

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMPARACIÓN DE PRUEBAS UTILIZADAS PARA EL DIAGNÓSTICO  
DE ASPERGILOSIS INVASIVA  
EN EL LABORATORIO DEL HOSPITAL CALDERÓN GUARDIA  
DE ENERO DEL 2019 A JUNIO DEL 2020:  
ELISA PARA LA DETECCIÓN DE GALACTOMANANO Y PCR EN TIEMPO REAL.

Trabajo final de investigación aplicada sometido a la consideración de la Comisión de Estudios de Posgrado en Especialidades de Microbiología para optar al grado y título de Especialidad Profesional en Inmunología Clínica

BRYAN EDUARDO DÍAZ BADILLA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2021

## Dedicatoria y agradecimientos

Quiero dedicar este logro a mi padre y a mi madre quienes siempre me ha inculcado la importancia de superarme y el ser perseverante para cumplir cada uno de mis objetivos.

Sin su educación, amor y disposición nada de lo actualmente logrado sería posible.

Me permito agradecer en primera estancia a Dios por brindarme salud y la oportunidad de crecer profesionalmente. Además, quiero agradecer a cada uno de los docentes y compañeros que fueron parte de este posgrado, todos ellos fueron pieza clave para forjar mi crecimiento profesional.



SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA

ACTA-51-2021

Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el viernes 14 de mayo de 2021 con el objeto de recibir el informe oral del estudiante Bryan Eduardo Díaz Badilla carné # B99344, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de Especialista en Inmunología Clínica. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: Lucía Figueroa Protti, Esp, tutora y quien preside, los lectores Marco Retana Peña, Esp. y José López Chacón, Esp.

ARTICULO 1

Quien preside solicita al postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: "Comparación de pruebas utilizadas para el diagnóstico de Aspergilosis Invasiva en el Laboratorio del Hospital Calderón Guardia de enero del 2019 a junio del 2020: ELISA para la detección de galactomanano y PCR en tiempo real"

ARTICULO 2

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado [checked box] Reprobado [empty box]

ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 17:07 horas.

Table with 3 columns: Nombre, Firma, No. Cédula. Rows include Lucía Figueroa Protti, Esp. (Quien preside), Marco Retana Peña, Esp., José López Chacón, Esp., and Bryan Eduardo Díaz Badilla (Estudiante).

Observaciones: Mención de Honor



Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Bryon Diaz Badillo, con cédula de identidad 115990153, en mi condición de autor del TFG titulado Comparacion de pruebas utilizadas para el diagnostico de aspergilosis invasiva en el laboratorio del HCG de enero 2019 a junio del 2020. ELISA para la detección de galactomanano y PCR en tiempo real

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI [X] NO \* [ ]

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Bryon Eduardo Diaz Badillo

Número de Carné: B99344 Número de cédula: 1-15990153

Correo Electrónico: bryon04tb@gmail.com

Fecha: 1/6/21 Número de teléfono: 8404-9032

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Dra Lucia Figueroa Pratti

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá

<b>Tabla de Contenido</b>	
<b>Resumen</b> .....	vi
<b>Lista de cuadros</b> .....	viii
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	ix
<b>1. Marco referencial</b> .....	1
<b>1.1. Antecedentes</b> .....	1
<b>1.2. Marco teórico</b> .....	5
<b>1.2.1. Epidemiología</b> .....	5
<b>1.2.2. Patogénesis</b> .....	7
<b>1.2.3. Diagnóstico</b> .....	10
<b>1.2.4. Tratamiento</b> .....	15
<b>2. Justificación y problema de investigación</b> .....	18
<b>2.1. Justificación:</b> .....	18
<b>2.2. Problema de Investigación:</b> .....	19
<b>3. Objetivos</b> .....	20
<b>3.1. Objetivo General</b> .....	20
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	20
<b>4. Metodología</b> .....	21
<b>4.1. Tipo de estudio, diseño, enfoque</b> .....	21
<b>4.2. Población y muestra</b> .....	21
<b>4.3. Criterios de inclusión/exclusión</b> .....	21
<b>4.4. Variables en estudio</b> .....	21
<b>4.5. Estrategia metodológica</b> .....	22
<b>4.6. Técnicas de recolección de datos</b> .....	22
<b>4.7. Técnicas de análisis</b> .....	23
<b>5. Resultados</b> .....	25
<b>6. Discusión</b> .....	28
<b>7. Conclusión y recomendaciones.</b> .....	32
<b>Bibliografía</b> .....	34
<b>Anexos</b> .....	41
<b>Anexo 1. Ficha de recolección de datos</b> .....	41
<b>Anexo 2. Definiciones</b> .....	42

## Resumen

La aspergilosis invasiva (AI) permanece en los últimos años como la principal causa de muerte por enfermedad fúngica invasiva (Pemán & Salavert, 2012). El diagnóstico definitivo de la AI se realiza por medio de una biopsia de tejido con visualización microscópica directa de hifas septadas ramificadas y el aislamiento en cultivo. Sin embargo, en muchos de los pacientes que están infectados, la biopsia no es posible debido al riesgo de sangrado producto de la trombocitopenia y el carácter invasivo de la técnica. Es por esta razón que se ha decidido emplear determinaciones no invasivas como el ELISA para la detección de galactomanano (AGA) y la Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Actualmente, existe ambigüedad en los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación, en cuanto al rendimiento de estas técnicas. La presente investigación corresponde a un estudio de tipo observacional analítico retrospectivo de enfoque cuantitativo que tiene como objetivo comparar el rendimiento y la costo efectividad del ELISA para la detección de AGA y la RT-PCR tanto en suero como lavado bronqueoalveolar (BAL), para el diagnóstico de AI en el laboratorio del Hospital Calderón Guardia (HCG) de enero del 2019 a junio del 2020.

Los resultados demuestran que los rendimientos obtenidos son diferentes respecto a lo reportado por otros autores y que además las determinaciones poseen un rendimiento no adecuado con puntos de mejora. El estudio de costo efectividad reflejó una efectividad similar para las determinaciones de ELISA para la detección de AGA y RT-PCR en suero y BAL, se evidenció que no existe una gran diferencia en cuanto a rendimiento, sin importar la metodología o matriz utilizada para el análisis y se evidenció que el RT-PCR es mucho más costoso por prueba respecto al ELISA.

Los resultados sugieren la realización de ambas determinaciones en ambas matrices, para que sean tomadas en cuenta en la evaluación de criterios diagnóstico ya definidos. Se recomienda aumentar el reporte de resultados de parte de investigadores y trabajadores que laboran en centros de salud y obtienen resultados de estas determinaciones, esto permitirá la búsqueda de una metodología adecuada de mayor rendimiento. A la hora de interpretar los resultados o de realizar la solicitud de estas determinaciones, es necesario tomar en consideración si el paciente está bajo el uso de terapias profilácticas antimicóticas, debido a que esto afecta directamente el rendimiento de las determinaciones y este grupo

de fármacos es usado comúnmente en pacientes que presentan un grado de inmunodeficiencia, los cuales, a su vez, son los más afectados con AI.

## Lista de cuadros

<b>Cuadro</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Cuadro 1.	Rendimiento del ELISA AGA en suero y BAL en resultados de otros grupos de investigación.	4
Cuadro 2.	Rendimiento de la RT-PCR en suero y BAL en resultados de otros grupos de investigación.	4
Cuadro 3.	Principales factores de riesgo asociados a AI.	6
Cuadro 4.	Criterios para diagnóstico clínico de AI establecidos según EORTC / MSG.	10
Cuadro 5.	Algoritmo clínico alternativo elaborado según criterios EORTC / MSG.	10
Cuadro 6.	Tabla de contingencia, ELISA para detección de AGA en BAL.	25
Cuadro 7.	Tabla de contingencia, ELISA para detección de AGA en suero.	25
Cuadro 8.	Tabla de contingencia, RT-PCR en suero.	26
Cuadro 9.	Tabla de contingencia, RT-PCR en BAL.	26
Cuadro 10.	Efectividad y Efectividad incremental de las determinaciones a evaluar	27
Cuadro 11.	Razón costo efectividad y razón costo efectividad incremental de las determinaciones a evaluar	27
Cuadro 12.	Comparación de resultados obtenidos y resultados de otros grupos de investigación, para la determinación de ELISA para detección de AGA en suero.	29
Cuadro 13.	Comparación de resultados obtenidos y resultados de otros grupos de investigación, para la determinación de ELISA para detección de AGA en BAL.	29
Cuadro 14.	Comparación de resultados obtenidos y resultados de otros grupos de investigación, para RT-PCR en suero.	30
Cuadro 15.	Comparación de resultados obtenidos y resultados de otros grupos de investigación, para RT-PCR en BAL.	30
Cuadro 16	Ficha de recolección de datos.	41



## Lista de abreviaturas

AGA: Antígeno de galactomamano

AI: Aspergilosis invasiva

BAL: Lavado bronqueoalveolar

E: Especificidad

EIA: Inmunoensayo enzimático

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EORTC/MSG: Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer / Grupo de Estudio de Micosis

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva

FDA: *Food and Drug Administration*

HSROC: *Hierarchical summary receiver operating curves*

OD: Índice de densidad óptica

PAMP: Patrón molecular asociado a patógenos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

S: Sensibilidad

TLR: *Toll like receptor*

VPN: Valor predictivo positivo

VPP: Valor predictivo negativo

## 1. Marco referencial

### 1.1. Antecedentes

En la última década se han realizado estudios y ensayos clínicos con el fin de evaluar y comparar las diferentes metodologías de laboratorio para el diagnóstico de AI. Estos estudios se han reportado principalmente en el continente de Europa.

En Austria, en el año 2016, Eigl y colaboradores realizaron un estudio prospectivo con 53 muestras de suero y 53 muestras de lavado bronqueo alveolar (BAL) correspondientes a 53 pacientes de los cuales 38 tenían diagnósticos asociados a neoplasias malignas. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en BAL se obtuvieron los valores diagnósticos presentados en el Cuadro 2, mientras que para el ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) para la detección de AGA en BAL se obtuvieron los valores diagnósticos presentados en Cuadro 1. El estudio permitió a los investigadores determinar qué variaciones en la densidad óptica del ELISA para la detección de AGA generan cambios en la sensibilidad de la prueba, además reportaron que la combinación de todas las técnicas aumentó considerablemente la sensibilidad a aproximadamente el 75% (Eigl et al., 2017).

En el 2016, se realizó un estudio prospectivo metacéntrico a cargo de Boch y colaboradores donde se analizaron muestras de 49 pacientes para evaluar técnicas diagnósticas para AI. Los pacientes se clasificaron de la siguiente manera: 29 casos confirmados/probables y 20 casos sin infección fúngica diseminada. Para PCR en BAL se obtuvieron los valores diagnósticos presentados en el Cuadro 2, mientras que para el ELISA para la detección de AGA en suero se obtuvieron los valores diagnósticos presentados en el Cuadro 1. Los resultados permitieron estimar que de la combinación de resultados de PCR y detección de AGA en BAL brindaba mayor sensibilidad (S) y especificidad (E), respecto a otras combinaciones de resultados de PCR y detección de AGA en las matrices de suero y BAL. (Boch et al., 2016).

El grupo de Springer y colaboradores, en el 2015, realizaron un estudio analítico prospectivo con 2128 sueros de 213 pacientes con signos o síntomas de infección fúngica invasiva y sin tratamiento profiláctico antifúngico del Hospital Universitario Würzburg en Alemania y el Hospital Elisabethinen, Linz en Austria, con el fin de evaluar la PCR como técnica

diagnóstica de AI. Se obtuvo como resultado para PCR en suero:  $S \approx 71,4\%$ ,  $E \approx 92,3\%$  y  $VPP \approx 62,5\%$  según lo presentado en Cuadro 2 (Springer et al., 2016).

