



Diagnóstico precoz de la aspergilosis invasora en enfermos neutropénicos mediante la detección bisemanal de galactomanano en suero con Platelia® *Aspergillus*

Carmen Pazos y Amalia del Palacio

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid

Resumen

El diagnóstico de aspergilosis invasora en enfermos neutropénicos es difícil y tardío, ya que los procedimientos no invasores carecen de sensibilidad y especificidad. Hemos estudiado en 154 pacientes con neutropenia grave y mantenida, el diagnóstico de aspergilosis invasora mediante la detección prospectiva bisemanal de galactomanano en suero. La sensibilidad global de la técnica fue del 73% y la especificidad del 96%. El valor predictivo positivo y negativo fueron 73% y 98% respectivamente y el porcentaje de falsos positivos fue del 2%. En el 30% de los pacientes, la aparición de galactomanano se anticipa en seis días a la sintomatología clínica, y en nueve a las imágenes radiológicas en un 60% de los mismos. En conclusión, la detección prospectiva de galactomanano en suero es una herramienta no invasora y sensible para establecer el diagnóstico precoz de aspergilosis invasora en enfermos hematológicos de alto riesgo.

Palabras clave

Aspergilosis invasora, Galactomanano, Neutropénicos

Early diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients with bi-weekly serial screening of circulating galactomannan by Platelia® *Aspergillus*

Summary

The diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic individuals is difficult and lengthy since non-invasive diagnostic tests lack sensitivity and specificity. The diagnosis of invasive aspergillosis in 154 prolonged neutropenic patients was prospectively bi-weekly validated by screening circulating galactomannan. The global sensitivity was 73% and specificity was 96%. The positive and negative predictive values were 73% and 98% respectively. False positive reactions occurred at a rate of 2%. Antigenemia was detected before clinical suspicion of invasive aspergillosis (median, 6 days before) in 30% of patients and anticipated the onset of radiologic signs 9 days in 60% of patients. Conclusion: the prospective screening of galactomannan is a sensitive and non-invasive tool for early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult hematology patients.

Key words

Invasive aspergillosis, Galactomannan, Neutropenic patients

La aspergilosis invasora es una causa importante de morbilidad y mortalidad en enfermos inmunocomprometidos [1,2]. El diagnóstico se hace frecuentemente de forma tardía e incluso post-mortem, estimándose actualmente que hasta un 30% de casos de aspergilosis invasora no se diagnostica ni trata, siendo un hallazgo necrópsico [3,4]. El diagnóstico temprano es esencial para poder instaurar un tratamiento antifúngico que conduzca al éxito. Así por ejemplo, en un estudio realizado con enfermos hematológicos neutropénicos, la mortalidad atribuida a la aspergilosis fue del 90% cuando la infección fue diagnosticada y tratada más de 10 días después de la aparición del primer signo clínico y/o radiológico, descendiendo al 40% cuando el tratamiento fue instaurado precozmente [5]. En esta última década, diversos estudios hechos en hospitales terciarios europeos, han demostrado que hasta un 4% de la población total hospitalaria (población no seleccionada) tiene aspergilosis invasora [3,4].

Dirección para correspondencia:
Dra. Carmen Pazos c/o Dra. Amalia del Palacio
Servicio de Microbiología
Hospital Universitario Doce de Octubre
Avenida de Córdoba s/n
28041 Madrid, España
Tel.: +34 91 390 82 39
Fax: +34 91 565 27 65
E-mail: pazos.c@terra.es

La incidencia de aspergilosis invasora es del 61% en pacientes hematológicos (leucemia, linfomas, 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 [1,2,6,7]. La presentación clínica de la aspergilosis invasora es inespecífica y variable y requiere ser sospechada en situaciones de riesgo. Por dicho motivo es importante, para poder realizar una profilaxis racional e instaurar una terapia anticipada, definir los grupos de riesgo de acuerdo con los datos publicados por Prentice *et al.* [8].

Las técnicas microbiológicas tradicionales (visión directa y cultivo de esputo) tienen una baja sensibilidad (15-20%) [2,7]. 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 la gravedad de su estado y/o trombopenia. Las técnicas radiológicas complementan el diagnóstico, aunque no siempre se detecten lesiones nodulares en la radiología simple de tórax y tan sólo sea fiable el signo del halo visualizado en la tomografía axial computarizada [2,7].

