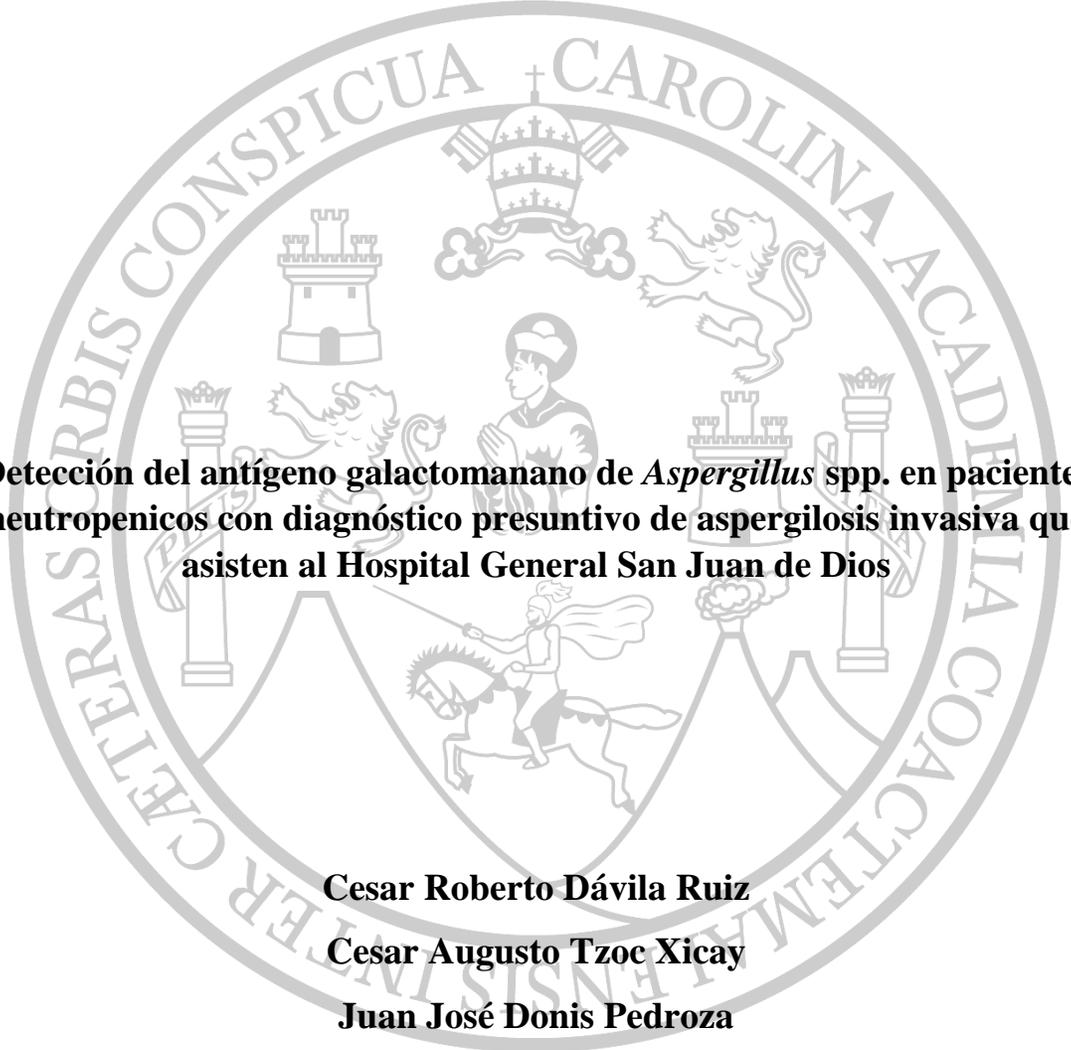


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem in the background. It features a central figure of a man in a cap and robe, possibly a saint or scholar, surrounded by various heraldic symbols including a castle, a lion, and a crown. The Latin motto "SIBI CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEM" is inscribed around the perimeter of the seal.

Detección del antígeno galactomanano de *Aspergillus* spp. en pacientes neutropenicos con diagnóstico presuntivo de aspergilosis invasiva que asisten al Hospital General San Juan de Dios

Cesar Roberto Dávila Ruiz
Cesar Augusto Tzoc Xicay
Juan José Donis Pedroza

QUÍMICOS BIÓLOGOS

Guatemala, marzo de 2017

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Detección del antígeno galactomanano de *Aspergillus* spp. en pacientes neutropenicos con diagnóstico presuntivo de aspergilosis invasiva que asisten al Hospital General San Juan de Dios

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

Cesar Roberto Dávila Ruiz

Cesar Augusto Tzoc Xicay

Juan José Donis Pedroza

PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICOS BIÓLOGOS

Guatemala, marzo de 2017

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

Decano

Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.

Secretaria

MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo

Vocal I

Dr. Juan Francisco Pérez Sabino

Vocal II

Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera

Vocal III

Br. Andreina Delia Irene López Hernández

Vocal IV

Br. Carol Andrea Betancourt Herrera

Vocal V

DEDICATORIA

A DIOS

Por guiarnos en cada paso, ser la fuente de fortaleza en nuestras vidas y permitirnos cumplir esta meta.

A LA USAC

Por ser la entidad educadora y brindarnos la oportunidad de formarnos como profesionales.

A NUESTROS PADRES

César Dávila, Mirtha Ruiz, Tomas Tzoc, Josefa Xicay, Rudy Orlando Donis, Evangelina Pedroza de Donis. Por su sacrificio, lucha y esfuerzo en cada paso que hemos dado.

A NUESTRAS FAMILIAS

Por apoyarnos a lo largo de nuestras carreras.

A NUESTROS COMPAÑEROS

Por los buenos momentos juntos, por acompañarnos durante nuestros años de estudios. Gracias por brindarnos su amistad, cariño y apoyo.

INDICE

I.	Resumen	2
II.	Ámbito de la Investigación	4
III.	Antecedentes	5
A.	Género <i>Aspergillus</i> y su interacción con el humano	5
1.	Generalidades	5
2.	Morfología e identificación	5
3.	Ciclo de vida infeccioso	6
4.	Factores de riesgo y patogenia	7
5.	Respuesta Inmune	9
6.	Diseminación	14
B.	Aspergilosis	15
1.	Generalidades	15
2.	Clasificación	16
3.	Epidemiología de la Aspergilosis Invasiva (AI)	21
4.	Diagnóstico de la Aspergilosis Invasiva	22
C.	Antígeno Galactomanano	26
1.	Determinación del antígeno galactomanano	27
2.	Criterios EORTC/MSG y en monitoreo del paciente	28
3.	Ventajas y desventajas	28
D.	Tratamiento para aspergilosis	29
IV.	Justificación	30
V.	Objetivos	32
VI.	Hipótesis	33
VII.	Materiales y Métodos	34
VIII.	Resultados	41
IX.	Discusión de resultados	43
X.	Conclusiones	47
XI.	Recomendaciones	48
XII.	Referencias	49

I. RESUMEN

Las infecciones provocadas por los hongos del género *Aspergillus* spp. se conocen como aspergilosis. Existen varios tipos de aspergilosis, siendo la aspergilosis invasiva (AI) la de peor pronóstico en los pacientes. El riesgo de desarrollar AI es mayor en pacientes con inmunodeficiencia primaria, neutropenia y tratamiento con corticosteroides, principalmente en pacientes inmunocomprometidos con leucemias, linfomas o trasplantes de órganos sólidos.

Se estima que por lo menos un 4% de la población hospitalaria desarrolla AI durante su estancia, con una mortalidad muy elevada que puede llegar hasta el 90%, dependiendo del centro y grupo de pacientes evaluado y las medidas profilácticas en dicho centro. Hasta un 31% del diagnóstico definitivo de AI se lleva a cabo post-mortem. El antígeno galactomanano es un heteropolisacárido que se encuentra presente en *Aspergillus* spp., el cual aumenta su concentración plasmática desde la fase inicial de AI. En la actualidad existe un examen diagnóstico temprano aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés), llamado comercialmente Platelia *Aspergillus*, que mide los niveles de antígeno galactomanano en el suero de pacientes, que en conjunto con otros criterios diagnósticos establecidos por el Grupo Cooperativo de Infecciones Fúngicas Invasivas de la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento de Cáncer y el Grupo de Estudios Micóticos del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (EORTC/MSG, por sus siglas en inglés) es de mucha utilidad para el diagnóstico temprano de AI, ayudando de esta forma a establecer un tratamiento temprano y de forma eficaz.

El objetivo de este estudio fue establecer la utilidad del uso del antígeno galactomanano como un auxiliar en el diagnóstico de AI, por medio de la inclusión de pacientes con sospecha de AI que asistieron al Hospital General San Juan de Dios (HGSJD). Se analizaron sueros seriados en un periodo de entre 2 y 4 semanas, con los que se determinó la presencia o ausencia del antígeno de galactomanano, además se describe las características clínicas y sociodemográficas de dichos pacientes y la frecuencia del antígeno de Galactomanano.

De los 48 pacientes incluidos en el estudio 20 (41.67%) presentaron antigenemia para galactomanano; la mayoría de estos pacientes padecían una enfermedad hematológica de base 13 (27.08%), siendo la leucemia mielocítica aguda la más frecuente 10 (20.83%).

Se encontró una alta frecuencia de antígeno galactomanano en este estudio, siendo los pacientes neutropénicos con enfermedades hematológicas que asisten al HGSJD los más propensos a mostrar antigenemia de galactomanano y por lo tanto, con más riesgo de desarrollar AI. En cuanto a la descripción de las características clínicas y sociodemográficas, ninguna de ellas es relevante para el diagnóstico presuntivo de AI. No se pudo determinar la categoría de enfermedad fúngica invasiva a la que pertenecen los pacientes según los criterios EORTC/MSG debido a falta de información clínica adicional para el efecto. Así mismo se indica que los resultados obtenidos en este estudio reforzaron los conocimientos sobre el uso del antígeno galactomanano para el diagnóstico de AI a nivel local y servirán de base para estudios más profundos relacionados con el tema.

II. Ámbito de la Investigación

xiste una elevada probabilidad que la AI presente una alta morbilidad y mortalidad en pacientes neutropénicos que asisten al HGSJD; por lo que es importante de realizar investigaciones que beneficien a los pacientes con el objetivo de establecer criterios diagnósticos específicos que permitan evitar tratamientos farmacológicos agresivos innecesarios y proporcionan un diagnóstico temprano que disminuya la elevada mortalidad que actualmente se observa en estos casos.

El estudio se realizó en pacientes neutropénicos con diagnóstico presuntivo de AI del HGSJD que cumplieran con los criterios de inclusión según EORTC/MSG. Las muestras fueron analizadas en el área de Tuberculosis y Hongos del laboratorio clínico del HGSJD, con la asesoría del departamento de Microbiología de la Escuela de Química Biológica de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

III. Antecedentes

A. Género *Aspergillus* y su interacción con el humano

1. Generalidades

Las especies de *Aspergillus* están entre los hongos más comunes encontrados en el ambiente y son los agentes etiológicos de una gran variedad de enfermedades en humanos. La respuesta del hospedero durante su encuentro con *Aspergillus* spp. es la clave determinante para eliminar al microorganismo sin desarrollar enfermedad o la colonización del mismo, exceptuando las enfermedades causadas por las micotoxinas generadas por este microorganismo (Park & Mehrad, 2009).