En Australia, el grupo de Heng y colaboradores realizó un estudio retrospectivo con muestras de BAL recolectadas del año 2007 al 2012 en pacientes con edad  $\geq 18$  años, con el objetivo de determinar la utilidad clínica del ELISA para la detección de AGA y PCR en BAL para el diagnóstico de AI. En el estudio participaron 116 pacientes clasificados de la siguiente manera: 18 casos confirmado/probable, 50 casos sospechosos, 6 casos probables no AI y 42 casos sin infección fúngica diseminada. Se obtuvieron los siguientes resultados, para PCR en BAL :  $S \approx 78,0\%$ ,  $E \approx 79,0\%$  y  $VPN \approx 90\%$ , como se muestra en el Cuadro 2 y para AGA en BAL:  $S \approx 61,0\%$ ,  $E \approx 93,0\%$  y  $VPN \approx 85\%$  según lo mostrado en el Cuadro 1 (Heng et al., 2014) .

El grupo de Hoenigl y colaboradores realizó un estudio retrospectivo con 67 muestras recolectadas en el hospital universitario de Graz en Austria y el hospital universitario de Mannheim en Alemania, con el objetivo de evaluar las metodologías ELISA para la detección de AGA y PCR en BAL para diagnóstico de AI. Para PCR en BAL se obtuvieron los valores diagnósticos presentados en el Cuadro 2. En este estudio, se obtuvo una mejor sensibilidad en AGA con un índice de densidad óptica (ODI) correspondiente a 0,5 (Hoenigl et al., 2014).

En el 2013, el grupo de White y colaboradores realizaron un estudio de casos y controles en 103 pacientes adultos con malignidad hematológica en Reino Unido. Los 103 pacientes se clasificaron de la siguiente manera: 8 casos confirmados, 14 casos probables, 22 casos sospechosos y 59 controles sin infección fúngica diseminada. En el estudio se evaluó la metodología de PCR en suero como herramienta para el diagnóstico de AI. Para PCR en suero se obtuvieron los valores diagnósticos presentados en el Cuadro 2, mientras que con el ELISA para la detección de AGA en suero se obtuvieron los valores diagnósticos presentados en el Cuadro 1. (White et al., 2013)

El grupo de Springer y colaboradores realizó un estudio de casos y controles en el 2013, con el objetivo de comparar las metodologías de PCR y ELISA para la detección de AGA para el diagnóstico de AI en suero. El estudio se realizó en 800 muestras de 78 pacientes del hospital universitario de Wuerzburg en Alemania y St. James Hospital Dublin en Irlanda, clasificadas como: 500 muestras de casos y 308 muestras de controles. Para PCR en suero se obtuvieron los valores diagnósticos presentados en el Cuadro 2, mientras que con el

ELISA para la detección de AGA en suero se obtuvieron los valores diagnósticos presentados en el Cuadro 1. Los resultados reflejaron que la determinación únicamente del ELISA para la detección de AGA en suero fue más óptima que la combinación de ambas metodologías en la población estudiada (Springer et al., 2016).

En una revisión sistemática realizada por Avni y colaboradores, se analizaron estudios del 1993 al 2011, con el fin de comparar la metodología PCR y ELISA para la detección de AGA en BAL para el diagnóstico de AI. Se analizaron 1449 estudios de los cuales solo 9 cumplieron con la calidad y criterios establecidos. De los 9 estudios incluidos, se obtuvieron datos de muestras posteriores a los 14 días de infección pertenecientes a 1585 pacientes, las muestras se clasificaron como 319 casos confirmados/probables y 169 casos sospechosos. El análisis de datos se realizó a través de un modelo de regresión binomial para el resumen de datos y estimaciones de parámetros para obtener las *hierarchical summary receiver operating curves* (HSROC). Los mejores valores obtenidos para las determinaciones fueron, para PCR en BAL:  $S \approx 92,6\%$ ,  $E \approx 97,7\%$  según lo mostrado en el Cuadro 2, mientras que en ELISA para detección de AGA en BAL:  $S \approx 85,1\%$ ,  $E \approx 99,7\%$  según lo mostrado en el Cuadro 1. (Avni et al., 2012).

En Túnez, el grupo de Hadrich y colaboradores realizó un estudio de casos y controles con muestras recolectadas del 2004-2007 en las salas de hematología del hospital de enseñanza Sfax. Se utilizaron 459 sueros clasificados de la siguiente manera: 98 con AI y 161 de pacientes control, además de 83 muestras de BAL clasificadas como: 1 caso confirmado, 42 casos probables y 47 controles sin infección fúngica invasiva. Se calcularon únicamente los valores de S y E para PCR en suero, PCR en BAL Y AGA en BAL según lo mostrado en el Cuadro 1 y el Cuadro 2. (Hadrich et al., 2011).

Cuadro 1. Rendimiento del ELISA AGA en suero y BAL en resultados de otros grupos de investigación.

Estudio / Método	Eigl et al., Austria, 2016				Boch et al., MC , 2016				Heng et al., Australia, 2014				Hoenigl et al., DE-AT, 2014			
	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%
AGA (Suero)	31,3	100	100	77,1	35,0	100,0	100,0	69,0	NR	NR	NR	NR	80	98	89	95
AGA (BAL)	37,5	91,9	100	80,4	80,0	9,0	94,0	88,0	61	93	NR	85	NR	NR	NR	NR
Estudio / Método	White el al., GB, 2013				Springer et al., DE-IE, 2013				Avni et al., MC, 2012				Hadrich et al., Túnez, 2011			
	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%
AGA (Suero)	77,2	81,3	60,7	90,6	80,0	96,8	97,4	76,9	85,1	99,7	NR	NR	NR	NR	NR	NR
AGA (BAL)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	92,6	97,7	NR	NR	85,7	92,9	NR	NR

Abreviaturas, AGA= galactomanano; BAL = lavado bronqueo alveolar ; AT = Australia ; DE = Alemania ; E = especificidad ; IE = Irlanda ; MC = multicéntrico ; GB = Reino Unido ; S = sensibilidad ; VPP = valor predictivo positivo ; VPN = valor predictivo negativo.

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 2. Rendimiento de la RT-PCR en suero y BAL en resultados de otros grupos de investigación.

Estudio / Método	Eigl et al., Austria, 2016				Boch et al, MC , 2016				Springer et al., DE-AT, 2015				Heng et al., Australia, 2014			
	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%
PCR (Suero)	NR	NR	NR	NR	10,0	97,0	67,0	61,0	71,4	92,3	62,5	NR	NR	NR	NR	NR
PCR (BAL)	43,8	100	100	80,4	45,0	100,0	100,0	73,0	NR	NR	NR	NR	78	79	NR	90
Estudio / Método	Hoenigl et al., DE-AT, 2014				White el al., Ucrania, 2013				Springer et al., DE-GB, 2013				Hadrich et al., Túnez, 2011			
	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%
PCR (Suero)	NR	NR	NR	NR	95,4	72,8	56,7	97,7	78,7	83,9	88,1	72,2	72,7	100	NR	NR
PCR (BAL)	70	95	80	95	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	64,3	96,4	NR	NR

Abreviaturas, AT = Australia; BAL = lavado bronqueo alveolar ; DE = Alemania ; E = especificidad ; MC = multicéntrico ; GB = Reino Unido ; S = sensibilidad ; VPP = valor predictivo positivo ; VPN = valor predictivo negativo.

Fuente: Elaboración propia

La falta de estandarización de procesos moleculares, la diversidad de procesos entre casas comerciales y el uso de terapias profilácticas en los enfermos son algunos de los factores que generan heterogeneidad en los resultados obtenidos por los diferentes grupos de investigadores interesados en comparar ambas técnicas. Sin embargo, en cada centro de diagnóstico es necesario evaluar e identificar las mejores pruebas diagnósticas para AI, con el fin de verificar si las determinaciones y procesos que se están empleando brindan diagnósticos adecuados y oportunos para los pacientes.

## 1.2. Marco teórico

### 1.2.1. Epidemiología

Los hongos del género *Aspergillus* spp. son el principal agente causal de enfermedad fúngica invasiva en pacientes inmunosupresos (Montero et al., 2013; Pemán & Salavert, 2012; Rabagliati, 2018). Se han descrito más de 300 especies del género *Aspergillus* spp. en el mundo (Pemán & Salavert, 2012). Sin embargo, el agente mayormente asociado a la enfermedad fúngica invasiva es *Aspergillus fumigatus* en aproximadamente un 90% de los casos, seguido de agentes como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus niger* (Kosmidis & Denning, 2015; Montero et al., 2013; Pemán & Salavert, 2012; Rabagliati, 2018). A pesar de que *Aspergillus fumigatus* es el principal agente causal de AI, recientemente se ha observado un aumento en la incidencia de la enfermedad producto de las otras especies. Los hongos del género *Aspergillus* spp. son considerados patógenos oportunistas que causan tanto cuadros alérgicos como invasores, donde el desarrollo de la patología depende tanto de factores del hospedero como del hongo. La especie *Aspergillus flavus* se asocia a infecciones otorrinolaringológicas producto de su afinidad por senos paranasales mientras que existe una predisposición a infecciones por *Aspergillus nodulans* en pacientes principalmente pediátricos con enfermedad granulomatosa crónica (Pemán & Salavert, 2012).

La ubicación geográfica juega un papel fundamental en cuanto a la prevalencia de las diferentes especies y en la incidencia de las especies asociadas a AI (Pemán & Salavert, 2012; Rabagliati, 2018). En América, se registran pocos estudios ambientales de determinación de especies de *Aspergillus* spp. En Cuba, Rojas *et al.* realizaron un muestreo ambiental del 2001 al 2002 resultando como especies más abundantes *Aspergillus japonicus* en el 2001, y *Aspergillus japonicus* y *Aspergillus fumigatus* en el 2002 (Rojas et al., 2007). Un estudio ambiental realizado en un hospital universitario de Bogotá, Colombia, por Cárdenas *et al.* reveló que *Aspergillus flavus* fue el hongo de este género más común en el entorno (Cárdenas et al., 2008). En Europa, Mortensen *et al.* compararon las especies en hospitales y otros entornos ambientales extrahospitalarios de Austria, Dinamarca y España, obteniendo a *Aspergillus fumigatus* como especie predominante en todos los países y entornos (Mortensen et al., 2010). En Costa Rica, no se han registrado estudios ambientales que demuestren diferencias en cuanto a prevalencia de especies, tampoco se han registrado estudios clínicos de prevalencia de especies en AI.

La AI permanece en los últimos años como la principal causa de muerte enfermedad fúngica invasiva y esto se asocia a un aumento de pacientes con presencia de factores de riesgo (Pemán & Salavert, 2012). Los pacientes con cánceres hematológicos tienen la mayor incidencia por AI, siendo afectados con mayor frecuencia los pacientes con leucemias (agudas o crónicas), principalmente leucemia mieloide aguda y, con menor frecuencia, linfomas y mieloma múltiple (Rabagliati, 2018). En el Cuadro 3 se presentan los principales factores de riesgo asociados a AI (Montero et al., 2013; Patterson & Streck, 2014; Pemán & Salavert, 2012; Rabagliati, 2018). La neutropenia y el grado de inmunosupresión se consideran unos de los más importantes. Sin embargo, en los últimos años se han estado describiendo casos en pacientes con conteos normales de neutrófilos y aparentemente inmunocompetentes (Patterson & Streck, 2014; Rabagliati, 2018). Recientemente, se han descrito factores genéticos y polimorfismos de la inmunidad innata que confieren mayor susceptibilidad de contraer AI, asociados a la expresión de *toll like receptors* (TLRs), citoquinas y otros receptores (Cunha et al., 2011; Rabagliati, 2018).

Cuadro 3. Principales factores de riesgo asociados a AI.

Factores de riesgo
Neutropenia
Enfermedad injerto vs huésped con terapia inmunosupresora
Trasplante hematopoyético alogénico
Trasplante de órgano sólido
Linfocitopenia CD4+ < 100 céls/mm <sup>3</sup>
Exposición medioambiental
Colonización previa por <i>Aspergillus</i> spp.
Infección por Citomegalovirus
Uso de terapias biológicas como anti-TNF $\alpha$ y anti-CD52
Falla renal en hemodiálisis
Cirrosis hepática
Déficit de función fagocitaria
Alteraciones de inmunidad celular
Uso de corticoesteroides e inmunosupresores
Ruptura de barreras mucocutáneas

Fuente: (Montero et al., 2013; Patterson & Streck, 2014; Pemán & Salavert, 2012; Rabagliati, 2018).

