) e incubar a 37°C durante al menos 12 horas o hasta que el botón de células esté completamente disuelto.
8. Hervir durante 10 minutos para inactivar la proteinasa K.
9. Añadir 20µL de lificasa. Continuar con el mismo protocolo que para los sueros.

En el caso de los sueros se siguió el protocolos del kit "EXTRACCIÓN MANUAL QIAamp® DNA mini kit" descrito anteriormente.

#### 4.6. PCR EN TIEMPO REAL

Para la amplificación y cuantificación en tiempo real se empleó el sistema Light Cycler PCR (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) versión 3.01.

La PCR se realizó en capilares de vidrio, que aseguran un equilibrio rápido entre el aire y los componentes de la reacción debido a la alta tasa superficie/volumen de los capilares. Se emplearon los cebadores 5' -ATTGGA GGG CAA GTC TGG TG-3' Y 5'-CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG-3' que se unen a las regiones conservadas del gen de 18S ARNr(17,35).

**Tabla 8.** Cebadores empleados en el estudio

CEBADORES	SECUENCIAS (5'-3')
ARN 18S	5'-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3'
ARN 18S	5'-CCGATCCCTAGTCGGCATAG-3'

La detección de los amplificados se realizó utilizando el kit Light Cycler DNA Master Hybridization Probes siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, dos oligonucleótidos distintos hibridan con una secuencia específica de especie al gen del rRNA 18S de *A fumigatus*. Una de las sondas está marcada en el final 5' con el

fluoróforo Light Cycler Red 640 (5'-TGA GGT TCC CCA GAA GGA AAG GTC CAG C para *A. fumigatus*) y la otra con fluoresceína en su extremo 3' (5'-GTT CCC CCC ACA GCC AGT GAA GGC para *A. fumigatus*).

Todas las sondas y los cebadores fueron sintetizados por TIB MOLBIOL (Servicio de Síntesis e ADN de Roche Diagnostic, Berlin, Alemania).

**Tabla 9.** Sondas utilizadas en el estudio.

SONDAS	SECUENCIAS (5'-3')
Asp FL	5'-GTTCCCCCACAGCCAGTGAAGGC-3'flu
Asp LC	5'-Red640-TGAGGTTCCCAGAAGGAAAGGTGCAGC-3'

Los componentes de la reacción se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 10.** Componentes de la reacción de PCR

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final
H <sub>2</sub> O estéril, grado PCR	5,4	
Cl <sub>2</sub> Mg 25mM	1,6	3 mM
Primer Asp For (12 pmol/ $\mu\text{L}$ )	1	0,6 $\mu\text{M}$
Primer Asp Rev (12 pmol/ $\mu\text{L}$ )	1	0,6 $\mu\text{M}$
Sonda Asp Fluo (3 pmol/ $\mu\text{L}$ )	2	0,3 $\mu\text{M}$
Sonda Asp LC (3 pmol/ $\mu\text{L}$ )	2	0,3 $\mu\text{M}$
LC Fast Start Master Hyb Probes	2	
ADN (muestra)	2	
<b>Total</b>	<b>20</b>	

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- Desnaturalización durante 10 segundos a 95°C
- Amplificación:

**Tabla 11.** Condiciones de la PCR

Parámetros	Valores		
	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Ciclos	35-45*		
Tipo	Cuantificación		
Temperatura (°C)	95	50-65	72
Tiempo de incubación (s)	10	10	0
Velocidad cambio temperatura (°C/s)	20	20	20
Modo de lectura	Ninguno	Ninguno	Individual
Valores de ganancia	F1=1 F2=10 F3=10		

(\*45 ciclos en el caso de muestras clínicas)

- Curvas de fusión. Tras la amplificación se lleva a cabo este programa para calcular la T<sub>m</sub>. Se incrementa lentamente la temperatura (0,1 °C/s) y se mide la fluorescencia de forma continua.

Parámetros	Valores		
	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Ciclos	1		
Tipo	Melting		
Temperatura (°C)	95	50	95
Tiempo de incubación (s)	30	10	0
Velocidad cambio temperatura (°C/s)	20	20	0,1
Modo de lectura	Ninguno	Ninguno	Continuo
Valores de ganancia	F1=1, F2=10, F3=10		

- Frío 40°C

El proceso completo de amplificación se realiza en 45 min.

#### 4.7. DETECCIÓN DE ANTIGENO GALACTOMANANO DE ASPERGILLUS

La detección de Galactomanano se realizó mediante el método ELISA (Platelia® Aspergillus; Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-La-Coquette, Francia) siempre por los mismos técnicos (19). Esta prueba detecta galactomanano aspergilar mediante una reacción inmunoenzimática tipo “sándwich” que se realiza en microplaca. Utiliza anticuerpos monoclonales de ratón EB-A2 dirigidos frente al galactomanano de *Aspergillus*. El galactomanano aspergilar tiene un estructura formada por un esqueleto lineal de manosas unidas por enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1-2) y  $\alpha$ -(1-6), cuya estructura se ramifica mediante enlaces  $\alpha$ -(1-2) con polímeros de  $\beta$ -(1-5)-galactofuranosas, con un promedio de cuatro unidades por cada ramificación. Estos últimos componentes son los epítomos reconocidos por anticuerpos específicos. Los anticuerpos monoclonales utilizados están previstos para sensibilizar los pocillos de la microplaca y unirse al antígeno de la muestra, y para la detección, con un anticuerpo sensibilizado con peroxidasa. La prueba tiene un umbral de detección establecido en 0,5 ng de galactomanano por ml de suero.

Los resultados se suministran en forma de índice de densidad óptica respecto al control “valor umbral”. Para cada suero se calcula la densidad óptica en relación con la proporcionada por el valor umbral. Este cálculo permite limitar las variaciones de densidad óptica inter-ensayos e intra-ensayos debidas a las diferentes condiciones de realización de la prueba. El fabricante marca los siguientes criterios para interpretar los resultados:

**Tabla 12.** Valores de Densidad Óptica e interpretación de los resultado de la técnica del GM

VALOR DE DENSIDAD OPTICA	INTERPRETACIÓN
<1	NEGATIVO
ENTRE 1-1.5	DUDOSOS
>1.5	POSITIVO

Sin embargo trabajos posteriores, sugieren que debería disminuir el criterio para considerar la prueba positiva hasta 1 ó 0,5. En la versión estadounidense de la misma prueba, comercializada recientemente, el punto de corte que recomienda el fabricante es de 0,5, criterio que ha sido utilizado en este trabajo (36-38). Evidentemente, con estos criterios se aumenta la sensibilidad, a costa de disminuir la especificidad. Por ello sólo deben aplicarse en poblaciones con una alta prevalencia *a priori* de aspergilosis invasiva, para disminuir el número de falsos positivos. Es conveniente confirmar todo resultado positivo con una nueva muestra. La prueba es útil para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad aspergilar invasora.

Es importante tener en cuenta las posibles limitaciones que pudiera tener esta técnica, por un lado se sabe que la presencia de galactomanano en el suero es intermitente, por lo que un resultado negativo no excluye el diagnóstico. Por otra parte, la precocidad del tratamiento es esencial para mejorar el pronóstico y en un 65% de los casos, una prueba positiva antecede a la aparición de cualquier signo clínico (rango de 1 a 27 días). Debido a la existencia de falsos positivos, para incrementar la efectividad de la prueba, debe realizarse de manera repetida y prospectiva en pacientes con alto riesgo de padecer la enfermedad. Solamente una valoración global hecha por un equipo asistencial podrá orientar con mayor claridad el manejo de cada paciente. Para el diagnóstico de la aspergilosis invasora se recomienda realizar la prueba de manera

repetida en los pacientes de alto riesgo. Actualmente, el criterio mas utilizado es de dos veces por semana.

La prueba es muy sensible. Las esporas de *Aspergillus* están presentes en la atmósfera, especialmente asociadas con el polvo, y pueden contaminar la muestra o los reactivos, dando lugar a resultado falsamente positivos. Por ello deben extremarse las precauciones de limpieza:

- ❖ No trabajar en una habitación donde se cultive *Aspergillus*.
- ❖ Limpiar las superficies contaminadas.
- ❖ Tapar los tubos.
- ❖ No exponer los pocillos al aire más tiempo del estrictamente necesario.
- ❖ Utilizar material limpio de polvo.
- ❖ Utilizar agua destilada estéril.

El galactomanano es termoestable, por lo que la esterilización del material no garantiza la ausencia del mismo (39-41).

**Tabla 13.** Principales causas de resultados Falsos Positivos

RESULTADOS FALSOS POSITIVOS ( 8-14%)
Colonización masiva del tubo digestivo por <i>Aspergillus</i> spp.
Infecciones por otros hongos, como <i>Paecilomyces</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp. y <i>Candida</i> spp. que presentan reacción cruzada con el anticuerpo usado en la prueba
Bacteriemia por microorganismos con antígenos con reacción cruzada
Ingesta de cereales ( como la pasta italiana), leche materna y otros alimentos que contenga galactomanano, en pacientes con lesiones en la mucosa digestiva (mucositis). <i>Aspergillus</i> spp. se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y en materias primas. Los procesos industriales no destruyen el galactomano y este se puede encontrar en una gran variedad de alimentos como té, arroz, leche, pimienta e incluso algunos antibióticos como piperacilina/tazobactam o amoxicilina/clavulánico.
Tratamiento con ciclofosfamida
Lactantes: En neonatos el porcentaje de falsos positivos puede llegar a ser del 83%. Al parecer sería la reacción cruzada que se produce con el ácido lipoteicoico de bacterias del genero <i>Bifidobacterium</i> que colonizan normalmente el tubo digestivo, especialmente en la población que se alimenta de leche, y que pasarían al torrente circulatorio por traslocación en una mucosa naturalmente inmadura (8,89).



**Tabla 14.** Principales causas de resultados Falsos Negativos

RESULTADOS FALSOS NEGATIVOS
Lesión encapsulada y poca invasión vascular
Lesión con poca cantidad de hongo
Inmunocomplejos anti- <i>Aspergillus</i>
El tratamiento del paciente con Anfotericina B previo a la recogida de la muestra puede negativizar la prueba (8,89).

No está claro que un solo resultado positivo sea significativo. Es conveniente repetirlo en una nueva muestra para su confirmación. La mayoría de los trabajos se han realizado en pacientes inmunodeprimidos, principalmente en neutropenia grave y persistente o sometidos a transplante de médula ósea o pulmón. Dada la prevalencia y el mal pronóstico de la enfermedad es difícil disponer de resultados a gran escala y en ciertas situaciones clínicas la experiencia publicada es escasa, particularmente en enfermos con enfermedades pulmonares crónicas tratados con corticoides y en formas de aspergilosis no pulmonares.

Esta prueba incluye las especies del género *Aspergillus* y, aunque existen reacciones cruzadas con otros hongos, no es una prueba válida para el diagnóstico de procesos infecciosos similares causados por otras especies, como por ejemplo del género *Scedosporium*.

No se conoce la utilidad de la prueba para confirmar el diagnóstico de aspergilosis invasiva en pacientes de bajo riesgo con cultivo positivo de muestras potencialmente contaminadas como puede ser un esputo. De todos modos, la lógica sugiere que debe tenerse en cuenta un resultado positivo en un paciente con un cultivo positivo por *Aspergillus*, que toma altas dosis de corticoides y cuya mucosa intestinal está intacta.

El galactomanano es además una herramienta útil para el seguimiento de los pacientes diagnosticados de aspergilosis invasiva, ya que se ha visto que una disminución del índice se relaciona con un mejor pronóstico, mientras que su mantenimiento indica peor pronóstico (39-41).

#### **4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La evaluación de los nuevos métodos empleados (GM y PCR a tiempo real) como métodos de cribado, se realizará determinando las sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos. La salida del protocolo se define como IFI probada o probable, alta o muerte del paciente. Debido a que la confirmación de invasión fúngica se debe realizar mediante estudios histopatológicos que serían la prueba diagnóstica de referencia, se emplearán los casos confirmados como verdaderos positivos y los que no presenten infección fúngica como verdaderos negativos. Con estos casos se determinarán los valores estadísticos y se ajustarán los valores obtenidos considerando todos los casos, tanto probados como posibles y probables.

Análisis de datos por métodos paramétricos y no paramétricos incluidos dentro del paquete estadístico SPSS 13.0.

## 5. RESULTADOS

## 5.1 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICAS

### 5.1.1 SENSIBILIDAD: LÍMITE MÍNIMO DE DETECCIÓN.

La sensibilidad o límite mínimo de detección de la técnica, se define como la cantidad mínima de ADN necesaria para obtener una reacción de amplificación positiva.

