



HOSPITAL INFANTIL *de* MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ
Instituto Nacional de Salud

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina

División de Estudios de Posgrado

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Utilidad de la detección de galactomananos por
ensayo inmunoenzimático para el diagnóstico de
aspergilosis invasiva en pacientes neutropénicos
ingresados en el Hospital Infantil de México

Federico Gómez

Tesis para obtener el título en

INFECTOLOGÍA

Presenta

Dr. Mario Augusto Melgar Toledo

Asesores de tesis:

Dra. Margarita Nava Frías

EBC. Jesús Reséndiz Sánchez



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

México D.F., Agosto 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina

División de Estudios de Posgrado

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Utilidad de la detección de galactomananos por ensayo
inmunoenzimático para el diagnóstico de aspergilosis invasiva
en pacientes neutropénicos ingresados en el Hospital Infantil
de México Federico Gómez

Tesis para obtener el título en

INFECTOLOGÍA

Asesores de tesis:

Dra. Margarita Nava Frías

EBC. Jesús Reséndiz Sánchez

Presenta

Dr. Mario Augusto Melgar Toledo

México D.F., agosto 2007

DEDICATORIA

A mi esposa, Jessica, quien es mi complemento y mi inspiración...

A mis padres, Saúl y Clara Luz, quienes han sido siempre mi ejemplo y mi guía....

A mis hermanos Saúl, Loren y Clarita, que me han apoyado y acompañado en toda mi carrera, y a mis sobrinos Saúl, Alfonso, Juan Esteban y Jimena.

Y a mis amigos Paola Carpio, Rocío Barrero, Blanca Guzmán, Alejandra Nava, Eneida Sánchez, Patricia Palomo, René Farfán.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, Margarita Nava y Jesús Reséndiz, por su invaluable ayuda para la realización de esta tesis,

A la Secretaría de Relaciones Exteriores de México, por proporcionarme los recursos necesarios para mis estudios,

Al Hospital Infantil de México Federico Gómez, por permitirme formarme en tan prestigiosa institución.

**Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una
beca otorgada por la Secretaría de Relaciones Exteriores
del Gobierno de México**

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	3
MARCO TEÓRICO.....	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	15
OBJETIVOS.....	16
HIPÓTESIS.....	17
MÉTODO.....	18
TIPO DE ESTUDIO.....	18
POBLACIÓN.....	18
CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	18
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN.....	18
METODOLOGÍA.....	18
LABORATORIO.....	19
PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	22
MARCHA.....	22
VARIABLES.....	22
LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	23
ASPECTOS ÉTICOS.....	23
BIOSEGURIDAD.....	23
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES.....	30
RECOMENDACIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
ANEXO 1.....	36
ANEXO 2.....	39

RESÚMEN

Utilidad de la detección de galactomananos por ensayo inmunoenzimático para el diagnóstico de aspergilosis invasiva en pacientes neutropénicos ingresados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez

Aspergillus es un hongo ubicuo en el ambiente; la aspergilosis invasiva (AI) es una causa importante de morbilidad y mortalidad en este tipo de pacientes; el abordaje diagnóstico implica la obtención de muestras por técnicas invasivas. La detección de galactomananos, un polisacárido presente en la pared celular de *Aspergillus*, ha sido utilizada como método diagnóstico de AI con resultados variables: los galactomananos están presentes en sangre de pacientes con enfermedad invasiva por *Aspergillus*. El presente estudio, planteó la utilidad de la detección de galactomananos con Platelia® para el diagnóstico de aspergilosis invasiva en los pacientes neutropénicos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG). METODOLOGÍA: Evaluación de prueba diagnóstica. Población y muestra pacientes de ambos sexos, ingresados en el HIMFG entre el período de enero a julio 2007, que presentaron neutropenia en el último mes o en el momento del estudio y que por presentar cuadro sugestivo de aspergilosis ameritaron toma de estudio histopatológico, examen directo y/o cultivo. Se consideró como estándar de oro la identificación de *Aspergillus* en estudio histopatológico, examen directo y/o cultivo. RESULTADOS: Se incluyeron en el estudio 10 pacientes. Se confirmó el diagnóstico de aspergilosis en 6 pacientes y se descartó en 4. El sitio de aspergilosis fue pulmonar en 5 casos y rinosinusal en 1. Los diagnósticos de base fueron leucemia linfoblástica aguda (f=4), leucemia mieloblástica aguda (f=3), anemia aplásica (f=1), lupus eritematoso sistémico (f=1) y hepatitis fulminante (f=1). Los géneros de *Aspergillus* encontrados fueron *Aspergillus fumigatus* (f=2), *Aspergillus flavus* (f=2) y *Aspergillus* sp (f=2). La medición de galactomananos fue positiva en 6 pacientes y negativa en 4. Se calculó una sensibilidad y especificidad del 100% para aspergilosis invasiva probada o probable, y valores predictivos positivo y negativo de 100%. CONCLUSIONES: 1) Los niveles de galactomanano en pacientes con aspergilosis invasiva en el HIMFG se encontraron entre 1.287 y 3 con un índice calculado entre 1.5 y 3.88. El punto de corte del índice para diagnosticar AI con Platelia® la población del HIMFG es de 1.5. 2) La sensibilidad y especificidad de la detección de galactomananos con Platelia® para el diagnóstico probado y probable de aspergilosis invasiva en los pacientes del HIMFG fue del 100%, El valor predictivo positivo y negativo fueron también del 100%. 3) Es necesario la realización de mayor número de estudios invasivos en los pacientes del HIMFG con sospecha AI (casos posibles) para poder tener un mayor número de pacientes con diagnóstico confirmado o descartado y así poder tener resultados más confiables de sensibilidad y especificidad, así como de valores predictivos. 4) En los casos de AI tanto probado, como probable y posible, la sensibilidad y especificidad de la detección de galactomananos con Platelia® para el diagnóstico de AI fue del 35% y 100% respectivamente. 5) La detección de galactomananos podría ser una ayuda diagnóstica útil en los pacientes neutropénicos con riesgo de AI en el HIMFG, con la ventaja de ser un estudio no invasivo, de rápida realización y con alta sensibilidad y especificidad.

INTRODUCCIÓN

Aspergillus es un hongo ubicuo en el ambiente, que puede causar enfermedad en el ser humano únicamente en situaciones especiales ⁽¹⁾. Se han reportado casos de enfermedad invasiva en pacientes inmunocomprometidos especialmente con enfermedad hematológica y luego de trasplante de médula ósea ⁽⁴⁻⁶⁾. La aspergilosis es una causa importante de mortalidad en este tipo de pacientes, calculándose que el riesgo relativo de morir en pacientes con aspergilosis invasiva y malignidad es de 13.5 ⁽⁷⁾. Se consideran como factores de riesgo para adquirir aspergilosis los estados de inmunosupresión, así como la neutropenia ^(9,10). El diagnóstico se puede realizar en base a técnicas directas, histopatológicas y cultivo ⁽¹²⁾. Esto implica la obtención de muestras por técnicas invasivas. Es por eso que se han utilizado también como ayudas diagnósticas criterios clínicos y radiológicos ⁽⁴⁾. En 2002 se publica un consenso para el diagnóstico de infecciones micóticas invasivas ⁽¹³⁾, incluyendo aspergilosis, en que se dividen en infección probada, probable y posible con base en criterios microbiológicos, clínicos y radiológicos. Se han buscado otros medios para diagnóstico temprano de aspergilosis invasiva. Entre estos están la detección de anticuerpos, antígenos, metabolitos y ácidos nucleicos ⁽¹²⁾. De estos la detección de galactomananos, un polisacárido presente en la pared celular de *Aspergillus*, es el que ha sido más estudiado y ha tenido mejores resultados ⁽¹⁷⁾; los galactomananos están presentes en sangre de pacientes con enfermedad invasiva por *Aspergillus*. Platelia® es un ensayo inmunoenzimático que utiliza un anticuerpo monoclonal para detectar incluso 0.5 µg/ml de galactomananos. Se han estudiado la sensibilidad y especificidad de Platelia para el diagnóstico de AI en distintas poblaciones, reportándose datos variables ⁽¹⁸⁻²¹⁾. Siendo la AI invasiva la infección fúngica filamentosa más común en inmunocomprometidos y significando esta una importante morbilidad y mortalidad ⁽⁷⁾, cobra relevancia el poder tener un estudio no invasivo que podría ser de utilidad para el diagnóstico de aspergilosis invasiva en pacientes inmunocomprometidos.

El Hospital Infantil de México Federico Gómez, es un centro de tercer nivel que atiende una importante población de pacientes con inmunocompromiso, incluyendo pacientes con patología hematológica.

El presente estudio, planteó como problema si será de utilidad de la detección de galactomananos con Platelia® para el diagnóstico de aspergilosis invasiva en los pacientes neutropénicos de nuestro hospital. Fue una evaluación de prueba diagnóstica, teniendo como población a los pacientes que fueron ingresados en el HIMFG con neutropenia entre enero y julio 2007, y como muestra a los pacientes que se les realizó estudio histopatológico, examen directo y/o cultivo por sospechase aspergilosis.

ANTECEDENTES

Aspergillus

Aspergillus es un hongo saprófito, ubicuo en el ambiente. Se encuentra comúnmente en materiales de desecho ⁽¹⁾. Pertenece al reino: Fungi, Phylum: *Ascomycota*, Orden: *Eurotiales*, Familia: *Trichocomaceae*, Genero: *Aspergillus*.

El género *Aspergillus* incluye más de 900 especies; de éstas, solo 19 son causantes de enfermedad, que incluye aspergilosis alérgica pulmonar, aspergiloma y aspergilosis invasiva (AI). Los más comúnmente aislados son *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus* ⁽²⁾. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) los aislamientos más comúnmente encontrados son *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*, cada uno en el 45% de las enfermedades invasivas, y *Aspergillus niger* en el 10% (datos no publicados).