El pronóstico de AI depende tanto de la presencia de factores del hospedero como del hongo, entre los que se encuentran: enfermedad subyacente, procedimientos a los que se ha sometido el enfermo, estado neto de inmunosupresión, ubicación geográfica, virulencia y sensibilidad antifúngica (Pemán & Salavert, 2012). A lo largo de la historia se ha observado un aumento de las tasas de supervivencia en pacientes con AI producto de la disponibilidad de nuevos agentes antifúngicos (Mortensen et al., 2010; Pemán & Salavert, 2012). Sin embargo, se ha observado un fenómeno de resistencia a los azoles posiblemente debido al uso excesivo de azoles en medios agrícolas y ganaderos. La enfermedad invasiva por *Aspergillus terreus* se ha asociado a peor pronóstico debido a la resistencia a Anfotericina-B presentada por esta especie (Pemán & Salavert, 2012). La epidemiología asociada a enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) ha sido poco estudiada; recientemente, se han descrito datos que revelan una baja incidencia, pero mortalidades cercanas al 100% (Montero et al., 2013; Patterson & Strek, 2014; Rabagliati, 2018). Se ha descrito la coinfección con otros patógenos oportunistas como Citomegalovirus, *Pneumocystis jirovecii* y bacterias causantes de neumonía recurrente, como factores de mal pronóstico en AI (Pemán & Salavert, 2012; Rabagliati, 2018).

### **1.2.2. Patogénesis**

A los hongos saprófitos del género *Aspergillus* spp. se les puede encontrar en suelos y desechos orgánicos, específicamente en tierra, hojas, semillas, abono y otros (Ben-Ami et al., 2010; García-Vidal & Salavert Lletí, 2014). Sin embargo, se ha descrito que las obras de construcción o remodelación pueden elevar significativamente la cantidad de esporas por metro cúbico en el entorno (García-Vidal & Carratalà, 2012). En el ciclo biológico del hongo, las esporas se forman con el objetivo de la reproducción, dispersión fúngica y preservación del genoma fúngico en condiciones ambientales adversas; posteriormente, luego de su germinación, se forman las hifas, las cuales son las formas invasivas del hongo (Ben-Ami et al., 2010). El hongo tiene la capacidad de esporular y este fenómeno da origen a altas concentraciones de esporas en el aire, las cuales son inhaladas para dar origen a la fase inicial de la AI. La inhalación de esporas es un fenómeno que ocurre constantemente y suelen producir enfermedad al no ser controladas por el sistema inmune del hospedero (Ben-Ami et al., 2010; García-Vidal & Carratalà, 2012; García-Vidal & Salavert Lletí, 2014; López-Cortés et al., 2012). La capacidad del sistema inmune para controlar y eliminar esporas fúngicas está directamente relacionada con la manifestación clínica y el curso de la posible enfermedad que se generará en el hospedero, en algunos hospederos las



esporas tienen mayor facilidad para alcanzar el tracto respiratorio inferior para posteriormente depositarse y acumularse en el alvéolo. La aspergilosis pulmonar alérgica es la manifestación clínica más común en pacientes inmunocompetentes, mientras que en hospederos con cavidades pulmonares preexistentes es probable que se dé la formación de masas fúngicas llamadas aspergilomas (García-Vidal & Carratalà, 2012; García-Vidal & Salavert Lletí, 2014). En hospederos con inmunosupresión es más probable que se presente la enfermedad de AI (López-Cortés et al., 2012).

La barrera anatómica del epitelio respiratorio y los cilios presentes en las mucosas consisten en la primera barrera para evitar la colonización de hongos en el sistema respiratorio del hospedero. Las células efectoras del sistema inmune innato como macrófagos, células dendríticas, monocitos y neutrófilos en condiciones normales son eficaces para eliminar las esporas que alcanzan las mucosas de las vías respiratorias (Ben-Ami et al., 2010; García-Vidal & Carratalà, 2012; García-Vidal & Salavert Lletí, 2014). Los macrófagos alveolares son las principales células implicadas, estos fagocitan rápidamente las esporas para posteriormente destruirlas dentro de los fagosomas por medio de la generación de NADPH dependiente de oxidasa y especies reactivas de oxígeno (Ben-Ami et al., 2010; Cadena et al., 2016). El mejor panorama en un paciente inmunocompetente es que estas células implicadas en la respuesta inmune innata logren eliminar las esporas, evitando así la transición a hifa como fase invasora. Las hifas del hongo son el morfotipo fúngico equipado para la invasión de tejidos, estas son demasiado grandes para ser fagocitadas por lo que una de las principales células para combatirlas son los neutrófilos y el proceso de netosis que estas células realizan.

Las células epiteliales respiratorias también participan en la respuesta a infecciones invasivas por *Aspergillus* spp., estas células secretan péptidos antimicrobianos presentes en las secreciones respiratorias, que incluyen proteínas tensoactivas, lactoferrina, lisozima y defensinas (Ben-Ami et al., 2010).

Como en la mayoría de infecciones por microorganismos el sistema inmune reconoce al agente por la activación de TLRs tras el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los PAMPs más importantes del género *Aspergillus* spp. son el manano, el B-glucano y la quitina (Ben-Ami et al., 2010). Sin embargo, aún no está claro cuáles PAMPs son reconocidos por cada tipo de TLR (García-Vidal & Carratalà, 2012; García-Vidal & Salavert Lletí, 2014).

Cuando las esporas inician el proceso de germinación, el daño en los neumocitos es poco notable (Ben-Ami et al., 2010). El daño clínicamente notable inicia con la angiainvasión característica de las infecciones fúngicas invasivas; en esta fase, las hifas invasoras atraviesan la barrera alveolar-capilar y penetran las células endoteliales para tener acceso a las arterias pulmonares (Ben-Ami et al., 2010; Kamai et al., 2006; Lopes Bezerra & Filler, 2004). Este proceso conlleva a lesión endotelial mediada por liberación de citocinas proinflamatorias, expresión del factor tisular en la superficie de la célula endotelial, activación de la cascada de coagulación y origen de trombosis intravascular. Estos procesos disminuyen la perfusión del parénquima pulmonar infectado, lo cual conduce a procesos de coagulación y necrosis en el tejido respiratorio (Ben-Ami et al., 2010). La zona central de la infección consiste en un aglomerado de hifas rodeadas de una zona de hemorragia alveolar (Ben-Ami et al., 2010; Shibuya et al., 2004). Cuando los hospederos no poseen un adecuado conteo o función de neutrófilos es más probable que se dé el proceso de angiainvasión y, por ende, aumenta el riesgo de AI.

Se han descrito casos en los que una pequeña fracción de esporas internalizadas sobreviven dentro de los neumocitos que funcionan como reservorio latente de AI, el tejido alveolar funciona como una coraza que protege las esporas de la vigilancia inmune (Ben-Ami et al., 2010).

Algunos metabolitos secundarios del hongo son potentes micotoxinas que dañan las células de los mamíferos. La comprensión científica de los metabolitos secundarios aún posee muchos vacíos. Sin embargo, la gliotoxina es uno de los metabolitos secundarios micotóxicos mayormente estudiado (Scharf et al., 2012). En las fases iniciales de AI, el hongo aumenta la transcripción de genes que codifican por la gliotoxina, la cual posee efectos en diversas líneas celulares (Willger et al., 2008). Algunas de las reacciones de la gliotoxina son la disminución del estallido respiratorio de neutrófilos al evitar el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa y la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual es un regulador central de los genes de respuesta inflamatoria en linfocitos T y B. Además, se ha establecido que con el aumento de la concentración de gliotoxina se induce la apoptosis de monocitos, macrófagos y neutrófilos (Ben-Ami et al., 2010; Scharf et al., 2012).

### 1.2.3. Diagnóstico

Según criterios clínicos de la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer / Grupo de Estudio de Micosis (EORTC / MSG), para el diagnóstico se deben utilizar los criterios presentados en el Cuadro 4 en conjunto con el algoritmo diagnóstico derivado de los criterios EORTC / MSG presentado en el Cuadro 5. (Blot et al., 2012)

#### Cuadro 4. Criterios para diagnóstico clínico de AI establecidos según EORTC / MSG

##### Aspergilosis pulmonar invasiva comprobada

Análisis microscópico en material estéril: examen histopatológico, citopatológico o microscópico directo de una muestra obtenida por aspiración estéril o biopsia en la que se ven hifas acompañadas de evidencia de daño tisular asociado. Aislamiento en cultivo de *Aspergillus* de una muestra obtenida por biopsia pulmonar

##### Aspergilosis pulmonar invasiva probable (se deben cumplir los tres criterios)

1. Factores del huésped (uno de los siguientes)
  - Historia reciente de neutropenia ( $500$  neutrófilos /  $\text{mm}^3$ ) por 110 días
  - Recepción de un trasplante alogénico de células madre.
  - Uso prolongado de corticosteroides a una dosis mínima media de  $0.3$  mg / kg / día de prednisona equivalente por 13 semanas
  - Tratamiento con otros inmunosupresores de células T reconocidos
  - Inmunodeficiencia severa hereditaria
2. Características clínicas (uno de los siguientes tres signos en la TC)
  - Lesiones densas y bien circunscritas con o sin signo de halo
  - Signo de media luna de aire
  - Cavidad
3. Criterios micológicos (uno de los siguientes)
  - Prueba directa (citología, microscopía directa o cultivo) en esputo, BAL o cepillado bronquial que indica la presencia de elementos fúngicos o aislamiento en cultivo de *Aspergillus* spp.
  - Pruebas indirectas (detección de antígeno o constituyentes de la pared celular): antígeno de galactomanano detectado en plasma, suero o líquido BAL

Fuente: Blot et al., 2012

#### Cuadro 5. Algoritmo clínico alterno elaborado según criterios EORTC / MSG

##### Aspergilosis pulmonar invasiva comprobada

Según Criterios EORTC / MSG (Cuadro 4)

##### Aspergilosis pulmonar invasiva putativa (se deben cumplir los cuatro criterios)

1. Cultivo positivo por *Aspergillus* spp. de muestras correspondientes a tracto respiratorio inferior
2. Signos y síntomas compatibles (uno de los siguientes)
  - Fiebre refractaria a al menos 3 días de tratamiento antibiótico apropiado
  - Fiebre retrógrada después de un período de defervescencia de al menos 48 h mientras todavía está tomando antibióticos y sin otra causa aparente
  - Dolor pleurítico en el pecho
  - Frotación pleurítica
  - Disnea
  - Hemoptisis
  - Empeoramiento de la insuficiencia respiratoria a pesar de la terapia antibiótica adecuada y el soporte ventilatorio
4. Imágenes médicas anormales por radiografía de tórax portátil o tomografía computarizada de los pulmones.
5. Al menos uno de los siguientes: 4a o 4b
  - 4a. Factores de riesgo del huésped (una de las siguientes condiciones)
    - Neutropenia (recuento absoluto de neutrófilos,  $500$  /  $\text{mm}^3$ ) anterior o en el momento de la admisión a la UCI re Neoplasia maligna hematológica u oncológica subyacente tratada con agentes citotóxicos
    - Tratamiento con glucocorticoides (equivalente de prednisona,  $.20$  mg / d)
    - Inmunodeficiencia congénita o adquirida
  - 4b. Cultivo semicuantitativo positivo por *Aspergillus* en BAL, sin crecimiento bacteriano y con un frotis citológico positivo que muestra hifas ramificadas.

##### Aspergillus colonización del tracto respiratorio

Cuando no se cumple más de un criterio necesario para el diagnóstico de una supuesta AI.