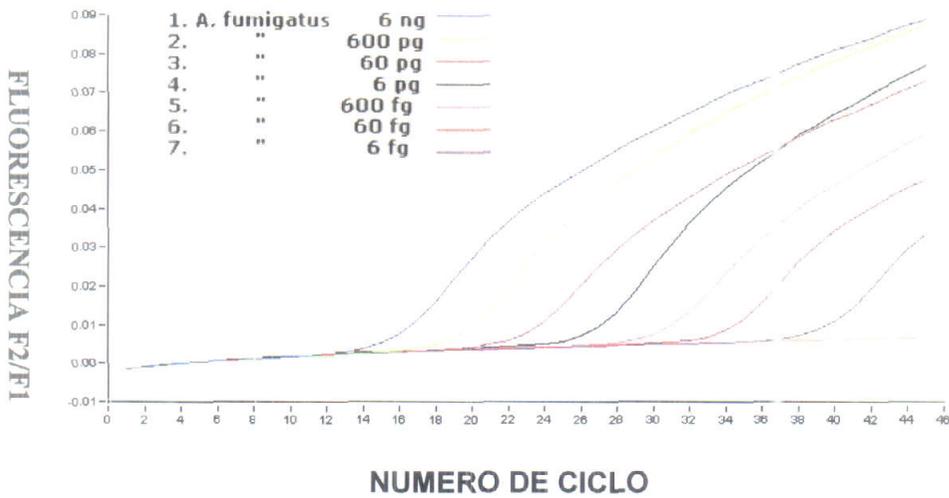
Esta se determinó en tres supuestos diferentes: a) ADN purificado, b) diluciones seriadas de un cultivo puro de *A. fumigatus* y c) muestras de sangre contaminadas con conidias de *A. fumigatus*.

5.1.1.1 ADN PURIFICADO: Para la determinación del límite mínimo de detección, se extrajo ADN de la cepa de *A.fumigatus*. Se midió la concentración del ADN purificado de *A.fumigatus*, extraído en el espectrofotómetro y se ajustó a una concentración final de 6 ng/μL. A partir de esta concentración se realizaron diluciones seriadas en base diez hasta llegar a una concentración de 6 fg/μL que se utilizaron directamente en la PCR. La cantidad mínima de ADN necesaria para obtener una reacción de amplificación positiva en la PCR en tiempo real, fue de 60 fg utilizando ADN purificado, lo cual se corresponde a un intervalo entre 5-20 conidias por PCR.

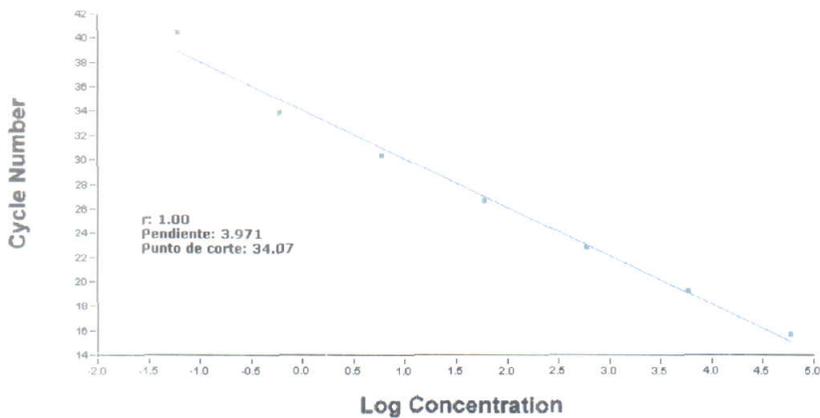
Las curvas de amplificación obtenidas durante la PCR en tiempo real y el número de ciclos necesarios para que la emisión de fluorescencia empiece a aumentar se muestran en la figura 1.

En la figura 2 se representa la relación existente entre el logaritmo de la concentración de ADN de *A.fumigatus* y el número de ciclos durante la PCR en tiempo real observándose una relación de linealidad entre ambas variables con un coeficiente de correlación (r) de 1 y una pendiente de 3,971.

**Figura 1.** Curvas de amplificación obtenidas durante la PCR en tiempo real con diluciones de ADN purificado de *Aspergillus fumigatus* y número de ciclos necesario para que la emisión de fluorescencia empiece a aumentar.



**Figura 2.** Recta de regresión obtenida con ADN purificado de *Aspergillus*. Se observa una relación lineal entre ambas variables.



5.1.1.2 DILUCIONES SERIADAS DE UN CULTIVO DE *A. fumigatus*: También se estudiaron diluciones dobles seriadas desde  $10^6$  hasta 1 ufc/mL a partir de un inóculo 0,5 MacFarland realizado con células vegetativas procedentes de un subcultivo de 7 días en agar patata dextrosa. En este caso, el resultado del límite de detección a partir de células, fué de 15 conidias por reacción de PCR. La gráfica que obtuvimos en este supuesto no se ajusta a una recta como en el caso del ADN puro, lo cual puede deberse a la dificultad que supone obtener una suspensión homogénea de este tipo de hongos, así como, la posibilidad de que se pueda perder parte de las células durante el proceso de extracción.

El ciclo umbral (Ct), ciclo a partir del cual se obtuvo un incremento significativo de la emisión de fluorescencia con respecto a la señal de base, se muestra en la tabla 15. Su valor esta relacionado con el crecimiento exponencial del producto de amplificación.

**Tabla 15.** Media y desviación estándar de los Ct (ciclo umbral) obtenidos con las células en función de la dilución de partida.

Ct	$10^4$	$10^5$	$10^6$
Media	28,4	27,1	24,3
Desviación	0,60	1,6	0,80

Los resultados obtenidos, tanto en el caso de ADN puro, como en el de diluciones seriadas con cultivo puro, cuando la extracción se realizó con el método del MagnaPure, fueron desestimados ya que, realizado el experimento por triplicado, solo

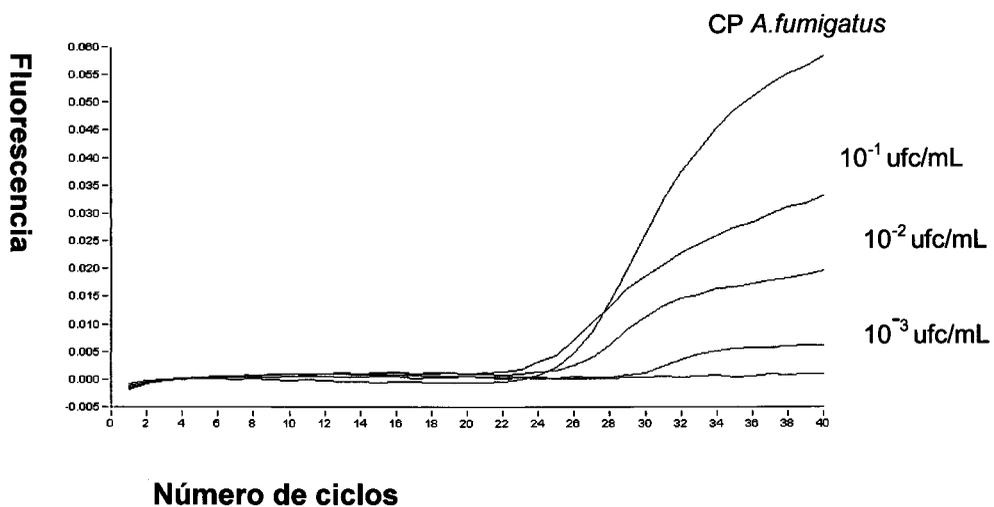
fue positiva la PCR en las tres primeras diluciones, obteniéndose los siguientes Ct (tabla16):

**Tabla 16.** Media de los valores de Ct (ciclo umbral) obtenidos utilizando el método automático de extracción del ADN MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation

DILUCIÓN	C <sub>t</sub>
<i>Aspergillus</i> spp inicial	23,93
<i>Aspergillus</i> spp 10 <sup>-1</sup>	25,56
<i>Aspergillus</i> spp 10 <sup>-2</sup>	28,40

5.1.1.3 SANGRE CONTAMINADA: Cuando el estudio se realizó contaminando sangre con una concentración conocida de conidias de *A.fumigatus*, el resultado del límite mínimo de detección fue de 20 a 500 ufc/ $\mu$ L. Como podemos observar en la gráfica 3 la amplificación comienza a partir de ciclo número 24 siendo la primera en amplificar aquella que tiene una mayor concentración de conidias de *Aspergillus fumigatus* (10<sup>-1</sup> ufc/mL).

**Figura 3.** Curvas de amplificación obtenidas durante la PCR en tiempo real con diluciones de sangre contaminada con conidias de *Aspergillus fumigatus* y número de ciclos necesarios para que la emisión de fluorescencia empiece a aumentar.



### 5.1.2 ESPECIFICIDAD

Se define la especificidad como la probabilidad de que el resultado de la prueba sea negativo entre aquellas muestras realmente negativas, es decir, determina la capacidad discriminativa diagnóstica de la técnica. Con la especificidad de la técnica se puede conocer la proporción de falsos positivos que se pueden obtener, entendiendo como falso positivo aquel microorganismo de una especie distinta al buscado que da un producto de amplificación igual al control positivo.

De acuerdo con esto, la fórmula aplicada para calcular la especificidad (E) es:

$$E = \frac{\text{N}^\circ \text{ de cepas con PCR negativa (VN)}}{\text{N}^\circ \text{ de cepas con PCR positiva (FP)} + \text{N}^\circ \text{ de cepas con PCR negativa (VN)}} \times 100$$



La especificidad del método se determinó realizando la técnica de amplificación con el mismo método pero utilizando otras especies patógenas y no patógenas de hongos y bacterias. El resultado que esperamos obtener para demostrar que la técnica es específica, es que solo amplifiquen las especies del género *Aspergillus*. Como se puede apreciar en la tabla, no se obtuvo amplificación con ninguna de las especies estudiadas de otros géneros de hongos o bacterias, lo cual pone de manifiesto una especificidad del 100% (tabla17)

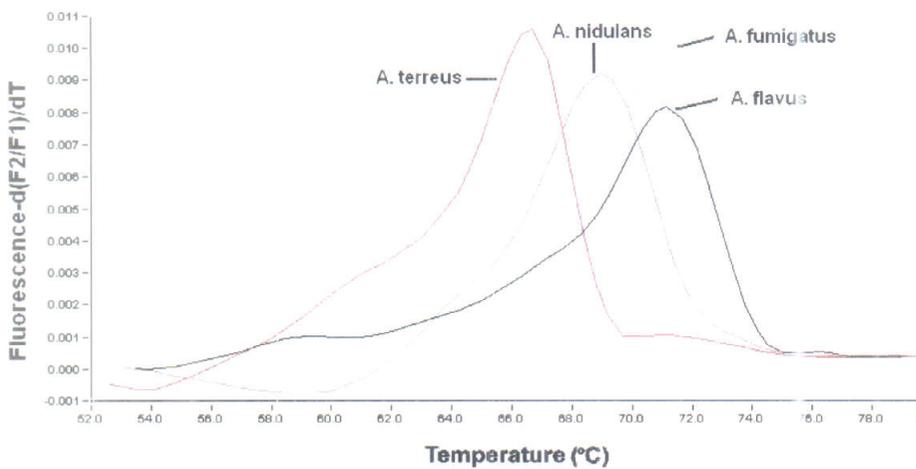
**Tabla 17.** Resultados de la especificidad de la técnica

MICROORGANISMO	RESULTADO PCR	MICROORGANISMO	RESULTADO PCR
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	<i>Fusarium spp</i>	-
<i>Aspergillus terreus</i>	+	<i>Acremonium spp</i>	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	<i>Penicillium spp</i>	-
<i>Aspergillus flavus</i>	+	<i>Rhodotorula spp</i>	-
<i>Aspergillus nidulans</i>	+	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>Candida guilliermondii</i>	-	<i>Bacillus megaterium</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Candida krusei</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Aeromonas spp</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

Además como vemos en la figura 4 esta técnica nos permite diferenciar las 4 especies de *Aspergillus* estudiadas en función de su Tm o temperatura de fusión, la cual se define como la temperatura a la que la mitad de la doble cadena de ADN (formada por

las sondas y el amplicón de cada especie) se han separado. Como observamos en la tabla 17 los valores de  $T_m$  obtenidos para cada especie fueron 68,6°C para *A. nidulans*, 70.°C para *A. fumigatus*, 66,9°C para *A. terreus* y 69,5°C para *A. flavus*. Esta diferenciación es importante ya que existen implicaciones clínicas con respecto al tratamiento. Esto es así porque las especies de *A. terreus* presentan una resistencia intrínseca a Anfotericina B, por lo que no podría ser utilizado en el tratamiento. De ahí la importancia en llegar la diagnóstico de especie en este tipo de infecciones.

**Figura 4.** Curvas de fusión de las distintas especies de *Aspergillus*.



**Tabla 18.** Clasificación de las especies de *Aspergillus* en función de la Tm (temperatura de fusión).

CEPAS	Tm (°C)
<i>A. fumigatus</i>	71,18
<i>A. terreus</i>	66,48
<i>A. nidulans</i>	68,9
<i>A. flavus</i>	71,03

## 5.2 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICAS

En este estudio participaron tres hospitales, 2 de la provincia de Sevilla y 1 de la provincia de Cádiz. Los hospitales fueron: a) Hospital del SAS de Jerez, b) H.U.V.Rocio, y c) H.U.Valme. Desde el 1 de enero de 2004 hasta el 30 junio de 2006, se procesaron un total de 948 muestras pertenecientes a 127 pacientes. La distribución por hospitales, así como la media de muestras recogidas por paciente aparecen recogidas en la tabla 19a, 19b y figura 5.

