

# Diagnóstico de la aspergilosis invasiva

Javier Pemán

Unidad de Micología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia

## Resumen

El diagnóstico de la aspergilosis invasiva debe basarse, como el de cualquier enfermedad infecciosa grave, en la sospecha clínica inicial y en la posterior confirmación microbiológica mediante observación directa de la muestra clínica, su cultivo y mediante la detección de galactomanano en suero.

## Palabras clave

Aspergilosis nosocomial, Diagnóstico

## Diagnosis of nosocomial aspergillosis

## Summary

The diagnosis of invasive aspergillosis is initially based, as in other severe infectious diseases, on clinical grounds. This diagnosis must be confirmed by microbiological methods such as the direct observation of the clinical specimen, its culture and the detection of galactomannan in serum.

## Key words

Nosocomial aspergillosis, Diagnosis

El género *Aspergillus* está constituido por más de 150 especies diferentes, de ellas sólo una veintena son capaces de afectar al hombre, habitualmente por la inhalación de sus esporas. *A. fumigatus* es la especie que con mayor frecuencia se aísla en el entorno humano (suelo, agua o vegetación) y constituye el agente causal de la mayoría de las aspergilosis invasoras, seguido por *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. nidulans*, entre otros.

El diagnóstico de la aspergilosis invasora (AI) debe basarse, como el de cualquier enfermedad infecciosa grave, en la sospecha clínica inicial y en la posterior confirmación microbiológica. Por otra parte, al ser la AI una enfermedad de sintomatología variable y poco específica, la sospecha clínica debe ser siempre confirmada por técnicas de imagen lo suficientemente sensibles (TAC, RMN).

El tipo adecuado de muestra para el diagnóstico microbiológico dependerá de la accesibilidad de la lesión, siendo siempre preferibles las muestras obtenidas por aspiración o biopsia a las secreciones respiratorias. Además del cultivo micológico, debe realizarse siempre un examen microscópico directo de la muestra que facilitará la instauración precoz del tratamiento en el caso de

ser positivo. El cultivo de la muestra requiere habitualmente 4-5 días para detectar el crecimiento y es irremplazable en el diagnóstico ya que permite, por un lado, la identificación de la especie causal y, por otro, el estudio de su sensibilidad a los antifúngicos. En los cultivos positivos de muestras obtenidas por procedimientos no estériles, siempre debe plantearse el significado del aislamiento ya que la colonización del tracto respiratorio de los pacientes por especies del género *Aspergillus* no es infrecuente debido a su distribución universal. Para paliar las deficiencias en sensibilidad e interpretación del cultivo clásico, se han desarrollado técnicas para la detección de ciertos componentes fúngicos (galactomanano,  $\beta$ -1-3-glucano, ADN) que abren nuevas expectativas en el diagnóstico de la AI, perfilándose como útiles herramientas en un futuro inmediato.

Los pacientes con mayor riesgo de desarrollar una AI se pueden distribuir en los siguientes grupos: 1) Receptores alógenicos de médula ósea con neutropenia prolongada o en tratamiento corticoideo; 2) Receptores de órgano sólido o médula ósea autóloga con neutropenia superior a dos semanas; 3) Pacientes con leucemia aguda o linfoma en tratamiento con quimioterapia; 4) Pacientes con anemia aplásica o neutropenia no inducida farmacológicamente; 5) Pacientes con aspergilosis previa sometidos a quimioterapia o TMO; 6) Pacientes con enfermedad granulosa crónica o con sida avanzado [1]. Esta variedad de factores de riesgo hace necesario el desarrollo de métodos alternativos al cultivo que faciliten un rápido diagnóstico y tratamiento precoz de la AI. En lugar de la clásica estrategia diagnóstica (paciente de riesgo con fiebre refractaria a tratamiento antibacteriano e infiltrados pulmonares) actualmente se recomienda la combinación de varias técnicas que, utilizadas conjuntamente, aumentan las probabilidades diagnósticas y disminuyen el número de pacientes que reciben tratamiento empírico (detección de antígeno, TAC de senos o pulmones, rastreo isotópico con IgG radiomarcada, etc.) [2].