El género *Aspergillus* se caracteriza por presentar hifas macrosifonadas, septadas, con ramificación dicotómica en ángulo agudo ⁽¹⁾. Se forman conidias a lo largo de cadenas de esterigmas que cubren estas vesículas. Se produce abundante esporulación demostrada en cada cabeza conidial produciendo numerosas conidias. Estas se transportan fácilmente en el aire, y su pequeño tamaño favorece el acceso en el tracto respiratorio ⁽¹⁾.

Aspergillus puede causar enfermedad por alergia (aspergilosis pulmonar alérgica), colonización o invasión en tejidos ⁽³⁾.

Figura 1: *Aspergillus sp.* en examen directo con azul de algodón de lactofenol



EPIDEMIOLOGÍA

Aspergillus crece adecuadamente en una variedad de sustratos, incluidos en granos, vegetales en descomposición y suelo.

Se ha asociado a brotes en salas de oncología y trasplantes atribuidos a fuentes hospitalarias de *Aspergillus* en el aire, tales como renovaciones o construcciones en edificios adyacentes o fomites, ninguno de los cuales se ha podido implicar directamente ⁽³⁾. La epidemiología de aspergilosis invasiva ha sido poco estudiada en población pediátrica.

En 2005 Steinbach realizó una revisión de la literatura sobre la incidencia de aspergilosis ⁽⁴⁾. Reporta nueve estudios con la limitante de no hacer análisis separado para población adulta y pediátrica. Revisa dos artículos publicados en edad pediátrica. En 1993 el Hospital for Sick Children en Toronto analiza 39 casos de aspergilosis entre 1979 y 1988, de éstos, 24 fueron aspergilosis probadas, 15 probables; la media de edad fue 10 años; 74% se presentaron en pacientes con algún tipo de malignidad o transplantados de médula ósea; 41% de los fueron en tejidos blandos, y el 40% en pulmón. La supervivencia total fue del 23% ^(4,5).

La revisión realizada por St Jude's Children's Hospital en Memphis, entre 1962 y 1996, encontró que el recuento absoluto de neutrófilos de los pacientes con AI fue de <500 células/ul por un tiempo medio de 14 días, y el intervalo entre inicio enfermedad de base y la detección de AI fue de 16 meses. Ellos calculan una incidencia de AI de 7% en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, 6% en coriocarcinoma, 4.6% en anemia aplásica, 4% en leucemia mieloblástica aguda, 4% en leucemia mieloblástica crónica, y 1% en leucemia linfoblástica aguda. La supervivencia fue del 58% al mes, y de 25% luego de 2 meses, con 15% luego de 10 meses ^(4,6).

El artículo publicado en 2006 por Zaoutis, revisó la epidemiología y los costos de AI en niños de Estados Unidos en el año 2000. Utilizó información de la base de datos Kid's Inpatient Database, que agrupa a 27 estados de Estados Unidos. Se revisaron 1.9 millones de expedientes, de un total de 2.5 millones contenidos en KID 2000. Incluyeron pacientes que tuvieron diagnóstico de aspergilosis, con los siguientes factores de riesgo: malignidad, enfermedad inmunológica o hematológica, y trasplante. Hallaron 153,231 pacientes inmunocomprometidos con riesgo de desarrollar AI, de estos la presentaron. La incidencia entre pacientes inmunocomprometidos fue del 437/100,000 admisiones pediátricas. En la tabla 1 se presenta la incidencia de AI por enfermedad de base. Este estudio también evalúa mortalidad y riesgo de muerte según patología de base. Se calculó un riesgo relativo de morir en pacientes con AI asociado a malignidad de 13.5 (10.9-16.8, $p < 0.001$), anemia aplásica 5.3 (3.7-7.5, $p < 0.001$), inmunodeficiencia 2.4 (1.1-5.2, $p < 0.001$), trasplante de médula ósea 3.8 (2.6-5.6, $p < 0.001$) (tabla 1) ⁽⁷⁾.

Tabla 1: Casos de Aspergilosis Invasiva según enfermedad de base en Estados Unidos durante el año 2000

Condición de Base	Mortalidad		RR (95% CI)	p
	Pacientes con AI (N=666)	Pacientes Sin AI (N=151537)		
Malignidad	21	1	13.5 (10.9-16.8)	<0.001
Tumor Sólido	18	1	14.0 (6.8-28.6)	
Hueso	0	0.6		NA
SNC	69	2	21.6 (9.1-51.0)	<0.001
Otro	0	0.7		NA
Leucemia	21	2	11.0(8.5-14.2)	<0.001
LLA	21	1	14.9 (10.2-21.7)	<0.001
LMA	20	3	5.0 (3.3-7.4)	<0.001
Linfoma	29	2	13.5 (6.7 - 27.3)	<0.001
Otra malignidad	19	2	9.5 (5.3-17.0)	<0.001
Anemia Aplásica	22	32.4	5.3 (3.7-7.5)	<0.001
Inmunodeficiencia	6	23	2.4 (1.1-5.2)	0.2
Transplante órgano sólido	33	6	4.7(0.9-23.6)	NA
Transplante medula ósea	44	8	3.8 (2.6-5.6)	<0.001
Alogénico	45	11	3.3 (2.2-4.8)	<0.001
Enfermedad de injerto contra huésped	44	10	3.4 (2.2-5.3)	<0.001
No injerto contra el huésped	52	13	3.0 (1.4-6.1)	<0.001
Antóloga	66	3		NA

Tomado de Zaoutis et al, Pediatrics 2006 ⁽⁷⁾

Los niños con inmunocompromiso y AI tuvieron una estancia hospitalaria media más larga (16 días, IQR: 3-38) que los que no tenían AI (3 días, IQR: 2.6 p < 0.001). El costo hospitalario medio por paciente inmunocomprometido con AI fue de \$49,309 (IQR: \$7975-\$189,579) comparado con los inmunocomprometidos sin AI \$9,035 (IQR \$4774-\$19,656, p<.01) ⁽⁷⁾.

FACTORES DE RIESGO

El estudio publicado en 2005 por Gavalda, realizado en pacientes transplantados de órgano sólido, de hospitales pertenecientes a la Red de Estudio de la Infección en el Transplante, en España, describió los factores de riesgo asociados con aspergilosis invasiva. Encontró como factores de riesgo en los primeros 3 meses post transplante las infecciones bacterianas repetidas, la enfermedad por citomegalovirus y el fallo renal; luego de 3 meses la sobre inmunosupresión y de nuevo el fallo renal post transplante ⁽⁸⁾.

En 2002, Allam M. encontró como factores de riesgo para AI en pacientes del Hospital Reina Sofía en España, el cursar con neutropenia los últimos 6 meses, la inmunosupresión de

cualquier tipo en el último ingreso y el número de ingresos el último año; describen algunos casos en pacientes con inmunocompetentes o con neutropenia leve ⁽⁹⁾.

En 2005, Müllermann describe los factores de riesgo de aspergilosis en pacientes neutropénicos hematológicos del hospital universitario de Berna, Suiza. En esta revisión de 189 adultos con 45 casos de aspergilosis (9 probadas, 3 probables y 33 posibles) reportan como factores asociados la leucemia aguda, el síndrome mielodisplásico, y la neutropenia prolongada. La AI ocurrió más en el período de inducción a la remisión y con un intervalo de tiempo corto entre episodios de neutropenia ⁽¹⁰⁾.

CLÍNICA

Las manifestaciones clínicas de aspergilosis dependerán del sitio de afección. En pacientes neutropénicos la invasión puede iniciar en nariz y senos paranasales y puede diseminarse a estructuras vecinas causando invasión vascular y necrosis. Rara vez pacientes previamente sanos pueden presentar AI en senos paranasales, pero la enfermedad es indolente y granulomatosa. Dolor localizado en senos, proptosis y ceguera mono ocular son presentaciones frecuentes. En el ojo puede haber invasión como una endoftalmitis con baja frecuencia. También puede presentarse en pulmón luego de la inhalación masiva de esporas de *Aspergillus* como un evento autolimitado en pacientes inmunocompetentes, pero los pacientes con neutropenia pueden desarrollar neumonía aguda rápidamente progresiva. La infección al inicio suele iniciar con fiebre, seguida de signos radiológicos. El aumento de la lesión y la diseminación periférica son datos de alarma. En una revisión de la literatura publicada en el 2002 por Müller ⁽¹¹⁾, reportó como presentación clínica en pacientes pediátricos neutropénicos y con afección pulmonar fiebre persistente o recurrente, tos no productiva, dolor pleurítico, frote pericárdico, hemoptisis, neumonía, regularmente cavitación (Figura 2) ⁽³⁾ y derrame pleural, con invasión vascular pulmonar y posible diseminación a otros focos ⁽¹¹⁾.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico se puede hacer con base en la identificación del hongo por técnicas directas, cultivo, y serológicas ⁽¹²⁾ así como por criterios clínicos y radiológicos ⁽⁴⁾.