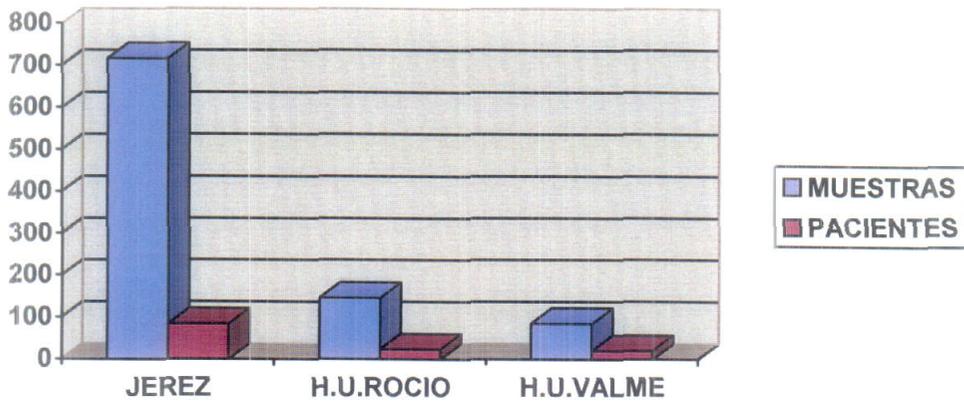
**Tabla 19a.** Distribución por hospitales de las muestras recogidas en el estudio

HOSPITAL	MUESTRAS	PACIENTES
H JEREZ	717	84
H.U.ROCIO	146	23
H.U.VALME	85	20
<b>TOTAL</b>	<b>948</b>	<b>127</b>

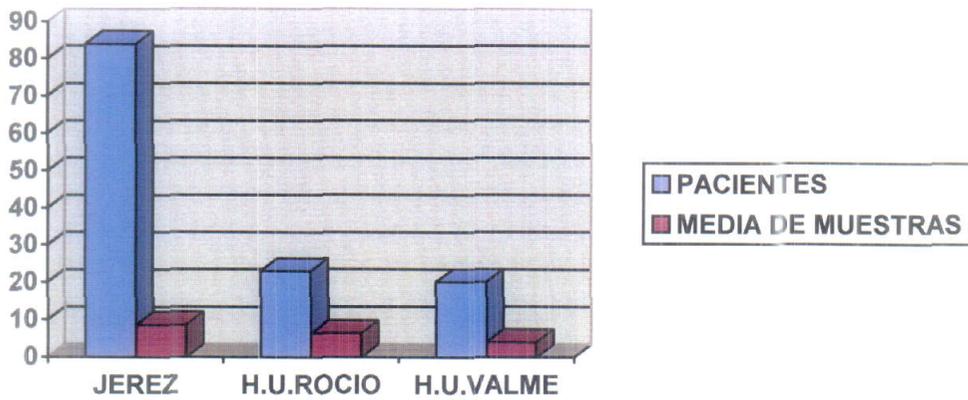
**Tabla 19b.** Distribución de las media de muestras recogidas en el estudio por cada paciente, según los hospitales de procedencia.

HOSPITAL	PACIENTES	MEDIA DE MUESTRAS POR PACIENTE
H JEREZ	84	8.6
H.U.ROCIO	23	6.3
H.U.VALME	20	4
<b>TOTAL</b>	<b>127</b>	<b>6.3</b>

**Figura 5a.** Distribución por hospitales de las muestras recogidas en el estudio



**Figura 5b.** Distribución por hospitales de la media de muestras recogidas por cada paciente



### 5.2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

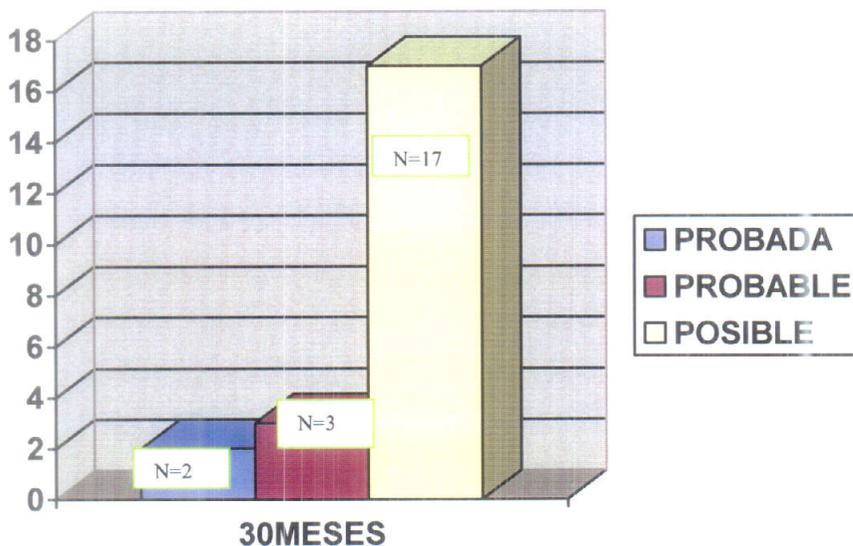
Las características de la población estudiada se reflejan en la tabla 20:

Tabla 20. Principales características de la población de estudio	
PARÁMETRO	VALOR
Edad, mediana (Q1-Q3)	45,4 (30,1-58,4)
Sexo varón (%)	64 (49,4)
Criterio de inclusión (%)	
1. T.M.O*	70 (58,4)
2. Neutropenia	46 (36,4)
3. Tto prolongado con esteroides	11 (5,2)
Tipo de TMO (%)	
1. alogénico	52 (74)
2. autólogo	18 (26)
Enfermedad subyacente (%)	
1. Leucemia	47 (41,5)
2. LNH**	29 (22,1)
3. Mieloma	22 (16,9)
4. Aplasia	10 (5,2)
5. Otros	19 (14,3)
Rechazo	
1. Si	105 (83,1)
2. No	22 (16,9)

\*TMO: Transplante de médula ósea \*\*LNH: Linfoma No Hodgkin

Durante los 30 meses de seguimiento, en los que no se han realizado obras en el entorno de los distintos centros hospitalarios participantes en el estudio, se han incluido en el estudio 127 pacientes con sospecha de aspergilosis invasiva (AI), que según los criterios diagnósticos de la EORTC/IFICG definiríamos como 2 casos de AI probada pertenecientes al H.U.V.Rocio, 3 casos de AI probable pertenecientes 2 de ellos al Hospital del SAS de Jerez y 1 al H.U.Valme. De los 122 pacientes restantes se clasifican como AI posible 14 casos en Hospital del SAS de Jerez, 3 en H.U.V.Rocio y ninguna en H.U.Valme.

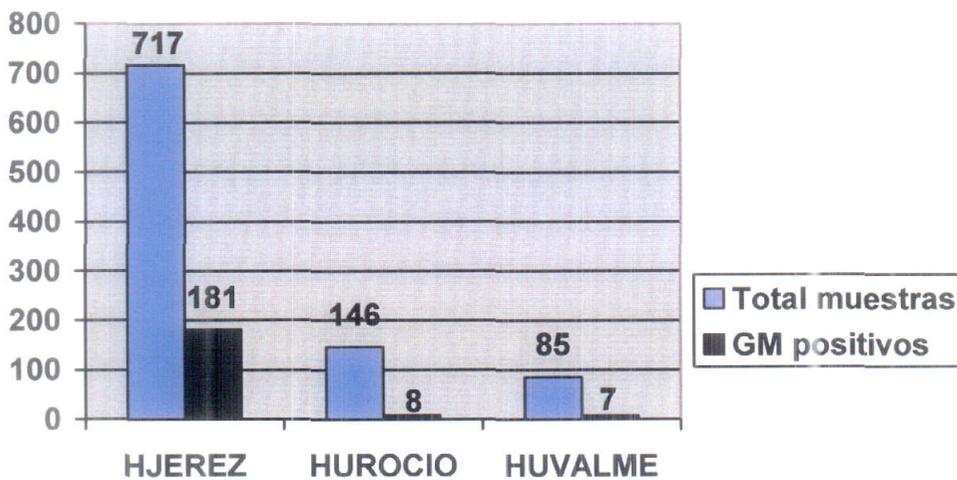
**Figura 6.** Distribución de los pacientes según de la clasificación de EORTC/IFICG



### 5.2.2 GALACTOMANANO (GM)

Se recogieron un total de 948 muestras de suero a lo largo del estudio. De ellas 717 procedían del Hospital de Jerez, 146 del HUVRocio y 85 del HUValme. De las 717 muestras pertenecientes al Hospital de Jerez, observamos que 181 fueron positivas para la detección del GM, mientras que en los dos hospitales restantes el número de muestras GM positivas fue mucho menor, 8 en el caso del HUVRocio y 7 en HUValme. (Figura 7).

**Figura 7.** Relación entre el total de muestras obtenidas en los distintos hospitales y las muestras Galactomanano positivo

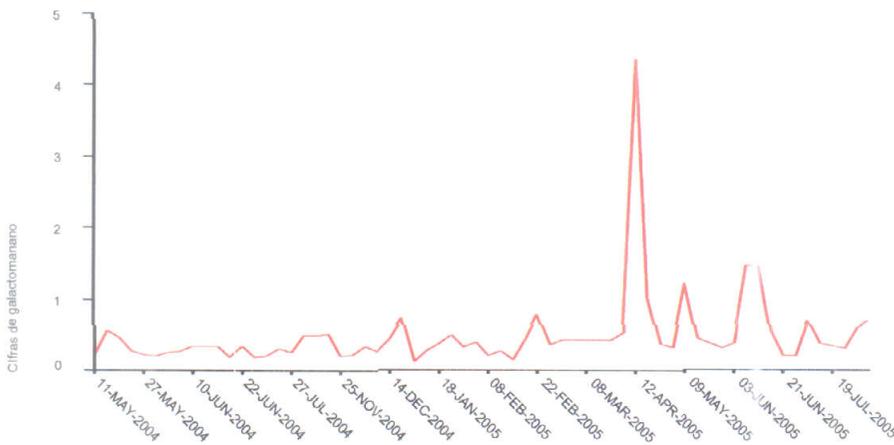




HOSPITAL DE JEREZ: Se han realizado un total de 717 determinaciones de GM. Hemos obtenido 16 casos positivos pertenecientes a 16 pacientes.

Del total de positivos, en un caso el paciente se encontraba asintomático y no existía sospecha clínica de infección fúngica por *Aspergillus*, el resto de los 15 casos, aunque presentaban factores de riesgo para presentar una infección fúngica, no se sospechó aspergilosis. El diagnóstico microbiológico se adelantó al clínico en 14 casos. En el caso restante cuando se obtuvo la segunda determinación semanal positiva, el paciente presentó en la imagen del TAC de alta resolución una imagen característica de doble halo por lo que el diagnóstico fue simultáneo. Solo en cuatro de estos casos se pudo cultivar *A.fumigatus* en muestras de esputo, aspirado bronquial y lavado alveolar respectivamente. Del total de los pacientes de este estudio, solo 2 cumplían los criterios de la EORTC/IFICG de infección fúngica invasiva probable, uno de ellos por presentar signo del halo en el TAC junto con 2 cultivos de esputo positivos para *A. fumigatus*, y GM positivo en 5 muestras. El otro por ser un paciente VIH que debuta con una neumonía por *P jirovecii* junto con una muestra de lavado broncoalveolar positiva para *A. fumigatus* y 2 determinaciones de GM positivas. El resto de los pacientes fueron clasificados como AI posible. No existió ningún caso de infección fúngica invasiva probada.

En 14 casos de los 16 que fueron positivos se instauró tratamiento precoz frente a *Aspergillus*. En 7 de estos casos pudimos monitorizar la respuesta al tratamiento con el seguimiento de los valores de GM. La buena evolución clínica de los pacientes fue paralela a la negativación de las cifras de GM.

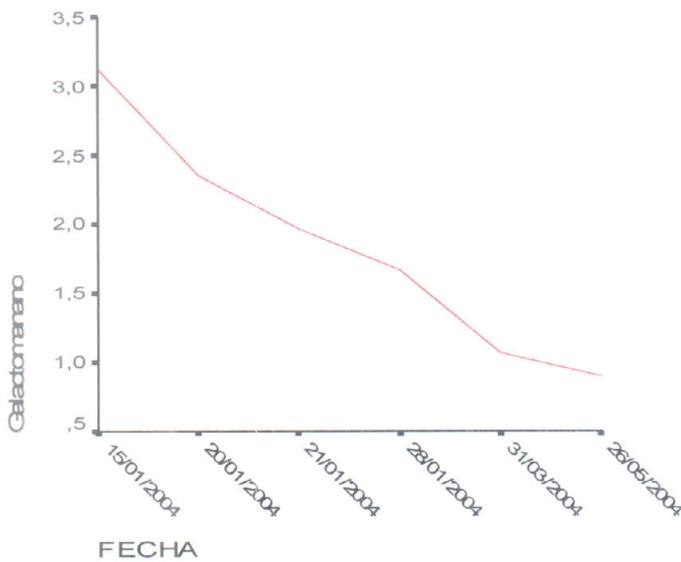
**Figura 8.** Evolución de las cifras de GM tras tratamiento antifúngico

H.U.V.ROCIO: Se procesaron un total de 146 muestras pertenecientes a 23 pacientes. Estos pacientes ingresan en el estudio por ser receptores de trasplante alogénico de médula ósea. Del total de muestras analizadas se obtiene un resultado GM positivo en 8 muestras, lo que corresponde a un 5,5% de porcentaje de positividad. Estas 8 muestras positivas pertenecen a 4 pacientes de los cuales, 2 pertenecen al grupo de AI probada al demostrarse la presencia de hifas tabicadas en biopsia, y los otros dos al de AI posible. Los dos pacientes con AI probada, presentaron 5 y 1 muestras GM positivas respectivamente de forma consecutiva, mientras que los otros 2 pacientes con AI posible, presentaron solo una determinación aislada GM positiva, por lo que fueron considerados resultados falsos positivos. En los dos casos de AI probada el resultado de GM se anticipó al diagnóstico clínico. No fue posible monitorizar la respuesta al tratamiento con la evolución de las cifras de GM ya que no se pudieron obtener mas muestras.

