

¿Qué podemos esperar de las nuevas técnicas de diagnóstico micológico de la aspergilosis invasora?

Detección de antígenos (ELISA: Platelia *Aspergillus*®)

**Amalia del Palacio
M^a Soledad Cuétara
Carmen Pazos**

©2003 Revista Iberoamericana de Micología

Puesto que los procedimientos microbiológicos tradicionales para establecer el diagnóstico de la aspergilosis invasora son tardíos y de poca rentabilidad, se han desarrollado una serie de marcadores de enfermedad invasora por *Aspergillus* spp. que permiten realizar un diagnóstico de forma precoz que conlleva la posibilidad de establecer un tratamiento anticipado.

Desde hace 20 años se conoce la presencia de más de 100 componentes antigénicos en el suero de enfermos con aspergilosis invasora, siendo el marcador de mayor utilidad diagnóstica el galactomanano. El galactomanano es un componente de la pared celular del género *Aspergillus*, siendo el principal exoantígeno liberado durante la angioinvasión [1]. En enfermos con aspergilosis invasora el galactomanano puede ser detectado en suero, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pericárdico/pleural y lavado broncoalveolar. Las concentraciones de galactomanano en suero son fluctuantes, y aunque no se conoce con exactitud su cinética, se sabe que en su aclaración intervienen las células de Kupffer [1,2].

Aspectos técnicos del Platelia *Aspergillus*®

Actualmente se utiliza un ELISA de doble sándwich que emplea un anticuerpo monoclonal de rata EBA-2 dirigido contra el galactomanano de *Aspergillus* que es utilizado como captor y detector del antígeno. Esta prueba está comercialmente disponible en Europa y desde hace un mes en EE.UU. denominándose Platelia *Aspergillus*® (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, Francia). Es una técnica sencilla, reproducible y rápida (aproximadamente 4 horas) cuyo punto crítico radica en el tratamiento del suero con calor en presencia de EDTA, para disociar los inmunocomplejos y precipitar las proteínas séricas que podrían interferir con el ELISA. El límite de detección es de 0,5-1 ng/ml [1].

Definición de galactomanano positivo

Se considera que la prueba es positiva cuando se obtienen al menos dos determinaciones consecutivas positivas, siendo el punto de corte inicialmente recomendado en suero de $\geq 1,5$ ng/ml en Europa, mientras que en EE.UU. la misma casa comercial recomienda 0,5 ng/ml. Como consecuencia práctica de esto será difícil extrapolar los resultados acumulados. Es destacable que la definición del punto de corte está en evolución y no se ha llegado todavía a un consenso.

La opinión más extendida es que la rentabilidad del galactomanano parece estar ligada a la obtención prospectiva y regular de suero (generalmente dos veces por semana) coincidiendo con el periodo en que el enfermo tiene más riesgo de desarrollar una aspergilosis invasora. Incluso este punto es debatido: se ha llegado a proponer el muestreo diario de suero debido a que no se conoce con exactitud el perfil de liberación del antígeno.

**Utilidad diagnóstica práctica:
sensibilidad, especificidad,
valor predictivo positivo,
valor predictivo negativo**

En pacientes neutropénicos adultos, estratificados como de alto riesgo de desarrollar una aspergilosis invasora, es donde el galactomanano es de gran utilidad diagnóstica [3] (Tabla 1).

Tabla 1. Pacientes neutropénicos adultos de alto riesgo [3]

- ◆ < 100 neutrófilos/mm³ > 3 semanas
- ◆ Trasplante de médula ósea no relacionado
- ◆ Enfermedad Injerto contra huésped
- ◆ Neutropenia < 500 neutrófilos/mm³ > 5 semanas
- ◆ Corticosteroides > 2 mg/kg > 2 semanas
- ◆ Corticosteroides > 1 mg/kg con neutropenia
- ◆ AraC a altas dosis
- ◆ Fludarabina
- ◆ Alemtuzumab

©2003 Revista Iberoamericana de Micología

En población pediátrica, receptores de trasplante de órgano sólido, SIDA, enfermedad granulomatosa crónica, neoplasias de órgano sólido y grandes quemados, el galactomanano no tiene utilidad diagnóstica.