La falta de consenso en el mejor método para diagnosticar aspergilosis invasiva, así como otras micosis invasivas, llevó en 2002 a elaborar un consenso por parte del Grupo Cooperativo de Infecciones Micóticas Invasivas (IFICG, Invasive Fungal Infections Cooperative Group) de la Organización Europea para Investigación y Tratamiento de Cáncer (EORTC European Organization for Research and Treatment of Cancer) así como el Grupo de Estudio de Micosis del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (MSG Mycoses Study Group, NIAID, National Institute of Allergy and Infectious Diseases) para la definición de enfermedad micótica invasiva en pacientes inmunocomprometidos con cáncer y transplantados de médula ósea ⁽¹³⁾. Dicha definición se resume en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Definiciones de infección fúngica invasiva en pacientes con cáncer y receptores de trasplante de Médula Ósea

Categoría, tipo de infección	Descripción
Infección fúngica invasiva probada	Examen histopatológico o citopatológico mostrando hifas de una aspiración con aguja o biopsia con evidencia de daño celular asociado (microscópico o inequívoco por imagen); o cultivo positivo de una muestra obtenida por procedimiento estéril de un sitio normalmente estéril y sitio clínica o radiológicamente anormal consistente con infección excluyendo orina y membranas mucosas
Infección fúngica invasiva probable	Al menos 1 criterio del huésped (tabla 3); y un criterio microbiológico; y 1 criterio clínico mayor (o 2 menores) de un sitio anormal consistente con infección
Infección fúngica invasiva posible	Al menos 1 factor del huésped (tabla 3); y 1 microbiológico o 1 criterio clínico mayor (o 2 menores) de sitios anormales consistentes con infección

Tomado de Asioglu R et al, Clin Inf Dis 2002 ⁽¹³⁾

Tabla 3. Criterios del huésped, microbiológicos y clínicos de infección fúngica invasiva en pacientes con cáncer y receptores de trasplante de Médula Ósea

Criterios del huésped, microbiológicos y clínicos de infección fúngica invasiva en pacientes con cáncer y receptores de trasplante MO			
Tipo de criterio		Criterio	
Factores del huésped		Neutropenia (<500 neutrófilos/mm ³) por >10 días	
		Fiebre persistente por >96 h refractaria a tratamiento antibacteriano apropiado de amplio espectro en pacientes de alto riesgo	
		Temperatura ya sea >38° C o <36 °C en cualquiera de las siguientes condiciones predisponentes: neutropenia prolongada (>10 días) en los últimos 60 días, uso reciente o actual de agentes inmunosupresores significativos en los últimos 30 días, infección probada o probable durante un episodio previo de neutropenia, o coexistencia de SIDA sintomático	
		Signos y síntomas indicantes de enfermedad de injerto contra el huésped, particularmente severa (grado >2) o enfermedad crónica extensa	
		Uso prolongado (>3 semanas) de corticosteroides en anteriores 60 días	
Microbiológico		Resultado positivo de cultivo de Aspergillus de esputo o lavado broncoalveolar	
		Resultado positivo de cultivo o hallazgos de microscopía directa o citología de hongos en aspirado de senos	
		Resultado positivo de antígeno de Aspergillus en especímenes de lavado broncoalveolar, LCR, o >2 muestras de sangre	
		Hallazgos positivos de citología o microscopía directa de elementos fúngicos en muestras de fluidos corporales estériles	
C l i n i c o	Tracto respiratorio inferior	Mayor	Cualquiera de los siguientes infiltrados nuevos en TAC: signo del halo, signo de aire crescente, o cavidad dentro de consolidado
		Menor	Síntomas de infección de tracto respiratorio inferior (tos, dolor torácico, hemoptisis, disnea); hallazgo clínico de frote pleural; cualquier infiltrado nuevo que no llena criterios mayores; efusión pleural
	senos para nasales	Mayor	Evidencia radiológica sugestiva de infección invasiva de senos (erosión de paredes, extensión de infección a estructuras vecinas, destrucción extensa de la base del cráneo)
		Menor	Síntomas respiratorios superiores (descarga nasal, obstrucción) ulceración en nariz o escarcha de mucosa nasal o epistaxis; edema peri orbitario; sensibilidad maxilar; lesiones negras necróticas o perforación del paladar duro

Tomado de Asioglu R et al, Clin Inf Dis 2002 ⁽¹³⁾

Técnicas directas

Las técnicas directas tienen la ventaja sobre el cultivo de tener una mayor sensibilidad y ser relativamente rápidas. Su principal desventaja es el no poder diferenciar distintos hongos filamentosos. En muestras de tejido, *Aspergillus sp* típicamente muestra hifas septadas, con ramificación angular.

Entre los procedimientos directos que se deben realizar siempre que se sospechen hongos, está el preparado en fresco, con hidróxido de potasio, y con azul de lactofenol de algodón. Se deben examinar en fresco o con hidróxido de potasio al 10% que ayuda a la visualización de hifas al digerir y limpiar el material proteináceo dejando la pared fúngica intacta. Subsecuentemente se hace un frote se fija y se aplican distintas tinciones. La tinción de Gram debe hacerse por rutina, pero tinciones para células fúngicas y fluorescentes pueden aumentar la sensibilidad. Entre las tinciones fúngicas se encuentra tinción de plata de Gomori y ácido periódico de Schiff (PAS). La primera permite evitar detalles del entorno celular, mientras que PAS permite revelar los alrededores de la célula, arquitectura del tejido y respuesta inflamatoria ⁽¹²⁾.

Fluorescentes

En las tinciones fluorescentes se utilizan tintes que se unen a los polisacáridos de la pared celular. No son específicas de *Aspergillus sp*, pero tienen alta sensibilidad, se realizan rápidamente y tienen amplia aplicabilidad. Se pueden aplicar a secciones congeladas, fijadas en parafina o especímenes en fresco ⁽¹²⁾.

Inmunohistoquímica, inmunofluorescencia e hibridación in situ

La inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales, inmunofluorescencia y la hibridación *in situ* se han estudiado como técnicas diagnósticas. Colectivamente tienen el potencial de dar género y especie, que puede ser importante en algunos casos en que los cultivos son negativos. Tienen la desventaja de no estar siempre disponibles ⁽¹²⁾.

Cultivo

El cultivo de *Aspergillus sp* permite el diagnóstico de aspergilosis, así como realizar pruebas de susceptibilidad a antifúngicos. Su mayor desventaja es el tiempo relativamente largo de realización, además de tener una sensibilidad baja, y requiere personal especializado para la determinación de especies.

La habilidad de crecer a 37° C distingue a *Aspergillus sp* de otros hongos no patogénicos ambientales. *Aspergillus sp* puede aislarse en la mayoría de medios sólidos y líquidos, como gelosa sangre, gelosa chocolate, infusión cerebro corazón. Siempre se debe incluir un medio específico para hongos, como agar Sabouraud dextrosa, en el primer aislamiento por su mejor crecimiento. La adición de antibióticos, como cloranfenicol o gentamicina, se requiere para

recuperar *Aspergillus sp* de sitios no estériles. La identificación del aislado de laboratorio se hace por la morfología microscópica y el aspecto colonial ⁽¹²⁾.

Serología

Entre las técnicas serológicas tenemos la detección de galactomanano y la detección de (1,3)- β -D glucano. Este último es un compuesto de la pared celular de la mayoría de hongos, con excepción de *Cryptococcus sp* y los Zigomicetos. La molécula es ubicua en la naturaleza y ha sido usada como marcador de la biomasa de los hongos. La presencia de este compuesto en otros hongos no permite el diagnóstico específico de *Aspergillus sp*.

La detección de (1,3)- β -D glucano se realiza típicamente en suero ⁽¹²⁾.

El galactomanano esta presente en la pared celular de la mayoría de especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, se detecta en forma temprana en sangre de pacientes con enfermedad invasiva por *Aspergillus sp*. La limitante para la aplicación de Platelia ha sido la diversidad de resultados obtenidos en la población pediátrica.

Detección de Anticuerpos

La detección de anticuerpos contra *Aspergillus sp* es necesaria para diagnóstico de aspergilosis pulmonar crónica. No ha sido útil por otro lado para el diagnóstico de aspergilosis invasiva, ya que refleja únicamente contacto con el hongo, mas no enfermedad invasiva ⁽¹²⁾.

Metabolitos

Aspergillus sp. produce una amplia gama de enzimas extracelulares, así como metabolitos, todos los cuales tienen el potencial de servir como marcadores de aspergilosis invasiva. Algunos de estos están en estudio ⁽¹²⁾.

Ácidos Nucleicos

La detección a través de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) ha sido estudiada para el diagnóstico de aspergilosis. Se han utilizado diversos especímenes clínicos tales como suero, plasma, sangre entera, han sido utilizados, así como lavado broncoalveolar, tejidos, incluyendo secciones fijadas en parafina. La muestra óptima para diagnóstico no ha sido determinada ⁽¹²⁾.

Con propósitos de toma de decisiones, la detección inicial de un amplio rango de hongos es importante, así como la identificación posterior del patógeno específico, por lo que un abordaje óptimo es la aplicación de iniciadores comunes para múltiples hongos con una amplificación posterior para determinación de especie. El blanco más común es el complejo de DNA ribosomal. Los estudios difieren considerablemente en cuanto a la determinación de especificidad analítica ya que no hay una estandarización entre las pruebas de biología molecular lo cual limita su reproductibilidad.

En cuanto a la sensibilidad y especificidad de la PCR, White et al en 2006 en el Hospital Universitario de Wales, en el Reino Unido, evaluó a 203 adultos con riesgo de infección fúngica, de estos se obtuvieron un total de 401 muestras. La prueba al compararla con los criterios de EORTC/IFICG presentó una sensibilidad de 34% y una especificidad del 94%, con un valor predictivo positivo de 69% y valor predictivo negativo de 80%. Al excluir del análisis a los pacientes con enfermedad posible, la sensibilidad llega al 92.3% y el valor predictivo negativo sube al 99.3, ellos concluyen que una prueba negativa de PCR podría excluir aspergilosis como diagnóstico ⁽¹⁴⁾.

En 2004 Kawazu compra PCR en tiempo real, detección de galactomananos y de β D glucano semanalmente para diagnóstico de aspergilosis en pacientes con enfermedad hematológica. Analizan 149 episodios probados de AI, hallando sensibilidad y especificidad de 100% y 93% para β D glucano; 55% y 93% para EIA de galactomananos; y 55 % y 93% para PCR ⁽¹⁵⁾.

