

Mercedes Chanzá¹
M^a Teresa Fraile¹
Concepción Gimeno^{1,2}
M^a Dolores Ocete¹

Evaluación del antígeno galactomanano y la PCR en tiempo real de *Aspergillus* para el diagnóstico de aspergilosis invasiva

¹Servicio de Microbiología. Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

²Facultad de Medicina. Departamento de Microbiología. Universidad de Valencia

RESUMEN

Introducción. Comparar las pruebas de antígeno galactomanano (AG) y moleculares (PCRrt) con el cultivo para el diagnóstico de aspergilosis invasiva (AI).

Material y métodos. Se analizaron 472 muestras: 388 respiratorias, 84 sueros, de 271 pacientes. En las respiratorias se realizó cultivo y AG y en los sueros AG. En caso de discordancia entre ellas se realizó PCR.

Resultados. El AG resultó positivo en 22 sueros de 84, 21 tenían esta prueba positiva en muestra respiratoria. De 62 sueros con AG negativo, 45 fueron también negativas en muestras respiratorias. El cultivo fue positivo en 37, coincidiendo todas con AG positivo. Comparando cultivo con AG, éste mostró un VPP= 23%, VPV=100%, S= 100% y E=52%. La PCRrt respecto al cultivo mostró un VPP= 69%, VPV= 89%, S= 64% y E= 82%. En los sueros entre AG y PCR encontramos 60% de discrepancias.

Conclusiones. Consideramos muy útil la detección de AG en suero combinada con cultivo y AG en muestras respiratorias para el diagnóstico de AI, precisando PCRrt más estudios para su estandarización y establecer puntos de corte.

Palabras clave: Aspergilosis invasiva. Antígeno galactomanano. PCR *Aspergillus*

Evaluation of galactomannan antigen and *Aspergillus* real time PCR for diagnosis of Invasive Aspergilosis

ABSTRACT

Introduction. The aim of the study was to compare the galactomannan antigen (GA) and molecular biology(PCRrt)

tests with the culture in the diagnosis of invasive aspergilosis (IA).

Material and methods. Four hundred and seventy two samples were analyzed: 388 respiratory and 84 serum samples from 271 patients. Culture and GA were evaluated in the respiratory samples and GA in the serum samples. PCR was used when discrepancies were observed among culture and GA tests.

Results. The detection of GA in serum was positive in 22 (of 84), 21 had the test positive respiratory sample. Of the 62 sera with negative GA, 45 were also negative respiratory specimens. The culture was positive in 37 of which were positive for GA. Comparing culture with AG, it showed PPV=23%, NPV=100%, S=100% and E=52%. The PCR showed respect to culture: PPV=69%, NPV=89%, S=64% and E=82%. In sera were found in 60% discrepancies between PCRrt and GA.

Conclusions. We consider useful the GA detection in serum combined with culture and GA in respiratory samples, for diagnosis of AI. PCR requires further studies for standardization and set breakpoints

Keywords: Invasive Aspergilosis. Galactomannan antigen. PCR *Aspergillus*

INTRODUCCIÓN

Se denomina aspergilosis a todas aquellas infecciones fúngicas producidas por diversas especies del género *Aspergillus*, siendo *Aspergillus fumigatus* la más frecuente, causando infecciones, a veces invasivas, que suponen un reto terapéutico¹.

La gravedad y penetración de esta infección fúngica varía en función del estado inmune de los pacientes, fundamentalmente de la neutropenia, describiéndose también en pacientes inmunocompetentes². En los últimos años se ha visto, cada vez con más frecuencia, asociada a otras patologías de base como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) relacionada con la terapia continuada o de altas dosis de corticoides³. Actualmente, entre el 30% y 50% de casos de aspergilosis invasiva (AI) se diagnostican en pacientes no neutropénicos⁴.

La elevada mortalidad de la AI puede ser superior al 50%, lo que hace necesario un diagnóstico, lo más rápido posible, ya

Correspondencia:
Mercedes Chanzá
Consorcio Hospital General Universitario de Valencia
Av. Tres cruces s/n. 46014 Valencia
E-mail: chanza_mer@gva.es

que el momento de actuación es crítico para la resolución del mismo. La prueba del antígeno galactomanano (AG) complementa las limitaciones microbiológicas en el diagnóstico de estos pacientes⁵⁻⁷.