Fuente: Blot et al., 2012

El diagnóstico definitivo de la AI se realiza por medio de una biopsia de tejido con la visualización microscópica directa de hifas septadas ramificadas y el aislamiento del microorganismo en cultivo. La obtención de la biopsia es un proceso riesgoso en pacientes trombocitopénicos, con trastornos de coagulación o con altos requerimientos de oxígeno (Cadena et al., 2016).

En cuanto a las imágenes médicas la radiografía de tórax convencional no aporta gran valor diagnóstico (Karthaus & Buchheidt, 2013). Sin embargo, la tomografía computarizada de tórax resulta muy útil cuando se sospecha de AI y requiere un analista entrenado para guiar eficazmente el diagnóstico al observar un halo perilesional. El uso de las imágenes médicas ha aumentado, pero ninguna imagen de tomografía computarizada es lo suficientemente sensible o específica para el diagnóstico de AI (Desoubeaux et al., 2014).

Como sucede con muchos otros microorganismos, es posible aislar hongos del género *Aspergillus* spp. en medios de cultivo estándar para hongos filamentosos (Cadena et al., 2016). Sin embargo, es difícil delimitar la importancia de cultivos positivos en sitios no estériles (Cadena et al., 2016; Karthaus & Buchheidt, 2013). Además, la terapia profiláctica antimicótica puede disminuir el rendimiento del cultivo microbiológico (Cadena et al., 2016). Por esta razón, el cultivo microbiológico positivo por sí mismo no es apto para realizar un diagnóstico y se debe recurrir al análisis de factores de riesgo individualizados, síntomas, hallazgos radiológicos y otras pruebas de diagnóstico (Cadena et al., 2016; Karthaus & Buchheidt, 2013).

Debido a los riesgos que presenta la obtención de una muestra para la biopsia y el rendimiento variable del cultivo microbiológico, se han desarrollado diagnósticos no invasivos que siguen siendo un foco activo de los grupos de investigación (Cadena et al., 2016). Entre las principales metodologías se encuentran los ensayos de detección de antígenos circulantes y de biología molecular. Por lo general, se examinan dos marcadores de suero: AGA, que presentan mayor especificidad al género *Aspergillus* spp., y  $\beta$ -D-glucano, presente en la mayoría de los patógenos fúngicos (Desoubeaux et al., 2014).

La rapidez del tratamiento antimicótico es un factor pronóstico crucial, una de las principales causas del alto índice de mortalidad es la dificultad para hacer un diagnóstico preciso y confiable (Desoubeaux et al., 2014), lo cual indica que la sensibilidad y especificidad son los valores diagnósticos más relevantes. El principal problema de las técnicas no invasivas de laboratorio es la baja sensibilidad en etapas iniciales.

#### 1.2.3.4. Detección de AGA

El AGA es un polisacárido que consiste en una cadena de manosa no inmunogénica formada por unidades de  $\beta$ -1.5-galactofuranosa unidas lateralmente, que conforman la pared celular de los hongos del género *Aspergillus* spp. (Desoubeaux et al., 2014). El AGA fue el primer antígeno en ser identificado en modelos animales y en pacientes con AI (Thornton, 2010). Este antígeno termoestable se libera a la circulación y tejidos durante el crecimiento o el desarrollo del hongo en la fase invasora (Desoubeaux et al., 2014). La detección de AGA se realiza principalmente en ensayos tipo ELISA, aunque se ha descrito la detección mediante otros inmunoensayos como inmunodifusión radial o inmunoelectroforesis (Thornton, 2010). La metodología mayormente utilizada constituye ELISA que utiliza el anticuerpo monoclonal EB-A2 en el set comercial PlateliaAspergillus EIA® aprobado por la FDA (*The Food and Drug Administration*) para realizar el test en suero y BAL, el anticuerpo monoclonal detecta múltiples epítomos de las cadenas laterales de galactofuranosa que están unidas al polímero largo manano (Arvanitis et al., 2014; Kudoh et al., 2014). La galactofuranosa es el miembro de seis anillos de la galactosa que se encuentra en eucariotas no mamíferos y algunos procariontes (Tefsen et al., 2011). Inicialmente se describió la galactofuranosa específicamente para aspergilosis, pero actualmente se sabe que la galactofuranosa está presente en otros hongos y ciertas sustancias (Tefsen et al., 2011).

El ELISA para la detección de AGA tiene una lectura óptica que se interpreta como un radio relativo de densidad óptica (OD) de un umbral control que es proveído por el desarrollador, el radio se conoce como ODI. Estudios subsecuentes han demostrado que umbrales bajos de 0.5 a 0.7 tienen un mayor rendimiento, el ensayo aprobado por la FDA sostiene un ODI cercano a 0.5 (Maertens et al., 2004; Marr et al., 2004).

Los inmunoensayos para la detección de AGA son una herramienta importante para la detección del antígeno en la etapa temprana o en etapas avanzadas de AI (Thornton, 2010). Este ensayo detecta antígenos fúngicos incluso cuando el organismo no crece en medios de cultivo y, al realizarse en BAL, tiene una sensibilidad mayormente representativa respecto al cultivo (Eigl et al., 2017).

En cuanto a la detección de AGA, se han reportado especificidades que varían del 66% al 100% y sensibilidades que varían del 57% al 100% (Thornton, 2010). Algunas de las

razones por las que existe variabilidad en el rendimiento se asocian al tratamiento con terapias antimicóticas profilácticas y empíricas que comprometen la sensibilidad de esta prueba (Thornton, 2010). En pacientes con neoplasia maligna hematológica, la sensibilidad es mayor que en aquellos con menores grados de inmunosupresión, mientras que los pacientes que reciben terapia antimicótica pueden tener resultados falsos negativos (Cadena et al., 2016).

Para la determinación de AGA existe una serie de eventos descritos que deben tomarse en consideración. Se han registrado resultados falsos positivos en pacientes que recibieron terapia antibiótica como Piperacilin-tazobactam IV y Amoxicilina-clavulanato IV por la presencia de AGA en la formulación de estos medicamentos (Mattei et al., 2004; Mikulska et al., 2012; Walsh et al., 2004). Otras especies de hongos presentan polisacáridos que contienen residuos de galactofuranosa en su pared celular por lo que generan resultados falsos positivos, algunas de estas especies son: *Fusarium* spp., *Penicilium* spp. e *Histoplasma capsulatum* (Wheat et al., 2007). Además, se ha registrado mayor probabilidad de obtener resultados falsos positivos en los primeros 100 días posterior a un trasplante de médula ósea (Asano-Mori et al., 2007). Asimismo, se reportan falsos positivos en pacientes con mucocitis gastrointestinal como consecuencia de quimioterapia o enfermedad injerto vs huésped, lo anterior se asocia a que el AGA y las bacterias presentes en los alimentos pueden translocarse por la mucosa afectada para ocasionar reacción cruzada (Mennink-Kersten et al., 2004). También, se han descrito resultados falsos positivos en pacientes que recibieron transfusiones con hemocomponentes recolectados en bolsas producidas por una industria alemana (Martín-Rabadán et al., 2012). Por último, en BAL, se reportan falsos positivos por colonización en vías aéreas de hongos que presentan polisacáridos con residuos de galactofuranosa en su pared celular, esto ocurre principalmente en pacientes con trasplante de pulmón (Husain et al., 2008). Además, la calidad en la recolección de la muestra va a influir directamente en el resultado y variaciones técnicas podrían dar origen principalmente a resultados falsos positivos, por lo que se deben establecer protocolos adecuados para la toma de muestra.

### 1.2.3.5. Ensayos de diagnóstico molecular PCR)

Las técnicas moleculares generalmente confieren alta especificidad y sensibilidad para la detección de microorganismos difíciles de aislar (Karthaus & Buchheidt, 2013). Sin embargo, a pesar de la promesa de alta especificidad y sensibilidad, la falta de estandarización en cuanto a: cebadores, sondas, establecimiento de secuencias base para la amplificación, volumen de muestra, tipo de muestra, etapa de lisis, tipo de extracción y volumen de elución, ha obstaculizado la obtención de métodos de PCR o RT-PCR validados para el diagnóstico de AI (Desoubeaux et al., 2014; Thornton, 2010).

Se ha realizado un esfuerzo para adoptar procesos a diferentes matrices, entre las que se encuentran: tejidos de biopsia, sangre, suero, BAL y líquido cefalorraquídeo (LCR). La mayor confiabilidad de resultados se ha observado en tejido de biopsias, muestras respiratorias y LCR (Thornton, 2010). Las muestras de sangre y suero tienen menor probabilidad de contaminación (Desoubeaux et al., 2014), pero han obtenido una menor fiabilidad diagnóstica. La poca información de métodos publicados y la obtención de resultados contradictorios ha generado conflicto a las organizaciones para llegar a un consenso sobre el diagnóstico con RT-PCR (Thornton, 2010).

Uno de los mayores inconvenientes de la RT-PCR es la incapacidad para discriminar entre contaminación e infección verdadera. Siempre existe el riesgo de contaminación de la muestra junto a la cama de los pacientes o en el laboratorio por esporas en el aire. Se estima que el 25% de BAL de personas sanas serían positivos al usar técnicas de diagnóstico molecular. El número de falsos positivos en BAL es superior al reportado en el ELISA para la detección de AGA (Desoubeaux et al., 2014). Al igual que en los ensayos de ELISA para la detección de AGA, los ensayos de PCR y RT-PCR son afectados por los tratamientos antifúngicos profilácticos (Karthaus & Buchheidt, 2013).

Para mejorar los problemas en cuanto a sensibilidad, se ha sugerido el uso de una versión anidada de un PCR específica de *Aspergillus* spp., un enfoque que ha sido blanco de estudio por algunos grupos de investigadores. En este método de PCR de dos pasos, se amplifica específicamente una región del gen 18S rRNA que es altamente conservado en especies de *Aspergillus* spp. y es útil para generar múltiples copias (Thornton, 2010). Otros genes utilizados son el 28S-rRNA y los genes mitocondriales (Karthaus & Buchheidt, 2013).

Los resultados de estudios han demostrado el potencial de la PCR anidada para detección de AI en grupos de pacientes de alto riesgo. Sin embargo, a pesar de su bajo costo y buenos resultados en cuanto a sensibilidad para el diagnóstico de AI, se necesitan estudios con poblaciones de estudio más grandes (Thornton, 2010). La PCR anidada es más susceptible a la contaminación respecto a la RT-PCR, debido a los procesos que se realizan posterior a la amplificación. Otros tipos de PCR cuantitativos se han propuesto con el fin de mejorar seguimiento y pronóstico de los pacientes (Desoubeaux et al., 2014).

Se han iniciado proyectos como "*Towards a European Standard for Aspergillus PCR*" a cargo de *European Aspergillus PCR Initiative* (EAPCRI). La tendencia de estandarización va dirigida a la utilización de un volumen de 1 ml de suero recogido en un tubo EDTA, ADNr como objetivo, con la utilización del resultado generado únicamente como soporte para el diagnóstico (Desoubeaux et al., 2014).

#### **1.2.4. Tratamiento**

Las opciones para combatir infecciones fúngicas se han expandido durante las últimas décadas, inicialmente se contaba con un panorama que va desde anfotericina B deoxicolato a anfotericina B liposomal, posteriormente se fueron incluyendo suspensiones líquidas, tabletas orales y fármacos intravenosos de azoles como: itraconazol, voriconazol y posaconazol y, más recientemente, se presentó el isavuconazol disponible por vía oral e intravenosa (Cadena et al., 2016).

Los triazoles ejercen sus efectos antifúngicos al inhibir las proteínas del citocromo P450, bloqueando la conversión de lanosterol a ergosterol, dando como resultado la inhibición del crecimiento y la replicación de células fúngicas. Los azoles también pueden causar la inhibición de varias enzimas humanas dependientes de citocromo P450, lo que lleva a eventos adversos clínicamente relevantes, principalmente hepatotoxicidad (Cadena et al., 2016).