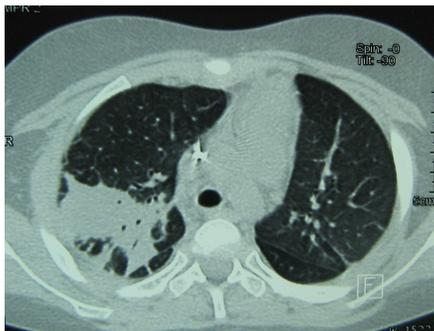
Radiológico

Los hallazgos radiológicos en adultos han sido estudiados. En población pediátrica existen pocos datos de estos hallazgos. En una revisión de 10 años de diagnóstico radiológico de aspergilosis invasiva realizada por Thomas en el hospital de niños de Londres, se encontró que las radiografías de tórax tenían datos variados, incluyendo consolidación segmentaria, multilobular, masas nodulares periféricas y derrame pleural. En ningún caso hallaron cavitación ni niveles aéreos. La tomografía mostró osteomielitis y nódulos múltiples y pequeños ⁽¹⁶⁾.

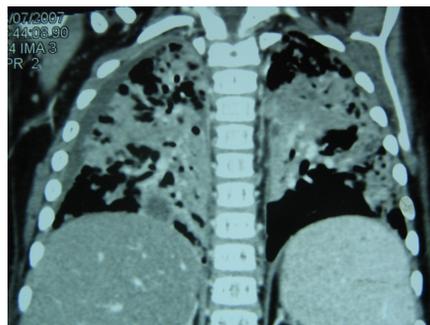
El consenso e la EORTC/IFICG refiere como datos sugestivos de aspergilosis invasiva cualquiera de los siguientes infiltrados nuevos en TAC: signo del halo, signo de aire crescente, o cavidad dentro de consolidado (Figura 2) ⁽¹³⁾.

Figura 2 (a): Tomografía Computada de paciente de 9 años con leucemia linfoblástica aguda y aspergilosis pulmonar que muestra un área de consolidación derecha. (b): paciente de 11 años con leucemia mieloblástica aguda y aspergilosis pulmonar que muestra áreas de consolidación con una cavitación en pulmón izquierdo.

Fig.2 (a).



(b).



TRATAMIENTO

Existen pocos estudios sobre tratamiento de aspergilosis invasiva en pacientes pediátricos. En 2005 Steinbach revisa el tratamiento de aspergilosis invasiva en niños reportando un estudio multicéntrico de tratamiento con anfotericina B liposomal realizado entre 1990 y 1995 en adultos y niños. Este estudio incluyó a 551 pacientes de los cuales 291 cumplieron criterios de AI con expedientes completos. Encontraron 42% con respuesta completa a la Anfotericina B, 12% parcial y 45% fallos. Un análisis separado de la población pediátrica, encontró una respuesta completa parcial o completa en 56% de los pacientes, respuesta estable en 8% y fallo en 36%. La respuesta completa o parcial fue en 50% de las AI pulmonares, 29% diseminadas, 100% sinusitis y 67% de un solo órgano extrapulmonar.

Un estudio francés reporta 46 pacientes pediátricos tratados con Anfotericina B liposomal entre 1994 y 1997. De estos 78% presentaron cura o mejoría, con 22% fallos a la terapia.

Un análisis del uso por de voriconazol para AI refractaria luego de 7 días de tratamiento con Anfotericina B incluyó a 42 pacientes con AI probable. En el análisis se encontró repuesta parcial o completa en 43% de los pacientes, respuesta estable en 7% y 40% con fallo a la terapia. La repuesta parcial o completa fue en el 33% los casos de AI pulmonar, 50% de sistema nervioso central, 86% de las diseminadas, 29% y de un órgano extrapulmonar 30%.

Otra serie pediátrica utilizando voriconazol incluyó 7 pacientes con patología hematooncológica, con tratamiento inicial con anfotericina B por 6 semanas antes de cambio a voriconazol. Hubo respuesta completa en 2 pacientes, parcial en 2, estabilidad en 1 y fallo en 2. La respuesta parcial o completa coincidió con la recuperación de neutrófilos y la remisión de la enfermedad hematológica de base ⁽⁴⁾.

El diagnóstico temprano de AI aunado a un tratamiento agresivo ha probado mejorar el pronóstico de pacientes con esta patología ^(27,28).

MARCO TEÓRICO

GALACTOMANAN

El galactomanano es un heteropolisacárido termoestable, presente en la pared celular de la mayoría de especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. La molécula está compuesta de un núcleo manano no inmunogénico, con cadenas laterales inmuno reactivas de distintos tamaños, conteniendo unidades de galactofuranosil. Es de interés médico ya que se halla en sangre de pacientes con enfermedad invasiva por *Aspergillus sp* ⁽¹⁷⁾.

La composición del galactomanano varía según cepas y géneros, así como por las condiciones de cultivo, extracción y purificación de las muestras.

Existen dos ensayos comerciales para la detección de galactomananos: Pastorex® (Sanofi Diagnostics Pasteur Marnes-La-Coquette, France), una prueba de aglutinación; y Platelia® (BioRad, Marnes-La-Coquette, France), estudio inmunoenzimático (EIA) ⁽¹²⁾.

PLATELIA®

La detección de galactomanano a través de Platelia® es un EIA de “doble sándwich”. Incorpora un anticuerpo monoclonal específico para B 1-5 galactofuranosa, EB A2, como detector y aceptor de galactomanano.

Ya en 1996 Rohrllich P. en el Hospital Robert Debré, París, presenta un estudio con EIA para galactomananos en el cual incluyen 37 pacientes hematoológicos, incluyendo 15 pacientes post trasplante de médula ósea y 18 pacientes con neutropenia por quimioterapia. Doce pacientes tuvieron detecciones positivas, de ellos 10 desarrollaron aspergilosis invasiva presuntiva (no utilizan criterios EORTC/MSG) ⁽¹⁹⁾.

Se ha estudiado la sensibilidad y especificidad de Platelia® en distintas poblaciones. Pfeiffer et al, en 2006 publicaron un meta análisis sobre el uso de esta prueba para diagnóstico de AI tomando en cuenta los estudios que diagnosticaron AI utilizando los criterios de EORTC/MSG y que tuvieran datos para cálculo de sensibilidad y especificidad. Identificaron 139 estudios realizados entre 1966 y febrero 2005; solo 27 estudios cumplieron los criterios de inclusión; 15 incluyeron solo adultos; 7 niños y adultos y en 5 no se mencionó la edad de la población. Solo 2 estudios reportaron datos separados para niños. Cinco estudios tomaron como positivo un índice de 0.5, 13 usaron 1 y 11 usaron 1.5. Las muestras fueron tomadas entre 1 y 2 veces por semana. En el análisis se evidenció amplia heterogeneidad entre los estudios mencionados. En la población adulta, se encontró una sensibilidad de 0.62 (95% IC, 0.52-0.72) y una especificidad de 0.87 (95% IC, 0.85-0.88). En los estudios en población pediátrica, la sensibilidad fue del 0.89 (95% IC, 0.51-1.00) y la especificidad de 0.85 (95% IC, 0.85-0.89) ⁽¹⁸⁾.

En el 2001 Sulahian A. et al evaluaron la detección de galactomananos en 347 niños en París encontrando para la población estudiada una sensibilidad del 90.6% y una especificidad de 94%, además la detección fue anterior a la aparición de signos radiológicos con una media de 8.4 días ⁽²⁰⁾.

La serie más grande realizada por Herbrecht R. publica datos de 797 episodios de neutropenia en pacientes hemato oncológicos del hospital universitario de Estrasburgo; de estos, 48 episodios fueron en niños. Realizó 3,294 mediciones de galactomananos reportando una especificidad de 47.6% en niños y de 98.2% en adultos. Reportan la sensibilidad de 64%, 16.4% y 25.5% según la clasificación diagnóstica (diagnóstico probado, probable o posible). No reportan la sensibilidad en población pediátrica ⁽²¹⁾.

Límites importantes para la aplicación de Platelia® han sido la diversidad de resultados obtenidos en la población pediátrica, desde publicaciones en las que se reporta una especificidad y sensibilidad del 89% y 100% ⁽²⁰⁾, hasta reportes de especificidades y sensibilidades abajo del 50% ⁽²¹⁾. También se han reportado falsos positivos luego del uso de amoxicilina clavulanato y piperacilina tazobactam ⁽²²⁻²⁴⁾. Así mismo, se ha reportado que el uso de terapia antifúngica disminuye la sensibilidad y especificidad del estudio ⁽²⁵⁾.

FUNDAMENTO

Platelia® *Aspergillus* es una técnica inmunoenzimática en un tiempo de tipo doble sándwich en microplaca, que permite la detección semicuantitativa del antígeno circulante galactomanano en sueros humanos. El anticuerpo monoclonal (Acm) de rata ABA-2 dirigido contra el galactomanano de *Aspergillus* se utiliza para:

- sensibilizar los pocillos de la microplaca y captar el antígeno galactomanano
- detectar el antígeno fijado a la microplaca sensibilizado (Acm acoplada a la peroxidasa)

La prueba tiene un umbral positivo de 1 ng de galactomananos por ml de suero ensayado ⁽²⁶⁾.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿La detección de galactomananos por ensayo inmuno enzimático con Platelia® es un método útil para el diagnóstico de aspergilosis invasiva en pacientes con neutropenia internados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez?

JUSTIFICACIÓN

La aspergilosis invasiva es la infección fúngica filamentosa más común observada en pacientes inmunocomprometidos. Su incidencia se ha incrementado en los últimos años, paralelo con el aumento de la supervivencia de pacientes inmunocomprometidos ⁽⁷⁾. En el HIMFG, en los años 2000 a 2006 se reportan 50 casos de aspergilosis invasiva (datos no publicados), 9 posibles, 9 probables y 32 probadas, de las cuales 7 fueron diagnosticadas por autopsia. De la misma forma el costo por tratamiento de estos pacientes ha ido en aumento, tanto por el internamiento hospitalario prolongado como por la terapia antifúngica ⁽⁴⁾. La detección precoz aunada al manejo antimicótico y quirúrgico agresivo mejora el pronóstico de los pacientes con aspergilosis invasiva ⁽²⁷⁻²⁸⁾.