Aspergillus es un género anamorfo que comprende entre 260 a 837 especies. Estas especies están clasificadas en aproximadamente diez diferentes géneros teleomórficos. Los géneros de *Aspergillus* no son muy selectivos respecto a condiciones de crecimiento favorables ya que pueden crecer en temperaturas que van desde los 6°C hasta los 55°C y en condiciones de relativa poca humedad (Krijgsheld, y otros, 2013).

2. Morfología e identificación

Algunas especies del género *Aspergillus* pueden producir conidios negruzcos, aunque la mayoría de especies tienen estructuras no melanizadas. Una característica relacionada a la formación de colonias de las especies de *Aspergillus*, que es muy útil para su identificación fenotípica, es que rápidamente desarrollan diversos colores (Pasqualotto, 2010).

Dependiendo del sustrato utilizado, el diámetro de las colonias puede ser pequeño (escala de milímetros) como las microcolonias que se forman en un grano de trigo, o

grande (escala de centímetros) como las macro-colonias formadas dentro de los lóbulos de un pulmón (Krijgsheld, y otros, 2013).

Las hifas del micelio vegetativo generalmente son hialinas y septadas. *Aspergillus* produce dos tipos de estructuras: la conidia formada por mitosis y las ascosporas que son producidas por meiosis. Los conidióforos son estructuras especializadas de este género donde se lleva a cabo la reproducción asexual; estos nacen del micelio vegetativo como hifas de pared delgada, erectas, aseptadas y especializadas que se expanden apicalmente para formar una vesícula. Numerosas células conidiógenas conocidas como fiálides, emergen de esta vesícula dentro de las cuales se producen conidias (Abarca, 2000).

Las conidias pueden ser de diferentes colores que son reproducidos por las colonias, son fuertemente hidrofóbicas, generalmente hialinas y son formadas en cadenas interconectadas. Las fiálides pueden consistir en un solo elemento o estar formadas por ramas cortas conocidas como métulas; cuando la métula se forma, las células conidiógenas son llamadas biseriado (Pasqualotto, 2010).

3. Ciclo de vida infeccioso

Todas las especies de *Aspergillus* son encontradas con frecuencia en muestras de suelo y colonizando semillas, especialmente granos, cultivos de raíces, especias, abono y una gran variedad de plantas alimenticias (Pasqualotto, 2010).

Aspergillus asegura su ubicuidad por la facilidad de dispersión de sus conidios en el aire, tanto en ambientes interiores como exteriores, siendo este el proceso con el cual inician su ciclo de vida infeccioso (Besteiro, 2007).

La inhalación de los conidios en el aire es la principal vía de infección humana, teniendo como consecuencia la deposición de estos en los bronquiolos o alveolos. En personas sanas hay varios procesos que se activan previo al alojamiento de los conidios; por ejemplo, el aclaramiento mucociliar, contacto con los macrófagos alveolares y una respuesta proinflamatoria que recluta neutrófilos en el sitio de infección. Si los conidios logran evitar la acción de los macrófagos pueden llegar a germinar, en cuyo caso pueden ser blanco de los neutrófilos y ser eliminados por los mismos (Taylor & Keller, 2009).

4. Factores de riesgo y patogenicidad

Algunos de los principales predisponentes para desarrollar la AI son: inmunodeficiencia primaria, neutropenia y el uso de corticosteroides; por ello, el uso de estos inmunosupresores provocan la manifestación de diversas consecuencias patológicas. La acción citotóxica de medicamentos como la ciclofosfamida, utilizada ampliamente en paciente de trasplante o con enfermedades hematológicas, produce generalmente neutropenia prolongada, la cual compromete seriamente al hospedero para desarrollar AI (Cambor, Veres, Cambor, Perez, & Paramio, 2007).

Existen algunos pacientes que reciben terapia con corticosteroides como profilaxis o tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedero, por ejemplo, pacientes con trasplante alogénico. Estos pacientes son susceptibles a desarrollar AI aunque no presenten neutropenia. En estos casos la patología de la enfermedad es diferente (Chiang, Sheppard, & Filler, 2008).

La disfunción de los macrófagos así como atributos propios del hongo, son factores que incrementan el riesgo de desarrollar AI, los cuales permiten la supervivencia de

Aspergillus y el crecimiento en el medio pulmonar (Kauffman, Pappas, Sobel, & Dismukes, 2011).

El desarrollo de AI está principalmente asociada a pacientes inmunocomprometidos con leucemias, linfomas o trasplantes de órganos sólidos. Del 5% al 15% de pacientes con trasplante reciente desarrollan AI, existiendo reportes de mortalidad en este grupo de 30% a 70% (Cuellar Rodriguez & Sierra Madero, 2005). La prevalencia de AI en pacientes leucémicos con tratamiento citotóxico va de 0.5% a 5%, con una mortalidad de hasta 80% (Besteiro, 2007).

La función fagocítica de los macrófagos se ve limitada durante el tratamiento con corticosteroides, provocando disminución de la producción de citocinas, quimiocinas y la migración celular (Lionakis & Kontoyiannis, 2003). La capacidad funcional de los fagocitos para matar a los conidios e hifas de *Aspergillus fumigatus* se ve deteriorada con el uso de corticosteroides (Taylor & Keller, 2009).

A pesar de los efectos de los esteroides sobre la función celular inmune innata, los neutrófilos se reclutan en el pulmón y previenen la invasión de hifas, pero crean un ambiente inflamatorio que resulta en lesiones de tejido. Esta respuesta inflamatoria exacerbada es generalmente considerada como la causa de la muerte, en contraste con el crecimiento sin control de hongos observado en hospederos neutropénicos (Lumbreras & Gavaldá, 2003).

Es importante estudiar la patogénesis de *Aspergillus* en el contexto del estado inmune del hospedero y la posterior respuesta a la infección por hongos, debido a las grandes

diferencias en las respuesta inmunes de los hospederos a las infecciones fúngicas bajo diferentes regímenes inmunosupresores (Taylor & Keller, 2009).

5. Respuesta Inmune

a. Interacción de *Aspergillus* con el epitelio respiratorio

La inhalación de conidias desde las vías aéreas hasta los pulmones suele ser la causa de la infección por *Aspergillus*; el tiempo de germinación varía dependiendo de la especie y el estado inmunológico del paciente (Cuervo Maldonado, Gomez Rincon, Rivas, & Guevara, 2010).

La defensa del hospedero consiste, en primer lugar, en la activación del aclaramiento ciliar y la fagocitosis. Los macrófagos alveolares ingieren las conidias y activan la enzima NADPH oxidasa, que a su vez activa la cascada de radicales libres de oxígeno y genera la eliminación dentro del fagosoma. Moléculas como los receptores de reconocimiento de patógenos (RRP) identifican proteínas de la pared celular durante la fase conidial y micelial activando la fagocitosis, la liberación de citosinas locales proinflamatorias, el reagrupamiento de neutrófilos activos e iniciando la subsecuente inmunidad antígeno específica (Sherif & Segal, 2010).

El epitelio respiratorio es de vital importancia en el inicio de la inmunidad innata antimicrobiana en contra de muchos patógenos inhalados, sin embargo hay pocos estudios que examinan el rol de este en la defensa del hospedero contra *Aspergillus*. Es probable que su contribución consista en potencializar la respuesta inmune global (Dagenais & Keller, 2009).

Existen receptores solubles que sirven como opsoninas para *Aspergillus fumigatus* uniéndose a algunos carbohidratos de sus conidias de forma dependiente de calcio. Entre estos se puede mencionar las colectinas pulmonares (familia de lectinas tipo-C) incluyendo las proteínas surfactantes del pulmón A y D y lectinas unidas a manano (Park & Mehrad, 2009).

Las células epiteliales pueden secretar componentes antimicrobianos solubles para la defensa de las vías aéreas. Algunas defensinas de péptidos antimicrobianos que tienen acción de amplio espectro para diversos microorganismos y son producidas después de la incubación con *Aspergillus fumigatus* (Dagenais & Keller, 2009).

Algunas células epiteliales (las presentes en la tráquea, alveolares tipo II, nasales y pulmonares A549) se unen a las conidias de *Aspergillus* y las envuelven entrando en contacto con fagolisosomas ácidos y pueden ser eliminadas. Algunas conidias son capaces de germinar y salir del fagolisosoma de las células alveolares tipo II sin causarle daño (Filler & Sheppard, 2006).

b. Respuesta de Macrófagos a *Aspergillus*

Los macrófagos alveolares son las células fagocíticas residentes primarias del tracto respiratorio y un componente crítico de la defensa del hospedero contra las conidias de *Aspergillus*. Los macrófagos alveolares fagocitan las conidias de *Aspergillus* de una manera actino-dependiente, un proceso mediado por el reconocimiento de patrones moleculares asociados al patógeno por los receptores de reconocimiento de patrones (RRP) de células del hospedero (Dagenais & Keller, 2009).

Los macrófagos alveolares son capaces de eliminar pequeños inóculos de conidias de *Aspergillus*, como se ha demostrado en algunos modelos de AI. Sin embargo, concentraciones más grandes de conidias evidentemente sobrepasan las capacidades de defensas locales, necesitando el reclutamiento de otros leucocitos efectores. Esto se puede deber a la muerte relativamente lenta de las conidias por parte de los macrófagos alveolares. En estudios *in vitro*, la muerte de las conidias por los macrófagos alveolares tardó de 3 a 6 horas después de la fagocitosis (Park & Mehrad, 2009).

El contacto de los RRP con los ligandos de *Aspergillus* generan una respuesta pro-inflamatoria caracterizada por la producción de citoquinas y quimioquinas que son importantes para la defensa del hospedero en contra de este organismo, incluyendo el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), proteína inflamatoria 1 alfa del macrófago (PIM-1 α) y la proteína 1 quimioatrayente del monocito (PQM-1) (Bellanger, y otros, 2009).

Los receptores tipo Toll 2 y 4 (RTT2 y RTT4) y la dectina-1 (receptor de lectina tipo C) son los RRP mejor caracterizados involucrados en el reconocimiento de *Aspergillus* y la activación de las células del hospedero. Estudios *in vitro* han demostrado que las conidias y las hifas activan macrófagos a través de RTT2 y RTT4. El RTT2 reconoce ambas morfologías, hifas y conidias, mientras que el RTT4 reconoce solamente la forma de hifas (Netea, y otros, 2003).

A diferencia de los RRP, la dectina-1 es esencial para la defensa del hospedero contra *Aspergillus* tanto en hospederos inmunosuprimidos como en inmunocompetentes. La dectina-1 es específica para el carbohidrato fúngico β 1,3 glucano, el cual está normalmente enmascarado en conidias de *Aspergillus* en reposo (Werner, y otros, 2009).