Por ello parece esperanzador la utilidad diagnóstica de la detección serológica de antígeno circulante de galactomanano, componente de la pared celular de *Aspergillus* spp. que se libera durante la invasión tisular, mediante una técnica inmunoenzimática (Platelia®*Aspergillus*, Bio-Rad, Francia) de tipo ELISA de doble sandwich en microplaca, que detecta de 0,5-1 ng/ml de galactomanano y aporta datos de sensibilidad del 89,7-90,6% y especificidad del 94-97,1% con una eficacia global de 83,3-96,3% [9-12]. Particularmente interesante es el poder utilizarlo como una herramienta no invasiva, que además de útil sea precoz, y se anticipe a la sintomatología clínica, imágenes radiológicas y tratamiento empírico antifúngico [9-11]. Con este estudio prospectivo realizado sobre pacientes hematológicos neutropénicos, pretendimos alcanzar dos objetivos fundamentales: el primero, establecer los datos estadísticos relacionados con la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y eficacia global de la técnica inmunoenzimática a estudiar y, como segundo objetivo, evaluar si la antigenemia positiva para *Aspergillus* precedía a la sintomatología clínica y a los datos radiológicos compatibles con aspergilosis invasora o, dicho de otra forma, si la detección de galactomanano en suero podría utilizarse como una herramienta de diagnóstico precoz de aspergilosis invasora.

Material y métodos

En primer lugar, definimos de forma muy estricta cada episodio de aspergilosis invasora, siguiendo los criterios diagnósticos estandarizados de posibilidad, probabilidad y firmeza que se definen por el consenso alcanzado por un grupo de expertos de la EORTC-IFICG y el Mycoses Study Group del NIAID-MSG (Bethesda), publicados en 2002 por Ascoglu *et al.* [13].

Nuestra población de estudio estaba constituida por 154 pacientes hematológicos ingresados en el Servicio de Hematología de nuestro hospital con hemopatías y/o trasplantes de médula ósea, durante un período de 14 meses (desde abril de 2001 a junio de 2002).

A todos estos enfermos les realizamos cultivos de vigilancia para valorar colonización fúngica, ya que podría servir como marcador indirecto para predecir la existencia de aspergilosis invasora e instaurar terapia antifúngica.

En el momento del ingreso se realizaba a cada paciente una determinación basal de galactomanano en suero, independientemente de la cifra de neutrófilos que tuviera. Cuando las cifras de neutrófilos descendían por debajo de 500/mm³, realizábamos determinaciones de galactomanano en suero bisemanalmente (dos veces por semana). Consideramos un resultado positivo un índice de densidad óptica mayor o igual a 1,5 ng/ml, en dos muestras serológicas consecutivas.

Los pacientes con resultado positivo han sido estratificados en grupos de riesgo de desarrollo de aspergilosis invasora valorando diferentes factores (edad, enfermedad de base y estado de la misma, neutropenia intensa y mantenida en el tiempo, quimioterapia citotóxica administrada, tratamiento corticoideo y/o antibiótico de amplio espectro recibido, episodios de bacteriemia, infección por citomegalovirus, mucositis, portador de catéter, profilaxis antifúngica, colonización fúngica en los cultivos de vigilancia, enfermedad injerto contra huésped, irradiación corporal...).

Dichos resultados positivos han sido correlacionados con la fecha de aparición de la sintomatología clínica y con las imágenes radiológicas, para valorar si la detección de galactomanano en suero puede tener utilidad en la anticipación diagnóstica de aspergilosis invasora.

Resultados

Durante los 14 meses de seguimiento, en los que no ha habido obras en el recinto hospitalario, se han presentado 11 casos de aspergilosis invasora en nuestra población hematológica, lo cual representa una prevalencia baja (2,5%).

Atendiendo a los últimos criterios diagnósticos de aspergilosis invasora [13], definimos cinco episodios de aspergilosis invasora probada, tres episodios de aspergilosis invasora probable y tres episodios de aspergilosis invasora posible.