El voriconazol es un triazol de segunda generación y se considera el tratamiento de elección para la AI (Cadena et al., 2016; Karthaus & Buchheidt, 2013; Lat & Thompson, 2011). Los principales eventos asociados a la terapia con voriconazol incluyen anomalías en las pruebas de función hepática, náuseas, vómitos, diarrea y erupciones cutáneas (Cadena



et al., 2016; Eiden et al., 2007). La formulación intravenosa contiene ciclodextrina que puede acumularse en pacientes con insuficiencia renal; aunque no se han demostrado eventos adversos, esto sigue generando preocupación por posibles complicaciones a nivel renal (Cadena et al., 2016).

El itraconazol es un azol generalmente utilizado para las formas no invasivas o crónicas de aspergilosis, y también se utiliza en casos asilados de AI donde se presenta intolerancia o toxicidad con otros azoles (Cadena et al., 2016). La principal presentación es en cápsulas orales y la absorción de estas cápsulas puede ocasionar daños a la integridad de pacientes gravemente enfermos (Andes et al., 2009; Cadena et al., 2016). Los efectos secundarios incluyen náuseas, vómitos, hipertrigliceridemia, hipocalcemia y hepatotoxicidad (Cadena et al., 2016).

El posaconazol es un triazol con estructura similar al itraconazol, altamente activo *in vitro* contra *Aspergillus* spp. (Cadena et al., 2016). Este azol suele ser utilizado como profiláctico en pacientes de alto riesgo, tales como: pacientes sometidos a trasplante de médula ósea con enfermedad de injerto contra huésped o pacientes con leucemia mieloide aguda o síndrome mielodisplásico, entre otros (Cadena et al., 2016; Ullmann et al., 2007).

El isavuconazol tiene efectividad incluso en especies de *Aspergillus* spp. que presentan menor susceptibilidad a otros triazoles (Cadena et al., 2016; Thompson & Wiederhold, 2010). Este fármaco presenta ciertas ventajas respecto al voriconazol, entre las que se encuentran: 17% menos de efectos secundarios que el voriconazol y el hecho de que la formulación intravenosa no contiene ciclodextrina como agente solubilizante (Cadena et al., 2016).

Las equinocandinas inhiben la síntesis de 1,3- D-glucano, mediante la inhibición de la enzima glucano sintetasa. La caspofungina, la micafungina y la anidulafungina están actualmente disponibles únicamente en formulaciones intravenosas (Cadena et al., 2016). Tienen la limitante de ser fungistáticos y no fungicidas, por lo que no se recomiendan como primera línea de defensa y se limita su eficiencia en pacientes inmunocomprometidos (Cadena et al., 2016; Viscoli et al., 2009).

La anfotericina B es un polieno fungicida que forma grandes agregados membranosos que extraen ergosterol de las bicapas lipídicas, lo que resulta en la muerte celular y la formación de canales iónicos, que destruyen al hongo (Anderson et al., 2014; Cadena et al., 2016). Este fármaco fue el agente terapéutico de primera línea para AI durante décadas, con la excepción de los casos en que el agente implicado era *Aspergillus terreus*, el cual tiene resistencia al fármaco. La toxicidad y los efectos adversos dieron lugar a que fuera sustituido por voriconazol como primera línea de defensa (Cadena et al., 2016). Las presentaciones de anfotericina B liposomal son menos nefrotóxicas y se suelen utilizar como primera línea de defensa en pacientes que no toleran el voriconazol (Cadena et al., 2016; Karthaus & Buchheidt, 2013).

## 2. Justificación y problema de investigación

### 2.1. Justificación:

La AI representa a nivel de salud pública la enfermedad fúngica invasiva más frecuente en personas inmunocomprometidas, además es una de las principales causas de muerte relacionada a infección en pacientes con leucemia aguda y pacientes sometidos a trasplantes alogénicos de células madre hematopoyéticas.

El diagnóstico histopatológico de invasión tisular por hifas en combinación con el cultivo de *Aspergillus* spp. se consideran la herramienta de diagnóstico definitivo de AI. Sin embargo, en muchos de los pacientes que están infectados por el agente micótico, la biopsia no es posible debido al riesgo de sangrado producto de la trombocitopenia y el carácter invasivo de la técnica. Es por esta razón, que se ha decidido emplear herramientas diagnósticas no invasivas como el ELISA para la detección de AGA, la RT-PCR y el cultivo por hongos.

Actualmente, existe ambigüedad en la literatura en cuanto a la definición de una técnica estándar de oro (*gold standard*) no invasiva para el diagnóstico de AI. Esta diferencia en cuanto a la diversidad de criterios y resultados obtenidos por parte de los diferentes grupos de investigadores a nivel mundial se puede deber a la utilización de métodos que, aunque funcionan bajo un mismo fundamento, poseen variaciones como: equipos utilizados, variaciones de casas comerciales, matrices utilizadas y condiciones de trabajo.

Esta ambigüedad de conocimiento en cuanto a la definición de una técnica *gold standard* no invasiva ha generado dificultad en la toma de decisiones por parte de los profesionales de salud que laboran en el Hospital Calderón Guardia y en otros centros de Salud, en cuanto al establecimiento de un algoritmo diagnóstico que permita una obtención más oportuna de resultados representativos en pacientes con sospecha por AI.

En el laboratorio del Hospital Calderón Guardia esta ambigüedad de conocimiento y la falta de estudio de las condiciones en las que se labora, ha originado un problema práctico sobre cuáles son las determinaciones no invasivas son realmente necesarias para el diagnóstico de AI. Por esta razón, el ELISA para la detección de AGA y el RT-PCR se realizan de manera no estandarizada en los pacientes ante sospecha clínica de AI en las matrices de BAL y suero, por lo que existen casos en los que se reportan resultados de ambas

determinaciones en ambas matrices por paciente y otros casos en que se realizan solo algunas de estas.

Al realizar las determinaciones que aportan mayor valor diagnóstico en las matrices adecuadas, se obtendrán resultados en menor tiempo debido a que se evitaría la espera de resultados para pruebas que aportan menor utilidad para generar criterio diagnóstico y, a su vez, permitiría generar diagnósticos más oportunos con el fin de iniciar esquemas de tratamiento de manera temprana y así favorecer las probabilidades de supervivencia de los pacientes con sospecha clínica de AI. La realización de las determinaciones que aporten mayor valor diagnóstico permitirá la obtención de resultados concretos a menor costo. Esto favorece la administración del servicio de laboratorio del Hospital Calderón Guardia al distribuir de una manera más adecuada la destinación de fondos para compra de equipos o reactivos y las funciones del recurso humano.

El presente proyecto pretende comparar las herramientas diagnósticas no invasivas realizadas desde enero del 2019 hasta junio del 2020 en el laboratorio del Hospital Calderón Guardia, con el fin de evidenciar las determinaciones que aportan mayor valor en el diagnóstico bajo las condiciones en las que se labora en el centro de salud. Hasta nuestro conocimiento, este estudio de técnicas no se ha registrado anteriormente en el Hospital Calderón Guardia ni en otros centros de salud ubicados en Costa Rica. La información generada permitirá estimar cuáles son las determinaciones que aportan mayor valor diagnóstico, demostrando cuáles de estas son realmente necesarias para lograr diagnósticos oportunos y de menor costo.

## **2.2. Problema de Investigación:**

¿Cuáles son las pruebas que aportaron mayor valor diagnóstico para AI en el laboratorio del Hospital Calderón Guardia desde enero del 2019 hasta junio del 2020?

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo General**

Comparar las pruebas utilizadas para el diagnóstico de AI en el laboratorio del Hospital Calderón Guardia desde enero del 2019 hasta junio del 2020, con el fin de evidenciar las determinaciones que aportan mayor valor en el diagnóstico.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Estimar los valores de especificidad y sensibilidad de las pruebas utilizadas en el diagnóstico de AI en el laboratorio del Hospital Calderón Guardia.
- Determinar el valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de las pruebas utilizadas en el diagnóstico de AI en el laboratorio del Hospital Calderón Guardia.
- Realizar un análisis costo-efectivo de las pruebas utilizadas en el diagnóstico de AI en el laboratorio del Hospital Calderón Guardia.

## **4. Metodología**

### **4.1. Tipo de estudio, diseño, enfoque**

La presente investigación consiste en un estudio de tipo observacional analítico retrospectivo con enfoque cuantitativo.

### **4.2. Población y muestra**

La población estudiada corresponde a una base de datos anonimizada de las personas mayores de 18 años que se realizaron determinaciones de ELISA para la detección de AGA y RT-PCR para la detección de AI en el laboratorio del Hospital Calderón Guardia desde enero del 2019 hasta junio del 2020. Los trámites y permisos correspondientes para acceder a la información de los usuarios fueron aprobados por el comité ético científico del Hospital Calderón Guardia.

En esta investigación se utilizó la totalidad de la población que cumpla con los criterios de inclusión y exclusión.

### **4.3. Criterios de inclusión/exclusión**

Como criterios de inclusión se estableció que los datos analizados deben corresponder a usuarios del laboratorio del Hospital Calderón Guardia mayores de 18 años que poseen registro de resultados de determinaciones en suero de ELISA para la detección de AGA y RT-PCR para detección de AI, o resultados en BAL de ELISA para la detección de AGA y RT-PCR para detección de AI.

Se excluyeron del estudio los resultados de usuarios que no tenían un diagnóstico final establecido, además se excluyeron datos que tenían resultados inconclusos o fuera del límite de detección de las metodologías utilizadas.

### **4.4. Variables en estudio**

Las variables que se utilizaron para la determinar el valor diagnóstico fueron: sensibilidad, especificidad, VPP y VPN. Por otro lado, las variables utilizadas para el análisis costo-efectividad corresponden a: costo, costo incremental, efectividad, efectividad incremental, razón costo efectividad (C/E) y razón costo efectividad incremental (RCEI).

#### 4.5. Estrategia metodológica

Para efectos de análisis se definieron como grupo de enfermos los usuarios que poseen registro de diagnóstico final establecido como AI en su expediente hospitalario, y se definieron como grupo de no enfermos los usuarios con registro de diagnóstico final diferente a AI. Se utilizó como patrón de comparación clínico los diagnósticos de AI establecidos en el Hospital Calderón Guardia por personal médico, los cuales se basan en los criterios clínicos de la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer / Grupo de Estudio de Micosis (EORTC / MSG), presentados en el Cuadro 4 en conjunto con el algoritmo diagnóstico derivado de los criterios EORTC / MSG presentado en el Cuadro 5.

#### 4.6. Técnicas de recolección de datos

Los datos de resultados que fueron recolectados correspondientes a RT-PCR fueron obtenidos con la utilización del Kit *Aspergillus* spp. ELITE MGB®, el equipo ELITE InGenius y la versión 1.3 del software ELITE InGenius o versiones posteriores equivalentes. Según el inserto del kit de la casa comercial el proceso de amplificación se logra mediante una sonda específica de *Aspergillus* spp. correspondiente a la tecnología ELITE MGB®, marcada con el fluoróforo FAM, dirigida a una región del gen de ADN ribosómico 18S de *Aspergillus* spp. Para la extracción del ADN en suero se procesaron 200 µL de muestra, control positivo de extracción a 10 µL/extracción y se eluyen los ácidos nucleicos en 100 µL, mientras que para muestras de BAL se procesaron 1000 µL de muestra, control positivo de extracción a 10 µL/extracción y se eluyen los ácidos nucleicos en 100 µL.

Los datos de resultados que fueron recolectados correspondientes al ELISA para la detección de AGA se obtuvieron por procesamiento con el kit Platelia™ *Aspergillus* Ag siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Este proceso consiste en un ensayo de microplaca sándwich inmunoenzimático de una etapa. El ensayo utiliza anticuerpos monoclonales EBA-2 dirigidos contra AGA, y el conjugado corresponde a anticuerpos monoclonales unidos a peroxidasa. Para esta metodología, se utilizó un ODI= 0.5 y la lectura se realizó en un equipo marca RAYTO ajustado a 450 y 620/630 nm de longitud de onda. Las muestras de suero, BAL y controles fueron sometidas a un tratamiento térmico según las instrucciones del kit de análisis. Los procesos de pipeteo, lavado e

incubación se realizaron manualmente según las instrucciones presentes en el kit del ensayo.