Los macrófagos alveolares eliminan conidias que han sido ingeridas dentro los fagolisosomas por medio de especies reactivas del oxígeno (ERO) y de la acidificación de los mismos (Dagenais & Keller, 2009).

El tratamiento con corticosteroides perjudica la capacidad de eliminar conidias por medio de los macrófagos alveolares. Los macrófagos alveolares de ratones con tratamiento de corticosteroides tenían más crecimiento fúngico, siendo esto asociado a la reducción de ERO (Park & Mehrad, 2009).

c. *Aspergillus* y los neutrófilos

La neutropenia es un factor de riesgo primario para la AI. Modelos animales y estudios *in vitro* han demostrado que los neutrófilos se unen a las hifas fúngicas y se degranulan, resultando en la muerte fúngica por mecanismos oxidativos y no oxidativos (Dagenais & Keller, 2009).

Para que la inmunidad innata reclute a los diferentes tipos de leucocitos, incluyendo a los neutrófilos, existen diversos mediadores como algunos receptores y ligandos de quimiocinas. Los ligandos de quimiocinas son una familia grande de péptidos estructuralmente relacionados. Se dividen en las familias CC, CXC, C y CX₃C. Un subconjunto de la familia CXC está definido por la presencia de ácido glutámico leucina-arginina (ELR por sus siglas en inglés) en su secuencia. Los ligandos de quimiocina CXC que contienen ELR son críticos para el reclutamiento de neutrófilos en muchos modelos. Los ligandos humanos dan señales por medio de receptores CXCR1 y CXCR2; los ligandos en ratones solamente dan señales por medio de receptores CXCR2 (Bonnett, Cornish, Harmsen, & Burritt, 2006).

En experimentos con ratones silvestres que han sido sometidos a grandes inóculos intratraqueales de conidias de *Aspergillus*, se demostró una alta señal de ligandos de quimiocina CXCL1 que contienen ELR, resultando en un rápido reclutamiento de neutrófilos a los pulmones. La inmunoneutralización de CXCR2 en ratones resultó perjudicial para el reclutamiento de neutrófilos provocando casi un 100% de mortalidad (Park & Mehrad, 2009).

Similar a las células epiteliales y macrófagos, los neutrófilos utilizan RRP, incluyendo RTT y dectina-1, para reconocer y responder a *Aspergillus fumigatus*. Adicionalmente al ataque oxidativo mediado por la NADPH oxidasa, los gránulos de los neutrófilos contienen una variedad de componentes antimicrobianos como proteasas, defensinas, pentraxina-3, lisozimas, y lactoferrina (Nauseef, 2007).

Aunque las conidias son relativamente resistentes a la muerte por neutrófilos, evidencias recientes sugieren que los neutrófilos contribuyen al control conidial formando agregados en el pulmón para inhibir la germinación conidial (Dagenais & Keller, 2009).

Según el Grupo Cooperativo de Infecciones Fúngicas Invasivas de la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer y el Grupo de Estudio de Micosis del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (EORTC/MSG por sus siglas en inglés) la neutropenia $<0.5 \times 10^9$ neutrófilos/litro por más de 10 días se considera de alto riesgo para el desarrollo de aspergilosis invasiva (Koo, Bryar, Baden, & Marty, 2010).

También se ha demostrado que los neutrófilos tienen un rol esencial en la eliminación de conidias en estado germinativo; en contraste a la tardada eliminación mediada por los

macrófagos y el daño fúngico, la eliminación llevada a cabo por medio de los neutrófilos es más rápida (Park & Mehrad, 2009).

6. Diseminación

Las especies de *Aspergillus* se pueden diseminar a través del pulmón y vía sanguínea a otros órganos. Las hifas en proceso de crecimiento que escapan de las defensas del hospedero, pueden invadir la línea de células endoteliales de los vasos sanguíneos para ganar acceso a la vasculatura. La angiainvasión está asociada regularmente al estado inmunológico del paciente, principalmente a la neutropenia, presentándose incluso en pacientes inmunocompetentes, ya que los neutrófilos no están disponibles para eliminar hifas y el control del crecimiento fúngico (Chanzá, Fraile, Gimeno, & Ocete, 2014).

La invasión de las hifas ocurre del lado abluminal al lado luminal de las células endoteliales, induciendo activación de las células endoteliales pero poco daño celular. Durante este proceso, los fragmentos de hifas pueden terminar en la corriente sanguínea e invadir el endotelio en otros lugares, resultando en una enfermedad hematológicamente diseminada (Dagenais & Keller, 2009).

Las conidias vivas inducen más daño celular endotelial que las conidias muertas por calor, lo que sugiere que participan a través de un compuesto secretado, mientras que el daño inducido por los tubos germinales es independiente de la viabilidad. En contraste, las hifas inducen una mayor activación de las células endoteliales que las conidias y la activación de las células endoteliales pueden ser independiente de metabolitos secundarios (Dagenais & Keller, 2009).

Mientras la infección avanza vía angioinvasión y se disemina, células fúngicas fagocitadas y no viables pueden ser detectadas por la metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). En este escenario, la positividad por PCR sería relativamente al azar y transitoria pero dependiente del grado de angioinvasión (White, Parr, Thornton, & Barnes, 2013).

B. Aspergilosis

1. Generalidades

Las infecciones en humanos causadas por hongos del género *Aspergillus* son conocidas en su conjunto como aspergilosis. Las especies de *Aspergillus* son ubicuas y juegan un papel determinante en el reciclaje global del carbono y nitrógeno. Aunque su nicho ecológico primario es el suelo y la materia en descomposición, el género produce pequeñas conidias hidrofóbicas que se dispersan fácilmente en el aire y que pueden sobrevivir un amplio rango de condiciones ambientales (Dagenais & Keller, 2009).

Las especies del género *Aspergillus* a pesar de ser saprobios, son los agentes etiológicos de una importante variedad de enfermedades en humanos. La respuesta del hospedero durante su encuentro con esporas de *Aspergillus* tiene un determinante para eliminar al microorganismo sin desarrollar enfermedad o la colonización por el mismo (Park & Mehrad, 2009).

A pesar de una constante exposición a las conidias de *Aspergillus*, es importante enfatizar que la mayoría de humanos no desarrollan ninguna enfermedad atribuible a este microorganismo, sin dejar tampoco evidencia de anticuerpos o inmunidad mediada por células. Esto sugiere que, para la mayoría de humanos saludables, la inmunidad innata es

suficiente para eliminar el organismo antes de ser requerida la inmunidad adquirida (Mambula, Sau, Henneke, Golenbock, & Levitz, 2002).

2. Clasificación

La clínica de la aspergilosis abarca desde las reacciones alérgicas, la colonización asintomática, la infección superficial y la forma invasiva. Su presencia depende en gran medida del estado inmunológico del paciente así como de los factores asociados a los que ha sido expuesto; la inmunosupresión es directamente proporcional a la probabilidad de progresar a la forma invasiva de la enfermedad (Patterson T. , 2015).

Las infecciones causadas por *Aspergillus* dependen del estado inmunológico del hospedero y se pueden clasificar en invasivas, las cuales se caracterizan por el crecimiento de hifas dentro de los tejidos, por colonización de las superficies mucosas sin invasión dentro del tejido y enfermedades por hipersensibilidad; como ejemplo de las infecciones invasivas podemos encontrar la aspergilosis pulmonar invasiva, rinosinusitis invasiva, aspergilosis traqueobronquial invasiva y aspergilosis crónica de cavidades pulmonares (Barnes & Marr, 2006).

Dentro de las infecciones relacionadas a hipersensibilidad encontramos asma, aspergilosis broncopulmonar alérgica, sinusitis alérgica y neumonitis hipersensible. En cuanto a las infecciones que implican colonización podemos encontrar micetomas pulmonares y algunas asintomáticas como en bronquiectasia o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Park & Mehrad, 2009).

En individuos con la función pulmonar alterada como asma y fibrosis quística *Aspergillus* spp. puede causar aspergilosis broncopulmonar alérgica, una respuesta hipersensible a los componentes fúngicos. Se pueden formar aspergilomas después de

repetidas exposiciones a las conidias; estos se alojan regularmente en cavidades pulmonares previas, como las encontradas en pacientes que se infectaron con tuberculosis en el pasado (Dagenais & Keller, 2009).

a. Manifestaciones Alérgicas

1) Aspergilosis Broncopulmonar alérgica (ABPA)

Consiste en una respuesta alérgica crónica a *Aspergillus*. La incidencia es de 1 a 2% en pacientes con asma y de 7% en pacientes con fibrosis quística. Se caracteriza por tener remisiones y exacerbaciones, los pacientes muestran signos de obstrucción de la vía aérea, con atrapamiento aéreo e incremento del volumen residual; a largo plazo y sin tratamiento puede progresar a fibrosis pulmonar (Fortún, Meije, Fresco, & Moreno, 2012).

Para el diagnóstico se utilizan principalmente los siguientes criterios: 1) eosinofilia en frote periférico, 2) asma, 3) reactividad cutánea inmediata al antígeno de *Aspergillus* spp., 4) concentraciones elevadas de la IgE total sérica, 5) concentraciones séricas elevadas de anticuerpos IgG, IgE contra *Aspergillus*, 6) Infiltrados pulmonares temporales o permanente y 7) bronquiectasia centrales. Existen otros criterios que refuerzan el diagnóstico, estos son: 1) detección repetida de *Aspergillus* spp. en muestras de esputo 2) antecedentes de expectoración de moco color pardo y 3) reactividad tardía a *Aspergillus* spp. (Cramer, Glaser, Vilhelmsson, Zeller, & Rhyner, 2010).

2) Otras manifestaciones alérgicas

La sinusitis alérgica por *Aspergillus* se presenta en pacientes adultos jóvenes con antecedentes de asma o rinitis alérgica, pólipos nasales crónicos y opacificación en los senos paranasales así como pacientes con asma mediado por mastocitos (Agarwal & Chakrabarti, 2010).

b. Formas crónicas y saprobias

1) Aspergiloma pulmonar

El aspergiloma es un acumulo sólido de hifas de *Aspergillus*, fibrina, moco y residuos celulares, que se ubica en la cavidad pulmonar. Es predominante en los ápices pulmonares y está asociado a una neumonía subyacente. Un diagnóstico previo de tuberculosis, enfisema bulboso, sarcoidosis, histoplasmosis, quistes congénitos o abscesos pulmonares causados por bacterias son las formas que más frecuentemente anteceden un aspergiloma (Silva, Orzechowski, de Mattos, & Severo, 2010).

En muchos pacientes se presenta como una lesión asintomática, pero existen casos en que puede provocar hemoptisis potencialmente fatal. El diagnóstico está dado por la clínica y el estudio radiológico; la imagen observada es una masa redonda de aspecto sólido y densidad similar al agua que se ubica en una cavidad, separada de la pared por un espacio de aire; esto es conocido como signo de luna creciente (Cuervo Maldonado, Gomez Rincon, Rivas, & Guevara, 2010).