### Dirección para correspondencia:

Dr. Javier Pemán  
Unidad de Micología,  
Servicio de Microbiología,  
Hospital Universitario La Fe,  
Valencia, España  
Tel.: +34 96 386 2744  
E-mail: peman\_jav@gva.es

## Aislamiento e identificación

El valor del cultivo de las muestras respiratorias en la AI ha sido cuestionado, debido a las posibles contaminaciones del mismo por las esporas de *Aspergillus* circulantes en el aire. Por tanto, para que el aislamiento tenga significación clínica en un sujeto inmunocompetente, el examen microscópico directo de la muestra también debe ser positivo y, además, el aislamiento debe repetirse en otras, o similares, muestras clínicas del paciente. Sin embargo, la presencia de *A. fumigatus* en pacientes con riesgo de padecer una AI, generalmente inmunocomprometidos, debe ser siempre considerada como altamente sugestiva de infección. En pacientes hematológicos, el cultivo y/o la microscopía es positivo en el 50-100% de los lavados broncoalveolares (LBA) de pacientes con aspergilosis probable o demostrada. Por desgracia, la rentabilidad diagnóstica del esputo es muy variable según los estudios y no tan elevada [3]. Las muestras de elección para el diagnóstico de AI son la biopsia, los aspirados de lugares estériles y el LBA. Sin embargo, debido a la idiosincrasia de estos enfermos (neutropenia, trombopenia, etc.) en la mayoría de las ocasiones estas maniobras están contraindicadas, debiendo procesarse muestras menos profundas como esputos o broncoaspirados.

El examen microscópico directo de toda muestra clínica es una parte esencial en el procesamiento de las mismas en un laboratorio de Micología. Este examen puede realizarse en fresco utilizando una solución de KOH o de blanco de calcoflúor (mediante este último procedimiento la presencia de estructuras fúngicas se detecta fácilmente con la ayuda de un microscopio de fluorescencia) [4]. La observación microscópica de las muestras clínicas puede realizarse también mediante técnicas tintoriales específicas como el PAS o la plata metenamina, pero la relativa complejidad de las mismas, frente a la rapidez y sensibilidad del examen en fresco (sobre todo del blanco de calcoflúor), hace que se utilicen en la actualidad como técnicas de confirmación diagnóstica e histología.

Toda muestra procesada para el diagnóstico de AI debe ser inoculada en agar de Sabouraud-cloranfenicol e incubada, a 25° y 35°, durante 4 semanas antes de ser descartada como negativa. Es aconsejable la utilización de tubos en lugar de placas de cultivo, porque de esta manera la deshidratación de los mismos después de varias semanas de cultivo es menor. Una vez detectado el crecimiento, debe procederse a la identificación de la especie causal en función de sus características morfológicas macro y microscópicas. La identificación de la especie es importante no sólo por su trascendencia epidemiológica sino también por la diferente sensibilidad de algunas de las especies de *Aspergillus* a los antifúngicos sistémicos, lo que facilita la elección del tratamiento adecuado según sea la especie aislada [5].

## Detección de antígeno

El diagnóstico serológico de la AI se basa en la detección de antígenos circulantes de *Aspergillus* en diferentes muestras clínicas (suero, orina, LBA, etc.). Aunque la presencia de antígenos en el suero de pacientes con AI fue ya detectada en 1979, son muy pocos los antígenos identificados, hasta la fecha, en los diferentes líquidos orgánicos, tan sólo el galactomanano, el b 1-3 glucano y los diferentes antígenos de 29, 18 y 11 kDa, respectivamente.

De los más de 100 componentes antigénicos de *A. fumigatus* que pueden unirse a las inmunoglobulinas

humanas, el galactomanano (GM), componente de la pared celular fúngica, es el único polisacárido caracterizado hasta la fecha y el primer antígeno detectado en pacientes con AI [6]. Aunque no posea capacidad inmunogénica, el b 1-3 glucano es otro componente de la pared celular de *Aspergillus* que puede ser utilizado para el diagnóstico de la AI. Su detección, mediante colorimetría, se basa en la activación del sistema proteolítico de la coagulación del cangrejo de herradura [7]. Es una técnica muy sensible que permite detectar mínimas cantidades (picogramos) de  $\beta$ -1-3 glucano, pero que no se encuentra comercializada para su uso habitual [8].