Para la generación de la base de datos para este estudio, se utilizó el software Microsoft Excel y se obtendrá la información del diagnóstico establecido de la base de datos estadísticos del Hospital Calderón Guardia y el expediente electrónico de los usuarios con pruebas de laboratorio para la detección de AI. Para la obtención de resultados se sustrajo la información de la base de datos del sistema Labcore del laboratorio del Hospital Calderón Guardia que corresponde a las determinaciones en suero de ELISA para la detección de AGA y RT-PCR para detección de AI, así como resultados en BAL de ELISA para la detección de AGA, RT-PCR y cultivo microbiológico para detección de AI. Los resultados obtenidos se clasificaron como positivo o negativo para cada una de las determinaciones.

#### **4.7. Técnicas de análisis**

Mediante la información de la base de datos generada se contabilizaron los datos obtenidos para cada una de las determinaciones realizadas en el laboratorio del Hospital Calderón Guardia para el diagnóstico de AI, con la finalidad de determinar cada uno de los siguientes valores: enfermos con test positivo, enfermos con test negativo, no enfermos con test positivo y no enfermos con test negativo. Estos datos permitieron obtener tablas de contingencia, además del cálculo de S, E, VPP y VPN para cada una de las terminaciones analizadas mediante el software Epi Info 7™.

Para la evaluación del costo, se analizaron únicamente el costo de los insumos requeridos para la realización de las determinaciones, el cual será expresado en dólares del año 2020. La tasa de descuento se asumirá igual a 0%, debido al corto periodo de análisis. Se tomó como fuente de datos de costo el registro de compras histórico del laboratorio del Hospital Calderón Guardia. La razón de número de casos detectados de AI entre el grupo de población estudiada clasificada como enfermos de AI con diagnóstico establecido se utilizó como indicador de efectividad por prueba.

Para el análisis de costo efectividad, se realizó una tabla de datos con fórmulas en Microsoft Excel que permitirá el cálculo y análisis en conjunto de los siguientes datos para cada una de las determinaciones: costo, costo incremental, efectividad, efectividad incremental, razón costo efectividad (C/E) y razón costo efectividad incremental (RCEI). Se consideró como costo incremental el aumento en dólares de la prueba de menor costo a la prueba de mayor costo, mientras que se consideró como efectividad incremental el aumento de la



razón número de casos detectados/número total de grupo de enfermos de la prueba con menor efectividad a la prueba de mayor efectividad.

## 5. Resultados

En cuanto a los datos que cumplieron con los criterios de inclusión para la detección de AGA, en suero se obtuvo un total de 174 datos y en BAL se obtuvo un total de 72 datos. Por otro lado, para los datos que cumplieron con los criterios de inclusión en RT-PCR, en muestras de suero se obtuvo un total de 141 datos y en muestras de BAL se obtuvo un total de 37 datos.

En cuanto al ELISA para la detección de AGA en BAL, se obtuvo un total de: 3 datos de individuos enfermos con test positivo, 3 datos de individuos enfermos con test negativo, 25 datos de individuos sanos con test positivo y 41 datos de individuos sanos con test negativo, según lo presentado en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Tabla de contingencia, ELISA para detección de AGA en BAL

Resultado \ Dx	AI	OTRO
TEST POSITIVO	3	25
TEST NEGATIVO	3	41

Abreviaturas, Dx= diagnóstico; AI= aspergilosis invasiva

Fuente: Elaboración propia

Por medio de los datos presentados en el Cuadro 6 se pudieron obtener los siguientes valores para la detección de AGA en BAL: S= 50%, E= 62%, VPP=11% y VPN=93%.

En cuanto al ELISA para la detección de AGA en Suero, se obtuvo un total de: 5 datos de individuos enfermos con test positivo, 6 datos de individuos enfermos con test negativo, 41 datos de individuos sanos con test positivo y 122 datos de individuos sanos con test negativo, según lo presentado en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Tabla de contingencia, ELISA para detección de AGA en suero

Resultado \ Dx	AI	OTRO
TEST POSITIVO	5	41
TEST NEGATIVO	6	122

Abreviaturas, Dx= diagnóstico; AI= aspergilosis invasiva

Fuente: Elaboración propia

Por medio de los datos presentados en el Cuadro 8 se pudieron obtener los siguientes valores para la detección de AGA en Suero: S= 45%, E= 75%, VPP=11% y VPN=95%.

Para la detección de RT-PCR en Suero, se obtuvo un total de: 2 datos de individuos enfermos con test positivo, 2 datos de individuos enfermos con test negativo, 16 datos de individuos sanos con test positivo y 121 datos de individuos sanos con test negativo, según lo presentado en el Cuadro 8.

Cadro 8. Tabla de contingencia, RT-PCR en suero

Resultado \ Dx	AI	OTRO
TEST POSITIVO	2	16
TEST NEGATIVO	2	121

Abreviaturas, Dx= diagnóstico; AI= aspergilosis invasiva

Fuente: Elaboración propia

Por medio de los datos presentados en el Cuadro 9 se pudieron obtener los siguientes valores para la detección de RT-PCR en Suero: S= 50%, E= 88%, VPP=11% y VPN=98%.

Para la detección de RT-PCR en BAL, se obtuvo un total de: 1 dato de un individuo enfermo con test positivo, 1 dato de un individuo enfermo con test negativo, 1 dato de un individuo sano con test positivo y 34 datos de individuos sanos con test negativo, según lo presentado en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Tabla de contingencia, RT-PCR en BAL

Resultado \ Dx	AI	OTRO
TEST POSITIVO	1	1
TEST NEGATIVO	1	34

Abreviaturas, Dx= diagnóstico; AI= aspergilosis invasiva

Fuente: Elaboración propia

Por medio de los datos presentados en el Cuadro 9 se pudieron obtener los siguientes valores para la detección de RT-PCR en BAL: S= 50%, E= 97%, VPP=50% y VPN=97%.

En cuanto a la efectividad y efectividad incremental se obtuvieron las siguientes razones según lo presentado en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Efectividad y Efectividad incremental de las determinaciones a evaluar

Test	Enfermos detectados	Total de Enfermos	Efectividad	Efectividad Incremental
Detección de AGA en suero	5	11	0,45	0
Detección de AGA en BAL	3	6	0,50	0,05
RT-PCR en suero	2	4	0,50	0
RT-PCR en BAL	1	2	0,50	0

Fuente: Elaboración propia

Para la razón costo efectividad se obtuvieron los datos presentados en el Cuadro 10.

Cuadro 11. Razón costo efectividad y razón costo efectividad incremental de las determinaciones a evaluar

Test	Costo (\$)	Costo incremental	Efectividad	Efectividad Incremental	C/E	RCEI
Detección de AGA en suero	9,9	0	0,40	0	19,8	0
Detección de AGA en BAL	9,9	0	0,50	0,05	21,8	0
RT-PCR en suero	60	50,1	0,50	0	120,0	-
RT-PCR en BAL	60	0	0,50	0	120,0	0

Fuente: Elaboración propia

Se obtuvo una efectividad muy similar para las determinaciones con ELISA para la detección de AGA y RT-PCR en suero y BAL. La efectividad incremental permite interpretar que no existe una diferencia de alto impacto en cuanto a rendimiento o ganancia de detección casos, sin importar la metodología o matriz utilizada para el análisis de detección de *Aspergillus* spp.

En cuanto a la razón costo efectividad, se puede observar que el costo es mayor respecto a la efectividad para las determinaciones de RT-PCR en comparación a las determinaciones de ELISA para detección AGA en ambas matrices. La razón costo efectividad permite evidenciar que el RT-PCR es mucho más costoso por prueba respecto al ELISA, a pesar de que ambas metodologías demuestran una efectividad muy similar.

## 6. Discusión

Como se muestra en los Cuadros 12 y 13 los resultados reportados entre diversos autores para la determinación de AGA tanto en suero como BAL presentan mucha variabilidad y los resultados obtenidos también difieren de los registrados por otros autores. En cuanto a la detección de AGA, tanto en suero como en BAL se reporta una menor sensibilidad y una menor especificidad respecto a lo comúnmente registrado según Thornton, donde se indican especificidades que varían del 66% al 100% y sensibilidades que varían del 57% al 100% (Thornton, 2010). Se debe tomar en cuenta que uno de los factores que se asocia a esta variabilidad en el rendimiento es el tratamiento con terapias antimicóticas profilácticas que son comúnmente utilizadas en los grupos que se someten a este estudio y comprometen la sensibilidad del ELISA para la detección de AGA (Thornton, 2010). Al tratarse este estudio de una patología tan poco prevalente, se debe tomar en cuenta la limitación de los escasos casos positivos y el total de datos de los que se tenía registro principalmente en los estudios de BAL que son más reducidos respecto a los estudios en suero como anteriormente se menciona. Sin embargo, se debe tomar en consideración que las determinaciones de AGA por ELISA que se realizaron tanto en suero como en BAL correspondientes al periodo estudiado, fueron realizadas mediante una metodología manual con un único paso automatizado que correspondía a la lectura de la placa de ELISA. El procesamiento manual de esta metodología hace que la técnica sea más susceptible a la contaminación y este es uno de los factores que podría estar influyendo en el bajo rendimiento con principal afectación del VPP que presenta la determinación del ELISA para la detección AGA en suero y BAL.

Cuadro 12. Comparación de resultados obtenidos y resultados de otros grupos de investigación, para la determinación de ELISA para detección de AGA en BAL.

Estudio / Método	RESULTADOS, 2020				Boch et al., MC , 2016				Heng et al., Australia, 2014			
	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%
AGA (BAL)	50	62	11	93	35,0	100,0	100,0	69,0	61	93	NR	85
Estudio / Método	Heng et al., Australia, 2014				Avni et al., MC, 2012				Hadrich et al., Túnez, 2011			
	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	S %	S %	E %
AGA (BAL)	61	93	NR	85	92,6	97,7	85,7	85,7	85,7	85,7	NR	NR

Abreviaturas, AGA= galactomanano ; BAL = lavado bronqueo alveolar ; E = especificidad ; MC = multicéntrico ;

S = sensibilidad ; VPP = valor predictivo positivo ; VPN = valor predictivo negativo.

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 13. Comparación de resultados obtenidos y resultados de otros grupos de investigación, para la determinación de ELISA para detección de AGA en suero.

Estudio / Método	RESULTADOS, 2020				Eigl et al., Austria, 2016				Boch et al., MC , 2016				Hoenigl et al., DE-AT, 2014			
	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%
AGA (Suero)	45	75	11	95	31,3	100	100	77,1	35,0	100,0	100,0	69,0	80	98	89	95
Estudio / Método	White el al., GB, 2013				Springer et al., DE-IE, 2013				Avni et al., MC, 2012							
	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%				
AGA (Suero)	77,2	81,3	60,7	90,6	80,0	96,8	97,4	76,9	85,1	99,7	NR	NR				

Abreviaturas, AGA= galactomanano ; AT = Australia ; DE = Alemania ; E = especificidad ; IE = Irlanda ; MC = multicéntrico ; GB = Reino Unido ;

S = sensibilidad; VPP = valor predictivo positivo; VPN = valor predictivo negativo.