2) Otras formas crónicas o saprobias

La aspergilosis pulmonar crónica cavitativa (APCC) es una condición con un grado de morbilidad elevada; gran parte de los pacientes presentan APCC luego de sufrir daños por condiciones previas como la tuberculosis. Entre los síntomas más frecuentes se encuentran la fatiga, tos crónica y hemoptisis. El diagnóstico se realiza mediante serología para *Aspergillus* spp. así como un aumento en los marcadores inflamatorios (Silva, Orzechowski, de Mattos, & Severo, 2010).

Existen también las infecciones en el canal auditivo externo llamadas otomicosis provocadas por *Aspergillus* spp. Los síntomas comunes son: otorrea, prurito, problemas

auditivos, dolor; los pacientes a riesgo son aquellos que presentan una condición que involucra su estado inmunológico, como lo son los pacientes con diabetes mellitus sin tratamiento, eczema crónico, hipogamaglobulinemia, infección por VIH o tratamiento con corticosteroides, los agentes que comúnmente se aíslan son *Aspergillus niger* o *Aspergillus fumigatus* (Labanore, Sighinolfi, & Ghinelli, 2010).

c. Aspergilosis invasiva (AI)

Entre los principales factores de riesgo para desarrollar AI en pacientes con sistemas inmunológicos comprometidos se encuentran: las neutropenias de más de 10 días, trasplante de órgano sólido principalmente pulmón, leucemia mieloide aguda o síndrome mielodisplásico, trasplante de células madre hematopoyéticas y enfermedad injerto contra hospedero (Peman & Salavert, 2011).

1) Aspergilosis pulmonar invasiva (API)

Entre los síntomas más frecuentes podemos encontrar: disnea, dolor pleural, tos crónica y fiebre. El diagnóstico se complica para el personal médico, ya que los hallazgos clínicos son inespecíficos; la sobrevivencia del paciente está determinada por la rapidez en el inicio de un tratamiento eficaz, razón por la cual se requiere un alto índice de sospecha clínica, así como el apoyo de las pruebas serológicas si en caso estuvieran disponibles (Chanzá, Fraile, Gimeno, & Ocete, 2014).

La mortalidad asociada a la API está entre el 60-90%, dependiendo del estado inmunológico del paciente. El tratamiento debe estar enfocado a un restablecimiento del estado inmune del paciente, por lo cual el uso de esteroides e inmunosupresores debe ser regulado (Kauffman & Nicolasora, 2010) .

2) Traqueobronquitis

La traqueobronquitis es común en pacientes con VIH avanzado y trasplante de pulmón; esta se puede presentar de las siguientes formas: colonización, bronquitis, traqueobronquitis obstructiva, traqueobronquitis pseudomembranosa y traqueobronquitis ulcerativa y puede presentar los siguientes síntomas: tos, disnea, fiebre, hemoptisis y dolor torácico. El objetivo del tratamiento en el caso de trasplante de pulmón está enfocado en prevenir la ruptura de sutura y por consecuencia la pérdida del pulmón trasplantado (Lopez, Garcia, Laporta, & Usseti, 2011).

3) Aspergilosis cerebral

Es la forma más agresiva y con mayores complicaciones de AI, ya que compromete en gran medida el sistema nervioso central lo que se traduce en una mortalidad superior al 80%. El diagnóstico frecuentemente se realiza post-mortem ya que su sospecha es difícil de confirmar, para realizarlo es necesaria una biopsia y dado el estado delicado del paciente este procedimiento se complica (Fortún, Meije, Fresco, & Moreno, 2012).

Los síntomas más comunes son: cefalea, convulsiones, déficit focal; suelen aparecer lesiones en forma de anillo al realizar los estudios radiológicos, que son compatibles con abscesos cerebrales, infartos corticales o subcorticales que pueden presentar o no hematomas asociados. El tratamiento y diagnóstico se deben de realizar de forma intensiva ya que una acción pronta puede limitar el daño neurológico (Fortún, Meije, Fresco, & Moreno, 2012).

4) Otras formas de Aspergilosis invasiva

Entre los sitios u órganos que se ven comprometidos con un episodio de AI están: sistema óseo (osteomielitis y artritis séptica), ojos (endofalmitis), piel, compromiso

cardiaco (endocarditis, miocarditis, pericarditis), riñones, senos paranasales, aparato gastrointestinal y peritoneo (Cuervo Maldonado, Gomez Rincon, Rivas, & Guevara, 2010).

3. Epidemiología de la Aspergilosis Invasiva (AI)

La epidemiología de la AI depende de la población de hospederos susceptibles y la exposición ambiental al organismo, siendo también influenciada por las medidas profilácticas tomadas para prevenir esta infección (Gavalda, Meije, Len, & Pahissa, 2012).

La aspergilosis invasiva es la infección por hongos filamentosos más común en pacientes inmunocomprometidos. Esta es una infección severa con un incremento del 35.7% en tasas de mortalidad reportadas en los Estados Unidos de América de 1980 a 1997. *Aspergillus fumigatus* es la especie más frecuentemente encontrada en dichas infecciones, seguida a cierta distancia por *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans* y *A. ustus* (Kauffman & Nicolasora, 2010).

En años recientes la proporción de infecciones causadas por especies que no son *A. fumigatus* se ha incrementado considerablemente. Hay una variación marcada entre centros que reportan infecciones por el género *Aspergillus* spp. algunos reportando una incidencia alta de infecciones por *A. terreus* y otros reportando *A. flavus*. Los factores climáticos y el uso de drogas antifúngicas pueden jugar un rol importante en la distribución geográfica de las especies de *Aspergillus* que causan estas infecciones (Oliveira & Caranhalho, 2014).

También es muy probable que muchos casos de AI atribuidos a *A. fumigatus* son producidos por otras especies. Estudios moleculares han demostrado que algunas cepas que producen colonias blancuzcas, de poco crecimiento y esporuladoras, hasta ahora atribuidas

a dicho hongo, pertenecen de hecho a la recién descubierta especie *A. lentus* (Cornet, Fleury, Maslo, Bernard, & Brucker, 2002).

La incidencia de AI se ha incrementado significativamente en pacientes neutropénicos y en receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas. Esta severa infección fúngica oportunista se caracteriza por una alta mortalidad en dichos pacientes en riesgo (Hadrich, y otros, 2012).

La incidencia de AI en receptores de trasplante de pulmón es estimada entre 5 y 10%, pero valores tan altos como 26% también han sido observados. En trasplante de órganos sólidos tiene un rango de entre 0 y 15%, sin embargo varía de una institución a otra y también de acuerdo al órgano trasplantado. La incidencia disminuye en el siguiente orden: corazón, hígado, páncreas y riñón (excluyendo a los pulmones) (Gangneux, Camus, & Philippe, 2010).

4. Diagnóstico de la Aspergilosis Invasiva

El diagnóstico clínico se basa a menudo en síntomas inespecíficos y exámenes radiológicos como tomografía computarizada y radiografía de tórax (White, Parr, Thornton, & Barnes, 2013).

La EORTC/MSG son los encargados de los lineamientos para el correcto diagnóstico y descripción de las infecciones fúngicas invasivas más frecuentes en pacientes con cáncer y receptores de trasplantes de células progenitoras con un grado de inmunodeficiencia (Moragues, Amutio, Garcia Ruiz, & Pontón, 2003).

Los criterios relacionados al hospedero incluyen neutropenia <500 neutrófilos/mm³ por más de 10 días, fiebre persistente por más de 96 horas y temperatura <36 °C o >38 °C

con cualquiera de las siguientes condiciones predisponentes: neutropenia prolongada en los 60 días previos, uso reciente o actual de inmunosupresores significativos 30 días previos, invasión fúngica probada o probable durante los episodios previos de neutropenia, o VIH avanzado coexistente y uso prolongado de corticosteroides (>3 semanas) en los 60 días previos (Ascioglu, y otros, 2002).

Los criterios microbiológicos incluyen entre otros, resultados positivos para hongos en cultivos de muestras de esputo o lavados broncoalveolar, hallazgos de micelio en evaluación microscópica directa, resultado positivo de antígeno de *Aspergillus* en muestras de lavado broncoalveolar o fluido cerebro-espinal o en más de dos muestras seriadas de sangre (Canton, Garcia, Martin, Pemán, & Guinea, 2014).

La detección de biomarcadores circulantes (DNA o antígenos) indicativos de AI incrementan la oportunidad de detectar una infección temprana antes que se desarrolle la enfermedad plenamente. Altos valores de sensibilidad y valor predictivo negativo pueden aportar un diagnóstico certero, previniendo tratamientos innecesarios. El número de opciones de biomarcadores es reducido (Dagenais & Keller, 2009).

La detección de antígenos circulantes, específicamente el antígeno galactomanano, es reconocida por la EORTC/MSG como un criterio para el diagnóstico de aspergilosis invasiva. En la actualidad hay disponibles comercialmente ensayos que detectan el antígeno galactomanano (Cuenca, 2012).

El antígeno galactomanano puede alterarse por varios factores variando considerablemente su sensibilidad y especificidad, guiando hacia falsos positivos o falsos negativos. Por muchos años la PCR ha sido utilizada como una prueba alternativa al

antígeno galactomanano alcanzando una sensibilidad y especificidad similar a dicho antígeno, cuando se utiliza como muestra sangre completa. (Chanzá, Fraile, Gimeno, & Ocete, 2014).

Las pruebas combinadas del antígeno galactomanano y el PCR ofrecen un mejor rendimiento en el diagnóstico de la aspergilosis que el uso de estas pruebas de forma individual. Sin embargo, la falta de estandarización y el poco interés comercial por la prueba de PCR ha detenido la inclusión de dicha prueba como criterio diagnóstico (White, Parr, Thornton, & Barnes, 2013).

Existe también un dispositivo de flujo lateral para el diagnóstico sérico de AI. Esta prueba incorpora un anticuerpo monoclonal (JF5) que se une a un antígeno glicoproteínico extracelular secretado durante el crecimiento activo de *Aspergillus* spp. El anticuerpo monoclonal es altamente específico para las especies de *Aspergillus* y no presenta reacción cruzada con un amplio rango de hongos de relevancia clínica (Alvarez, 2015).

a. Diagnóstico de laboratorio

1) Pruebas microscópicas directas

Para el caso de pacientes con sospecha de infección por *Aspergillus*, la identificación se basa en el hallazgo de las estructuras fúngicas características a partir de preparaciones en fresco y tinciones microbiológicas; dependiendo de la sospecha clínica así será la muestra a utilizar. Las muestras más frecuentemente analizadas son esputo y lavado broncoalveolar a las cuales se les realiza de rutina examen directo con KOH 20%, Gram y Giemsa. Una de las ventajas de este método es la rapidez del resultado, aunque con poca sensibilidad y especificidad, ya que solo es posible sugerir el género al que corresponde la estructura

fúngica encontrada. Además, con estas técnicas es imposible determinar la capacidad de invasión tisular (Cuervo Maldonado, Gomez Rincon, Rivas, & Guevara, 2010).