Para la detección de GM se han desarrollado dos técnicas que, aunque utilizan los mismos anticuerpos monoclonales, presentan diferente sensibilidad. La aglutinación con partículas de látex (Pastorex *Aspergillus*, Sanofi Diagnostics Pasteur) es más sencilla de realizar pero su nivel de detección es demasiado insensible (15 ng/ml) mientras que el ELISA de doble sándwich (Platelia *Aspergillus*, Sanofi Diagnostics Pasteur), recientemente comercializado como, es capaz de detectar hasta 1 ng/ml de GM en suero. En la actualidad el ELISA de doble sándwich es la técnica más sensible que existe para la detección de GM. Los estudios publicados hasta el momento han demostrado que, además de contribuir al diagnóstico precoz de la AI, presenta una reproducibilidad intra e interlaboratorio muy aceptable, siempre y cuando como resultado positivo se entienda la existencia de dos muestras consecutivas positivas [9-12]. Mediante esta técnica, el GM se detecta en menor concentración en orina que en suero. Aunque los niveles detectados en LBA son aceptables, en la mayoría de los enfermos con AI este procedimiento diagnóstico está contraindicado, por lo que el suero es la muestra más apropiada para la detección de GM en estos pacientes. Por lo tanto, las muestras de orina y LBA deben utilizarse sólo como confirmatorias de un resultado positivo en suero.

La detección de GM mediante ELISA es positiva en las primeras fases de la infección, pudiéndose detectar 2-3 semanas antes que la aglutinación de látex y casi siempre antes de la aparición de signos o síntomas de infección fúngica, lo que la convierte en una útil herramienta para la instauración de un terapia precoz [13]. Otra de las ventajas de esta técnica radica en la posibilidad de monitorización de los niveles de GM durante el tratamiento, asociándose un descenso de los mismos a la eficacia del tratamiento [10,14].

La quitina y una superóxido dismutasa han sido también utilizados como marcadores de AI experimentalmente [15, 16]. La detección de quitina es un método sensible que permite cuantificar el grado de infección fúngica de un órgano y por tanto podría ser de utilidad en la monitorización del tratamiento antifúngico.

## Detección de ADN específico

Además de los métodos de detección de componentes estructurales de *Aspergillus* (polisacáridos o proteínas), también se han desarrollado técnicas, todavía no comercializadas, para la detección de su ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los primeros estudios aplicando técnicas de PCR para el diagnóstico de la AI se realizaron en muestras de LBA y, en ellos, los casos de AI confirmada se asociaron siempre a resultados de PCR positivos [17,18,19]. Sin embargo, debido a la ubicuidad de las esporas en suspensión de *Aspergillus* y a la elevada sensibilidad de la técnica (capaz de detectar hasta 10 fg de ADN), la posibilidad de un falso positivo siempre debe valorarse cuando se utiliza este tipo de téc-

nicas en muestras respiratorias, ya que pueden deberse a la presencia transitoria de estas esporas en el tracto respiratorio del paciente. De hecho, el 25% de sujetos sanos presentan una PCR positiva para *Aspergillus* [17]. Todo ello, unido a la escasa correlación que presentan los resultados de PCR con los de ELISA en muestras de LBA [20] y a la dificultad de obtener un LBA en la mayoría de los pacientes con riesgo de AI, ha obligado a la aplicación de la PCR en otro tipo de muestras, como plasma o suero. Hasta la fecha, los resultados obtenidos con estas muestras son prometedores, si bien el suero parece ser la muestra de elección para el diagnóstico de la AI mediante PCR [21, 22]. Actualmente, las investigaciones continúan para determinar el mejor método de extracción de DNA a partir del suero así como para establecer el grado de correlación entre los resultados de PCR y la detección de GM mediante ELISA.