La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la detección de galactomanano en varios estudios se describe en la [tabla 2](#).

Tabla 2. Estudios prospectivos de aspergilosis invasora mediante detección de galactomanano con Platelia *Aspergillus*®

	Maertens <i>et al.</i> [4]	Maertens <i>et al.</i> [5]	Sulahian <i>et al.</i> [6]
Punto de corte (Nº de pruebas positivas)	1 (2)	1 (2)	1,5 (2)
Aspergilosis invasora (probada+probable) (n)	33	39	53
Sensibilidad (%)	93	90	91
Especificidad (%)	95	98	94
VPP ¹ (%)	93	87	ND ³
VPN ² (%)	95	98	ND
Falsos positivos (%)	8	14	12
Precocidad días (%)	6 (54)	5 (68)	7 (40)
Eficacia global (%)	94	95	ND

¹ VPP: Valor predictivo positivo
² VPN: Valor predictivo negativo
³ ND: sin datos

Conviene resaltar que cuando se utiliza una prueba de *screening* es de suma importancia la incidencia de la enfermedad que se quiere diagnosticar, especialmente cuando la incidencia es baja como sucede con la aspergilosis invasora. La incidencia es decisiva en el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo como muestra la [tabla 3](#).

Es importante señalar que la sensibilidad del galactomanano de *Aspergillus* es más elevada en los enfermos con aspergilosis invasora probada, que en los que tienen aspergilosis invasora probable y, por supuesto, que en los que tienen aspergilosis invasora posible.

En cambio, el galactomanano puede ser detectado en el suero en un estadio inicial de la infección, generalmente antecede a la aparición de signos y síntomas clínicos e incluso a la aparición de anomalías radiológicas que sugieren el diagnóstico

Tabla 3. Valores predictivos positivo y negativo de detección de antígeno de *Aspergillus* por el método Platelia *Aspergillus*® [7]

Incidencia de aspergilosis invasora (%)	VPP ¹ (%)	VPN ² (%)
0,5	10	95,4
5	50	95,7
10	69	95,6
20	84	97,5

¹ VPP: Valor predictivo positivo
² VPN: Valor predictivo negativo

de aspergilosis invasora [4-5,7,8]. Incluso, es destacable que el título de antígeno de galactomanano se corresponde con la evaluación clínica de la enfermedad [7,8] y es una herramienta útil también en la monitorización de la terapéutica antifúngica y puede incluso predecir la respuesta a la misma, ya que el aumento de galactomanano (≥ 1 ng/ml) sobre el valor basal en la primera semana de tratamiento predice el fallo terapéutico con una sensibilidad del 44%, un especificidad el 87% y un valor predictivo positivo del 94% [9]. De modo que también sirve para modificar el tratamiento o añadir una segunda droga antifúngica con el objeto de potenciar o mejorar la eficacia del antifúngico que inicialmente se hubiese elegido [9].

La **figura 1** muestra la cinética de la antigenemia de galactomanano en un paciente neutropénico que presentó mortalidad atribuible a aspergilosis invasora a pesar del tratamiento profiláctico y terapéutico con anfotericina B.

En cambio, la **figura 2** muestra la evolución del galactomanano en un paciente neutropénico con aspergilosis invasora con respuesta satisfactoria clínica y radiológica tras el tratamiento antifúngico con anfotericina B.

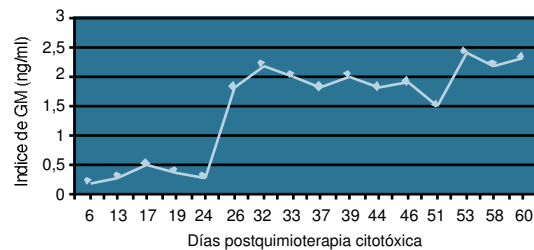


Figura 1. Cinética de la antigenemia de galactomanano en un paciente neutropénico que presentó mortalidad atribuible a aspergilosis invasora y no respondió al tratamiento con anfotericina B.