HOSPITAL DE VALME: En este centro se procesaron un total de 85 muestras pertenecientes a 20 pacientes que ingresaron en el estudio por presentar una neutropenia prolongada, en la mayoría de los casos secundaria a un tratamiento

inmunosupresor derivado de su patología de base. Entre los 20 pacientes existe un caso de AI probable por presentar una neutropenia de  $<500$  neutrófilos/ $\text{mm}^3$  durante más de 10 días, junto con un antígeno de GM de *Aspergillus* spp positivo en mas de 4 muestras de sangre consecutivas, y signo del halo en la TAC de alta resolución. Este hallazgo fue el primero en aparecer y lo que determinó la realización de forma seriada de 2 determinaciones semanales de Ag GM de *Aspergillus* spp hasta la remisión de la neutropenia. Por lo tanto, este es el único caso en el que el GM no se anticipa al resto de los datos clínicos para el diagnóstico de la AI. El resto de los casos no puede ser clasificado como AI posible ya que el único dato clínico que presentan, y por el que fueron incluidos en el estudio es el de neutropenia prolongada.

**Figura 9.** Evolución de las cifras de GM en un caso de AI posible con signo del halo positivo



### 5.2.3 PCR TIEMPO REAL

La PCR a tiempo real se realizó a un total de 948 muestras pertenecientes a 127 pacientes que fueron incluidos en el estudio por presentar uno o mas de los criterios de inclusión anteriormente mencionados.

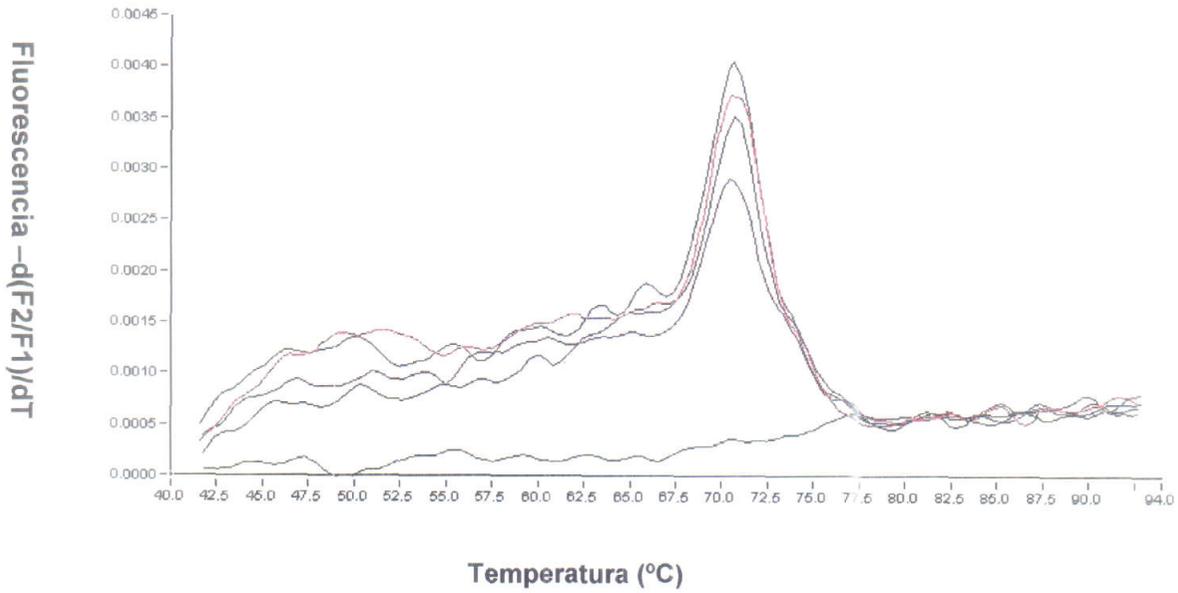
Solo se obtuvo resultado positivo de PCR en tiempo real en un total de 10 muestras (1,05%) pertenecientes a 4 pacientes. Todos ellos proceden del HUVRocio y que ingresaron en el estudio por ser receptores de un TMO alogénico. De estos 4 pacientes 2 fueron diagnosticados como AI probada en base a la presencia histo/citopatológica de hifas tabicadas con evidencia de daño o invasión tisular procedentes de una muestra de tejido pulmonar obtenida mediante aspiración con aguja fina. Los otros dos pacientes se clasificaron como AI posible ya que el resultado de la PCR positiva fue el único dato clínico de sospecha de AI.

Inicialmente se empezó a trabajar en muestras de suero pero posteriormente con la aparición en la bibliografía de la mayor rentabilidad en las muestras de sangre total se abandonó el suero y empezamos a trabajar en muestras de sangre. En la tabla 21 se refleja la media y la desviación estándar de los Ct obtenidos tanto con muestras de suero como con sangre total.

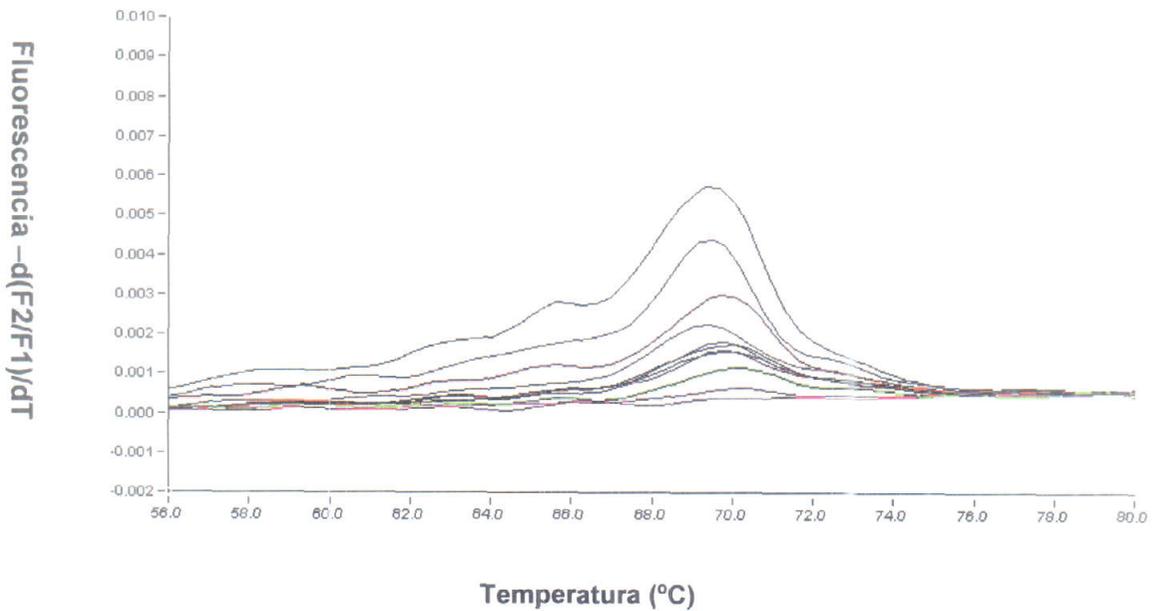
**Tabla 21.** Resultados de la media y la desviación de los distintos valores de Ct (ciclo umbral) obtenidos tanto para suero como para sangre total.

	Ct SUERO	Ct SANGRE
Media	32,9	30,6
Desviación	1,3	1,8

**Figura 10.** Curvas de disociación de los productos de amplificación obtenidos utilizando sueros de un paciente con Aspergilosis Invasiva probada



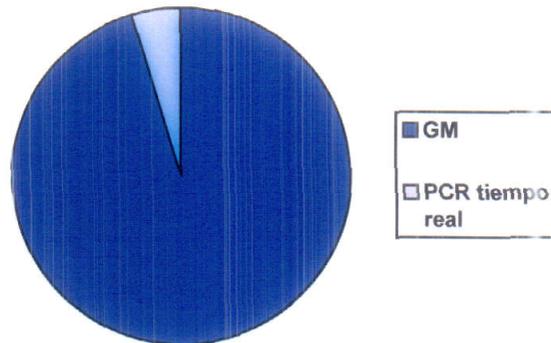
**Figura 11.** Curvas de disociación de los productos de amplificación obtenidos utilizando sangre total de un paciente con Aspergilosis Invasiva probada



### 5.3 COMPARACIÓN ENTRE GALACTOMANANO Y PCR TIEMPO REAL

Cuando analizamos los resultados obtenidos por ambas técnicas, esto es, la detección de antígeno galactomanano de *Aspergillus* spp y PCR en tiempo real, observamos que de las 948 muestras analizadas, fueron positivas por la técnica del GM un total de 196 lo que corresponde a un 20,6% , mientras que con la PCR a tiempo real se obtuvo un resultado positivo en 10 muestras de las 948 analizadas lo que corresponde a un 1% de porcentaje de positividad.

**Figura 12.** Distribución del porcentaje de resultados positivos obtenidos mediante la detección de Ag GM de *Aspergillus* spp y PCR en tiempo real.



Se consideraron resultados falsos positivos en la técnica de detección de Ag GM de *Aspergillus* spp un total de 6 muestras pertenecientes a 5 pacientes. En todos los casos excepto uno, se trataba de una única muestras de suero y los pacientes estaban recibiendo tratamiento con Piperacilina-tazobactam. En el caso restante, a pesar de tratarse de dos muestras positivas, el paciente también estaba recibiendo tratamiento con el mismo antibiótico presentando un índice de GM muy próximo a 0,5ng/mL.

En la tabla siguiente aparecen resumidos los resultados obtenidos tanto por PCR a tiempo real como por GM de los pacientes clasificados según presente una aspergilosis invasiva probada, probable y posible (29).

Los 2 pacientes con AI probada, presentaron un resultado positivo tanto por PCR como mediante la detección de GM. El paciente 1 presentó 6 muestras PCR positivas de un total de 6 mientras que solo 5 de esas muestras fueron positivas para GM. Por el contrario solo pudimos obtener 1 muestra del paciente 2 que resultó ser positiva tanto por PCR como para GM. En ambos casos la primera en positivizarse fué la PCR a tiempo real. En los 3 casos de AI probable solo fue positiva la detección de GM, mientras que en los 17 casos de AI posible fue positiva la determinación de GM 15 pacientes obteniéndose un resultado simultaneo positivo para PCR y GM en dos pacientes pertenecientes a este último grupo. En la tabla solo se recogen el número de muestras positivas por GM en aquellos pacientes que también presentaron un resultado positivo por PCR, no mostrándose los resultados positivos obtenidos solo mediante la detección de GM.

Asimismo presentamos en la tabla 22b las principales características que nos permitieron clasificar a los pacientes según los criterios de la EORTC/NIAID en AI probada, probable y posible.

**Tabla 22a.** Distribución y comparación de los resultados obtenidos mediante PCR a tiempo real y Galactomanano en los pacientes con Aspergilosis Invasiva probada, probable y posible.

AI	TOTAL PACIENTES	GM+ (Nº POSITIVAS/ TOTAL)	PCR + (Nº POSITIVAS/ TOTAL)	MUESTRAS SIMULTANEAMENTE + PCR/GM (TOTAL)
PROBADA	2	Paciente 1 : 5/6 Paciente 2 : 1/1	Paciente 1 : 6/6 Paciente 2 : 1/1	Paciente 1 : 5/5 (6) Paciente 2 : 1/1 (1)
PROBABLE	3	Paciente 3 : 5/5 Paciente 4 : 2/2 Paciente 5 : 4/6	NO	NO
POSIBLE	17	Paciente 6 : 1/12 Paciente 7 : 1/15	Paciente 6 : 2/12 Paciente 7 : 1/15	Paciente 6 : 1/1 (12) Paciente 7 : 1/1 (15)
TOTAL	22	19/47	10/34	8/8

**Tabla 22b.** Principales características clínicas de los pacientes con Aspergilosis invasiva probada, probable y posible.

PACIENTE	CLASIFICACIÓN	HOPITAL	CRITERIOS EORTC/NIAID
Paciente 1	AI PROBADA	HUVROCIO	Presencia histo/citopatologica de hifas
Paciente 2	AI PROBADA	HUVROCIO	Presencia histo/citopatologica de hifas
Paciente 3	AI PROBABLE	H JEREZ	Signo del halo, cultivo positivo de esputo, GM positivo
Paciente 4	AI PROBABLE	H JEREZ	Sida sintomático + cultivo positivo de lavado broncoalveolar+ GM positivo
Paciente 5	AI PROBABLE	HUVALME	Signo del halo + neutropenia prolongada + GM positivo
Paciente 6	AI POSIBLE	HUVROCIO	Neutropenia prolongada + cultivo esputo positivo
Paciente 7	AI POSIBLE	HUVROCIO	Uso de esteroides prolongado + cultivo esputo positivo



## 6. DISCUSIÓN

Las infecciones fúngicas invasivas son una importante y creciente causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes que reciben quimioterapia intensiva o son sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos. De hecho, aunque se ha descrito una amplia variabilidad en la incidencia de estas infecciones, que oscila entre el 10-15%, la percepción de un incremento con respecto a otras épocas es prácticamente universal (42-46), persistiendo una alta mortalidad a pesar de los avances realizados en el campo del tratamiento.