Estos 11 pacientes, comparten factores de riesgo para poder ser estratificados dentro del grupo de alto riesgo para desarrollar aspergilosis invasora:

- Edad media: 43 años.
- Enfermedad basal: 36% leucemia mieloide aguda (4/11), 18% leucemia linfoblástica aguda (2/11), 18% anemia refractaria con exceso de blastos (2/11), 18% linfoma (2/11) y 9% trasplante de médula ósea (1/11).
- Estado de la enfermedad de base: 58% recaída de hemopatía y 42% ingreso para realizar primer tratamiento citotóxico.
- Los 11 pacientes recibieron quimioterapia citotóxica, resaltando que en 54,5% (6/11) la droga administrada fue arabinósido de citosina y/o fludarabina, que provoca una intensa inmunosupresión.
- Neutropenia intensa (<100 neutrófilos/mm³) y mantenida en el tiempo (más de tres semanas) en todos los pacientes.
- Tratamiento corticoideo (>2 mg/kg, más de dos semanas) en 54,5% de los pacientes (6/11).
- Los 11 pacientes eran portadores de accesos vasculares periféricos.
- Desarrollo de mucositis en 54,5% (6/11) de los pacientes.
- Episodios de bacteriemia documentada microbiológicamente en 36% (4/11) de los mismos, debido a grampositivos en tres pacientes frente a gramnegativos sólo en uno de ellos.

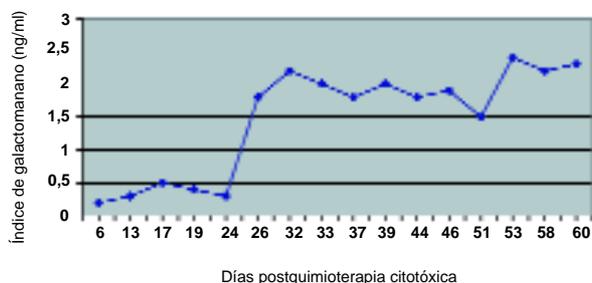


Figura 1. Cinética de antigenemia de galactomanano en paciente neutropénico con leucemia mieloide aguda que presentó mortalidad atribuible a aspergilosis invasora a pesar de profilaxis con anfotericina B (por episodio previo de aspergilosis invasora posible) y de tratamiento posterior con dosis terapéuticas a partir del séptimo día postquimioterapia, tras aparición de fiebre sin foco, y hasta el día del fallecimiento.

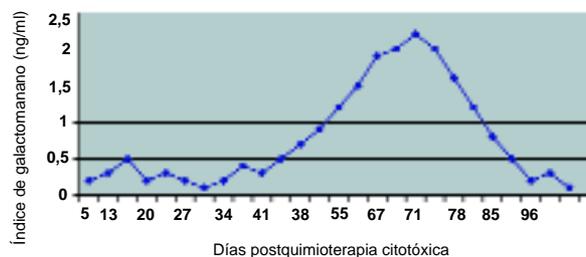


Figura 2. Cinética de antigenemia de galactomanano en paciente neutropénico con leucemia mieloide aguda que presentó aspergilosis invasora con buena evolución clínica y radiológica tras terapia antifúngica con anfotericina B desde el día 69 postquimioterapia, por aparición de nódulo pulmonar cavitado y posterior desarrollo de nódulo subcutáneo.

- Tratamiento antibiótico de amplio espectro recibido en la totalidad de los pacientes.
- Profilaxis antifúngica administrada en 36% de los pacientes (4/11) consistente en fluconazol en dos pacientes, itraconazol en un paciente con episodio previo de traqueobronquitis fúngica por *Aspergillus fumigatus*, y anfotericina B en una paciente que el año previo a este ingreso sufrió un episodio de aspergilosis invasora posible.
- Tratamiento antifúngico empírico en 27% de los pacientes (3/11) con anfotericina B.
- Tratamiento antifúngico dirigido en 73% de los mismos (8/11) con anfotericina B.
- Colonización fúngica en el 64% de los pacientes (7/11): un paciente colonizado por *Aspergillus flavus* (9%), cuatro pacientes por *Candida glabrata* (36%) y dos por *Candida albicans* (18%), en dos o más localizaciones anatómicas diferentes.
- Desarrollo de enfermedad injerto contra huésped tan sólo en un paciente (9%).
- Irradiación corporal total en dos pacientes (18%).