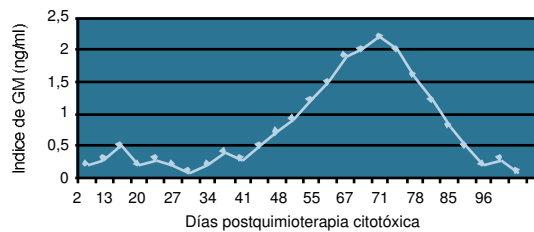


Figura 2. Cinética de la antigenemia de galactomanano en un paciente neutropénico con aspergilosis invasora con respuesta satisfactoria clínico-radiológica tras el tratamiento con anfotericina B.

El mismo grado de respuesta antigenémica puede observarse con otros antifúngicos como se observa en un paciente neutropénico con síndrome mielodisplásico con aspergilosis invasora y buena evolución clínico-radiológica tras la terapia antifúngica con voriconazol (Figura 3).

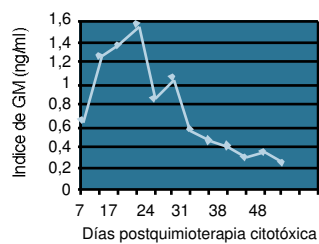


Figura 3. Cinética de la antigenemia de galactomanano en un paciente neutropénico con síndrome mielodisplásico y aspergilosis invasora que mostró buena respuesta clínico-radiológica tras el tratamiento con voriconazol.

¿Existen falsos positivos y falsos negativos con el Platelia *Aspergillus*?

Un aspecto importante para conocer la utilidad de una prueba diagnóstica es el análisis de los resultados falsos negativos o positivos. La tasa de falsos negativos del Platelia *Aspergillus*® oscila entre el 8% y el 10% [4,5,10,11], mientras que la tasa de falsos positivos oscila entre el 8% y el 14% [5,7,12-15] (Tabla 4).

Tabla 4. Factores causales de falsos (-) y falsos (+) en la detección de galactomanano

Falsos (-)

- Encapsulación de la infección
- Formación de inmunocomplejos por anticuerpos anti-*Aspergillus*
- Población no seleccionada

Falsos (+)

- Población pediátrica
- Receptores de trasplante de médula ósea
- Enfermedad injerto contra huésped
- Ciclofosfamida
- Mucositis intensa (coexistencia con ingesta de cereales, leche maternizada)
- Infección por *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Alternaria* y *Candida*
- Colonización masiva intestinal por *Aspergillus*
- Bacteriemias
- Transfusiones
- Piperacilina-Tazobactam

En la práctica clínica la positividad de dos galactomananos en población de alto riesgo obliga a la instauración de tratamiento antifúngico (terapia anticipada), puesto que este dato sería indicativo de

infección. La evolución clínica, radiológica, antigenémica, conjuntamente con los datos proporcionados por la biología molecular (PCR) permitirían probar la aspergilosis invasora.

En poblaciones de pacientes con menor inmunosupresión, hasta un 36% de enfermos tienen anticuerpos anti-*Aspergillus*, que por formar inmunocomplejos, ocasionarían falsos negativos, disminuyendo la sensibilidad de la técnica: incluso se ha llegado a plantear la necesidad de realizar conjuntamente pruebas serológicas para antígenos y anticuerpos en enfermos con sospecha de aspergilosis invasora [11].

Galactomanano: Incógnitas por resolver

A pesar del conocimiento actual sobre la utilidad diagnóstica del galactomanano existen una serie de incógnitas pendientes de resolver:

- ◆ Puesto que la cinética de galactomanano *in vivo* no es completamente conocida y los datos sobre el perfil de liberación de galactomanano son insuficientes, ¿habría que hacer la determinación prospectiva de galactomanano más frecuentemente?, ¿incluso a diario?
- ◆ ¿Existe relación entre el lugar anatómico donde asienta la infección y la liberación de galactomanano al torrente circulatorio?
- ◆ Puesto que la sensibilidad de la detección de galactomanano se reduciría por la presencia de anticuerpos anti-*Aspergillus*, ¿habría que hacer simultáneamente detección de galactomanano prospectivo y de anticuerpos en los pacientes menos inmunodeprimidos?
- ◆ ¿Qué se entiende por un galactomanano positivo?: ¿un solo resultado positivo o al menos dos resultados positivos?
- ◆ ¿Qué punto de corte debemos elegir?: ¿1,5?, ¿1,2?, ¿1?, ¿0,7?, ¿0,5?