Además, junto con el incremento en las infecciones fúngicas se están observando cambios en la prevalencia de los distintos géneros y especies de los hongos causales de estas infecciones. Así, parece constante el incremento de infecciones producidas por *Aspergillus* spp., en especial en pacientes sometidos a quimioterapia intensiva así como trasplante alogénico. Igual sucede con el creciente aislamiento de los denominados hongos emergentes tales como *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Trichosporon* spp., *Cryptococcus* spp. que en su conjunto pueden constituir entre el 20 y el 30% de los hongos aislados en las IFI.

La Aspergilosis invasiva (AI) se ha convertido en una importante causa de morbimortalidad entre los pacientes inmunodeprimidos, incluyendo sobretudo a determinados pacientes que reúnen una serie de factores de riesgo tales como pacientes transplantados, receptores de tratamientos prolongados con esteroides y sobretudo aquellos pacientes con tumores hematológicos susceptibles de ser receptores de trasplante de médula ósea. Además se ha observado un aumento en la incidencia de AI en la fase de no neutropenia que sigue a un trasplante de médula ósea y en pacientes muy debilitados con estancias prolongadas en la UCI (47).

Como acabamos de comentar, la frecuencia de la AI varía considerablemente de acuerdo con la enfermedad de base y el tratamiento aplicado. Los pacientes con

leucemia aguda y receptores de TMO son los de mayor riesgo. Basándonos en los pacientes evaluados en nuestro estudio, el TMO fue el criterio de inclusión más frecuente, ya que el 70% de los pacientes de nuestra población fueron receptores de un TMO y de ellos el 94% recibieron un TMO alogénico. Si analizamos cual fue la enfermedad subyacente de los pacientes incluidos en el estudio, observamos como el 47% de ellos tenían una leucemia mieloblástica aguda (LMA) lo cual pone de manifiesto una mayor incidencia de IFI en pacientes receptores de TMO alogénico así como los que sufren una LMA datos coincidentes con lo publicado (48-51).

En primer lugar es importante definir la AI. Hasta el año 2000 no se disponen de definiciones internacionalmente aceptadas de las distintas AI. La European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) y el National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) publicaron unas definiciones de consenso internacional para pacientes oncohematológicos y receptores de TMO (29).

Durante los dos años y medio que dura la recogida de pacientes en nuestro estudio, concretamente el periodo comprendido entre el 1 de enero de 2004 hasta el 30 de junio de 2006, observamos 2 casos de AI probada (1,5%), 3 casos de AI probable (2,3%) y 17 casos de AI posibles (13,3%) entre un total de 127 pacientes, lo cual corresponde a una incidencia global del 17,3%, lo que se sitúa entre los márgenes anteriormente mencionados (52-57) (Figura 6).

La elevada mortalidad asociada a esta patología se debe fundamentalmente a la dificultad para establecer un diagnóstico precoz en los estadios iniciales de la enfermedad, dado que los síntomas, cuando aparecen, son muy inespecíficos y no existe ningún signo patognomónico que nos ayude al diagnóstico. Asimismo, las técnicas convencionales de diagnóstico microbiológico tales como el cultivo han demostrado una baja sensibilidad. Aunque se ha descrito que el hemocultivo es una

de las mejores técnicas para la detección de fungemia (58), en el caso de los hongos filamentosos como es el caso de *Aspergillus* spp, su significado clínico debe evaluarse de manera detenida pues son raros los hongos filamentosos oportunistas causantes de micosis invasivas que cursan con fungemia, a excepción de *Penicillium marneffe* y *Fusarium* spp. (59). Además no se conoce con exactitud la cinética del hongo una vez que invade un determinado órgano de nuestra economía, siendo la tasa de hemocultivos positivos inferior al 30% en este tipo de pacientes (60). Por tanto mientras no se demuestre su verdadera implicación patológica, el aislamiento de *Aspergillus* en sangre debe ser considerado como una contaminación (5).

El lavado broncoalveolar (BAL), es la técnica de elección para el diagnóstico de presunción de la AI del tracto respiratorio inferior en los enfermos inmunodeprimidos, recomendándose como alternativa al esputo obtenido por expectoración espontánea o inducido. En pacientes con neoplasias hematológicas el valor predictivo positivo del BAL puede ser superior al 80% por lo que su aislamiento es un criterio de AI probable (29). Sin embargo para poder considerarse como AI documentada se precisa de una biopsia de parénquima pulmonar y demostrar histopatológicamente la invasión tisular por elementos fúngicos.

La recogida de una adecuada muestra clínica también suele ser compleja, pues o se desconoce el foco de infección o este es inaccesible, sin un riesgo importante para este tipo de pacientes.

El diagnóstico precoz de la AI en los pacientes con neoplasias hematológicas por las técnicas convencionales anteriormente mencionadas, continúa siendo un gran problema para el clínico. Con frecuencia, los signos y síntomas de infección son inespecíficos, los cultivos son comúnmente negativos y, debido a las propias características del paciente (insuficiencia respiratoria, trombopenia), a menudo no es

posible emplear técnicas invasivas de diagnóstico (broncoscopio, biopsia). En muchos casos el diagnóstico y tratamiento de una AI se basa más en la sospecha clínica que en la presencia de datos objetivos de infección, ya que estos son difíciles de obtener. Todo ello conlleva que muchas veces el diagnóstico de seguridad se realice en fases avanzadas de la infección, o incluso en estudios necrópsicos. El difícil diagnóstico de la AI queda demostrado por el hecho de que tan solo se sospechan el 60% de los casos de infección durante la vida del paciente (61).

Además de la inespecificidad de los síntomas, nos encontramos con otra limitación en el diagnóstico convencional de las IFI ya que el cultivo es incapaz de diferenciar entre colonización e infección. El aislamiento de *Aspergillus* spp. en un cultivo de una muestra no estéril, como por ejemplo un esputo, no significa que sea el agente productor de la infección. Además al tratarse de pacientes clínicamente muy debilitados, la posibilidad de obtener una muestra invasiva de mejor calidad, parece prácticamente remota ya que el balance riesgo beneficio es éticamente inaceptable.

El beneficio de un diagnóstico preciso y precoz de la AI es indudable. Esto es especialmente cierto en pacientes severamente inmunodeprimidos en los que el pronóstico de la enfermedad es peor, ya que permite la instauración temprana de un tratamiento específico y evita tratamientos empíricos que podrían favorecer la aparición de resistencias. Lamentablemente, mediante los métodos disponibles hoy día, este diagnóstico no es siempre ni tan preciso ni tan rápido como sería necesario para mejorar el pronóstico de la AI.

En la actualidad se centran muchos esfuerzos en el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico más sensibles y específicas a la vez que rápidas tales como la detección de antígenos, (entre los que cabe destacar el galactomano de *Aspergillus* y el 1,3 $\beta$ -D glucano) y los métodos moleculares basados en la detección de ácidos nucleicos, campo en el que se han realizado grandes avances (12-19).

Las técnicas de biología molecular basadas en la detección de ácidos nucleicos, a diferencia de las inmunológicas, en general, están escasamente implantadas en los laboratorios de microbiología, por lo que se dispone de pocos protocolos estandarizados con el aval de un uso amplio y contrastado. No obstante, algunas técnicas van consolidándose para su aplicación en el diagnóstico de rutina y, otras, para estudios más especializados propios de laboratorios de referencia (62).

La valoración de la sensibilidad y la especificidad son fundamentales en cualquier método diagnóstico porque determinan el límite de detección de la prueba y permiten distinguir entre infección y colonización. En este punto cabe resaltar la gran utilidad que supondría obtener una prueba con alta sensibilidad pero que además fuera capaz de distinguir entre colonización e infección. Por otro lado la estandarización es uno de los objetivos de cualquier método diagnóstico que se pretende proponer como el más apropiado. Esto supone una permanente valoración de la efectividad del mismo, a la vez que incide en otro aspecto a tener en cuenta: la reducción de los costes. Es importante de cara a la estandarización, conseguir la metodología más sencilla posible para la aplicación del método propuesto; de forma que no precise personal altamente cualificado y evite interpretaciones erróneas de resultados. Todo ello abarata el método y permite su aplicación de manera rutinaria en el ámbito hospitalario.

Además, una clara ventaja de los métodos de detección de ácidos nucleicos frente al cultivo, es la posibilidad de detección de patógenos en muestras de pacientes que están recibiendo terapia antifúngica, ya que la viabilidad del hongo no es imprescindible para el diagnóstico aunque, obviamente, puede haber disminuido la carga fúngica en la muestra por efecto del tratamiento recibido.

Cuando se plantea aplicar técnicas de amplificación de ácidos nucleicos es especialmente importante ser muy cuidadoso con la asepsia. La mayoría de estos métodos tienen una alta sensibilidad y son capaces de detectar cantidades muy pequeñas de ADN fúngico, por lo que una dosis contaminante, aunque sea muy baja, puede ofrecer un resultado positivo claro. Este aspecto es de importancia extrema cuando se llevan a cabo métodos basados en la amplificación de secuencias universales para hongos. De forma general, tal y como recomiendan la mayoría de los autores, en nuestro estudio, no se manipularon las muestras en el mismo laboratorio en el que se trabajó con cultivos fúngicos. Además, el LighCycler, se encuentra situado en una habitación o cubículo independiente del resto del laboratorio y sin sistema de ventilación que genere corrientes de aire (62).

La tecnología de la PCR en tiempo real, utilizando cebadores dirigidos específicamente contra regiones conservadas del gen 18S ARNr de los hongos tales como *Aspergillus* spp., ha sido descrita por numerosos autores (63-67). Todos ellos muestran una elevada sensibilidad "in vitro", con resultados superiores al cultivo.

Una de las principales cuestiones que se plantean a la hora de comenzar el trabajo es cual es la muestra más adecuada para obtener un mayor rendimiento de la técnica, teniendo en cuenta las características clínicas de los pacientes sometidos a estudio. Inicialmente, tal y como recomiendan Bougnoux et al (68) y Chryssanthou et al (69) empezamos utilizando suero. Aunque la sangre en principio es mejor muestra que el suero o plasma, los primeros protocolos aplicados para la extracción de ADN de estas muestras ofrecían un bajo rendimiento, en gran medida debido a la dificultad para romper las células fúngicas y extraer con éxito suficiente cantidad de molécula diana, además la presencia de hemoglobina puede inhibir la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Así pues, se consideró que la utilización de suero como sustrato, ofrecería mejor rendimiento ya que en el mismo se podrían detectar fragmentos libres

de moléculas de ácidos nucleicos (68,69). Algunos estudios han ofrecido resultados positivos en este sentido pero actualmente, los problemas planteados con la sangre total se van solucionando y es minoritario el empleo de suero como sustrato de estudio para detección de ácidos nucleicos. De hecho este método tiene un bajo rendimiento ya que el ácido nucleico libre se degrada rápidamente y la concentración de estas moléculas completas es siempre más baja que en sangre total. Por todo ello decidimos utilizar sangre total. En ella se pueden encontrar estructuras celulares fúngicas completas en las que el hongo se conserva con su genoma intacto.

La presencia de los envoltorios celulares propios de los hongos generó, al comienzo, muchos problemas para conseguir la extracción del ADN, pero estas limitaciones se han ido resolviendo y, actualmente, el problema que genera la sangre total depende sobre todo de los componentes que interfieren con la PCR. Por tanto, es conveniente tratar la sangre (lisando los hematíes) antes de procesarla para la extracción de ácidos nucleicos. Por todo ello, parece claro que puede ser más efectivo realizar la detección de ADN en muestras de sangre total ya que en este tipo de muestras las células fúngicas se encuentran libres o dentro de fagocitos y mediante el pre-tratamiento quedan precipitadas todas en el fondo del tubo tras la centrifugación, para comenzar con la extracción del DNA. Por este motivo en sangre total se puede detectar tanto el ADN libre como el ADN genómico de células fúngicas y fagocitadas. En contraste, en las muestras de suero y plasma sólo se puede detectar ADN libre ya que las hifas y células fúngicas precipitan junto con los leucocitos durante la centrifugación, por ello la sensibilidad teóricamente podría estar disminuida.

Las muestras respiratorias tienen una especificidad menor, debido a los falsos positivos que genera la presencia de *Aspergillus*, y otras especies fúngicas, que colonizan el tracto respiratorio. En el caso de utilizar lavados broncoalveolares, muestras presuntamente estériles, la sensibilidad, la especificidad y los valores



predictivos positivo y negativo son superiores a los de otras muestras, según han demostrado algunos estudios (70-76).

Antes de empezar a trabajar con muestras clínicas, probamos los tres sistemas de extracción descritos en el apartado de material y métodos, tanto en ADN puro, como en las diluciones de las células y en la sangre contaminada. Los mejores resultados fueron obtenidos con el QIAamp® DNA mini kit. Por este motivo, fue el sistema elegido para extraer el ADN de las muestras de suero y sangre total. Estas últimas fueron previamente tratadas con el tampón RCBS. No obtuvimos una cantidad significativa de BAL debido al deteriorado estado clínico de nuestros pacientes.