La determinación de galactomanano en suero, mostrando una sensibilidad global del 73% (100% en el grupo de episodios de aspergilosis invasora probada, 67% en aspergilosis invasora probable y 33% en aspergilosis invasora posible), una especificidad del 96%, un valor predictivo positivo del 73% y un valor predictivo negativo del 98%. La eficacia global de la técnica alcanzó el 96%.

Valoramos si los resultados positivos de galactomanano se anticipaban a los datos clínicos y radiológicos compatibles con aspergilosis invasora y observamos que:

- el galactomanano se anticipa a la fiebre un día en un 7% de los pacientes.
- el galactomanano se anticipa a la sintomatología clínica (tos, disnea, hemoptisis...) seis días en un 30%.
- el galactomanano se anticipa a las imágenes radiológicas nueve días en un 60%.
- el galactomanano se anticipa a la instauración de tratamiento antifúngico empírico ocho días en un 37% de los pacientes.

Se nos planteó el interrogante de si podrían utilizarse los niveles de galactomanano para establecer monitorización terapéutica en los pacientes con diagnóstico de aspergilosis invasora, basándonos en los datos de un artículo publicado por Boutboul *et al.* [15]. Para ello, diferenciamos nuestros pacientes con galactomanano positivo en dos grupos, aquéllos en los que la evolución fue mala y

fallecieron de forma atribuible a aspergilosis invasora (28%), y aquéllos en los que se desarrolló una respuesta clínica y radiológica favorable que originó la supervivencia de los mismos (46%). En el primer grupo observamos que, a pesar de la administración del antifúngico a dosis terapéuticas, los índices de densidad óptica del galactomanano en suero fueron aumentando de forma progresiva hasta que el paciente fallecía (Figura 1). En el segundo grupo, por el contrario, las cifras de galactomanano fueron descendiendo progresivamente de forma significativa (>0,5 ng/ml) (Figura 2) a partir del quinto o sexto día de inicio del tratamiento antifúngico (tan sólo uno de los pacientes comenzó el descenso a los ocho días) hasta negativizarse por completo.

Discusión

La sensibilidad global en la detección de galactomanano en suero observada en este estudio es del 73%. La detección de galactomanano fue siempre positiva en los pacientes con diagnóstico de aspergilosis invasora probada, siendo la sensibilidad en este grupo del 100%; pero es de rigor citar, que en los grupos de aspergilosis invasora probable y posible las cifras oscilaron entre el 67% y el 33% respectivamente.

Nos preguntamos por qué razón en estos pacientes (27%) los valores de galactomanano detectados no fueron de utilidad como herramienta diagnóstica de aspergilosis invasora. ¿Quizá fuimos muy estrictos con los criterios de positividad (densidad óptica >1,5 ng/ml en dos muestras consecutivas)? Es conocido que la mayor parte de los trabajos publicados definen el punto de corte de la técnica en 1,0 ng/ml en dos muestras consecutivas [9-10], en 1 ng/ml en una sola muestra positiva [11], e incluso lo descienden hasta 0,7 ng/ml [12]. Si nosotros adoptamos dichos puntos de corte para definir un verdadero positivo, nuestros resultados no mejoran en sensibilidad y descienden de nuestra especificidad un 10-15%. ¿Quizá sean los anticuerpos anti-*Aspergillus* los responsables de los falsos negativos?

Es cierto que hay publicaciones que citan en 36% [12] la proporción de pacientes con aspergilosis invasora que pueden llegar a tener anticuerpos anti-*Aspergillus* que disminuyan la sensibilidad de la técnica inmunoenzimática, impidiendo que el galactomanano se positivice. Esto, sin embargo, es más frecuente en pacientes con un grado de inmunosupresión menor a los nuestros.

Sin embargo, una enseñanza a tener en cuenta es poder utilizar como herramienta diagnóstica de aspergilo-

sis invasora tanto la detección de antígeno de galactomanano como la determinación de anticuerpos anti-*Aspergillus* en el suero de aquellos pacientes con alta sospecha de aspergilosis invasora y en donde el galactomanano permanece falsamente negativo.