Otra herramienta diagnóstica es la detección de ácidos nucleicos cuya aplicabilidad requiere más estudios y una mejor estandarización técnica⁶.

En los pacientes críticos córtico-dependientes con aspergilosis, la sensibilidad del AG en suero es < 50% pero en el lavado broncoalveolar puede superar el 90%³.

Actualmente la cinética de la antigenemia se usa como recurso para valorar la respuesta terapéutica², ya que los índices de AG se correlacionan con la carga fúngica en los tejidos.

La mayoría de autores coinciden en que un AG $\geq 0,5$ en dos sueros consecutivos aumenta la especificidad y el valor predictivo positivo de la prueba. Si se realiza una única determinación serológica un índice de AG $\geq 0,7$ puede ser considerado como positivo. Si la muestra es lavado broncoalveolar el punto de corte de positividad del índice varía según autores de 0,5 a 1. En el caso de muestras respiratorias la especificidad de esta prueba se incrementaría al aumentar este índice⁸.

La intención de este estudio es evaluar la utilidad del AG, valorando los índices que se consideran positivos para muestras respiratorias, comparando los resultados obtenidos en las muestras de suero y relacionándolos con el cultivo y la técnica de PCR en tiempo real (PCRrt), con el objetivo de establecer un protocolo de diagnóstico precoz en los pacientes con sospecha clínica o de riesgo y también para realizar el seguimiento evolutivo de la infección por *Aspergillus* spp.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron prospectivamente, a lo largo de 8 meses, 472 muestras de 271 pacientes adultos con clínica compatible con infección fúngica o en situación de riesgo, procedentes de los servicios de: Unidad de Infecciosos (22 muestras de 19 pacientes), Neumología (187 muestras de 135 pacientes), Oncología y Hematología (22 muestras de 12 pacientes) y Unidad de Cuidados Críticos (241 muestras de 105 pacientes).

Las muestras remitidas para el estudio fueron:

- 388 muestras respiratorias: 104 esputos, 263 broncoaspirados (BAS) y 21 lavados broncoalveolares (BAL).
- 84 muestras de suero.

Las muestras respiratorias fueron procesadas para cultivo de hongos, detección de AG y de DNA fúngico por PCRrt. En los sueros se realizaron el AG y PCRrt.

El AG se determinó mediante la prueba de Platelia *Aspergillus* (Bio-Rad Ref 62794), según recomendaciones del fabricante. Un índice <0,5 se considera negativo. Si el índice es $\geq 0,5$, indica un resultado positivo.

Tabla 1		Relación de los resultados de la prueba antígeno galactomanano en sueros y muestras respiratorias			
		Antígeno galactomanano			
Suero		Muestras respiratorias			
Positivo: índice $\geq 0,5$	22	Positivas:	índice	Negativas:	índice
		6	0,5-1	1	< 0,5
		15	> 1		
		Índice de Kappa= 0,9			
Negativo: índice < 0'5	62	Positivas:	índice	Negativas:	índice
		8	0,5-1	45	< 0,5
		9	> 1		
		Índice de Kappa = 0,7			

Tabla 2		Resultados de las pruebas antígeno galactomanano y PCR frente al cultivo de <i>Aspergillus</i> spp.	
		Antígeno galactomanano	PCR
Valor predictivo positivo		23 %	69 %
Valor predictivo negativo		100 %	89 %
Sensibilidad		100 %	64 %
Especificidad		52 %	82 %

El diagnóstico molecular se basa en la detección del DNA genómico de *Aspergillus* mediante PCRrt. Para la detección cualitativa de ADN en muestras respiratorias y de suero se utilizó *Aspergillus* Q-PCR. NANOGEN® y el equipo SmartCyclerR (Myconostica).

El estudio estadístico de precisión de las pruebas diagnósticas se basó en determinar el valor predictivo positivo y negativo así como la sensibilidad y especificidad de las pruebas de AG y PCRrt tomando como patrón el cultivo de hongos.

También se aplicó el índice Kappa para evaluar la concordancia del AG entre las muestras de suero y respiratorias.

RESULTADOS

La detección de AG en suero resultó positiva en 22 muestras, de las que 21 tenían esta prueba positiva (6 con índices entre 0,5-1 y 15 > 1), mostrando una concordancia de 0.9; siendo negativa esta prueba en 1 de las muestras respiratorias.