2) Cultivo

Se sabe que *Aspergillus* spp. al ser un agente saprobio se puede recuperar de muestras líquidas y sólidas, aislándolo en medios comunes de laboratorio, como lo es el agar BHI, sangre de carnero al 5% o tripticasa soya; sin embargo cuando existe sospecha de un episodio de AI, es recomendable utilizar un medio selectivo para hongos como el sabouraud dextrosa. Una de las desventajas del cultivo y recuperación de *Aspergillus* spp. es el tiempo en el que logra crecer que va desde unos días hasta semanas, así como las diferencias que existen entre especies que pertenecen al mismo género; por lo que incubarlos a 37°C puede ayudar a diferenciar las especies patógenas de los saprobios ambientales (Cuenca, 2012).

3) Pruebas de susceptibilidad antifúngica

El interés por las pruebas de diagnóstico para hongos filamentosos por medio de sensibilidad *in vitro* crece actualmente, ya que permite establecer de forma rápida la concentración mínima inhibitoria de los fármacos de elección para una terapia dirigida y con esto lograr una adecuada actividad farmacológica (Cercenado, y otros, 2006).

Se sabe que tanto la actividad farmacológica *in vitro* de los diferentes antifúngicos como su perfil de sensibilidad y resistencia tienen un comportamiento diferente especie-específica (Cuervo Maldonado, Gomez Rincon, Rivas, & Guevara, 2010).

4) Detección de antígenos circulantes: Galactomanano y (1,3) β-D Glucano

Actualmente existe un número reducido de pruebas certificadas para la detección del antígeno galactomanano, que es un heteropolisacarido termoestable presente en las especies de *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. La prueba aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en ingles) para su uso en el diagnóstico de AI recibe el nombre comercial de Platelia *Aspergillus* de la empresa BIORAD. Dicha prueba es la más utilizada por su sensibilidad y especificidad además de su sencillez y reproducibilidad. El principio de la prueba es ELISA de doble sándwich que utiliza un anticuerpo monoclonal EBA-2 de rata que se dirige a las paredes laterales 1-5-galactofuranosido del galactomanano de *Aspergillus* (Park, y otros, 2015).

Existen otros métodos además de la detección del antígeno de galactomanano como el (1,3) β -D Glucano, que es un componente principal de la pared celular del genero *Aspergillus* spp. Sin embargo este no cuenta con la aprobación de la FDA por presentar una baja especificidad y sensibilidad (Cuervo Maldonado, Gomez Rincon, Rivas, & Guevara, 2010).

C. Antígeno Galactomanano

El galactomanano es un polisacárido liberado a la circulación durante el crecimiento de *Aspergillus* cuando invade al hospedero; es utilizado como un biomarcador de aspergilosis y su detección en la circulación y en los embalses de tejido se ha convertido en un valioso complemento junto con el cultivo y la histopatología de los tejidos afectados (Fisher, y otros, 2013). Para la detección del antígeno galactomanano se han desarrollado dos técnicas que utilizan los mismos anticuerpos monoclonales, pero presentan diferente sensibilidad. Estas técnicas son la aglutinación con partículas de látex (Pastorex *Aspergillus*, Sanofi Diagnostics Pasteur) y el ELISA de doble sándwich (Platelia

Aspergillus, Sanofi Diagnostics Pasteur). La aglutinación con látex es una técnica más sencilla de realizar, pero su nivel de detección tiene una baja sensibilidad (15 ng/ml) mientras, el ELISA es capaz de detectar hasta 1 ng/ml de galactomanano en suero (Pemán, 2000).

Se destaca la utilidad del antígeno galactomanano para el diagnóstico clínico ya que se adelanta en varios días al diagnóstico de la AI realizado por otros procedimientos, lo que permite la temprana instauración de una terapia antifúngica. También es importante para el seguimiento de la terapia por medio del comportamiento del índice de antigenemia en muestras seriadas, lo que permite modificar la concentración de medicamento administrado y/o agregar una segunda droga antifúngica con el objeto de potenciar o mejorar la eficacia del tratamiento inicial (Palacio, Cuétara, & Pontón, 2003).

1. Determinación del antígeno galactomanano

Debido a la alta sensibilidad del ELISA de doble sándwich desarrollada por Platelia (*Platelia Aspergillus*®, Bio Rad, Marnes La Coquette, Francia), es la técnica inmunoenzimática que se utiliza en la actualidad, se trabaja con microplacas sensibilizadas con anticuerpos monoclonales tipo EBA-2 de rata dirigidos a la fracción (1,5) - β -D-galactofuranósido de la cadena del galactomanano. Se requiere de un pre tratamiento del suero, incubación a 100°C y ultracentrifugación 10 minutos a 10.000 RPM; posteriormente se realiza el enzimo inmunoanálisis, demandando un tiempo inferior a las 3 horas para tener el resultado final. La sensibilidad y especificidad general está dentro del 90,5 % y 94,5 %, respectivamente (Besteiro S. , 2007). Estudios recientes indican que la prueba del antígeno galactomanano es de mayor utilidad en pacientes con neutropenia prolongada (sensibilidad

del 72% al 82%) que en pacientes enfermos críticos no neutropénicos (sensibilidad del 40% al 55%) (Shi, Li, Huang, & Lu, 2012).

En el ELISA las muestras de orina y lavado bronquial deben utilizarse sólo como confirmatorias de un resultado positivo en suero, ya que en orina los niveles de galactomanano se encuentran en menor concentración respecto al suero y el lavado bronquial está contraindicado en pacientes enfermos con AI (Pemán, 2000).

2. Criterios EORTC/MSG y en monitoreo del paciente

La detección del antígeno de galactomanano, es usado por la comisión EORTC/MSG para estandarizar el diagnóstico y monitoreo de pacientes con AI. Dicha comisión estandarizó las definiciones para las infecciones fúngicas invasivas y estableció los términos “probado”, “probable” y “posible” para expresar la certeza de enfermedad (Ascioglu, y otros, 2002).

Estas expresiones verbales de probabilidad subjetiva corresponden a un estimado numérico razonable. Tres elementos forman la base de las definiciones: factores del hospedero, manifestaciones clínicas y resultados micológicos. El uso del antígeno galactomanano establecido por la comisión EORTC/MSG consiste en determinarlo como un factor positivo dentro de los resultados micológicos si se encuentra antigenemia en una muestra de lavado broncoalveolar o en dos o más muestras en suero. (Ascioglu, y otros, 2002).

3. Ventajas y desventajas

La técnica más sensible que existe en la actualidad para la detección de galactomanano es el ELISA de doble sándwich, dicha prueba además de presentar una

reproducibilidad intra e interlaboratorio muy aceptable contribuye al diagnóstico precoz de la AI, ya que puede detectar la aspergilosis entre 2 y 3 semanas antes de la aparición de signos o síntomas, lo que facilita la instauración de un terapia precoz. Otra de las ventajas del ELISA es la posibilidad de monitorizar los niveles de galactomanano durante el tratamiento, evaluando la eficacia del mismo (Pemán, 2000).

Sin embargo, muchas desventajas han sido descritas, por ejemplo, los resultados falsos positivos y falsos negativos obtenidos por esta metodología (Torelli, Sanguinetti, Moody, & Pagano, 2011), su uso limitado para el diagnóstico en pacientes no neutropénicos (Shi, Li, Huang, & Lu, 2012), la necesidad de tener dos o más muestras seriadas positivas para considerar un resultado positivo (Ascioglu, y otros, 2002), falsos positivos causados por la reacción cruzada con otros hongos oportunistas (Giacchino, Chiapello, Bezzio, & Fagioli, 2006).

D. Tratamiento para aspergilosis

El itraconazol es a menudo utilizado para el tratamiento de aspergilosis no invasiva crónica probando ser efectivo, disminuyendo el uso de esteroides. El voriconazol es recomendado como la primera línea terapéutica para AI, y el posaconazol está recomendado para pacientes con inmunocompromiso severo. La resistencia de *Aspergillus fumigatus* al itraconazol está documentada y fue reportada por primera vez en 1997 para tres aislamientos clínicos obtenidos a finales de los años 80. El principal mecanismo de la resistencia a los azoles actualmente reportados es alteraciones al blanco de la droga codificado por el gen *cyp51A* (Mortensen, y otros, 2011).

IV. Justificación

La AI es una causa importante de morbilidad y mortalidad en enfermos inmunosuprimidos. En los últimos años, varios estudios realizados en hospitales de tercer nivel en Europa han demostrado que hasta el 4% de la población total hospitalaria puede desarrollar AI. Esta enfermedad se asocia de forma significativa a la inmunosupresión intensa, neutropenia profunda y la alteración de la inmunidad celular entre otras afecciones (Cuellar Rodriguez & Sierra Madero, 2005).

El diagnóstico microbiológico de esta enfermedad se dificulta debido al tiempo que demora tener resultados que la confirmen, de manera que frecuentemente se realiza de forma tardía y se estima que actualmente hasta un 31% de casos de AI no es diagnosticada y por lo tanto no se trata adecuadamente, sino que constituye un hallazgo post-mortem (Vallejo & Ruiz, 2012).

En la actualidad se han realizado esfuerzos para lograr el diagnóstico temprano de AI, principalmente en el grupo de riesgo más numeroso que lo constituyen los pacientes hematológicos, ya que en ellos la prevalencia puede llegar a un 61%, así como la incidencia aumenta según la enfermedad de base. En pacientes neutropénicos con AI diagnosticada y tratada por más de 10 días de la aparición del primer signo clínico y radiológico, la mortalidad atribuida a esta infección era del 90%, pero descendía al 40% cuando el tratamiento era instaurado de forma temprana (Denning, y otros, 2002).

En este sentido, una de las pruebas que ha demostrado su utilidad en el diagnóstico temprano es la detección del antígeno galactomanano ya que se convierte en una herramienta esencial para iniciar un tratamiento antifúngico apropiado. Se ha demostrado

que el estudio seriado de los niveles de este antígeno puede ayudar a establecer un diagnóstico precoz de esta enfermedad y en algunos casos antes de la aparición de síntomas y signos clínicos.

Dada la utilidad demostrada de esta prueba y debido a que en Guatemala a la fecha no existe ningún estudio que describa los resultados del diagnóstico de AI en pacientes neutropénicos, en la presente investigación se realizó la detección del antígeno galactomanano y se describió las características clínicas de dichos pacientes para ayudar al diagnóstico temprano de esta enfermedad.

V. Objetivos

A. General

Evidenciar la importancia de la detección del antígeno galactomanano de *Aspergillus* spp. como un auxiliar en el diagnóstico presuntivo de aspergilosis invasiva (AI) en pacientes neutropénicos que asisten al Hospital General San Juan de Dios.

B. Específicos

1. Describir las características clínicas y socio-demográficas de los pacientes con diagnóstico presuntivo de AI.
2. Determinar la frecuencia del antígeno galactomanano en los pacientes con diagnóstico presuntivo de AI.
3. Establecer la categoría de enfermedad fúngica invasiva a la que pertenecen los pacientes, a través de las definiciones del EORTC/MSG.