- ◆ ¿La utilización de antifúngicos activos frente a *Aspergillus* en quimioprofilaxis (voriconazol, itraconazol, anfotericina B) obligarían a elegir un punto de corte de 0,5?
- ◆ ¿Qué significan los galactomananos falsos positivos?
- ◆ ¿Qué son y a qué se deben los galactomananos falsos negativos?
- ◆ Puesto que está sin definir la utilidad del galactomanano prospectivo en poblaciones no neutropénicas, ¿qué utilidad tiene en otros grupos de enfermos como receptores de trasplante de órgano sólidos, población pediátrica, SIDA, enfermedad granulomatosa crónica, tumores de órgano sólido, etc?
- ◆ ¿Es la detección de galactomanano un buen marcador terapéutico?
- ◆ ¿El tratamiento antifúngico previo (quimioprofilaxis) decapitaría la infección por *Aspergillus*? En este sentido un solo galactomanano positivo coincidiendo con periodos de máxima neutropenia e inmunosupresión podría no ser un falso positivo, sino una antigenemia transitoria.
- ◆ ¿Existe reactividad cruzada con bacterias y hongos?
- ◆ Recordad siempre, en cualquier caso que la sensibilidad del galactomanano de *Aspergillus* es más elevada en enfermos con aspergilosis invasora probada, que en los que tienen aspergilosis invasora probable y que por supuesto en aspergilosis invasora posible según los criterios conjuntos de la *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) y el *Mycoses Study Group del National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) [16].

Tened presente que la máxima utilidad de la detección de galactomanano de *Aspergillus* es actualmente en poblaciones neutropénicas consideradas de alto riesgo según los criterios de Prentice *et al.* [3] y en las que la incidencia de la aspergilosis invasora es elevada [7] con lo que los valores predictivo positivo y negativo son asimismo elevados.

Referencias

1. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 310-350.
2. Denning DW. Early diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet 2000; 355: 423-424.
3. Prentice HG, Kibbler CC, Prentice AG. Towards a targeted, risk based, antifungal strategy in neutropenic patients. Br J Haematol 2000; 110: 273-284.
4. Maertens J, Verhaegen J, Demuyne H, *et al.* Autopsy – controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis. J Clin Microb 1999; 37: 3223-3228.
5. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, *et al.* Screening for circulating galactomannan as a non-invasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. Blood 2001; 97: 1604-1610.
6. Sulahian A, Boutboul, Ribaud P, *et al.* Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4 year prospective study. Cancer 2001; 91: 311-318.
7. Klont RR, Meis JFG, Verweij PE. Critical assessment of issues in the diagnosis of invasive aspergillosis. Clin Microbiol Infect 2001; 7 (Suppl. 2): 32-37.
8. Verweij PE, Dompeling EC, Donnelly JP, *et al.* Serial monitoring of *Aspergillus* antigen in the early diagnosis of invasive aspergillosis. Preliminary investigations with two examples. Infection 1997; 25: 86-89.
9. Boutboul F, Alberti C, Leblanc T, *et al.* Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease. Clin Infect Dis 2002; 34: 939-943.

10. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, *et al.* Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogenic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis* 2002; 186: 1297-1306.
11. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, *et al.* *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1898-1906.
12. Siemann N, Koch-Dorfler M, Gaude M. False positive results in premature infants with the Platelia *Aspergillus* sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycoses* 1998; 41: 373-377.
13. Swanink CM, Meis JF, Rijs AJ, *et al.* Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus* galactomannan. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 257-260.
14. Kami M, Kanda Y, Ogawa S, *et al.* Frequent false –positive results of *Aspergillus* latex agglutination test: transient *Aspergillus* antigenemia during neutropenia. *Cancer* 1999; 86: 274-281.
15. Hamaki T, Kami M, Kanda Y, *et al.* False – positive results of *Aspergillus* enzyme – linked immunosorbent assay in a patient with chronic graft – versus – host disease after allogenic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 633-634.
16. Ascioğlu S, de Paw B, Bennett JE, *et al.* Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 7-14.