Platelia®, un estudio de ensayo inmuno enzimático para la detección de galactomananos, inicialmente mostró una sensibilidad y especificidad elevadas (100% y 89% respectivamente) así como una detección más temprana de pacientes con aspergilosis invasiva, en comparación con las pruebas tradicionales ⁽¹⁷⁾; sin embargo, distintos estudios han mostrado resultados variables, tanto en población adulta como pediátrica ⁽¹⁸⁾. Existen muy pocos estudios en población pediátrica ⁽¹⁸⁾, y no se cuenta con experiencia en población pediátrica latino americana. Es por eso que nos planteamos evaluar la detección de galactomananos a través de Platelia® en nuestra población, lo cual nos puede dar una nueva herramienta diagnóstica, que potencialmente puede permitir un diagnóstico más precoz y por lo tanto un tratamiento oportuno en nuestros pacientes.

OBJETIVOS

GENERAL

- Evaluar la utilidad de la detección de galactomanano por ensayo inmuno enzimático con Platelia® para el diagnóstico de aspergilosis invasiva en pacientes neutropénicos ingresados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la detección de galactomananos con Platelia® en pacientes pediátricos del HIMFG.
2. Medir los niveles de galactomanano en pacientes con aspergilosis invasiva en el HIMFG.
3. Calcular la sensibilidad y especificidad de detección de galactomanano con Platelia® para el diagnóstico de aspergilosis invasiva.

HIPÓTESIS

La medición de galactomanano por ensayo inmunoenzimático con Platelia® es positiva en los pacientes del HIMFG con aspergilosis invasiva probada y probable.

MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO

Evaluación de prueba diagnóstica.

POBLACIÓN

Pacientes de ambos sexos, entre 1 y 18 años de vida, ingresados en el HIMFG entre el período de enero a julio 2007, que presentaron neutropenia durante el último mes o en el momento del estudio.

MUESTRA

Para el estudio se tomaron todos los pacientes ingresados entre enero y julio 2007 que presentaron neutropenia el último mes o en el momento del estudio y que cumplieron los criterios de inclusión, siendo un total de 10 pacientes.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes de ambos sexos, que por presentar cuadro sugerente de aspergilosis ameritaron toma de estudio histopatológico, examen directo y/o cultivo.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN

No se excluyó ni eliminó a ningún paciente.

METODOLOGÍA

A los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión se les realizó una toma de 3 ml de sangre coagulada en un tubo de ensayo estéril. Bajo técnica estéril se separó el suero de dicha muestra y se almacenó a -70°C; posteriormente se descongelaron y se determinó a través de Platelia® la presencia de galactomanano en la misma.

Se recabó el resultado histopatológico, de examen directo y/o de cultivo, según el caso, para determinar el diagnóstico de aspergilosis invasiva.

Se consideró como Aspergilosis invasiva a los pacientes que presentaron clínica compatible con la misma, así como un estudio histopatológico y/o examen directo y/o cultivo positivo para *Aspergillus sp.*

LABORATORIO

Se tomó una muestra de 3 ml de sangre preferentemente en el momento de toma de muestra para otro estudio de rutina. Se separó el suero y se congeló para procesarse posteriormente. Al tener todos los sueros se procesaron según se detalla a continuación.

El ensayo incluye las siguientes etapas:

1. Tratamiento de los sueros con calor en presencia de EDTA para disociar los complejos inmunes y precipitar las proteínas séricas que eventualmente puedan interferir en la reacción inmunoenzimática
2. Incubación simultánea del suero sobrenadante y del conjugado en los pocillos de la microplaca sensibilizados con anticuerpo monoclonal. En presencia de antígeno galactomanano, durante 90 minutos a 37°C se forma un complejo de tipo Acm-galactomanano – Acm/peroxidasa
3. Revelado, tras el lavado, de los complejos Acm-galactomanano-Acm eventualmente formados por adición del sustrato
4. Lectura de la reacción a 450/620 nm después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente (+18 - -30° C) y parada de la reacción con ácido sulfúrico 1,5 N

El kit incluye los reactivos en cantidad suficiente para realizar 96 determinaciones en 6 series.

Incluye:

- Microplaca: 12 tiras de 8 pocillos sensibilizados con el anticuerpo monoclonal EBA-2 anti galactomanano
- Solución de lavado concentrada 10x: Tampón TRIS-NaCl (pH 7.4), 1% Tween 20
- Suero control negativo liofilizado: suero humano que no contiene galactomanano
- Suero umbral liofilizado: Suero humano que contiene galactomanano 1ng/ml
- Suero control positivo: Suero humano que contiene galactomanano
- Conjugado: Anticuerpo monoclonal anti galactomanano marcado con peroxidasa
- Solución de tratamiento: Solución ácida de EDTA
- Tampón de sustrato de la peroxidasa: solución de ácido cítrico y acetato de sodio pH 5.2 que contiene 0.009% de H₂O₂ y 4% de DiMetilSulfOxido (DMSO)
- Solución de parada: Solución de ácido sulfúrico 1.5 N ⁽²⁶⁾

MUESTRAS

Las pruebas se efectúan en muestras de suero extraídas en tubos secos. Se recomienda extraer una muestra de sangre según las prácticas habituales; dejar que el coágulo se forme

completamente antes de centrifugar; conservar los tubos cerrados; tras la centrifugación extraer el suero y conservarlo en un tubo cerrado; almacenar las muestras entre +2 y +8° C cuando la prueba se realice en las 24 horas siguientes, y a -20° C o menos si el tiempo de almacenamiento sea mayor; conservar los sueros en tubos herméticamente cerrados; no utilizar muestras que se hayan congelado y descongelado más de 3 veces; antes de efectuar la prueba homogenizar (vortex) las muestras; los resultados no se verán afectados en muestras que contengan 20 mg/l de bilirrubina, en muestras lipémicas que contengan equivalente a 2g /l de triglicérido o en las muestras hemolizadas que contengan 165 mg/l de hemoglobina; no descomplementar los sueros; la detección de antígeno de galactomanano se realiza en suero sin diluir.

PROCEDIMIENTO

Antes de utilizar se deben dejar todos los reactivos se equilibren a temperatura ambiente.

Tratamiento de los sueros

Todos Los sueros control: negativo (R3), positivo (R5) y el suero umbral (R4) deben ensayarse al mismo tiempo que las muestras de los pacientes de la siguiente forma:

- depositar 300 µl del suero a ensayar en un tubo de Eppendorf de 1.5 ml
- Añadir 100 µl de la solución de tratamiento (R7)
- Homogenizar enérgicamente con vortex
- Cerrar herméticamente
- Incubar durante 3 minutos en baño de maría a 100° C
- Centrifugar a 10,000 g durante 10 minutos
- El sobrenadante se utiliza para la prueba
- Una vez tratado el suero debe ser sometido a ensayo lo antes posible (el mismo día)

Reacción inmunoenzimática

1. Establecer cuidadosamente el plan de distribución de los sueros.
2. Sacar el marco y las tiras (R1) del embalaje protector.
3. Homogenizar el contenido del frasco de conjugado (R6) por inversión antes de su utilización
4. Distribuir sucesivamente en los pocillos:
 - 50 µl del conjugado (R6)
 - 50 µl del sobrenadante del suero tratado

Prever 1 pocillo para el suero control negativo, dos para el umbral y uno para el suero control positivo, los cuales se colocarán

- A1: suero control negativo
- B1: suero umbral

- C1: suero umbral
 - D1: suero control positivo
5. Cubrir la microplaca con una película adhesiva.
 6. Incubar la microplaca al baño maría con termostato o en incubadora seca durante 90 minutos a 37° C.
 7. Preparar la solución de lavado diluida.
 8. Retirar la película adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y realizar 5 lavados. Secar las tiras dándole la vuelta sobre una hoja de papel absorbente y dar ligeros golpecitos.
 9. Preparar la solución de revelado: diluida a 1/50 en tampón sustrato de peroxidasa. Distribuir rápidamente, protegida de la luz directa, 200 ul en todos los pocillos. Dejar que la reacción se desarrolle en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 10. Detener la reacción enzimática con 100 ul de solución de parada en cada pocillo. Adoptar la misma secuencia y el mismo ritmo de distribución que para la solución de revelado.
 11. Limpiar cuidadosamente la parte inferior y leer la densidad óptica (DO) a 450/620 nm con un lector de placas en los 30 minutos siguientes a la parada de la reacción.

INTERPRETACIÓN

VALOR UMBRAL

El valor umbral corresponde a la media de las densidades ópticas de los pocillos que contienen el suero umbral .