VI. Hipótesis

Por ser un estudio descriptivo, no es necesaria la formulación de hipótesis.

VII. Materiales y Métodos

A. Universo

Pacientes neutropénicos que asisten al HGSJD con diagnóstico presuntivo de AI durante el período comprendido de septiembre de 2013 a julio de 2015.

B. Muestra

Se recolectaron muestras de suero de todos los pacientes incluidos en el estudio durante el período de tiempo definido.

1. Criterios de inclusión: Todas las muestras que provinieron de pacientes que cumplieron con el criterio de neutropenia (menos de quinientos neutrófilos por milímetro cúbico) establecido por EORTC/IFICG y MSG, el cual está incluido en la ficha epidemiológica.

2. Criterios de Exclusión: Todas las muestras que no cumplieron con el criterio de neutropenia (menos de quinientos neutrófilos por milímetro cúbico) determinado por EORTC/IFICG y MSG.

C. Recursos

1. Recursos Humanos

a. Seminaristas

Cesar Roberto Dávila Ruiz

Cesar Augusto Tzoc Xicay

Juan José Donis Pedroza

b. Asesor responsable

Licenciada María Luisa García de López.

c. Co-asesor

Licenciado César Conde Pereira.

2. Recursos Institucionales

- a. Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- b. Área de Tuberculosis y Hongos, Laboratorio Clínico, HGSJD

D. Materiales y equipo

1. Equipo

- a. Lavador de micro placa ImmunoWash 1575 BIORAD
- b. Lector de micro placas PR 2100
- c. Impresora Epson lx 300
- d. Incubadora a 25°C
- e. Incubadora a 37°C
- f. Centrifuga microspin eppendorf
- g. Cabina de bio-seguridad biológica Clase II A
- h. Termobloque
- i. Pipeta multicanal 10 - 200µl
- j. Pipeta automática 100 - 1000µl

2. Materiales

- a. Platelia™ *Aspergillus* EIA (Kit para detección de antígeno galactomanano)
- b. Tubos Isolator
- c. Tubos para serología 369614V Silicón, 13 x 75 mm, 5.0 ml

- d. Tubos eppendorf
- e. Puntas para pipeta azules y amarillas
- f. Papel parafilm

E. Metodología

1. Inclusión de pacientes al estudio

Se gestionó con el personal médico del departamento de medicina interna del HGSJD para que notificaran a los seminaristas o al personal técnico del laboratorio clínico del hospital la presencia de pacientes que cumplieran el criterio de inclusión: pacientes con neutropenia de menos de quinientos neutrófilos por milímetro cubico. Los seminaristas también realizaron visitas directas a las unidades de dicho departamento para revisar expedientes médicos y/o comunicarse con los médicos en busca de pacientes que cumplieran el criterio de inclusión.

Una vez los seminaristas fueron notificados o encontraban un expediente médico que cumpliera con dicho criterio, procedieron a informar al paciente los detalles del estudio; se le solicito leer el consentimiento informado, si el paciente estaba de acuerdo en participar en el mismo, procedió a firmar el consentimiento informado para el efecto. Los investigadores llenaron una ficha epidemiológica específica para el estudio de cada participante.

2. Toma de muestras

Firmando el consentimiento informado, se procedió a extraer una muestra sanguínea para la detección del antígeno galactomanano. Por cada paciente participante se obtuvo 4 muestras seriadas en el lapso de 2 semanas. Todas las muestras obtenidas fueron

centrifugadas; luego se separó el suero de los componentes celulares y fue almacenado en temperatura de congelación hasta el momento de la realización de la prueba.

3. Procedimiento ELISA *Platelia Aspergillus*

a. Tratamiento previo de los sueros almacenados

- 1) Se encendió el termobloque y se esperó a que llegara a 120°C (tardó de 1 a 1.5 horas).
- 2) Se pipetearon 300 µl de suero del paciente, control negativo, control del valor umbral y/o control positivo en microtubos plásticos con tapadera de 1.5 ml.
- 3) Se añadió 100 µl de la solución de tratamiento de sueros (R7) a cada microtubo.
- 4) Mezclando bien los microtubos en un vortex.
- 5) Se calentaron los microtubos en un termobloque a 120°C por 6 min (evitando que se abriera el microtubo).
- 6) Inmediatamente después de cumplido el tiempo, se centrifugó a 10000 g x durante 10 min.
- 7) El sobrenadante se almacenó de 2 a 8 °C por un máximo de 48hrs.

b. Prueba de ELISA con sueros pre-tratados

- 1) Se estabilizaron los reactivos a temperatura ambiente 15 min. antes de iniciar la corrida.
- 2) Se preparó solución de lavado.
- 3) Se preparó solución sustrato - cromógeno (por tira de 8 pozos: 40 µl R9+ 2 ml R8; estable por 6 horas a temperatura ambiente en oscuridad).

- 4) Se preparó un diagrama del orden de controles y muestras en la placa (A1 C, B1Cut).
- 5) Se mezcló el contenido del frasco R6 (conjugado).
- 6) Se añadió 50 µl de R6 a cada pozo a utilizar.
- 7) Se añadió 50 µl de sobrenadante de sueros tratado a cada pozo a utilizar.
- 8) Se Cubrió la placa con sellador proporcionado por el kit.
- 9) Se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 90 ± 5 minutos.
- 10) Al retirar el sellador se aspira el contenido del pozo al recipiente descarte.
- 11) Se Lavó 5 veces con solución de lavado, usando como mínimo 370 µl.
- 12) Después del último lavado se invirtió la placa y se golpeó suavemente en papel absorbente.
- 13) Se añadió 200 µl de solución sustrato-cromógeno a cada pocillo, evitando la luz brillante.
- 14) Se incubó a $18-25^{\circ}\text{C}$ por 30 min ± 5 , no se utiliza adhesivo para este paso.
- 15) Se agregó 100 µl de solución de parada (R10) a cada pocillo.
- 16) Se Secó bien la base de la placa.
- 17) La placa se leyó en los próximos 30 minutos.

c. Interpretación y validación de resultados

Cada kit de Platelia *Aspergillus* incluye un control del valor umbral, control negativo y control positivo, los cuales fueron sometidos por duplicado al procedimiento descrito anteriormente.

1) Cálculo de la media del control del valor umbral

Se calculó un promedio de los resultados de lecturas de absorbancia obtenidos.

2) Cálculo del índice del control negativo

El valor de la lectura de absorbancia del control negativo fue dividido entre el valor de lectura de absorbancia del control del valor umbral, obteniendo así el índice del control negativo.

3) Cálculo del índice del control positivo

El valor de la lectura de absorbancia del control positivo se dividió entre el valor de lectura de absorbancia del control del valor umbral, obteniendo así el índice del control positivo.

4) Cálculo del índice de sueros de pacientes e interpretación

Los valores de lectura de absorbancia obtenidos de cada suero de paciente fueron divididos entre el valor de lectura de absorbancia del control del valor umbral, obteniendo así el índice del suero del paciente. Los sueros con un índice menor a 0.50 se consideraron negativos para el antígeno galactomanano. Los sueros con un índice mayor o igual a 0.50 se consideraron positivos para dicho antígeno.

5) Validación de resultados

Los resultados fueron validados siempre que cumplieran con los siguientes criterios:

1) el valor de lectura de absorbancia del control de valor umbral debía estar entre 0.300 y 0.800 2) el índice de control negativo debía ser <0.40 3) el índice del control positivo debía ser >2.00 .

F. Análisis de Datos

1. Tipo de estudio

La investigación se desarrolló como un estudio descriptivo.

2. Tipo de muestreo

Por conveniencia, tomando todas las muestras posibles que cumplieran los criterios de inclusión dentro del período de tiempo establecido: septiembre de 2013 a julio de 2015.

3. Clasificación de pacientes

Los participantes en el estudio se clasificaron como pacientes hematológicos y no hematológicos.

- a. Hematológicos:** se refiere a los pacientes que presentan una alteración de las líneas celulares del tejido sanguíneo (serie leucocitaria), de las que podemos mencionar como: leucemias, síndrome mielodisplásico, anemia, pancitopenia, etc.
- b. No hematológicos:** son aquellos que presentan una alteración del sistema inmunológico que conlleva una disfunción del tejido celular del tejido sanguíneo, de las que se puede mencionar infección de VIH, transplantes de órganos sólidos, entre otros.

4. Análisis estadístico

Se creó una base de datos a partir de los resultados de la prueba *Platelia Aspergillus* tabulando la información en el programa EpiInfo 7. Utilizando una estadística descriptiva se determinó la frecuencia absoluta de todos los datos demográficos y clínicos recopilados en las fichas epidemiológicas, así como el porcentaje de resultados positivos y negativos para antígeno de galactomanano en las muestras.

VIII. Resultados

En este estudio se incluyó un total de 48 pacientes que asistieron al HGSJD de los cuales se obtuvo un total de 118 muestras de suero, que fueron analizadas para determinar la presencia o ausencia de antígeno galactomanano. Dichos pacientes aceptaron participar firmando un consentimiento informado y cumpliendo con los criterios de inclusión del estudio.

Tabla 1

Características sociodemográficas de los pacientes con diagnóstico presuntivo de AI del HGSJDD

		Frecuencia	Porcentaje
Genero	Masculino	23	47.92%
	Femenino	25	52.08%
		48	100.00%
Grupo etario	14 a 17	8	16.67%
	18 a 35	13	27.08%
	36 a 60	20	41.67%
	61 en adelante	7	14.58%
		48	100.00%
Etnia	Maya	13	27.08%
	Mestizo	33	68.75%
	Garífuna	2	4.17%
		48	100.00%
Departamento de residencia	Guatemala	27	56.25%
	Izabal	3	6.25%
	Santa Rosa	1	2.08%
	San Marcos	1	2.08%
	Quetzaltenango	4	8.33%
	Jalapa	1	2.08%
	Chimaltenango	4	8.33%
	El progreso	1	2.08%
	Jutiapa	3	6.25%
	Suchitepéquez	1	2.08%
	Escuintla	1	2.08%
	Zacapa	1	2.08%
		48	100.00%

Fuente de datos: los generados en esta investigación

La frecuencia de pacientes provenientes del departamento de Guatemala constituyen más de la mitad de los pacientes estudiados 27 (56.25%). Así mismo 32 (66.67%) de los pacientes fueron clasificados como hematológicos. La mayoría pertenecían de la etnia mestizo 33 (68.75%), el grupo etario de mayor frecuencia era el comprendido entre los adultos de 36 y 60 años que corresponde a 20 (41.67%) y en relación al género la cantidad de pacientes tanto de masculino como femenino fue similar, 23 (47.92%) y 25 (52.08%) respectivamente. (Tabla No. 1)

La frecuencia de antígeno galactomanano obtenida por medio de la prueba Platelia™ *Aspergillus* EIA (BIORAD, Francia) mostró 20 pacientes con resultado positivo lo que corresponde al 41.66% de la población analizada. Así mismo la prueba mostró más resultados positivos en pacientes clasificados como hematológicos 13 (27.08%) comparados con los no hematológicos 7 (14.58%). (Tabla No.2)