En nuestro trabajo la cantidad mínima de ADN necesaria para obtener una reacción de amplificación positiva en la PCR en tiempo real, fue de 60 fg utilizando ADN purificado, lo cual se corresponde a un intervalo entre 5-20 conidias por PCR (77-82). La sensibilidad analítica obtenida en la mayoría de los artículos publicados en la literatura, varía en varios órdenes de magnitud, la mayoría de ellos se sitúa en el intervalo comprendido entre 1 fg y 10 pg de ADN. Esta gran variabilidad puede deberse a que en cada caso se ha utilizado una metodología diferente y por tanto es difícil realizar una comparación. Cuando lo que utilizamos son diluciones seriadas de células el límite mínimo de detección se sitúa en 15 conidias por reacción de PCR, y en el último supuesto, cuando el estudio se realizó contaminando sangre con una concentración conocida de conidias de *A. fumigatus*, el resultado del límite mínimo de detección fue de 20 a 500 ufc/ $\mu$ L. Esto podría deberse a que es difícil preparar una suspensión homogénea de conidias de *A. fumigatus* probablemente porque no se separan con facilidad, quedando mayoritariamente formando grupos pequeños. Así, al no ser homogéneas las suspensiones, cuando realizamos las diluciones seriadas y las inoculamos en medios sólidos para recuento, hay mucha diferencia en las distintas placas: 2, 24, 57, 1000...., mientras que si las diluciones fuesen homogéneas,

deberían obtenerse recuentos para diluciones en base 10 de aproximadamente 3, 30, 300, 3000... No obstante, para intentar conseguir una suspensión homogénea se agitaron vigorosamente las diluciones preparadas utilizando bolitas de vidrio estériles y agitación 5 minutos en vórtex. Los resultados obtenidos fueron similares a los anteriores no consiguiendo realizar suspensiones homogéneas. A pesar de la poca homogeneidad de las suspensiones, los resultados globales en los tres tipos de experimentos fueron muy similares.

Es importante tener en cuenta que, la cantidad de ADN que somos capaces de detectar, estimada en base a los valores de Ct obtenidos, es muy baja en los pacientes que presentan un resultado de PCR positivo. Esto genera algunos problemas a la hora de interpretar los resultados obtenidos. El primero de ellos es que la cuantificación de pequeñas cantidades de ADN limita la reproducibilidad del ensayo. La concentración de ADN calculada después de un control positivo no sobrepasan los 60 fg/ $\mu$ L. De acuerdo con la ley de Poisson, no se puede considerar un resultado verdadero positivo por PCR cuando las cantidades de ADN son tan pequeñas. Ya que una muestra puede ser negativa y la siguiente positiva dependiendo de la cantidad de ADN que exista en ese volumen de muestra concreto. En nuestro caso el Ct obtenido para suero fue de 33 ciclos para el suero y 30,6 para la sangre total. Por tanto consideramos una muestra positiva cuando su Ct fuera  $\leq 30,6 \pm 1,3$ .

Los valores de especificidad analítica obtenidos en el ensayo, (100%) ponen de manifiesto que un resultado positivo, podría excluir al resto de patógenos tanto bacterianos como otras especies de hongos distintos a *Aspergillus* spp. ya que en ningún caso ocurrió amplificación de ADN cuando se empleaban bacterias u otras especies de hongos de géneros diferentes (Tabla 16).

La identificación de las distintas especies de *Aspergillus* spp. es fundamental tanto para poder interpretar el significado clínico de un determinado aislamiento, como para conocer cual es el tratamiento antifúngico apropiado, la dosis del mismo, así como la duración del tratamiento. Hasta ahora si recurrimos al cultivo del microorganismo a partir de la muestra clínica era necesario esperar un mínimo de 48 horas para poder aislarlo y posteriormente, si procede determinar sus sensibilidad a los distintos antifúngicos. Por lo tanto, resulta interesante constatar como mediante la tecnología de la PCR a tiempo real, se puede llegar a la identificación de especie. Esto se consigue gracias a que las especies que con mayor frecuencia producen patología en el hombre, poseen una Tm específica que nos permite poder diferenciarlas. Además esto tiene importantes repercusiones clínicas, ya que las especie de *A. flavus* presenta de forma intrínseca resistencia a la Anfotericina B. Sería por tanto de gran utilidad conocer en menos de 6 horas, de qué especie se trata para poder ajustar el tratamiento de forma adecuada y precoz. No obstante las Tm obtenidas para las especies de *A. fumigatus* y *A. flavus* son muy similares, 71,18°C y 71,03°C respectivamente (Tabla 18). Dada la repercusión clínica que esto pudiera tener a la hora de elegir un tratamiento adecuado, parece necesario poder disponer de sondas específicas de especie para diferenciarlas (83).

Algunos autores plantean el utilizar la PCR anidada por ser más sensible en los estadios iniciales de la infección, como técnica de "screening" y posteriormente una vez que sea positiva, utilizar la PCR a tiempo real que ofrece la ventaja de poder cuantificar (76,84-86). Nosotros no utilizamos la PCR anidada al ser esta una técnica más compleja que emplea un mayor tiempo para obtener un resultado y con un mayor riesgo de contaminación (87).

Como se describe en algunas publicaciones, el porcentaje de resultados positivos mediante PCR en muestras de sangre total de pacientes con sospecha de AI

disminuye, si los pacientes están recibiendo algún tratamiento antifúngico (88). Esto puede ser debido a que el tratamiento antifúngico produce un aclaramiento del hongo libre en la sangre hasta niveles no detectables. Esto no ocurre en los tejidos donde existen niveles detectables de conidias. Las condiciones clínicas de nuestros pacientes no nos permitieron obtener muestras más invasivas para poder comparar los resultados. Por eso se recomienda en todos los casos la realización de esta técnica como "screening" antes de que se haya iniciado el tratamiento. El escaso número de resultados positivos por PCR en tiempo real, puede explicarse por el hecho de que la mayoría de los pacientes oncohematológicos y sobretodo, aquellos que entraron en el estudio por ser receptores de un TMO alogénico, estaban recibiendo tratamiento antifúngico cuando se empezó la recogida seriada de las muestras. Esto se debe al mal pronóstico de la enfermedad así como, a que el deteriorado estado clínico e inmunológico de estos pacientes exige ser lo mas agresivo y precoz posible en cuanto a profilaxis (35).

Otra de las herramientas diagnósticas que se plantean para realizar el diagnóstico precoz de la AI, es la detección de antígenos circulantes, en concreto de Ag galactomanano de *Aspergillus* spp. Este antígeno forma parte de la pared celular de *Aspergillus* spp. y es liberado en gran cantidad cuando se produce invasión tisular por parte de este hongo. Por tanto podría tratarse de un marcador indirecto de AI.

Varias han sido las técnicas comercializadas para la detección de galactomanano ofreciendo mejores resultados de sensibilidad y especificidad la técnica comercializada por Bio-Rad. Se trata de una técnica inmunoenzimática en 1 tiempo, de tipo sándwich en microplaca que utiliza un anticuerpo monoclonal de rata EBA-2 dirigido contra el galactomanano de *Aspergillus* spp. Esta técnica tiene un límite de detección establecido entre 0,5-1ng/mL. Para considerarse un resultado positivo deben obtenerse 2 o mas muestra consecutivas positivas con un índice  $\geq 0,5$ . Debido a la

gran controversia que ha existido en relación al punto de corte de esta técnica establecido por la misma casa comercial en 1,5 (DO), 1, y finalmente 0,5, se hace muy difícil la comparación entre los distintos artículos y observamos en la bibliografía cómo los valores de sensibilidad oscilan entre 0 y 100% (89,90,12-16). Esta enorme variabilidad viene determinada por diversos factores entre los que destacan el punto de corte establecido así como el número de determinaciones necesarias para considerar un resultado como positivo (91-95). En nuestro caso se estableció como punto de corte el 0,5, y la necesidad de al menos 2 resultados de  $GM \geq 0,5$  para considerar un resultado como verdadero positivo. Debido a la escasa incidencia de AI probada y probable de nuestra población resultaría impreciso calcular valores de sensibilidad y especificidad para esta técnica. No obstante, de las 948 muestras que se procesaron obtuvimos 196 con un resultado positivo para GM, lo cual representa un porcentaje de positividad del 20%. Cuando analizamos los resultados por hospitales, obtuvimos 181 resultados positivos entre las 717 muestras pertenecientes al H Jerez (25%), 8 de las 146 pertenecientes al Hospital Universitario Virgen del Rocío (5.4%), y 7 de las 85 muestras obtenidas en el H. U. Valme (9.2%) (Figura 7).

Para optimizar la rentabilidad de la detección de GM clasificamos a nuestros pacientes en función del riesgo de padecer una AI según los criterios de Prentice et al. (7) y así establecimos los dos grupos de estudio, por un lado aquellos pacientes pertenecientes a lo que llamamos Grupo 1: Estudio prospectivo: son pacientes en los que no existía aún una sospecha clínica de AI pero eran pacientes hematológicos que serían sometidos a un TMO alogénico y/o los pacientes con un leucemia aguda no linfoblástica. En el segundo grupo se incluyeron a los pacientes que tenían sospecha clínica de AI y además eran enfermos hematológicos con TMO alogénico. y/o pacientes con leucemia aguda no linfoblástica, y/o pacientes neutropénicos. Esta división fue tan solo inicial ya que a lo largo del estudio los pacientes fueron pasando de uno a otro grupo en función de la sospecha clínica. A todos ellos se les extrajeron 2

muestras de suero y sangre total a la semana para la realización de GM y PCR en tiempo real respectivamente. Además y siempre que las condiciones clínicas del paciente lo permitieron se intentaron obtener muestras de esputo, aspirado bronquial y lavado broncoalveolar u otro tipo de muestras menos invasivas. Solo fue posible obtener simultáneamente un cultivo positivo para *Aspergillus fumigatus* junto con un resultado positivo de GM en 4 pacientes, 3 de ellos con AI probable y 1 con AI posible. En ninguno de los 2 casos de AI probada pudo demostrarse simultáneamente la positividad del cultivo.

Obtuvimos 2 casos de AI probada, los dos varones con edad inferior a 18 años. En ambos casos, tanto el GM como la PCR en tiempo real fueron positivas, 3 casos de AI probable, en los que solo fue positivo el GM y 17 casos de AI posible en los que igualmente fue positiva la determinación de GM, y solo en dos pacientes obtuvimos un resultado positivo mediante PCR. (Tabla 22).

En los 2 únicos casos de AI probada, en los que existe un resultado positivo tanto por PCR como por GM, el primero en positivizarse fue la PCR antes que la determinación de GM e incluso antes de que aparecieran datos clínicos o radiológicos que hicieran sospechar la presencia de AI. En la tabla 22 podemos observar como de las 6 muestras obtenidas en el paciente 1, solo una de ellas fue positiva para GM, mientras que las 6 lo fueron por PCR. En el paciente 2 solo obtuvimos 1 muestra que fue positiva tanto por PCR como para GM. No encontramos una explicación para la escasa rentabilidad del GM en el paciente 1 ya que al tratarse de población pediátrica lo que cabría esperar es un mayor número de muestras positivas, debido alto índice de resultados positivos que presenta el GM en la población pediátrica (15,96,97). En los 3 casos de AI probable solo se positivizó el GM y este se adelanto a la aparición de datos clínicos o imágenes en el TAC de alta resolución en todos los casos excepto en uno de ellos, Por ultimo 15 de los pacientes que fueron clasificados como AI posible

presentaron dos o más determinaciones de GM positivas que precedieron al resto de parámetros clínicos. En los dos pacientes restantes obtuvimos 2 muestras con un resultado positivo por PCR en uno de ellos y en el otro una sola muestra positiva. De los 17 pacientes con AI posible, 15 recibieron tratamiento precoz frente a *Aspergillus* spp. En 7 casos pudo monitorizarse la respuesta al tratamiento con el seguimiento de los valores de GM. En la primera semana de tratamiento no se negativizó ningún valor de GM. En la segunda semana la primera determinación semanal se negativizó en dos sueros, y en la segunda determinación un suero. Al finalizar la segunda semana de tratamiento fallecieron dos pacientes sin haber negativizado los valores de GM. La evolución clínica de los pacientes fue paralela a la negativización de los valores de GM (98). (Figura 8).

## 7. CONCLUSIONES



1. La técnica de la PCR en tiempo real utilizando la tecnología del Light Cycler tal y como se describe en este trabajo, proporciona una elevada sensibilidad y especificidad para la detección de ADN fúngico en muestra de sangre total y una rápida identificación de las especies de *Aspergillus* spp. Por lo tanto la mayoría de las especies de *Aspergillus* spp que tienen importancia en patología humana y que afectan a pacientes inmunodeprimidos, son detectadas e identificadas con esta técnica.
2. La detección de GM puede ser de gran valor utilizada como “screening” en los pacientes con alto riesgo de padecer una AI, utilizando un mínimo de dos muestras seriadas desde el inicio de la sospecha clínica, y considerando como positivo un valor de D.O:  $\geq 0,5\text{ng/mL}$ . Así mismo sería útil en la monitorización de la respuesta al tratamiento antifúngico.
3. En los casos de AI probada tanto la PCR como el GM fueron positivos adelantándose la PCR al diagnóstico de AI.
4. En los casos de AI probable solo fue positivo el GM y en todos los casos se anticipó al diagnóstico clínico.
5. Dada la escasa incidencia de AI en nuestra población de estudio resulta bastante impreciso obtener valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.
6. Los beneficios de la utilización de la PCR en tiempo real para el diagnóstico de AI en pacientes sometidos a tratamiento antifúngico son limitados, siendo mucho más rentable la utilización de esta técnica antes del inicio del tratamiento antifúngico.