CÁLCULO DEL ÍNDICE

Por cada suero ensayado se calcula la relación:

$$\text{Índice} = \text{DO muestra} / \text{Valor umbral}$$

VALIDACIÓN

Utilizar los controles en cada placa y en cada ensayo. Para validar la manipulación deben cumplirse los siguientes criterios:

$$0.3 = \text{VS} < 0.8$$

$$\text{Índice control positivo} > 2.0$$

$$\text{Índice control negativo} < 0.5$$

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

$$\text{Índice} > 1.5 \text{ positivo}$$

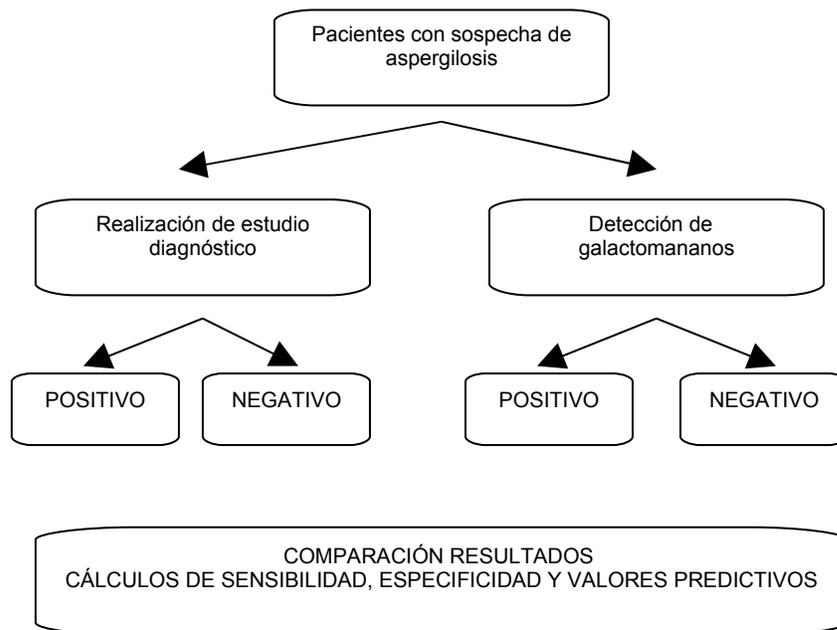
PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se recolectaron los datos a través de una hoja de recolección de datos (anexo 1) y los mismos se ingresaron a una hoja electrónica (Excel). Se tabularon según variables y se presentan en tablas.

Análisis : Se utilizó estadística descriptiva reportando frecuencia simples así como cálculos de Sensibilidad, Especificidad, Valores predictivos positivos y negativos.

MARCHA

Figura 3: Marcha



VARIABLES

Variable Independiente: Presencia de galactomanano. Variable dependiente: Aspergilosis invasiva

Tabla 4: Variables

VARIABLE	TIPO	Definición Operacional	ESCALA DE MEDICIÓN
Aspergilosis Invasiva	Dependiente	Resultado positivo para Aspergillus en muestra tomada a paciente (histopatológica, examen directo y/o cultivo)	Nominal (Si/No)
Presencia de Galactomanano	Independiente	Índice obtenido al dividir la densidad óptica de la muestra dentro del valor umbral del control. Positivo mayor de 0.5, negativo menor de 0.5	Nominal (Positiva/negativa)

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La prueba diagnóstica (detección de galactomananos) únicamente se comparó con el estándar de oro (examen directo, cultivo o estudio histopatológico), el cual implica un procedimiento invasivo en la mayoría de los casos. Dado que algunos pacientes no se les realiza dicho procedimiento por distintos motivos, consideramos estos casos sospechosos de aspergilosis por lo que existe la limitante de no poder incluirlos en los cálculos estadísticos.

ASPECTOS ÉTICOS

Como se trata de la realización de una prueba en la que utilizamos una muestra de sangre independiente a las que rutinariamente son tomadas a estos pacientes, se considera como Riesgo Mínimo (dolor en sitio punción, equimosis) por lo que se solicitó el consentimiento informado (Anexo 2) de parte de los padres o tutores del paciente previo a la toma de la muestra. La venopunción se hizo preferentemente en el momento de la toma de muestras de rutina.

BIOSEGURIDAD

Todas las muestras biológicas fueron desechadas según los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el manejo de bioinfecciosos.

Ya que se trabajó en el laboratorio de Micología, se desecharon los materiales bioinfecciosos en los depósitos designados para dicho fin en el laboratorio, siendo procesados junto al resto de desechos del HIMFG.

RESULTADOS

En el período de estudio, 10 pacientes se consideraron sospechosos de presentar aspergilosis invasiva y cumplieron los criterios de inclusión (sospecha de aspergilosis invasiva y realización de estudio histopatológico y/o examen directo y/o cultivo).

Las edades de los pacientes se encontraron entre 1 y 17 años (media de 10 años). Los diagnósticos de base fueron leucemia linfoblástica aguda en 4 casos, leucemia mieloblástica aguda en 3, anemia aplásica 1 caso, lupus eritematoso sistémico 1 caso y hepatitis fulminante en 1 caso. Todos los pacientes presentaban neutropenia, con un mínimo de 1 día y un máximo de 30 (promedio 11 días, mediana 8 días). Ningún paciente estaba bajo tratamiento con piperacilina tazobactam, ampicilina sulbactam ni amoxicilina clavulanato en el momento de la toma de muestra. En los pacientes en los que se confirmó el diagnóstico de AI, el sitio de aspergilosis fue pulmonar en 5 casos y en un caso rinosinusal. 3 pacientes ya habían recibido manejo con anfotericina B, 1 con voriconazol y 1 con caspofungina (Tabla 5).

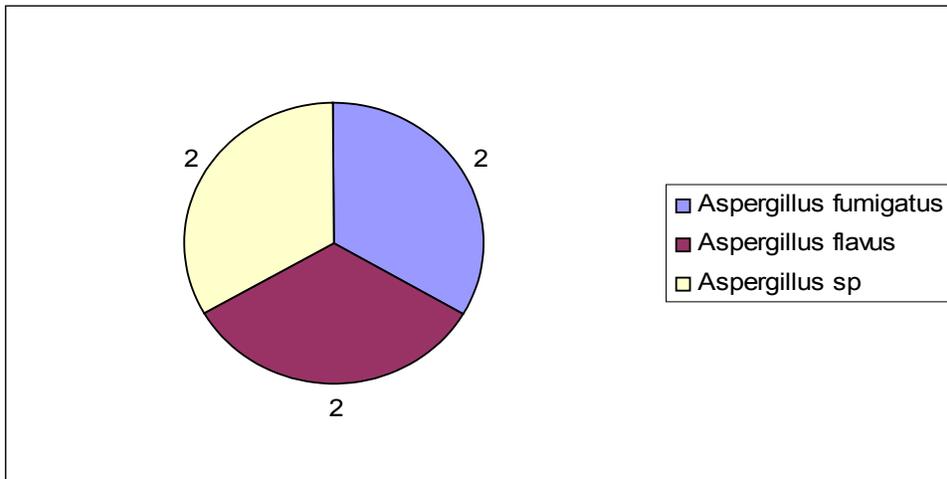
Tabla 5. Casos de Aspergilosis Invasiva

EDAD	ENFERMEDAD DE BASE	SITIO DE ASPERIGLOSIS	DIAS DE NEUTROPENIA	Tx. DE ASPERGILOSIS PREVIO
17 años	LMA M2	PULMONAR	24	SI
14 años	LES	PULMONAR	5	NO
1 año	HEPATITIS FULMINANTE	PULMONAR	1	NO
7 años	LLA L2	PULMONAR	19	NO
7 años	LLA L2	PULMONAR	6	NO
9 años	LMA M3	RINOSINUSAL	7	NO

LMA: Leucemia mieloblástica aguda; LLA leucemia linfoblástica aguda; LES: lupus eritematoso sistémico.

Las especies de *Aspergillus* encontradas fueron *Aspergillus fumigatus* (f=2), *Aspergillus flavus* (f=2) y *Aspergillus sp* (f=2) (Figura 4).

Figura 4: Especies de *Aspergillus* aislados



Los pacientes a los que se les descartó aspergilosis invasiva (f=4) tenían como diagnóstico de base leucemia en 3 casos y anemia aplásica en uno. El diagnóstico final fue neumonía bacteriana en 3 casos, y un hongo demateáceo en uno. (Tabla 6)

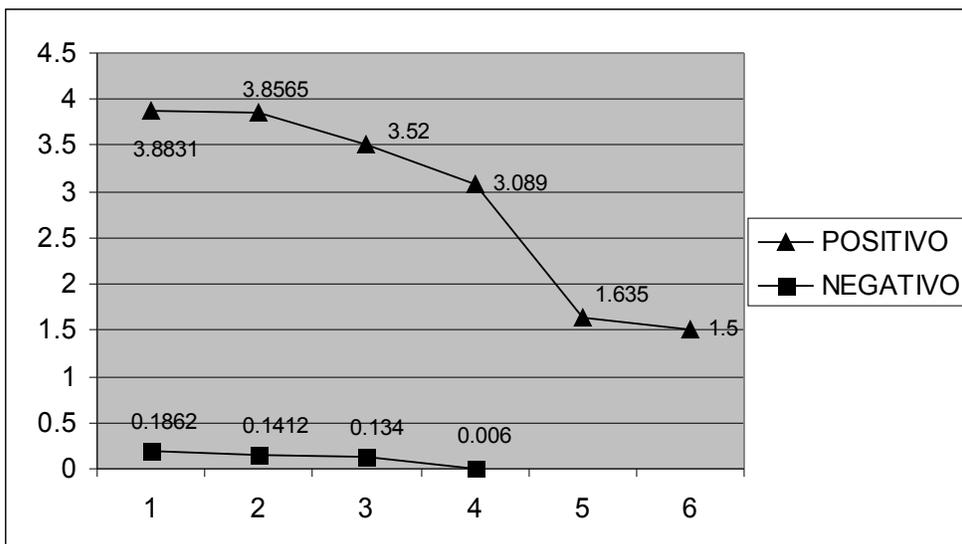
Tabla 6. Casos en que se descartó aspergilosis invasiva

EDAD	ENFERMEDAD DE BASE	DIAS DE NEUTROPENIA	SITIO	AGENTE
3 años	LMA M5	30	PULMONAR	BACTERIANO
16 años	LLA L2	8	SENOS PARANASALES	<i>Excerohilium rostratum</i>
18 años	LLA L1	2	PULMONAR	BACTERIANO
11 años	ANEMIA APLASICA	10	PULMONAR	BACTERIANO

LLA: leucemia linfoblástica aguda; LMA: leucemia linfoblástica aguda.