Tabla 2

Frecuencia del antígeno galactomanano en pacientes con diagnostico presuntivo de AI

	Positivo, n (%)	Negativo, n(%)	Total
Hematológico	13 (27.08%)	14 (29.17%)	27
No Hematológico	7 (14.58%)	14 (29.17%)	21
Total	20 (41.67%)	28 (58.33%)	48

Fuente de datos: los generados en esta investigación

De los 27 pacientes hematológicos, 10 (20.84%) presentaban leucemia mielocítica aguda (LMA) y 8 (16.67%) con leucemia linfocítica aguda (LLA). De los pacientes con LMA 5 (10.42%) y de los pacientes con LLA 3 (6.25%) presentaban antigenemia para galactomanano; en cuanto a los pacientes no hematológicos, 7 (14.58%) fueron positivos, siendo VIH 2(4.17%) y síndrome neoplásico 2(4.17%) las enfermedades de base más frecuentes. (Tabla No. 3)

Tabla3

Frecuencia del antígeno galactomanano detectado según la enfermedad de base que presentaron los pacientes del HGSJD

		POSITIVO	%	NEGATIVO	%	TOTAL	%
Hematológico	Leucemia mielocítica aguda	5	10.42%	5	10.42%	10	20.83%
	Leucemia Linfocítica aguda	3	6.25%	5	10.42%	8	16.67%
	Leucemias sin clasificación	2	4.17%	3	6.25%	5	10.42%
	Síndrome Mielodisplásico	2	4.17%	0	0.00%	2	4.17%
	Anemia aplásica	1	2.08%	0	0.00%	1	2.08%
	Pancitopenia	0	0.00%	1	2.08%	1	2.08%
No hematológico	VIH	2	4.17%	2	4.17%	4	8.33%
	Síndrome Neoplásico	2	4.17%	2	4.17%	4	8.33%
	Otros	2	4.17%	4	8.33%	6	12.50%
	Trasplante	1	2.08%	2	4.17%	3	6.25%
	Sin diagnóstico presuntivo o factor de riesgo	0	0.00%	4	8.33%	4	8.33%
Totales		20	41.67%	28	58.33%	48	100.00%

Fuente de datos: los generados en esta investigación

IX. Discusión de resultados

Actualmente en Guatemala no existen estudios en los cuales se haya utilizado la prueba para la detección del Antígeno Galactomanano de *Aspergillus* spp. como un auxiliar en el diagnóstico de AI, razón por lo que esta investigación aplicó la prueba de Platellia.

Se reclutaron pacientes neutropénicos que asisten al HGSJD, con el objetivo de establecer la utilidad del método como un auxiliar en el diagnóstico presuntivo de A.I. Además se establecieron las características clínicas y sociodemográficas de los pacientes que participaron en el estudio y se determinó la frecuencia de la presencia del antígeno galactomanano.

En esta investigación no se incluyen pacientes pediátricos, ya que algunos autores resaltan el hecho que hay pocos estudios de pruebas diagnósticas de AI, debido a reacciones cruzadas dadas principalmente por factores dietéticos por lo que son poco útiles en comparación a la población adulta; La prueba de antígeno galactomanano podría ser evaluada en estas poblaciones, sola o en conjunto con los criterios de la EORTC/MSG, con un posible ajuste del índice que marca la antigenemia para mejorar el desempeño del diagnóstico temprano de AI en estos pacientes (Hummel, y otros, 2009).

A excepción del grupo de recién nacidos prematuros, la literatura no reporta asociación entre la edad y predisposición o desarrollo de AI. En nuestro estudio no se encontraron datos relevantes de frecuencia y/o porcentaje relacionados a los grupos etarios (Guarner & Brandt, 2011).

En este estudio se observó que no hay relación entre la frecuencia y/o porcentaje de antigenemia con la región geográfica de donde provienen los pacientes, reforzando el hecho que *Aspergillus* spp es ubicuo, encontrando de 0.2 a 1×10^6 conidios por metro

cúbico tanto en ambientes urbanos como rurales (Park & Mehrad, 2009). También debe mencionarse que el HGSJD es uno de los más grandes de la república, siendo un centro de referencia a nivel nacional que atiende población de todos departamentos, con lo cual se excluye un posible sesgo por no atender a un sector geográfico específico.

No encontramos datos que hagan referencia a la predisposición de desarrollar AI dependiendo del género y la etnia. En nuestro estudio no se hallaron datos relevantes de frecuencia y porcentaje al respecto.

La frecuencia de pacientes con antigenemia dentro del grupo de pacientes hematológicos comparado con el de no hematológicos es más elevada con un 27.08%. Esto concuerda con otros estudios los cuales mencionan que este grupo de pacientes tienen una alta predisposición a desarrollar AI (Dagenais & Keller, 2009).

De los 48 pacientes que participaron en este estudio, 23 (48%) de ellos presentaban leucemia como enfermedad de base y 13 (27.08%), independientemente de la clasificación de la leucemia, dieron resultados positivos para antígeno galactomanano. Este resultado correlaciona con el estudio realizado por Montserrat & Puig (2003) en donde se encontró que 75% de pacientes diagnosticados con leucemia y AI confirmada por medio de los criterios establecidos por EORTC/MSG presentaban antígeno galactomanano positivo.

El hecho que la mayoría de pacientes con antigenemia positiva para galactomanano sean pacientes clasificados como hematológicos concuerda con datos de otros autores que resaltan el alto porcentaje (29%) de incidencia de la AI en este tipo de pacientes, evidenciando el enorme riesgo que corren en comparación con pacientes que presentan otras patologías de base (transplante alogénico de medula 25%, trasplante de órgano sólido 9%, etc.) (Palacio, Cuétara, & Ponton, 2003) .

Dentro de las causas de infección nosocomial por hongos del género *Aspergillus* spp., que conlleva el riesgo de desarrollar AI, se debe considerar el ambiente hospitalario. Un estudio realizado por Juan Cobos López sobre la calidad de aire ambiental menciona que de las 200,000 especies de hongos, 12 especies provocan el 90% de las infecciones y de estas el 80% son causadas por *Aspergillus* spp., género del cual se encuentran mayores concentraciones en el aire, por ejemplo, cuando hay obras de construcción o remodelación dentro de las instalaciones de los hospitales. Otros medios importantes por los cuales se introduce o incrementa la concentración de hongos en los hospitales son la ropa, mercancías, flores, ropa de personal sanitario y familiares del paciente. Por ello nace y cobra importancia el concepto de bioseguridad fúngica, el cual se refiere a que un ambiente tenga niveles de contaminación por esporas fúngicas que hagan poco probable que los enfermos susceptibles se infecten por medio del aire (López, 2009).

La estandarización del diagnóstico de una infección fúngica en pacientes inmunocomprometidos es un desafío para los profesionales del área de salud pública. Por ello la EORTC/MSG ha implementado varios criterios para poder generar una clasificación sistemática que aporte certeza y rapidez en el diagnóstico (Pauw, y otros, 2008).

X. Conclusiones

1. La detección de antígeno galactomanano aporta suficiente indicio para instaurar un tratamiento temprano en pacientes con riesgo de desarrollar AI.
2. La principal característica clínica en pacientes neutropénicos de este estudio fue la leucemia como la enfermedad de base.
3. La antigenemia para galactomanano se presenta con mayor frecuencia en los pacientes neutropénicos con enfermedades hematológicas.
4. El género, grupo etario, etnia y lugar de residencia no tienen relevancia en el diagnóstico. presuntivo de AI.

XI. Recomendaciones

1. Continuar la investigación de AI por medio de equipos multidisciplinarios, en sectores públicos y privados, con el objetivo de determinar prevalencias e incidencias de esta patología a nivel nacional.
2. Realizar campañas de actualización y concientización sobre el diagnóstico de AI, para que se conozca el impacto de esta patología en los pacientes que ingresan a cualquier hospital o institución relacionada con la salud.
3. Llevar a cabo más estudios con el objetivo de evaluar la efectividad de diferentes metodologías para el diagnóstico de AI comparando estas con diagnósticos confirmados por medio de los criterios de EORTC/MSG.
4. Evaluar si el antígeno galactomanano tiene algún valor diagnóstico estableciéndola como prueba única en la detección de AI en poblaciones de Guatemala que asisten al HGSJD, fuera del protocolo establecido por la EORTC/MSG, modificando el punto de corte de la misma, tomando en cuenta diferentes variables como edad, género y patología base del paciente.

XII. Referencias

- Abarca, M. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, 79-84.
- Agarwal, R., & Chakrabarti, A. (2010). Manifestaciones Clínicas e Historia Natural de la Aspergilosis Broncopulmonar Alergica. *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*, 707-724.
- Alvarez, E. (2015). Utilidad de la prueba Aspergillus-LFD para el diagnóstico de aspergilosis: primera experiencia en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 117-119.
- Ascioglu, S., Rex, J., Pauw, B. d., Bennet, J. E., Bille, J., Crokaert, F., . . . Walsh, T. J. (2002). Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. *Clinical Infectious Diseases*, 7-14.
- Barnes, P., & Marr, K. (2006). Aspergillosis Spectrum of disease diagnosis and treatment. *Infectious Disease Clinics of North America*, 545-561.
- Bellanger, A., Millon, L., Khoufache, K., Rivollet, D., Bieche, I., Laurendeau, I., . . . Bretagne, S. (2009). Aspergillus fumigatus germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line. *Journal of Medical Microbiology*, 174-179.
- Besteiro, S. (2007). Utilidad clínica de la detección del antígeno galactomanano de Aspergillus en inmunosuprimidos. *Fundacion Dr. J.R. Villavicencio*(XV), 205-207.
- Bonnett, C., Cornish, E., Harmsen, A., & Burritt, J. (2006). Early neutrophil recruitment and aggregation in the murine lung inhibit germination of Aspergillus fumigatus conidia. *Infection and Immunity*, 6528-6539.
- Camblor, E., Veres, A., Camblor, J., Perez, L., & Paramio, M. (2007). Respuesta al tratamiento antiasmático convencional en aspergilosis broncopulmonar alérgica. *Pneuma*, 36-40.
- Canton, E., Garcia, J., Martin, E., Pemán, J., & Guinea, J. (2014). Métodos microbiológicos para el diagnóstico, manejo y estudio de la infección fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 375-379.
- Cercenado, E., Canton, R., Gadea, I., Cuenca, M., Martin, E., Peman, J., . . . Rodriguez, J. (2006). Diagnostico microbiologico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifungicos. *SEIMC*, 16-19.
- Chanzá, M., Fraile, M., Gimeno, C., & Ocete, M. (2014). Evaluación del antígeno galactomanano y la PCR en tiempo real de Aspergillus para el diagnóstico de aspergilosis invasiva. *Revista Española de Quimioterapia*, 43-45.