A pesar de todos los progresos diagnósticos realizados en la última década, el diagnóstico precoz y específico de la AI sigue siendo un reto para clínicos, radiólogos y microbiólogos. Este diagnóstico evitaría los tratamientos empíricos y, en muchas ocasiones, tardíos de los pacientes con riesgo de desarrollar AI. En lo que a las técnicas microbiológicas se refiere, el futuro pasa por la estandarización de las pruebas moleculares y su uso combinado con las inmunológicas, así como en la correcta identificación de todas las especies de *Aspergillus* aisladas en las muestras clínicas de los pacientes

## Bibliografía

1. Latgé J-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 12:310-350.
2. Severens JL, Donnelly JP, Meis JF, et al. Two strategies for managing invasive aspergillosis: a decision analysis. Clin Infect Dis 1997; 25: 1148-1154.
3. Yu B, Muder RR, Poorsattar A. Significance of isolation of *Aspergillus* from respiratory tract in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Results from three-year prospective study. Am J Med 1986; 81:249-254.
4. Harrington BJ, Hageage GJ. Calcofluor white: tips for improving its use. Clin Microbiol Newsletter 1991; 13:3-5.
5. Larone DH. Medically important fungi, a guide to identification, 2nd edition, New York, Elsevier Science Publishing Co. 1987.
6. Dupont B, Huber M, Kim SJ, Bennett JE. Galactomannan antigenemia and antigenuria in aspergillosis: studies in patients and experimentally infected rabbits. J Infect Dis 1990; 155:1-11.
7. Obayashi T, Yoshida M, Tamura H, et al. Determination of plasma (1-3)- $\beta$ -D-glucan: a new diagnosis aid to deep mycosis. J Med Vet Mycol 1992; 30:275-280.
8. Yuasa K, Goto H, M Iguchi, et al. Evaluation of the diagnostic value of the measurement of (1-3)- $\beta$ -D-glucan in patients with pulmonary aspergillosis. Respiration 1996; 63:78-83.
9. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latgé JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 1995; 33:497-500.
10. Röhrlich P, Sarfati J, Mariani P, et al. Prospective sandwich ELISA galactomannan assay: early predictive value and clinical use in invasive aspergillosis. Pediatr Infect Dis J 1996; 15:321-327.
11. Verweij PE, Erjavec Z, Sluiter W, et al. Detection of antigen in sera of patients with invasive aspergillosis: intra- and inter-laboratory reproducibility. J Clin Microbiol 1998; 36:1612-1616.
12. Tabone MD, Vu-Thien H, Latgé JP, et al. Value of galactomannan detection by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis and follow-up of invasive aspergillosis. Opport Pathog 1997; 9:7-13.
13. Bretagne S, Marmorat-Khuong A, Kuentz M, et al. Serum *Aspergillus* galactomannan antigen testing by sandwich ELISA: practical use in neutropenic patients. J Infect 1997; 35:7-15.
14. Patterson TF, Minitier P, Ryan JL, Andriole V. Effect of immunosuppression and amphotericin B on *Aspergillus* antigenemia in a experimental model. J Infect Dis 1988; 158:415-422.
15. Jauregui A, Martínez ML, Arnaiz I, Pontón J, Cisterna R. Estudio de la infección diseminada por *Aspergillus fumigatus* mediante la detección de quitina. Rev Iberoam Micol 1994; 11:21-24.
16. Patterson TF, Minitier P, Patterson JE, et al. *Aspergillus* antigen detection in the diagnosis of invasive aspergillosis. J Infect Dis 1995; 171:1553-1558.
17. Bart-Delabesse E, Marmorat-Khuong A, Costa JM, et al. Detection of *Aspergillus* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of AIDS patients by polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15:24-25.
18. Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, et al. Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. J Clin Microbiol 1995; 33:1164-1168.
19. Melchers WJG, Verweij PE, Van der Hurk P, et al. General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. J Clin Microbiol 1994; 32: 1710-1717.
20. Verweij PE, Latgé JP, Rijs AJMM, et al. Comparison of antigen detection and PCR assay in BAL fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients. J Clin Microbiol 1995; 33:3150-3153.
21. Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, et al. Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 1998; 26:1407-1412.
22. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, et al. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. J Clin Microbiol 1998; 36:1169-1175.