La especificidad de la detección de galactomanano en suero fue del 96%. Obtuvimos tan sólo tres pacientes con resultados falsos positivos, que representan un 2% del total de la población, considerablemente más baja que publicaciones recientes que lo cifran de 8-15% [9,14], si bien es cierto que la población estudiada por nosotros no incluía pacientes pediátricos donde se cifran porcentajes más altos. La naturaleza de dichos falsos positivos no pudo ser claramente establecida, ya que son múltiples las causas que pueden interferir en su determinación (hemo-derivados, colonización fúngica intestinal, administración de ciclofosfamida, exoantígenos bacterianos en episodios de bacteriemia, ingestión de alimentos que contienen cereales, administración de tratamiento antifúngico que pudiera haber decapitado la infección, etc.).

Una vez correlacionados los resultados positivos de galactomanano con la anticipación clínica y radiológica de aspergilosis invasora, observamos que si bien sólo se anticipa seis días a la sintomatología clínica en un 30% de los pacientes, a los datos radiológicos lo hace nueve días en el 60% de los mismos. Son datos comparables con publicaciones significativas [9-11] en este campo que demuestran la capacidad de diagnóstico precoz de aspergilosis invasora utilizando esta técnica inmunoenzimática. Asimismo, el galactomanano se positiviza en un 37% de los pacientes ocho días antes de instaurar tratamiento antifúngico empírico, siendo posible por ello administrar terapia anticipada que conlleve una mayor supervivencia del enfermo.

Conclusión

De forma preliminar, y siempre con cautela, pues disponemos de pocos pacientes en los que se haya realizado un seguimiento estrecho, estamos ante un método de diagnóstico útil para la realización de seguimiento terapéutico antifúngico en aspergilosis invasora.

Este estudio prospectivo demuestra que la técnica de detección de galactomanano en suero puede ser considerada como:

- Una herramienta de diagnóstico útil, ya que un resultado positivo confirmado representa un valor diagnóstico de aspergilosis invasora con sensibilidad y valor predictivo positivo del 73% y, sobre todo, un resultado negativo repetido es fuertemente indicativo de no existencia de aspergilosis invasora aportando especificidad del 96% y valor predictivo negativo del 98%.
- Una herramienta de diagnóstico precoz, precediendo en seis días a la sintomatología clínica en el 30% de los pacientes, nueve días a las imágenes radiológicas en el 60%, y ocho días a la terapia empírica antifúngica en el 37%).

Para que estas premisas de herramienta de diagnóstico eficaz y precoz se cumplan, deben estar definidas las condiciones para el uso de esta técnica ya que, en primer lugar, los pacientes han de estar estratificados dentro del grupo de alto riesgo para desarrollo de aspergilosis invasora (no hay suficiente experiencia en otro tipo de poblaciones no hematológicas, como SIDA, neoplasia y/o trasplante de órganos sólidos, enfermedad granulomatosa crónica...) y en segundo lugar, las determinaciones de galactomanano en suero, debido a que no se conoce bien su perfil cinético, deben ser realizadas, como mínimo, de forma bisemanal para poder diagnosticar aspergilosis invasora de forma precoz y para poder realizar posteriormente seguimiento de dichos pacientes mediante monitorización terapéutica de los antifúngicos administrados, que incida de forma favorable en la evolución de nuestro paciente.

Bibliografía

1. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, *et al.* Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices and outcomes. *Medicine* 2000; 79: 250-260.
2. Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 781-803.
3. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, *et al.* Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect* 1996; 33: 23-32.
4. Vogesen M, Wanders A, Haas A, Ruckdeschel G. A four-year review of fatal aspergillosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 42-45.
5. Von Eiff M, Zuhlsdorf M, Roos N, *et al.* Pulmonary fungal infections in patients with hematological malignancies-diagnostic approaches. *Ann Hematol* 1995; 70: 135-141.
6. Denning DW. Invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cur Opin Infect Dis* 1994; 7: 456-462.
7. Denning DW. Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet* 2000; 355: 423-424.
8. Prentice HG, Kibbler CC, Prentice AG. Towards a targeted, risk-based, antifungal strategy in neutropenic patients. *Br J Haematol* 2000; 110: 273-284.
9. 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 hematological patients at risk for invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3223-3228.
10. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, *et al.* 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.
11. Sulahian A, Boutboul F, 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.
12. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, *et al.* *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patient. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1898-1906.
13. Asciglu S, Rex JH, de Pauw B, *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.
14. Swanink CM, Meis JF, Rijs AJ, *et al.* Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus* galactomannan. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 257-260.
15. 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.