7. En la actualidad no existe ninguna técnica microbiológica, que de forma independiente sea capaz de diagnosticar la AI. Es necesaria la combinación de diagnóstico convencional, con microscopía y cultivo junto con la determinación de GM y la utilización de la PCR a tiempo real para conseguir una mejor sensibilidad. La baja incidencia de la AI, justificaría el empleo de todas estas técnicas en el diagnóstico de esta enfermedad con independencia del gasto.
8. La PCR en tiempo real actualmente no es una técnica definitiva para monitorizar la respuesta al tratamiento antifúngico en pacientes que padecen una AI. Son necesarios más estudios en este sentido.
9. El gran beneficio de la PCR a tiempo real es que permite llegar a la identificación de especie incluso con cultivos negativos. Esto es de gran utilidad a la hora de iniciar tratamiento antifúngico dada la resistencia intrínseca de determinadas especies a Anfotericina B.
10. La PCR solo fue positiva en aquellos casos de Aspergilosis Invasiva probada.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ruhnke M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. *Curr Drug Targets* 2006; 7: 495-504.
2. Lumbreras C, Gavaldá J. Aspergilosis invasora: manifestaciones clínicas y tratamiento. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 79-89.
3. Dasbach EJ, Davies GM, Teutsch SM. Burden of aspergillosis-related hospitalizations in the United States. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1524-1528.
4. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, et al. Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices and outcomes. *Medicine* 2000; 79: 250-260.
5. Denning, DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26:781-805.
6. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, et al. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1824-1833.
7. Prentice HG, Kibbler CC, Prentice AG. Towards a targeted risk based antifungal strategy in neutropenic patients. *Br J Haematol* 2000; 110: 273-284.
8. Mennink-kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 349-57.
9. Boutboul F, Alberti C, Leblanc T, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 939-943.
10. Sanz MA, Salavert M, Jarque I. Tratamiento de las infecciones fúngicas invasoras en pacientes oncohematológicos. *Enf Infec Microbiol Clin* 2002; 1: 4-12.
11. Gavaldá J, Pahisa A. Visión actual de la infección fúngica en el paciente sometido a un trasplante de órgano sólido. *Enf. Infec Microbiol Clin* 2002; 1: 21-31.

12. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, Eldere JA, 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: 1604-1610.
13. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, et al. Aspergillus galactomannan detection in diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1898-1906.
14. Sulahian A, Boutboul, Ribaud P, et al. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4 year prospective study. *Cancer* 2001; 91: 311-318.
15. Siemann M, Koch-Dorfler M, Gaude M. False positive results in premature infants with the Platelia®Aspergillus sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycoses* 1998; 41: 373-377
16. Hebart, H. Loeffler J, Meisner C, et al. Early Detection of Aspergillus Infection after Allogeneic Stem Cell Transplantation by Polymerase Chain Reaction Screening. *The J Infect Dis* 2000; 181: 1713-1719.
17. Loeffler J, Henke N, Hebart H, et al. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the Light Cycler system. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 586-590.
18. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp hematol* 2002; 30: 513-512.
19. Costa C, Costa JM, Desterke C, et al. Real-time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of Galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2224-2227.
20. Maertens J, Verhaegen J, Demuyneck H, et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich

- enzyme-linked immunosorbent assay for haematological patients at risk for invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3223-3228.
21. Loeffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3311-3312.
22. Pemán J. Diagnóstico de la aspergilosis invasiva. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: S90-S92.
23. Pontón J, García ME, López Medrano R. Diagnóstico basado en métodos independientes del cultivo. En: Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC (Eds.) *Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. Revista Iberoamericana de Micología.* 2001; 14.1-14.21.
24. Latgé JP, *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310-350.
25. Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory – tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Sm J Med* 1996; 100: 171-178.
26. Mc Whinney PH, Kibbler CC, Hammon MD et al. Progress in the diagnosis and management of aspergillosis in bone marrow transplantation: 13 years experience. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 397-404.
27. Yu VL, Muder RR, Poorsattar A. Significance of isolation of *Aspergillus* from the respiratory tract in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: results from a three-year prospective study. *Am J Med* 1986; 81:249-254.
28. Jantunen E, Piilonen A, Volin L, et al. Diagnostic aspects of invasive *Aspergillus* infection in allogenic BMT recipients. *Bone Marrow Transp.* 2000; 25: 867-871.
29. Ascoglu S, de Paw B, Bennett JE, 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.
30. Kontoyiannis DP, Sumoza D, Tarrand J, et al. Significance of aspergillemia in patients with cancer: a 10 year study. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 188-189.

31. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, *et al.* Plasma (1-3)- $\beta$ -D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 1995; 345: 17-20.
32. Pickering JW, Sant HW, Bowles CAP, Roberts WL and Woods GL. Evaluation of a (1-3)- $\beta$ -D-Glucan Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5957-5962.
33. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Moulds: Approved standard M38-A. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.
34. Saiki, RK, Gelfand, DH, Stpfeñ, S, Scharf, S, Higuchi, R, Horn, GT, Mullis, KB, Erlich, HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
35. Einsele H, Hebart H, Roller G, *et al.* Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1353-1360.
36. Alexander BD, Pfaller MA. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. *Clin Infect Dis* 2006; 43: S15-S27.
37. Anaissie EJ. Trial design for mold-active agents: time to break the mold-aspergillosis in neutropenic adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1298-1306.
38. Moreno JM, Alhambra A, Cuétara MS, Ortiz MC, Pontón J, del Palacio A. Incidence of invasive fungal infection in adult haematological malignancy: a prospective validation of a risk stratification scheme. *Br J Haematol* 2006; 134: 343-345.
39. Yeo SF, Wong B. Current status of Nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 465-484.
40. Murray PR, Baron DJ, Pfaller MA, Tenover JC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8<sup>a</sup> ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2003.

41. Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2ª edición. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2006.
42. Hotchi M, Okada M, Nasu T. Present state of fungal infections in autopsy cases in Japan. *Am J Clin Pathol* 1980; 74: 410-416.
43. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneiner M, Just-Nuebling G, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect* 1996; 33: 23-32.
44. Yamazaki T, Kume H, Murase S, Yamashita E, Arisawa M. Epidemiology of visceral mycoses: Análisis of data in annual of the pathological autopsy cases in Japan. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1732-1738.
45. McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 641-647.
46. Clark TA, Hajjeh R. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15: 569-574.
47. Denning, D.W. Aspergillosis in "nonimmunocompromised" critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 580-581.
48. Bodey G, Bueltmann B, Duguid W, Gibas D, Hanak H, Hotchi M, et al. Fungal infections in cancer patient: An international autopsy survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 99-109.
49. Van Buril JH, Leisenring W, Myerson D, Hackman RC, Shulman HM, Sale GE, et al. The effect of prophylactic fluconazole on the clinical spectrum of fungal diseases in bone marrow transplant recipients with special attention to hepatic candidiasis. An autopsy study of 355 patients. *Medicine* 1998; 77: 246-254.
50. Pagano L, Girmenia C, Mele L, Ricci P, Tosti ME, Nosari A, et al. Infections caused by filamentous fungi in patients with hematologic malignancies. A report of 391 cases by GIMENA Infection Program. *Haematologica* 2001; 86: 862-870.



51. Wald A, Leisenring W, Van Buren JA, Borden RA. Epidemiology of Aspergillus infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1997; 175: 1459-1466.
52. De Pauw BE. Increasing fungal infections in the intensive care unit. *Surg Infect* 2006; 7: 93-96.
53. Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, Pastore D, Picardi M, Bonini A, Chierichini A, Fanci R, Caramatti C, Invernizzi R, Mattei D, Mitra ME, Melillo L, Aversa F, Van Lint MT, Faluccci P, Valentini CG, Girmenia C, Nosari A. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 2006; 91: 1068-1075.
54. Bhatti Z, Shaukat A, Almyroudis NG, Segal BH. Review of epidemiology, diagnosis, and treatment of invasive mould infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Mycopathologia* 2006; 162: 1-15.
55. Chamilos G, Luna M, Lewis RE, Bodey GP, Chemaly R, Tarrand JJ, Safdar A, Raad II, Kontoyiannis DP. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). *Haematologica* 2006; 91: 986-989.
56. Siwek GT, Pfaller MA, Polgreen PM, Cobb S, Hoth P, Magalhães-Silverman M, Diekema DJ. Incidence of invasive aspergillosis among allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients receiving voriconazole prophylaxis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 55: 209-212.
57. Vonberg RP, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect* 2006; 63: 246-254.
58. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 444-465.
59. Bodey GP. Fungal infections in immunocompromised patients. III. Emerging pathogens and recent therapeutic advances. *Infect Dis Rev* 2000; 2: 12-16.

60. Pazos C, del Palacio A. Early diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients with bi-weekly serial screening of circulating galactomannan by Platelia Aspergillus. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 99-102.
61. Voseger M, Wanders A, Haaas A et al. A four-year review of fatal aspergillosis. *Eur J Clin Microbiol Dis* 1999; 18: 42-45.
62. Palomares JC, Cuenca-Estrella M, Ferrer C, Colom M. F. Diagnóstico micológico mediante técnicas de biología molecular. 2006. En Diagnóstico micolog Ed J Pemán E Martin. (En prensa).
63. Deventer AJM, Goessens WHF, van Belkum A, van Vliet HJA, van Etten AW M, and Verbrugh HA. Improved detection of *Candida albicans* by PCR in blood of neutropenic mice with systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 625-628.
64. Makimura K, Muyarama SY, Yamaguchi H. Detection of a Wide range of medically important fungi by the polimerase chain reaction. *J Med Microbiol* 1994; 40: 358-364.
65. Melchers WJG, Verweij PE, van den Hurk P, van Belkum A, De Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JAA, and Meis JFGM. General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1710-1717.
66. Niesters HGM, Goessens WHF, Meis JFMG, and Quint WGY. Rapid polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 904-910.
67. Polanco AM, Rodríguez-Tudela J, and Martínez-Suárez JV. Detection of pathogenic fungi in human blood by the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 618-621.
68. Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, Nicolas-Canine M. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 925-930.

69. Chryssanthou E, Andersson B, Petrini B, Lofdahl S, Tollemar J. Detection of *Candida albicans* DNA in serum by polymerase chain reaction. *Scand J Infect Dis* 1994; 26: 479-485.
70. Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3466-3471.
71. Evertsson U, Monstein HJ, Johansson AG. Detection and identification of fungi in blood using broad-range 28S rDNA PCR amplification and species-specific hybridisation. *APMIS* 2000; 108: 385-392.
72. Ferrer C, Colom F, Frases S, Mulet E, Abad JL, Alio JL. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2873-2879.
73. Kirby A, Chapman C, Hassan C, Burnie J. The diagnosis of hepatosplenic candidiasis by DNA analysis of tissue biopsy and serum. *J Clin Pathol* 2004; 57: 764-765.
74. Pryce TM, Kay ID, Palladino S, Heath CH. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47: 487-496.
75. Scotter JM, Stevens JM, Chambers ST, Lynn KL, Patton WN. Diagnosis of *Aspergillus* peritonitis in a renal dialysis patient by PCR and galactomannan detection. *J Clin Pathol* 2004; 57: 662-664.
76. Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Baldus M, Brauning S, Hehlmann R. Clinical evaluation of a polymerase chain reaction assay to detect *Aspergillus* species in bronchoalveolar lavage samples of neutropenic patients. *Br J Haematol* 2002; 116: 803-811.
77. Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, Dhedin N, Rieux C, Cordonnier C. Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive

- polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1407-1412.
78. Hummel M, Baust C, Kretschmar M, Nichterlein T, Schleiermacher D, Spiess B, Skladny H, Morz H, Hehlmann R, Buchheidt D. Detection of *Aspergillus* DNA by nested PCR assay is superior to blood culture in an experimental murine model of invasive aspergillosis. *J Med Microbiol* 2004; 53: 803-806.
79. Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, Kanda Y, Kashima T, Yamazaki Y, Hamaki T, Mori S, Akiyama H, Mutou y, Sakamaki H, Osumi K, Kimura S, Hirai H. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1504-1512.
80. Spiess B, Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Seifarth W, Zeilfelder U, Leib-Mosch C, Morz H, Hehlmann R. Development of a LightCycler PCR assay for detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in clinical samples from neutropenic patients. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1811-1818.
81. Spreadbury C, Holden D, Aufauvre-Brown A, Bainbridge B, Cohen J. Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 615-621.
82. Yamakami Y, Hashimoto A, Yamagata E, Kamberi P, Karashima R, Nagai H, Nasu M. Evaluation of PCR for detection of DNA specific for *Aspergillus* species in sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3619-3623.
83. Walsh TJ, Francesconi A, Kasai M, and Chanock SJ. PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3216-3220.
84. Skladny H, Buchheidt D, Baust C, Krieg-Schneider F, Seifarth W, Leib-Mösch C, and Hehlmann R. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3865-3871.

85. Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Baldus M, Brauning S, Hehlmann R. Clinical evaluation of a polymerase chain reaction assay to detect *Aspergillus* species in bronchoalveolar lavage samples of neutropenic patients. *Br J Haematol* 2002; 116: 803-811.
86. Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Ritter J, Suedhoff T, Baldus M, Seifarth W, Leib-Moesch C, Hehlmann R. 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: 428-435.
87. Kawamura S, Maesaki S, Noda T, Hirakata Y, Tomon K, Tashiro T, and Kohno S. Comparison between PCR and detection of antigen in sera for diagnosis of pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 218-220.
88. Lass-Flörl C, Gunsilius E, Gastl G, Bonatti H, Freund MC, Gschwendtner A, Kropshofer G, Dierich MP, Petzer A. Diagnosing invasive aspergillosis during antifungal therapy by PCR analysis of blood samples. *J Clin Microbiol*. 2004 ; 42: 4154-4157.
89. Verweij PE, Stynen D, Rijs AJ, de Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with *Pastorex* latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1912-1914.
90. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of Invasive Aspergillosis Using a Galactomannan Assay: A Meta-Analysis. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1417-1427.
91. Allan EK, Jordanides NE, McLintock LA, Copland M, Devaney M, Stewart K, Parker AN, Johnson PR, Holyoake TL, Jones BL. Poor performance of galactomannan and mannan sandwich enzyme-linked immunosorbent assays in the diagnosis of invasive fungal infection. *Br J Haematol* 2005; 128: 578-579.
92. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Garban F, Hamidfar R, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus*

- galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2184-2186.
93. Upton A, Gugel A, Leisenring W, Limaye A, Alexander B, Hayden R, Marr KA. Reproducibility of low galactomannan enzyme immunoassay index values tested in multiple laboratories. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4796-4800.
94. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E, Lagrou K, Verhaegen J, Boogaerts M, Eldere JV. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2004; 126: 852-860.
95. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis* 2002; 186: 1297-1306.
96. Rollides E. Early diagnosis of invasive aspergillosis in small children. 2<sup>nd</sup> advances against aspergillosis (AAA). 2006.
97. Rohrlich P, Safarti J, Mariani P, Duval M, Carol A, Saint-Martín C, Bingen E, Latge JP, Vilmer E. Prospective sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for serum galactomannan: early predictive value and clinical use in invasive aspergillosis. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 232-237.
98. Boutboul F et al. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 939-943

**ANEXO**

**ESTUDIO DE LA RENTABILIDAD DIAGNÓSTICA DE LA DETECCIÓN DE GALACTOMANANO DE ASPERGILLUS Y PCR EN TIEMPO REAL EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES FUNGICAS INVASIVAS (IFI) EN HEMATOLOGIA.**

FECHA DE INGRESO ...../...../.....

FECHA DE ALTA ...../...../.....

CÓDIGO .....

**1- CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- <500 Neutrófilos /mm<sup>3</sup>
- Pacientes con trasplante alogénico de Médula Osea
- Tratamiento prolongado con esteroides

**- DATOS DEMOGRÁFICOS**

Número de historia clínica .....

Apellidos, nombre .....

Domicilio..... C.P. ....

Localidad (ciudad).....

Telefono .....

Fecha de nacimiento ...../...../..... Sexo  Hombre  Mujer

**Tipo de paciente**

- Médico
- Quirúrgico
- Traumatológico

Diagnóstico definitivo .....



**3- FACTORES DE RIESGO**

CÓDIGO ..... SEMANA 1

Fecha extracción (martes) ...../...../.....

Ventilación mecánica  Sí  NoSonda urinaria  Sí  NoCatéter venoso central  Sí  NoCatéter arterial  Sí  NoAntibióticos  Sí  NoDepuración extrarrenal  Sí  NoEsteroides  Sí  NoTratamiento antitumoral  Sí  NoNutrición parenteral  Sí  NoTransplante alogénico M.O.  Sí  NoFiebre.  Sí  NoImágenes radiológicas.  Sí  No**4- DATOS ANALÍTICOS**Leucocitos      /lNeutrófilos      /lLinfocitos      /lHemoglobina   .  g/dLPlaquetas       /l**5- DATOS SEROLÓGICOS**Galactomanano      ng/ml

PCR .....

Fecha extracción (viernes) ...../...../.....

Ventilación mecánica  Sí  NoSonda urinaria  Sí  NoCatéter venoso central  Sí  NoCatéter arterial  Sí  NoAntibióticos  Sí  NoDepuración extrarrenal  Sí  NoEsteroides  Sí  NoTratamiento antitumoral  Sí  NoNutrición parenteral  Sí  NoTransplante alogénico M.O.  Sí  NoFiebre  Sí  NoImágenes radiológicas  Sí  NoLeucocitos      /lNeutrófilos      /lLinfocitos      /lHemoglobina   .  g/dLPlaquetas       /lGalactomanano      ng/ml

PCR .....

## **Definiciones de las Infecciones Fúngicas Invasoras en Pacientes con cancer v receptores de transplantes de médula ósea.**

*Ascioglou 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.* A.-Infección Fúngica Invasora

Probada:

### *A.1.-Infección de tejidos profundos:*

Se considerará probada la IFI por hongos filamentosos en las siguientes situaciones:

1. -Cuando se demuestre la presencia de hifas en el examen citopatológico o histopatológico de muestras obtenidas mediante técnica invasiva (punción-aspiración, biopsia) con evidencia de daño tisular asociado documentado mediante examen microscópico o, de forma inequívoca, por técnicas de imagen.

O bien 2.-Cuando se obtenga un resultado positivo en el cultivo de muestras tomadas mediante técnica aséptica de una localización anatómica habitualmente estéril que presente anomalías clínicas o radiológicas compatibles con infección (excluyendo orina y membranas mucosas).

Se considerará probada la IFI por hongos levaduriformes en las siguientes situaciones:

1.-Cuando se demuestre la presencia de células levaduriformes (en caso de infección por *Candida* también pueden presentarse pseudohifas o hifas verdaderas) en el examen citopatológico o histopatológico de muestras obtenidas mediante técnica invasiva (punción-aspiración, biopsia), excluyendo membranas mucosas.

2.-Cuando se obtenga un resultado positivo en el cultivo de muestras tomadas mediante técnica aséptica de una localización anatómica habitualmente estéril que presente anomalías clínicas o radiológicas compatibles con infección (excluyendo orina, senos paranasales y membranas mucosas)

3.-En caso de examen microscópico positivo (tras tinción con tinta china o mucicarmín) o detección de antígeno positivo en caso de especies de *Criptococcus* en muestras de LCR.

#### A.2. -Fungemia:

Se considerará probada la fungemia por hongos filamentosos o levaduriformes si se obtienen hemocultivos positivos con crecimiento de cualquier hongo (excepto especies de *Aspergillus* o *Penicillium no marnefeii*) asociados en el tiempo a signos y síntomas clínicos compatibles con la infección por un microorganismo relevante.

#### B.-Infección Fúngica Invasora Probable:

Se considerará probable la infección fúngica invasora por hongos filamentosos o levaduriformes cuando concurren al menos un criterio de condición del huésped (ver criterios asociados), un criterio microbiológico y un criterio clínico mayor o dos criterios clínicos menores en caso de anomalías en una localización anatómica compatible con infección.

#### C.-Infección Fúngica Invasora Posible:

Se considerará probable la infección fúngica invasora por hongos filamentosos o levaduriformes cuando, en caso de anomalías en una localización anatómica compatible con infección, concurren al menos un criterio de condición del huésped con:

un criterio microbiológico o bien con un criterio clínico mayor o dos menores.

Criterios asociados.

#### A.-Criterios de condición del huésped:

A.1.-Neutropenia mantenida, es decir, menos de 500 neutrófilos/mm<sup>3</sup> durante más de 10 días.

A.2.-Fiebre persistente durante más de 96 horas refractaria a un adecuado tratamiento antimicrobiano de amplio espectro en pacientes de alto riesgo.

A.3.-Temperatura corporal superior a 38°C o inferior a 36°C asociada a alguna de las siguientes condiciones predisponentes:

1. -Neutropenia mantenida durante más de 10 días en el transcurso de los 60 días anteriores.
2. -Uso en los 30 días anteriores o en el momento actual de agentes inmunosupresores.
3. -Episodio de IFI probada o probable en el curso de un periodo anterior de neutropenia.
4. -Coexistencia de SIDA sintomático.

B. -*Criterios microbiológicos:*

B.1.-Resultado positivo para hongos filamentosos (incluyendo especies de *Aspergillus*, *Fusarium* o *Scedosporium* o *Zygomycetes*) o *C. neoformans* en el cultivo de muestras de esputo o lavado broncoalveolar.

B.2.-Resultado positivo para hongos filamentosos en cultivo o evaluación microscópica citológica o directa en muestras de aspirado sinusal.

B.3.-Hallazgos positivos para *Cryptococcus* u hongos filamentosos en la evaluación microscópica directa o citológica de muestras de esputo o lavado broncoalveolar.

B.4.-Resultados positivos en la detección de antígenos de *Aspergillus* en muestras de lavado broncoalveolar, LCR o al menos dos muestras de sangre.

S.5.-Resultado positivo en la detección de antígeno criptocócico en sangre, siempre que se descarte la posibilidad de un falso positivo por reacción cruzada debida a infección por *Trichosporon beigellii* o *Stomatococcus mucilaginosus*, factor reumatoide circulante o enfermedad maligna concomitante.

S.6.-Hallazgos positivos sugerentes de elementos fúngicos en el examen microscópico directo o citológico de muestras de fluidos estériles.

S.7.-Dos urocultivos positivos para levaduras en ausencia de sonda urinaria.

S.8.-Emisión urinaria de *Candida* en ausencia de sonda urinaria.

S.9.-Hemocultivo positivo para especies de *Candida*.

C.-*Criterios clínicos:*

C.1.-Infección del tracto respiratorio inferior:

-Criterios mayores:

Cualquiera de los siguientes infiltrados de nueva aparición en las imágenes de tomografía axial computerizada:

Signo del halo: presencia de una lesión nodular rodeada por una zona ligeramente atenuada en receptores de TPH alogénico o pacientes neutropénicos.

Signo de la media luna: lesión cavitada con presencia de aire en una lesión nodular.

Cavitación dentro de un área de consolidación en ausencia de infección por microorganismos que pueden originar lesiones radiológicas similares (especies de *Mycobacterium*, *Legionella*, *Nocardia* u otros)

-Criterios menores:

Síntomas de infección del tracto respiratorio inferior (tos, dolor torácico, hemoptisis, disnea). Hallazgo en la exploración de roce pleural.

Cualquier nuevo infiltrado no incluido en criterios mayores.

Derrame pleural.

C.2.-Infección rinosinusal:

-Criterio mayor: Evidencia radiológica sugestiva de infección invasora de los senos paranasales (ej.: erosión de las paredes de 105 senos o extensión de la infección a estructuras adyacentes, destrucción extensa de la base del cráneo)

-Criterios menores:

Síntomas del tracto respiratorio superior (ej.: rinorrea, mala ventilación nasal)

Ulceración nasal, escaras en mucosa nasal o epistaxis.

Inflamación periorbital.

Reblandecimiento maxilar.

Lesiones necróticas de color negro o perforación del paladar duro.

C.3.-infección de Sistema Nervioso Central (SNC): .

-Criterio mayor: Evidencia radiológica sugestiva de infección del SNC (ej.: mastoiditis u otro foco parameningeo, empiema extradural, masa dentro de parénquima cerebral o médula espinal).

-Criterios menores: Signos y síntomas de focalidad neurológica, incluyendo convulsiones focales, hemiparesia y parálisis de pares craneales.

Alteraciones mentales.

Signos y síntomas de irritación meníngea.

Alteraciones en la bioquímica y celularidad del LCR tras descartar otros motivos que justifiquen tales cambios (otros patógenos en LCR por cultivo o microscopía; células malignas).

C.4.-Infección fúngica diseminada:

-Lesiones papulares o nodulares que no se justifiquen por otra causa.

-Hallazgos en la exploración intraocular sugerentes de endoftalmitis o coriorretinitis fúngica hematógena.

C.5.-Candidiasis diseminada crónica:

Pequeños abscesos periféricos en forma de diana (lesiones "en ojo de buey") en hígado y, o en bazo evidentes en imágenes de tomografía, resonancia o ecografía, así como elevación de la fosfatasa alcalina sérica. Para etiquetar este cuadro como probable no se requerirán criterios microbiológicos adicionales.

C.S.-Candidemia:

Se requerirán criterios clínicos para etiquetar como probable una candidemia. No hay definición para la categoría de candidemia posible.



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

Reunido el tribunal en el día de la fecha, integrado por los abajo firmantes, para evaluar la tesis doctoral de D.

titulada **MERCEDES RAMIREZ ARCOS**

acordó otorgarle la calificación de **SOBRESALIENTE CON LAUDE**

Sevilla, a 25 de **SEP**, de 2008

Vocal,

Presidente,

Vocal,

Secretario,

Vocal,

Doctorando,