De las 62 muestras de suero con AG negativo, 45 resultaron también negativas para AG en muestras respiratorias y en 17 esta prueba fue positiva (8 con índices 0,5-1 y 9 >1), mostrando una concordancia de 0.7 (tabla 1).

En cuanto al cultivo las muestras respiratorias para *Aspergillus* spp. éste fue positivo en 37 de un total de 229, todas ellas con AG positivo.

Considerando el cultivo como prueba patrón, la determinación de AG en muestras respiratorias mostró un valor predictivo positivo (VPP) del 23%, valor predictivo negativo (VPN) del 100%, una sensibilidad del 100% y una especificidad del 52%.

Comparando los resultados de la PCRrt con el cultivo se obtuvo un VPP de 69%, VPN del 89%, sensibilidad del 64% y especificidad 82% (tabla 2).

DISCUSION

Ante nuestros resultados y, aunque algunos autores⁸ consideran AG positivo en muestra respiratoria con un índice $\geq 0,9$, pensamos que se debe realizar la prueba de AG en suero, siempre que aparezca un índice $\geq 0,5$ en muestra respiratoria, con el fin de realizar un seguimiento que nos lleve a un diagnóstico precoz en caso de AI.

Según Perfect et al.⁹ el cultivo positivo para *Aspergillus* spp se asocia con AI en 50-64% de los casos de pacientes con riesgo elevado.

En nuestro estudio al comparar el resultado del cultivo con el AG en muestras respiratorias obtuvimos una sensibilidad para esta última del 100% y una especificidad del 52% lo que convierte a esta prueba en una buena herramienta para la detección temprana de esta infección.

Cuando se produce disparidad en los resultados mediante estos métodos, cultivo y AG, o ante un resultado negativo en pacientes con síntomas sugestivos de AI, la combinación de varias determinaciones en muestras respiratorias y de suero simultáneamente nos permite aumentar la rentabilidad diagnóstica.

Fortún et al.⁴ refieren en su estudio que la PCR sobre muestra respiratoria se muestra más sensible que el cultivo en el caso de Aspergilosis pulmonar crónica. Sin embargo en nuestra serie la prueba de PCR mostró menor sensibilidad (64-100%) y mayor especificidad (82-52%) que el AG en muestras respiratorias cuando comparamos ambas pruebas con un cultivo positivo para *Aspergillus* spp.

De acuerdo con Pemán et al.¹⁰ y atendiendo a los resultados obtenidos en nuestra serie, pensamos que hacen falta más estudios para estandarizar el método, las condiciones técnicas de realización y determinar el umbral significativo de positividad de la PCR cuantitativa de *Aspergillus*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fortún J, Meije Y, Fresco G, Moreno S. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30:201-8.
2. España Yandiola PP. Diagnóstico de Aspergilosis Pulmonar invasiva y semiinvasiva. Sociedad Vasco-Navarra de Patología Respiratoria. Comunicación presentada en la 44ª Edición del Congreso anual de SEPAR. 19-11-2010.
3. Samarakoon P., Soubani AO. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with COPD: a report of five cases and systematic review of the literature. *Chron Respir Dis* 2008; 5: 19-27.
4. Vallejo Llamas C, Ruiz-Camps I. Infección fúngica invasora en los pacientes hematológicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30: 572-9.
5. Cuenca-Estrella M. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30: 257-64.
6. Quindós G, Eraso E, López-Soria LM, Ezpeleta G.. Enfermedad fúngica invasora: ¿Diagnóstico micológico convencional o molecular? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30: 560-71.
7. Lopez Cortes LE, Garcia Vidal C, Ayats J, Budiol C, Bodro M, Sanchez Ortega I, et al. Aspergilosis invasora con afectación extrapulmonar: patogenia, características clínicas y pronóstico. *Rev Iberoam Micol* 2012; 29: 139-43.
8. Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sanchez F, García-Rodríguez J, et al. Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29: 39e1-39e15.
9. Rabagliati BR, Fuentes LG, Guzmán DA, Orellana UE, Oporto CJ, Aedo CI, et al. Enfermedad fúngica invasora en pacientes hemato-oncológicos y receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos bajo la perspectiva de los criterios diagnósticos EORTC/MSG. *Rev Chil Infect* 2009; 26: 212-9.
10. Pemán J, Quindós G. Programa de formación continuada: Atención compartida en Enfermedades infecciosas y uso de antimicrobianos. 2010; Cap. 2: 25-26.