Fuente: Elaboración propia

Según lo presentado en los cuadros 14 y 15 los resultados de RT-PCR para la detección de *Aspergillus* spp. en suero y BAL también presentan mucha variabilidad y difieren de los resultados obtenidos por el laboratorio del HCG en el presente análisis, lo anterior correlaciona con lo registrado por Thornton quien expone que esta variación y resultados contradictorios obtenidos de RT-PCR para detección de *Aspergillus* spp. por los diferentes grupos de investigación, ha generado conflicto a las organizaciones para llegar a un consenso sobre la determinación de PCR (Thornton, 2010). De todas las determinaciones evaluadas en este estudio la RT-PCR en BAL fue la que demostró el mejor rendimiento y esto correlaciona con lo registrado por Thornton que indica que entre las mejores con mayor fiabilidad para el RT-PCR de *Aspergillus* se encuentran las biopsias de tejido, muestras respiratorias y LCR (Thornton, 2010). En cuanto a lo obtenido se reporta menor rendimiento para RT-PCR en suero respecto a RT-PCR en BAL, se puede relacionar esta

información a lo descrito por Desoubeaux, quien describe las determinaciones en suero como metodologías de menos probabilidad de contaminación, pero con menor fiabilidad diagnóstica. (Desoubeaux et al., 2014) Se debe tomar en consideración que se trabajó con una población de menos magnitud en las determinaciones de BAL respecto a las de suero y esta diferencia en la cantidad de datos analizados puede influir en lo reflejado en los resultados.

Cuadro 14. Comparación de resultados obtenidos y resultados de otros grupos de investigación, para RT-PCR en suero.

Estudio Método	RESULTADOS, 2020				Boch et al, MC , 2016				Springer et al., DE-AT, 2015			
	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%
RT-PCR (Suero)	50	88	11	98	10,0	97,0	67,0	61,0	71,4	92,3	62,5	NR
Estudio Método	White el al., Ucrania, 2013				Springer et al., DE-GB, 2013				Hadrich et al., Túnez, 2011			
	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%
RT-PCR (Suero)	95,4	72,8	56,7	97,7	78,7	83,9	88,1	72,2	72,7	100	NR	NR

Abreviaturas, AT = Australia; DE = Alemania; E = especificidad ; MC = multicéntrico ; GB = Reino Unido ; S = sensibilidad; VPP = valor predictivo positivo; VPN = valor predictivo negativo.

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 15. Comparación de resultados obtenidos y resultados de otros grupos de investigación, para RT-PCR en BAL.

Estudio Método	RESULTADOS, 2020				Eigl et al., Austria, 2016				Boch et al, MC , 2016			
	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%
RT-PCR (BAL)	50	97	50	97	43,8	100	100	80,4	45,0	100,0	100,0	73,0
Estudio Método	Heng et al., Australia, 2014				Hoenigl et al., DE-AT, 2014				Hadrich et al., Túnez, 2011			
	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%	S %	E %	VPP%	VPN%
RT-PCR (BAL)	78	79	NR	90	70	95	80	95	64,3	96,4	NR	NR

Abreviaturas, AT = Australia; DE = Alemania; E = especificidad ; MC = multicéntrico ; GB = Reino Unido ; S = sensibilidad; VPP = valor predictivo positivo; VPN = valor predictivo negativo.

Fuente: Elaboración propia

Los datos obtenidos para S, E, VPP, VPN y el indicador de efectividad indican que no existe una diferencia de gran magnitud en cuanto a rendimiento de las metodologías utilizadas para el diagnóstico de AI en el laboratorio del Hospital Calderón Guardia, sin importar la matriz utilizada.

Los resultados permiten evidenciar que el RT-PCR es mucho más costoso por prueba respecto al ELISA, a pesar de que ambas metodologías demuestran una efectividad muy similar en el laboratorio del Hospital Calderón Guardia. Sin embargo, se debe considerar que para las determinaciones de ELISA para la detección de AGA es necesario realizar por duplicado la medición de control positivo, control negativo y punto de corte en cada corrida de determinación. La medición de puntos de corte y controles tienen el mismo costo que tiene cada una de las determinaciones en los usuarios, correspondiente a \$9,9. Por otro lado, para las determinaciones de RT-PCR se realiza una calibración por mes y un control de calidad cada dos semanas. Estas determinaciones de control de calidad y calibración influyen en el costo neto de las metodologías para el laboratorio del Hospital Calderón Guardia.



## 7. Conclusión y recomendaciones.

Históricamente, el rendimiento de las determinaciones por medio de RT-PCR y ELISA para la detección de AGA tanto en suero como en BAL ha sido muy variable en cuanto a lo reportado por diversos autores. En los resultados obtenidos, se pudo determinar que los ensayos realizados en el HCG de RT-PCR para la detección de *Aspergillus* spp. y ELISA para la detección de AGA reflejan un rendimiento no suficiente como para realizar el diagnóstico con únicamente estas determinaciones. Es por esta razón que se recomienda seguir realizando ambas determinaciones en ambas matrices en todos los usuarios en los que existe sospecha clínica de AI, para que estos resultados sean tomados en cuenta en la evaluación de criterios diagnóstico ya definidos para de esta forma realizar diagnósticos más oportunos, sin dejar de lado hallazgos clínicos e imágenes médicas. Por otro lado, se recomienda la realización de las cuatro determinaciones en todos los pacientes en los que existe sospecha clínica de AI por un periodo establecido, para de esta manera lograr un estudio más profundo con las posibles combinaciones de técnicas diagnósticas en ambas matrices.

Es necesario evaluar las metodologías realizadas en el HCG con el fin de identificar puntos de mejora que permitan aumentar el rendimiento de estas determinaciones. Para aumentar el rendimiento del ELISA para la determinación de AGA, se recomienda realizar la gestión necesaria para que el laboratorio del Hospital Calderón Guardia sustituya la metodología manual por una metodología automatizada en un sistema cerrado que disminuya el riesgo de contaminación en los ensayos. De esta manera, se podrá aumentar el rendimiento del ELISA para determinación de AGA y así lograr diagnósticos más oportunos que permitan hacer un mejor aprovechamiento de los recursos.

Actualmente, a nivel mundial no se cuenta con determinaciones validadas de RT-PCR para la detección de *Aspergillus* spp., debido a que existe poca información de métodos publicados y se reportan resultados contradictorios que han generado conflicto a las organizaciones internacionales para llegar a un consenso sobre una metodología adecuada para RT-PCR. Es por esta razón que se debe aumentar el reporte de resultados para esta determinación de parte de investigadores y trabajadores que laboran en centros de salud y obtienen resultados de estas determinaciones, esto permitirá que la búsqueda de una metodología adecuada y la búsqueda de puntos de mejora en caso de deficiencias de

rendimiento, faciliten el camino a la estandarización y validación de una metodología de mayor rendimiento.

A la hora de interpretar los resultados o de realizar la solicitud de las determinaciones de ELISA para la detección de AGA o RT-PCR para detección de *Aspergillus* spp. en suero o BAL, es necesario tomar en consideración el uso de terapias profilácticas antimicóticas en los usuarios, debido a que un grupo importante de usuarios que se someten a estas determinaciones presentan un grado de inmunodeficiencia y reciben terapias profilácticas antimicóticas, lo cual influye directamente en el rendimiento de las determinaciones.

## Bibliografía

1. Anderson, T. M., Clay, M. C., Cioffi, A. G., Diaz, K. A., Hisao, G. S., Tuttle, M. D., Nieuwkoop, A. J., Comellas, G., Maryum, N., Wang, S., Uno, B. E., Wildeman, E. L., Gonen, T., Rienstra, C. M., & Burke, M. D. (2014). Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nature Chemical Biology*, *10*(5), 400-406. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1496>
2. Andes, D., Pascual, A., & Marchetti, O. (2009). Antifungal therapeutic drug monitoring: Established and emerging indications. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(1), 24-34. <https://doi.org/10.1128/AAC.00705-08>
3. Arvanitis, M., Ziakas, P. D., Zacharioudakis, I. M., Zervou, F. N., Caliendo, A. M., & Mylonakis, E. (2014). PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: A meta-analysis of diagnostic performance. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(10), 3731-3742. <https://doi.org/10.1128/JCM.01365-14>
4. Asano-Mori, Y., Kanda, Y., Oshima, K., Kako, S., Shinohara, A., Nakasone, H., Kaneko, M., Sato, H., Watanabe, T., Hosoya, N., Izutsu, K., Asai, T., Hangaishi, A., Motokura, T., Chiba, S., & Kurokawa, M. (2007). False-positive *Aspergillus galactomannan* antigenaemia after haematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *61*(2), 411-416. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm463>
5. Avni, T., Levy, I., Sprecher, H., Yahav, D., Leibovici, L., & Paul, M. (2012). Diagnostic Accuracy of PCR Alone Compared to Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis: A Systematic Review. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(11), 3652-3658. <https://doi.org/10.1128/JCM.00942-12>
6. Ben-Ami, R., Lewis, R., & Kontoyiannis, D. (2010). Enemy of the (immunosuppressed) state: An update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *British journal of haematology*, *150*, 406-417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08283.x>
7. Blot, S. I., Taccone, F. S., Van den Abeele, A.-M., Bulpa, P., Meersseman, W., Brusselaers, N., Dimopoulos, G., Paiva, J. A., Misset, B., Rello, J., Vandewoude, K., & Vogelaers, D. (2012). A Clinical Algorithm to Diagnose Invasive Pulmonary Aspergillosis in Critically Ill Patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *186*(1), 56-64. <https://doi.org/10.1164/rccm.201111-1978OC>
8. Boch, T., Spiess, B., Cornely, O. A., Vehreschild, J. J., Rath, P. M., Steinmann, J., Heinz, W. J., Hahn, J., Krause, S. W., Kiehl, M. G., Egerer, G., Liebrechts, T., Koldehoff, M., Klein, M., Nolte, F., Mueller, M. C., Merker, N., Will, S., Mossner, M., ... Buchheidt, D.

- (2016). Diagnosis of invasive fungal infections in haematological patients by combined use of galactomannan, 1,3- $\beta$ -D-glucan, Aspergillus PCR, multifungal DNA-microarray, and Aspergillus azole resistance PCRs in blood and bronchoalveolar lavage samples: Results of a prospective multicentre study. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(10), 862-868. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.06.021>
9. Cadena, J., Thompson, G. R., & Patterson, T. F. (2016). Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management. *Infectious Disease Clinics*, 30(1), 125-142. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.015>
  10. Cárdenas, M., Alberto Cortes, J., & Marcela Parra, C. (2008). Presencia de Aspergillus spp. en áreas de riesgo en pacientes trasplantados en un hospital universitario. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(4), 232-236. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70055-X](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70055-X)
  11. Cornely, O. A. (2014). Galactomannan testing during mold-active prophylaxis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 59(12), 1703-1704. PubMed. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu677>
  12. Cunha, C., Rodrigues, F., Zelante, T., Aversa, F., Romani, L., & Carvalho, A. (2011). Genetic susceptibility to aspergillosis in allogeneic stem-cell transplantation. *Medical Mycology*, 49(Supplement\_1), S137-S143. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.508797>
  13. Desoubeaux, G., Bailly, É., & Chandener, J. (2014). Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: Updates and recommendations. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(3), 89-101. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.11.006>
  14. Eiden, C., Peyrière, H., Cociglio, M., Djezzar, S., Hansel, S., Blayac, J.-P., Hillaire-Buys, D., & Network of the French Pharmacovigilance Centers. (2007). Adverse effects of voriconazole: Analysis of the French Pharmacovigilance Database. *The Annals of Pharmacotherapy*, 41(5), 755-763. <https://doi.org/10.1345/aph.1H671>
  15. Eigl, S., Hoenigl, M., Spiess, B., Heldt, S., Prattes, J., Neumeister, P., Wolfler, A., Rabensteiner, J., Pruessler, F., Krause, R., Reinwald, M., Flick, H., Buchheidt, D., & Boch, T. (2017). Galactomannan testing and Aspergillus PCR in same-day bronchoalveolar lavage and blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Medical Mycology*, 55(5), 528-534. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw102>
  16. Garcia-Vidal, C., & Carratalà, J. (2012). Patogenia de la infecció fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(3), 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.011>