Se midió el nivel de galactomananos en todos los pacientes, obteniéndose 6 resultados positivos y 4 negativos. Los niveles de galactomananos fueron hallados entre 1.378 y 3.026 en los positivos, con índices entre 1.5 y 3.8831; y entre 0.005 y 0.145 en los negativos, con índices entre 0.006 y 0.1862. (Figura 5)

Figura 5: Índices de galactomananos encontrados.



Se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100% para la medición de galactomanano con un índice de 1.5 en los pacientes con aspergilosis invasiva (Tabla 7). El valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la prueba son de 100%.

Tabla 7. Tabla de 2x2 para cálculo de Sensibilidad y Especificidad

		ASPERGILOSIS	
		SI	NO
GALACTOMANAN	POSITIVO	6	0
	NEGATIVO	0	4

De los casos sospechosos de AI en el período de estudio, 15 no fueron incluidos por no llenar los criterios de inclusión (no se realizó examen directo y/o cultivo y/o estudio histopatológico), por lo que se consideraron casos de aspergilosis posible. Si se toman en cuenta estos casos para cálculo de sensibilidad y especificidad, la sensibilidad de la prueba es del 35%, y la especificidad del 100% (Tabla 8).

Tabla 8. Tabla de 2x2 para aspergilosis probada, probable y posible

		ASPERGILOSIS	
		SI	NO
GALACTOMANAN	POSITIVO	7	0
	NEGATIVO	13	4

En un caso se tomó muestra para detección de galactomananos 10 días después de iniciado manejo antimicótico con voriconazol y de la resección quirúrgica de un segmento de pulmón hallándose en éste *Aspergillus* sp; el resultado de galactomananos fue negativo. En otro caso, se aisló *Aspergillus fumigatus* en líquido cefalorraquídeo de un paciente de 4 meses sin neutropenia; se realizó detección de galactomananos tanto en suero como en LCR de este paciente, siendo ambos positivos. Estos casos no se incluyeron en los análisis.

DISCUSIÓN

El presente es hasta nuestro conocimiento el primer estudio sobre la utilización de la detección galactomananos con Platelia® para el diagnóstico de aspergilosis invasiva en población pediátrica en México.

La aspergilosis invasiva continúa siendo un reto diagnóstico debido a distintos factores, como su presentación muchas veces inespecífica, pero principalmente porque la obtención de muestras para el diagnóstico confirmatorio requiere métodos invasivos que en muchos casos no es posible obtener. Es por eso que las técnicas no invasivas, como la detección de galactomananos han cobrado relevancia en los últimos años ⁽¹⁸⁾.

En el caso de nuestro hospital, en el período de estudio, se presentaron un total de 25 casos sospechosos de AI, la cual fue descartada en 4 casos, y se consideraron casos probados 7, probables 1, y posibles 14, según la clasificación propuesta por EORTC/IFICG. La alta proporción de casos posibles, comparados con los probados y probables no se ha observado en otras publicaciones ⁽²⁾ y puede explicarse por la dificultad en nuestro hospital para obtener estudios invasivos en el tipo de pacientes en que habitualmente se presenta la enfermedad, quienes muchas veces cursan con una condición clínica grave.

El diagnóstico de base de los pacientes con aspergilosis invasiva fue predominantemente padecimientos hematológicos, siendo la mayoría de los casos a nivel pulmonar, coincidiendo con lo reportado en la literatura. Los géneros hallados también son los más frecuentemente reportados, siendo estos *A. flavus* y *A. fumigatus* ⁽⁴⁻⁷⁾. Ya que en dos casos no se realizó cultivo no se tiene la especiación de los mismos.

Algunas publicaciones han sugerido para considerar un resultado de Platelia® positivo, un índice distinto a 1.5 (entre 0.5 y 1), lo cual mejoraría la sensibilidad de la prueba ⁽¹⁸⁾. En nuestro estudio sin embargo, no varía la sensibilidad ni la especificidad de la prueba disminuyendo el valor índice para considerarlo positivo, pues ningún resultado se halló en el intervalo entre 0.5 y 1.5. Esto sugiere que el índice de 1.5 podría ser utilizado con buenos resultados, con la ventaja teórica de lograr una mayor especificidad de la prueba (Figura 5). Es necesario tener mayor número de casos para poder sustentar este punto.

Para el grupo de pacientes estudiado, al cual se le realizó un estudio confirmatorio de AI (casos probados y probables según EORTC/IFICG), se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100%. Estos valores son más altos de los reportados en la literatura, coincidiendo con algunos estudios en los que se encontraron tan altas como del 100 y 89.9% reportadas por Sulahian ⁽²⁰⁾, y a diferencia de las reportadas por Herbrecht, tan bajas como del 64% de sensibilidad en adultos y niños, y 47% de especificidad en niños ⁽²¹⁾. Es necesario un estudio en nuestros pacientes con un

mayor número de casos para poder avalar estos resultados; sin embargo pareciera ser que en nuestra población Platelia® tiene una alta sensibilidad y especificidad.

En la práctica clínica, los pacientes con aspergilosis invasiva posible (pacientes con sospecha de aspergilosis invasiva a los que no se les realiza un estudio diagnóstico microbiológico) son tratados de igual forma que los que tienen diagnóstico probado o probable. En un análisis adicional, si se incluyeran estos pacientes la sensibilidad baja a un 35% y la especificidad continúa en el 100%. En la mayoría de estudios publicados, encontramos esta misma tendencia. Se han propuesto que esta baja sensibilidad podría deberse a distintos motivos, como la presencia de anticuerpos anti *Aspergillus*, el índice utilizado como positivo en Platelia®, pero pareciera estar relacionado tanto con una menor carga del hongo a nivel sanguíneo, como a que entre los casos posibles se incluyan casos secundarios a otros hongos o a patologías diferentes.

Marr en una revisión sobre evaluación de estudios diagnósticos de aspergilosis, aborda la heterogeneidad de resultados de sensibilidad y especificidad de los distintos estudios; propone que las diferencias de diseño, así como la dificultad diagnóstica para aspergilosis invasiva podrían influir en los distintos resultados, y que se necesitan estudios multicéntricos con mayor número de casos y mejor estandarización ⁽³⁰⁾. Siendo nuestra muestra de un bajo número de pacientes, se hace evidente la anterior afirmación.

Incluso con las limitantes mencionadas, pareciera ser que la detección de galactomananos con Platelia® es una ayuda diagnóstica útil en los pacientes con neutropenia, que podría contribuir a un diagnóstico más temprano y por ende a un mejor pronóstico de estos pacientes.

CONCLUSIONES

1. Los niveles de galactomanano en pacientes con aspergilosis invasiva en el HIMFG se encontraron entre 1.287 y 3 con un índice calculado entre 1.5 y 3.88. El punto de corte del índice para diagnosticar AI con Platelia® a la población del HIMFG es de 1.5.
2. La sensibilidad y especificidad de la detección de galactomananos con Platelia® para el diagnóstico probado y probable de aspergilosis invasiva en los pacientes del HIMFG fue del 100%, el valor predictivo positivo y negativo fueron también del 100%.
3. Es necesario la realización de mayor número de estudios invasivos en los pacientes del HIMFG con sospecha AI (casos posibles) para poder tener un mayor número de pacientes con diagnóstico confirmado o descartado y así poder tener resultados más confiables de sensibilidad y especificidad, así como de valores predictivos.
4. En los casos de AI tanto probado, como probable y posible, la sensibilidad y especificidad de la detección de galactomananos con Platelia® para el diagnóstico de AI fue del 35% y 100% respectivamente.
5. La detección de galactomananos podría ser una ayuda diagnóstica útil en los pacientes neutropénicos con riesgo de AI en el HIMFG, con la ventaja de ser un estudio no invasivo, de rápida realización y con alta sensibilidad y especificidad.

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios con mayor número de pacientes, de preferencia multicéntrico, aplicando los criterios diagnósticos de EORC/IFICG en la evaluación y clasificación de los pacientes del HIMFG, incluyendo casos de aspergilosis probada, probable y posible, para calcular sensibilidad, especificidad y valores predictivos.
2. Crear estrategias para aumentar los casos en que se logren realizar estudios para confirmar o descartar AI en los pacientes del HIMFG.
3. Implementar en el HIMFG la realización de estudios de la detección de galactomananos con Platelia® como diagnóstico temprano de aspergilosis invasiva en pacientes de riesgo, y evaluar costo beneficio.
4. Incluir la detección de galactomananos con Platelia ® como método diagnóstico de aspergilosis invasiva en los pacientes neutropénicos del HIMFG.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Blum MD, Wiedermann BL. Aspergillus infections. En: Feigin RD, Cherry JD, Demmler GJ, Kaplan SL, editors. Textbook of pediatric infectious diseases. 5th edition. Philadelphia: Saunders; 2004. p 2550-60.
- 2 Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L, Chapman W, et al. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergilosis. Clin Infect Dis 2001; 33: 1824-33.
- 3 Gerald L. Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin . Mandell, Douglas, and Bennett's Principles & Practice of Infectious Diseases Churchill Livingstone; 5th edition (June 15, 2000)
- 4 Steinbach WJ. Pediatric aspergilosis disease and treatment differences in children. Pediatr Infect Dis J 2005; 24: 358-364.
- 5 Walmsley S, Devi S, King S, Schneider R, Richardson S, Ford-Jones L. Invasive Aspergillus infections in a pediatric hospital: a ten year review. Pediatr Infect Dis J. 1993; 12: 673– 682.
- 6 Abbasi S, Shenep JL, Hughes WT, Flynn PM. Aspergillosis in children with cancer: a 34-year experience. Clin Infect Dis. 1999; 29: 1210 –1219.
- 7 Zaoutis TE, Heydon K, Chu JH, Walsh TJ, Steinbach WJ. Epidemiology, outcomes, and costs of invasive aspergillosis in immunocompromised children in the United States 2000. Pediatrics 2006; 117; 711-716.
- 8 Gavalda J, Len O, San Juan R, Aguado JM, Frotun J, Lumbreras C, et al. Risk factors for invasive aspergillosis in solid-organ transplant recipients: a case-control study. Clin Infect Dis; 41: 52-9.
- 9 Allam MF, del castillo AS, Diaz Molina C, Navajas RF. Invasive pulmonary aspergillosis: identification of risk factors. Scand J Infect Dis. 2002; 4(11): 19-22.
- 10 Mühlemann K, Wenger C, Zenhäusern, Täuber MG. Risk factors for invasive aspergillosis in neutropenic patients with hematologic malignancies. Leukemia 2005; 19: 545–550