- Chiang, L., Sheppard, D., & Filler, S. (2008). Aspergillus fumigatus Stimulates Leukocyte Adhesion Molecules and Cytokine Production by Endothelial Cells In Vitro and during Invasive Pulmonary Disease. *American Society for Microbiology: infection and immunity*, 3429-3438.
- Cornet, M., Fleury, L., Maslo, C., Bernard, J., & Brucker, G. (2002). Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area. *The journal of hospital infection*, 288-296.
- Crameri, R., Glaser, A., Vilhelmsson, M., Zeller, S., & Rhyner, C. (2010). Overview of Aspergillus Allergens. En A. Paqualotto, *Aspergillosis: from diagnosis to prevention* (págs. 655-665). York, Londres: Springer.
- Cuellar Rodriguez, J., & Sierra Madero, J. (2005). Infecciones en pacientes sometidos a trasplantes de órgano sólido. *Revista de investigacion clinica*, 57; 368-380.
- Cuenca, M. (2012). Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 257-264.
- Cuervo Maldonado, S. I., Gomez Rincon, J. C., Rivas, P., & Guevara, F. O. (2010). Actualización en Aspergilosis con énfasis en Aspergilosis invasora. *Infectio*, 131-144.
- Dagenais, T. R., & Keller, N. P. (2009). Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 447-465.
- Denning, D. W., Ribaud, P., Milpied, N., Caillot, D., Herbrecht, R., Thiel, E., . . . Lode, H. (2002). Efficacy and Safety of Voriconazole in the Treatment of Acute Invasive Aspergillosis. *Oxford Journals: Clinical Infectious Diseases*, 34(5), 563-571.
- Filler, S., & Sheppard, D. (2006). Fungal Invasion of Normally Non-Phagocytic Host Cells. *PLOS Pathogens* .
- Fisher, C., Stevens, A. M., Leisenring, W., Pergam, S. A., Boeckh, M., & and Hohl, T. (2013). The Serum Galactomannan Index Predicts Mortality in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients With Invasive Aspergillosis. *Oxford Journal*, 1001-1004.
- Fortún, J., Meije, Y., Fresco, G., & Moreno, S. (2012). Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(4), 201-208.
- Gangneux, J. -P., Camus, C., & Philippe, B. (2010). Épidémiologie et facteurs de risque de l'aspergillose invasive du sujet non neutropénique. *Maladies Respiratoires*, 34-46.
- Gavalda, J., Meije, Y., Len, O., & Pahissa, A. (2012). Infección fúngica invasora en el trasplante de órgano sólido. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 645-653.

- Giacchino, M., Chiapello, N., Bezzio, S., & Fagioli, F. y. (2006). Aspergillus galactomannan Enzyme-Liked Immunosorbent Assay Cross-reactivity Caused by Invasive Geotrichum capitatum. *Journal of Clinical Microbiology*, 3432-3434.
- Guarner, J., & Brandt, M. E. (2011). Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections in the 21st Century. *Clinical Microbiology Reviews*, 247-280.
- Hadrich, I., Makni, F., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Amouri, I., Sellami, H., . . . Ayadi, A. (2012). Clinical utility and prognostic value of galactomannan in neutropenic patients with invasive aspergillosis. *Phatologie Biologie*, 357-361.
- Hummel, M., Spiess, B., Roder, J., von Komorowski, G., Durken, M., Kentouche, K., . . . Buchheidt, D. (2009). Detection of Aspergillus DNA by a nested PCR assay is able to improve the diagnosis of invasive aspergillosis in paediatric patients . *Journal of Medical Microbiology*, 1291-1297.
- Kauffman, C., & Nicolasora, N. (2010). Epidemiology of Invasive Pulmonary Aspergillosis. En A. Pasqualotto, *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention* (págs. 329-339). Brasil: Springer.
- Kauffman, C., & Nicolasora, N. (2010). Epidemiology of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*, 329-339.
- Kauffman, C., Pappas, P., Sobel, J., & Dismukes, W. (2011). Essentials of Clinical Mycology. *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*, 465-496.
- Koo, S., Bryar, J., Baden, L., & Marty, F. (2010). Prognostic Features of Galactomannan Antigenemia in Galactomannan-Positive Invasive Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1255-1260.
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G., Wang, F., Muller, W., Dijksterhuis, J., & Wosten, H. (2013). Development in Aspergillosis. *Studies in Micology*, 1-29.
- Labanore, M., Sighinolfi, L., & Ghinelli, F. (2010). Invasive Aspergillosis and HIV infection. En A. Pasqualotto, *Aspergillosis: from diagnosis to prevention* (págs. 559-569). York: Springer.
- Lionakis, M., & Kontoyiannis, D. (2003). Glucocorticoids and invasive fungal infections. *The Lancet*, 1828-1838.
- Lopez, C., Garcia, C., Laporta, R., & Usseti, P. (2011). Traqueobronquitis aspergilar en paciente sometido a trasplante pulmonar. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 129-133.
- López, J. C. (2009). *Gestion de la calidad del aire ambiental en el Hospital Universitario de Guadalajara y su implicacion en la infeccion hospitalaria*. Universidad de Alcalá. Hospital Universitario de Guadalajara. Guadalajara: CONAMA.

- Lumbreras, C., & Gavaldá, J. (2003). Aspergilosis invasora: manifestaciones clínicas y tratamiento. *Revista iberoamericana de micología*(20), 79-89.
- Mambula, S., Sau, K., Henneke, P., Golenbock, D., & Levitz, S. (2002). Toll-like Receptor (TLR) Signaling in Response to *Aspergillus fumigatus*. *The journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39320-39326.
- Montserrat, R. T., & Puig, J. d. (2003). Detección de Antígeno galactomanano de *Aspergillus* en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 111-115.
- Moragues, M., Amutio, E., Garcia Ruiz, J., & Pontón, J. (2003). Utilidad de la detección de galactomanano en el diagnóstico y seguimiento de la aspergilosis invasora en pacientes hematológicos. *Iberoam Micol*(20), 103-110.
- Mortensen, K. L., Jensen, R. H., Johansen, H. K., Skov, M., Pressler, T., Howard, S. J., . . . Arendrup, M. C. (2011). *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with Cystic Fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* Azole resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 2243-2251.
- Nauseef, W. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunology*, 88-102.
- Netea, M. G., Warris, A., van der Meer, J., Fenton, M., Verver-Jansen, T., Jacobs, L., . . . Kullberg, B. (2003). *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of Toll-Like receptor-4-mediated signal transduction. *Journal of Infectious Diseases*, 320-326.
- Oliveira, M., & Caranhalho, R. (2014). *Aspergillus fumigatus*: a mere bioaerosol or a powerful biohazard? *NACC, Universidad de Santiago de Compostela*, 57-64.
- Palacio, A. d., Cuétara, M. S., & Pontón, J. (2003). El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. *Revista Iberoamericana de Micología* , 90-98.
- Palacio, A., Cuétara, M. S., & Ponton, J. (2003). El Diagnóstico de Laboratorio de la Aspergilosis Invasora. *Iberoamericana de Micología*, 90-98.
- Park, S., & Mehrad, B. (2009). Innate Immunity to *Aspergillus* Species. *Clinical Microbiology Reviews*, 535-551.
- Park, S., Lee, S., Choi, S., Jeong, J., Sung, H., Kim, M. N., . . . Woo, J. (2015). Serum and Bronchoalveolar Lavage Fluid Galactomannan Assay in patients with Pulmonary Aspergilloma. *Oxford Journals; Clinical Infection Diseases*, 149-152.
- Pasqualotto, A. C. (2010). Aspergillosis in Surgical Patients. *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*, 505-508.

- Patterson, T. (2015). *Aspergillus* species. En j. Bennett, R. Dolin, & M. Blaser, *Principles and practice of Infection Diseases* (octava ed., pág. 2899). Philadelphia, Estados Unifod: ELSevier.
- Pauw, B., Walsh, T. J., Donnelly, J. P., Stevens, D. A., Edwards, J. E., Calandra, T., . . . Bille, J. (2008). Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institue of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) . *Clinical Infectious Diseases*, 1813-1821.
- Pemán, J. (2000). Diagnóstico de la aspergilosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, 90-92.
- Peman, J., & Salavert, M. (2011). Epidemiología general de la enfermedad fungica invasora. *Enfermedades Infeccioasas y Microbiología Clínica* , 90-98.
- Ponton, J., & Cabañes, F. (2000). *Aspergillus* y aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, 77-78.
- Sherif, R., & Segal, B. (2010). Pulmonary Aspergillosis: clinical presentation, diagnostic test, management and complications. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 242-250.
- Shi, L.-n., Li, F.-q., Huang, M., & Lu, J. F. (2012). Immunoproteomics based identification of thioredoxin reductase GliT and novel *Aspergillus fumigatus* antigens for serologic diagnosis of invasive aspergilosis. *BMC Microbiology*, 11.
- Silva, L., Orzechowski, M., de Mattos, F., & Severo, L. (2010). Chronic Cavitary Pulmonary Aspergillosis and Fungal Balls. En A. Pasqualotto, *Aspergollosis: from diagnosis to prevention* (pág. 591). York, Londres: Springer.
- Taylor, R., & Keller, N. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *American Society for Microbiology: Clinical microbiology reviews*, 447-465.
- Torelli, R., Sanguinetti, M., Moody, A., & Pagano, L. y. (2011). Diagnosis of Invasive Aspergillosis by a commercial Real-Time PCR Assay for *Aspergillus* DNA in Bronchoalveolar Lavage FLuid Samples from High Risk patients compared to a Galactomannan Enzyme Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 4273-4278.
- Vallejo, C., & Ruiz, I. (2012). Infección fúngica invasora en los pacientes hematológicos. *Enfermedades Infecciosas y Mocrobiolgia Clinica*, 572-579.
- Werner, J., Metz, A., Horn, D., Schoeb, T., Hewit, M. M., Schwiebert, L., . . . Steele, C. (2009). Requisite role for the dectin-1 beta glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Immunology*, 4938-4946.

- Wheat, L. J., Hackett, E., Durkin, M., Connolly, P., Petraitiene, R., Walsh, T., . . . Hage, C. (2007). Histoplasmosis associated cross-reactivity in the Bio-Rad Platelia Aspergillus enzyme immunoassay. *Clinical and Vaccine Immunology*, 638-640.
- White, P., Parr, C., Thornton, C., & Barnes, R. (2013). Evaluation of Real-Time PCR, Galactomannan Enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA), and a novel Lateral-Flow Device for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1510-1516.
- Wheat, L. J., Hackett, E., Durkin, M., Connolly, P., Petraitiene, R., Walsh, T., . . . Hage, C. (2007). Histoplasmosis associated cross-reactivity in the Bio-Rad Platelia Aspergillus enzyme immunoassay. *Clinical and Vaccine Immunology*, 638-640.

César Roberto Dávila Ruiz
Autor

César Augusto Tzoc Xicay
Autor

Juan José Donis Pedroza
Autor

Licda. María Luisa García de López
Asesor

Lic. César Roberto Conde Pereira
Co Asesor

Licda. Margarita Paz
Revisor

MSc. Alba Marina Valdés de García
Directora de escuela de Química Biológica

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
Decano