17. García-Vidal, C., & Salavert Lletí, M. (2014). Inmunopatología de las micosis invasivas por hongos filamentosos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(4), 219-228. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.09.001>
18. Hadrich, I., Mary, C., Makni, F., Elloumi, M., Dumon, H., Ayadi, A., & Ranque, S. (2011). Comparison of PCR-ELISA and Real-Time PCR for invasive aspergillosis diagnosis in patients with hematological malignancies. *Medical Mycology*, 49(5), 489-494. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.540724>
19. Heng, S.-C., Chen, S. C.-A., Morrissey, C. O., Thursky, K., Manser, R. L., De Silva, H. D., Halliday, C. L., Seymour, J. F., Nation, R. L., Kong, D. C. M., & Slavin, M. A. (2014). Clinical utility of Aspergillus galactomannan and PCR in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with haematological malignancies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(3), 322-327. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.020>
20. Hoenigl, M., Prattes, J., Spiess, B., Wagner, J., Pruellner, F., Raggam, R. B., Posch, V., Duettmann, W., Hoenigl, K., Wölfler, A., Koidl, C., Buzina, W., Reinwald, M., Thornton, C. R., Krause, R., & Buchheidt, D. (2014). Performance of Galactomannan, Beta-d-Glucan, Aspergillus Lateral-Flow Device, Conventional Culture, and PCR Tests with Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(6), 2039-2045. <https://doi.org/10.1128/JCM.00467-14>
21. Husain, S., Clancy, C. J., Nguyen, M. H., Swartzentruber, S., Leather, H., LeMonte, A. M., Durkin, M. M., Knox, K. S., Hage, C. A., Bentsen, C., Singh, N., Wingard, J. R., & Wheat, L. J. (2008). Performance characteristics of the platelia Aspergillus enzyme immunoassay for detection of Aspergillus galactomannan antigen in bronchoalveolar lavage fluid. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 15(12), 1760-1763. PubMed. <https://doi.org/10.1128/CVI.00226-08>
22. Kamai, Y., Chiang, L. Y., Lopes Bezerra, L. M., Doedt, T., Lossinsky, A. S., Sheppard, D. C., & Filler, S. G. (2006). Interactions of Aspergillus fumigatus with vascular endothelial cells. *Medical Mycology*, 44(Supplement\_1), S115-S117. <https://doi.org/10.1080/13693780600897989>
23. Karthaus, M., & Buchheidt, D. (2013). Invasive aspergillosis: New insights into disease, diagnostic and treatment. *Current Pharmaceutical Design*, 19(20), 3569-3594. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990330>

24. Kosmidis, C., & Denning, D. W. (2015). The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*, 70(3), 270-277. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206291>
25. Kudoh, A., Okawa, Y., & Shibata, N. (2014). Significant structural change in both O- and N-linked carbohydrate moieties of the antigenic galactomannan from *Aspergillus fumigatus* grown under different culture conditions. *Glycobiology*, 25(1), 74-87. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu091>
26. Lat, A., & Thompson, G. R., 3rd. (2011). Update on the optimal use of voriconazole for invasive fungal infections. *Infection and Drug Resistance*, 4, 43-53. PubMed. <https://doi.org/10.2147/IDR.S12714>
27. Lopes Bezerra, L. M., & Filler, S. G. (2004). Interactions of *Aspergillus fumigatus* with endothelial cells: Internalization, injury, and stimulation of tissue factor activity. *Blood*, 103(6), 2143-2149. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-2186>
28. López-Cortés, L. E., Garcia-Vidal, C., Ayats, J., Gudiol, C., Bodro, M., Sánchez-Ortega, I., Peña, C., & Carratalá, J. (2012). Aspergilosis invasora con afectación extrapulmonar: Patogenia, características clínicas y pronóstico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(3), 139-143. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.10.001>
29. Maertens, J., Theunissen, K., Verbeken, E., Lagrou, K., Verhaegen, J., Boogaerts, M., & Eldere, J. V. (2004). Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *British Journal of Haematology*, 126(6), 852-860. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05140.x>
30. Marr, K. A., Balajee, S. A., McLaughlin, L., Tabouret, M., Bentsen, C., & Walsh, T. J. (2004). Detection of Galactomannan Antigenemia by Enzyme Immunoassay for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis: Variables That Affect Performance. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(3), 641-649. <https://doi.org/10.1086/422009>
31. Martín-Rabadán, P., Gijón, P., Alonso Fernández, R., Ballesteros, M., Anguita, J., & Bouza, E. (2012). False-positive *Aspergillus* Antigenemia Due to Blood Product Conditioning Fluids. *Clinical Infectious Diseases*, 55(4), e22-e27. <https://doi.org/10.1093/cid/cis493>
32. Mattei, D., Rapezzi, D., Mordini, N., Cuda, F., Lo Nigro, C., Musso, M., Arnelli, A., Cagnassi, S., & Gallamini, A. (2004). False-Positive *Aspergillus* Galactomannan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Results In Vivo during Amoxicillin-Clavulanic Acid Treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 5362. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5362-5363.2004>

33. Medina, M. C. (2011). Generalidades de las pruebas diagnósticas, y su utilidad en la toma de decisiones médicas. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 40(4), 787-797. [https://doi.org/10.1016/S0034-7450\(14\)60165-7](https://doi.org/10.1016/S0034-7450(14)60165-7)
34. Mennink-Kersten, M. A. S. H., Donnelly, J. P., & Verweij, P. E. (2004). Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 4(6), 349-357. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01045-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01045-X)
35. Mikulska, M., Furfaro, E., Del Bono, V., Raiola, A. M., Ratto, S., Bacigalupo, A., & Viscoli, C. (2012). Piperacillin/tazobactam (Tazocin™) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), 1746-1748. <https://doi.org/10.1093/jac/dks111>
36. Montero, J. G., Olaechea, P., Lerma, F. Á., Rocha, L. Á., Blanquer, J., Galván, B., Oviedo, A. R., Crespo, R. Z., Aguado, J. M., Pueyo, J. M., Jover, A. S., & López, J. B. (2013). Epidemiología, diagnóstico y tratamiento de las infecciones fúngicas respiratorias en el paciente crítico. *Revista Española de Quimioterapia*, 26(2), 173-188.
37. Mortensen, K. L., Mellado, E., Lass-Flörl, C., Rodríguez-Tudela, J. L., Johansen, H. K., & Arendrup, M. C. (2010). Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4545-4549. <https://doi.org/10.1128/AAC.00692-10>
38. Patterson, K. C., & Streck, M. E. (2014). Diagnosis and Treatment of Pulmonary Aspergillosis Syndromes. *Chest*, 146(5), 1358-1368. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0917>
39. Pemán, J., & Salavert, M. (2012). Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(2), 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.004>
40. Rabagliati, R. (2018). Actualización en el diagnóstico y manejo de aspergilosis invasora en pacientes adultos. *Revista chilena de infectología*, 35(5), 531-544. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000500531>
41. Scharf, D. H., Heinekamp, T., Remme, N., Hortschansky, P., Brakhage, A. A., & Hertweck, C. (2012). Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(2), 467-472. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3689-1>
42. Shibuya, K., Hasegawa, C., Hamatani, S., Hatori, T., Nagayama, T., Nonaka, H., Ando, T., & Wakayama, M. (2004). Pathophysiology of pulmonary aspergillosis. *Journal of*

- Infection and Chemotherapy*, 10(3), 138-145. <https://doi.org/10.1007/s10156-004-0315-5>
43. Springer, J., Lackner, M., Nachbaur, D., Girschikofsky, M., Risslegger, B., Mutschlechner, W., Fritz, J., Heinz, W. J., Einsele, H., Ullmann, A. J., Löffler, J., & Lass-Flörl, C. (2016). Prospective multicentre PCR-based *Aspergillus* DNA screening in high-risk patients with and without primary antifungal mould prophylaxis. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(1), 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.09.009>
44. Tefsen, B., Ram, A. F., van Die, I., & Routier, F. H. (2011). Galactofuranose in eukaryotes: aspects of biosynthesis and functional impact. *Glycobiology*, 22(4), 456-469. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr144>
45. Thompson, G. R., & Wiederhold, N. P. (2010). Isavuconazole: A comprehensive review of spectrum of activity of a new triazole. *Mycopathologia*, 170(5), 291-313. <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9324-3>
46. Thornton, C. R. (2010). Detection of Invasive Aspergillosis. En *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 70, pp. 187-216). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70006-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70006-X)
47. Ullmann, A. J., Lipton, J. H., Vesole, D. H., Chandrasekar, P., Langston, A., Tarantolo, S. R., Greinix, H., Morais de Azevedo, W., Reddy, V., Boparai, N., Pedicone, L., Patino, H., & Durrant, S. (2007). Posaconazole or Fluconazole for Prophylaxis in Severe Graft-versus-Host Disease. *New England Journal of Medicine*, 356(4), 335-347. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061098>
48. Viscoli, C., Herbrecht, R., Akan, H., Baila, L., Sonet, A., Gallamini, A., Giagounidis, A., Marchetti, O., Martino, R., Meert, L., Paesmans, M., Ameye, L., Shivaprakash, M., Ullmann, A. J., Maertens, J., & Infectious Disease Group of the EORTC. (2009). An EORTC Phase II study of caspofungin as first-line therapy of invasive aspergillosis in haematological patients. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(6), 1274-1281. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp355>
49. Walsh, T. J., Shoham, S., Petraitiene, R., Sein, T., Schaufele, R., Kelaher, A., Murray, H., Mya-San, C., Bacher, J., & Petraitis, V. (2004). Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen interaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4744-4748. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4744-4748.2004>
50. Wheat, L. J., Hackett, E., Durkin, M., Connolly, P., Petraitiene, R., Walsh, T. J., Knox, K., & Hage, C. (2007). Histoplasmosis-associated cross-reactivity in the BioRad Platelia



- Aspergillus enzyme immunoassay. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, 14(5), 638-640. PubMed. <https://doi.org/10.1128/CVI.00479-06>
51. White, P. L., Parr, C., Thornton, C., & Barnes, R. A. (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*, 51(5), 1510-1516. <https://doi.org/10.1128/JCM.03189-12>
52. Willger, S. D., Puttikamonkul, S., Kim, K.-H., Burritt, J. B., Grahl, N., Metzler, L. J., Barbuch, R., Bard, M., Lawrence, C. B., & Cramer, R. A., Jr. (2008). A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens*, 4(11), e1000200-e1000200. PubMed. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000200>

**Anexos****Anexo 1. Ficha de recolección de datos**

Cuadro 16. Ficha de recolección de datos

<b>Número consecutivo</b>	(Usuario 1, Usuario 2, Usuario, ect ...)
<b>Resultado RT-PCR BAL</b>	(Positivo o negativo)
<b>Resultado RT-PCR suero</b>	(Positivo o negativo)
<b>Resultado ELISA-AGA BAL</b>	(Positivo o negativo)
<b>Resultado ELISA-AGA suero</b>	(Positivo o negativo)
<b>Diagnóstico final:</b>	(Al u otro)

Fuente: Elaboración propia

## Anexo 2. Definiciones

**Sensibilidad (S):** capacidad de una prueba para clasificar como enfermo a un sujeto realmente enfermo; corresponde a la probabilidad de tener un resultado positivo si el sujeto está enfermo. Para calcular la sensibilidad se debe dividir el número de enfermos con prueba positiva por la sumatoria de los enfermos con prueba positiva y los enfermos con prueba negativa (Medina, 2011).

**Especificidad (E):** capacidad de la prueba para clasificar adecuadamente a las personas realmente sanas como sanos; corresponde al porcentaje de personas que no tienen la enfermedad y obtienen resultados negativos. Para calcular la especificidad se debe dividir el número no enfermos con prueba positiva por la sumatoria de los sujetos no enfermos con prueba positiva y los no enfermos con prueba negativa (Medina, 2011).

**Valor predictivo positivo (VPP):** Es la probabilidad de presentar la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en la prueba. Para calcular el VPP de una prueba diagnóstica se divide el número enfermos con prueba positiva por la sumatoria de enfermos con prueba positiva y los no enfermos con prueba positiva (Medina, 2011).

**Valor predictivo negativo (VPN):** Es la probabilidad de estar sano si se obtiene un resultado negativo en la prueba. Para calcular el VPN se debe dividir el número de enfermos con prueba negativa por la sumatoria de los enfermos con prueba negativa y los no enfermos con prueba negativa (Medina, 2011).