- 11 Müller FM, Trusen A, Weig M. Clinical manifestations and diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised children. *Eur J Pediatr* 2002; 161: 563–574.
- 12 Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 609–22.
- 13 Asioğlu S, Rex JH, de Pauw B, Bennet JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants : an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 7-14.
- 14 White PL, Linton CJ, Perry MD, Johnson M, Barnes RA. The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. *Clin Infect Dis*. 2006; 42: 479-86.
- 15 Kawazy M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, et al. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme linked immunosorbent assay for galactomannan, and 1-3 β D glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2733-40.
- 16 Thomas KE, Owens CM, Veys PA, Novelli V, Costoli V. The radiological spectrum of invasive aspergillosis in children: a 10-year review. *Pediatr Radiol* 2003; 33: 453-460.
- 17 Latgé JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP, Diaquin M, Sarfati J, Wieruszkeski JM, et al . Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1994; 62: 5424-33.
- 18 Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1417-27.
- 19 Rohrlisch P, Sarfati J, Mariani P, Duval M, Carol A, Saint-Martin C, et al. Prospective sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for serum galactomannan: early predictive value and clinical use in invasive aspergillosis. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 232-7.
- 20 Sulahian A, Boutbould F, Ribaud P, Leblanc T, Lacroix C, Derouin F. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-Year prospective study. *Cancer* 2001; 91: 311-8.
- 21 Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B, Waller J, Campos F, et al. *Aspergillus*

- galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. J Clin Oncol 2002; 20:1898-1906.
- 22 Aubry A, Porcher R, Bottero J, Touratier S, Leblanc T, Brethon B, et al. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with β -lactam antibiotics in patients with hematological disorders. J Clin Microbiol 2006; 44: 389-94.
 - 23 Mattei D, Rapezzi D, Mordini N, Cuda F, Nigro CL, Musso M. False-positivo *Aspergillus* galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay result in vivo during amoxicillin-clavulanic acid treatment. J Clin Microbiol 2004; 42: 5362-3.
 - 24 Walsh T, Shoham S, Petraitiene R, Sein T, Schaufele R, Kelaheer A, et al. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen interaction. J Clin Microbiol 2004; 42: 4744-48.
 - 25 Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. Clin Infect Dis 2005; 40: 1762-9.
 - 26 BIO RAD Platelia® *Aspergillus* Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in serum by enzyme immunoassay. Folleto instructivo.
 - 27 Kim K, Lee MH, Kim J, Lee KS, Kim SM, Jung MP, et al . Importance of open lung biopsy in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies. Am J Hematol 2002; 71: 75-9.
 - 28 Ali R, Ozkalemkas F, Ozcelik T, Ozkocaman V, Ozkan A, Bayram S, et al. Invasive pulmonary aspergillosis: role of early diagnosis and surgical treatment in patients with acute leukemia. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006; 5:17.
 - 29 David L. Sackett. Epidemiología clínica, una ciencia básica para la medicina clínica. Madrid: Editorial Díaz de Santos; 1989.
 - 30 Marr KA, Leisenring W. Design issues in studies evaluating diagnostic tests for aspergillosis. Clin Infect Dis 2005;41;S381-6.

ANEXOS 1

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

DATOS GENERALES

REGISTRO EDAD

NOMBRE

DATOS DE LA ENFERMEDAD

DIAGNOSTICO DE BASE

INICIO NEUTROPENIA

NEUTROFILOS AL DX

<500
<100

TRATAMIENTO AL MOMENTO DE LA TOMA

ANTIMICOTICOS			
Anfo B			
Voriconazol			
Caspofungina			

ANTIBIOTICOS			
Piperacilina Tazobactam			
Amoxicilina Clavulanato			
Ampicilina Sulbactam			

DATOS ASPERGILOSIS

	Fecha	Número
Patología		
Fresco		
Cultivo		

	Clave	Fecha	Descripción
Criterio del Huésped			
Criterio microbiológico			
Criterio Clínico	Mayor		
Criterio Clínico	Menor		
	Menor		

	fecha
PROBADA	
PROBABLE	
POSIBLE	

DATOS GALACTOMANAN

Fecha	Nivel	Resultado

CLAVE CRITERIOS ASPERGILOSIS

Tipo de criterio			CLAVE	Criterio
HUESPED			1	Neutropenia (<500 neutrófilos/mm ³ por >10 días
			2	Fiebre persistente por >96 h refractaria a tratamiento antibacteriano apropiado de amplio espectro en pacientes de alto riesgo
			3	Temperatura ya sea >38°C o <36°C en cualquiera de las siguientes condiciones predisponentes: neutropenia prolongada (>10 días) en los últimos 60 días, uso reciente o actual de agentes inmunosupresores significativos en los últimos 30 días, infección probada o probable durante un episodio previo de neutropenia, o coexistencia de SIDA sintomático
			4	Signos y síntomas indicantes de enfermedad de injerto contra el huésped, particularmente severa (grado >2) o enfermedad crónica extensa
			5	Uso prolongado (>3 semanas) de corticosteroides en anteriores 60 días
MICROBIOLOGICO			6	Resultado positivo de cultivo de <i>Aspergillus</i> de esputo o lavado bronco alveolar
			7	Resultado positivo de cultivo o hallazgos de microscopía directa o citología de hongos en aspirado de senos
			8	Hallazgos positivos de citología o microscopía directa de elementos fúngicos en muestras de fluidos corporales estériles
CLINICA	RESP	Mayor	9	Cualquiera de los siguientes infiltrados nuevos en TAC: signo del halo, signo de aire crescente, o cavidad dentro de consolidado
		Menor	10	Síntomas de infección de tracto respiratorio inferior (tos, dolor torácico, hemoptisis, disnea); hallazgo clínico de frote pleural; cualquier infiltrado nuevo que no llena criterios mayores; efusión pleural
	SENOS	Mayor	11	Evidencia radiológica sugestiva de infección invasiva de senos (erosión de paredes, extensión de infección a estructuras vecinas, destrucción de base del cráneo extensa)
		Menor	12	Síntomas respiratorios superiores (descarga nasal, obstrucción) ulceración en nariz o escarcha de mucosa nasal o epistaxis; edema periorbitario; sensibilidad maxilar; lesiones negras necróticas o perforación del paladar duro

ANEXO 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TITULO DEL ESTUDIO: **Utilidad de la detección de galactomananos por ensayo inmunoenzimático para el diagnóstico de aspergilosis invasiva en pacientes neutropénicos ingresados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez**

Fecha _____

¿Sabe usted, que los niños que tienen enfermedades graves como cáncer, leucemias, trasplantes, lupus u otras enfermedades, para curarse, necesitan recibir quimioterapia, o sea, medicamentos que son muy “fuertes” para poder destruir las células que están produciendo la enfermedad y el niño o niña se pueda curar?. Sin embargo, estos tratamientos pueden hacer que se bajen las defensas del cuerpo. Los neutrófilos, son parte de las células de defensa que se bajan (neutropenia), y entonces, los niños(as) tienen gran riesgo de desarrollar infecciones graves por muchos gérmenes, algunos de ellos son los hongos, entre los que se encuentran los *Aspergillus*. La aspergilosis es una enfermedad que puede afectar los pulmones, nariz, o cualquier otra parte del cuerpo y pone en peligro la vida del niño(a). El diagnóstico de aspergilosis cuando inicia la enfermedad es difícil, ya que actualmente solo se logra tomando un pedacito de tejido (una biopsia) para cultivarlo y ver al hongo, lo cual ocurre cuando el hongo ya hizo mucho daño como para verse en las radiografías (TAC). En el Departamento de Infectología del Hospital Infantil de México, estamos realizando una prueba nueva para el diagnóstico de aspergilosis, esta prueba ya se utiliza en pacientes adultos de otros países como Estados Unidos y consiste en un análisis de sangre para detectar en forma temprana la infección por *Aspergillus* lo cual nos permitirá iniciar los medicamentos específicos más rápido y en los pacientes que realmente los necesiten.

Estimado(a) responsable del niño(a), esta es una invitación que le hacemos para participar en este estudio, por favor le pedimos que lea con cuidado la siguiente información y pregunte cualquier duda sobre lo que leerá a continuación:

¿Para qué se efectúa este estudio?

En niños con neutrófilos bajos (células de la sangre que sirven como defensas del cuerpo) se pueden presentar infecciones graves por hongos. Estas infecciones son difíciles de diagnosticar. El propósito de este estudio es evaluar un examen de laboratorio llamado Platelia® que detecta una sustancia que tienen los hongos, y puede ayudar diagnosticarlos a través de analizar una muestra de sangre.

¿Quiénes pueden participar en el estudio?

Pueden participar los pacientes ingresados en el HIM que tengan neutrófilos bajos y que tengan algún síntoma o alteración en radiografía y/o tomografía que haga sospechar al médico que tiene infección por un hongo, en particular el *Aspergillus*, y que estén de acuerdo con su ingreso al estudio

¿Qué se me pedirá/se le pedirá a mi hijo que haga?

En caso de que su hijo tenga los neutrófilos bajos (menos de 500 por mm³) por más de 5 días, o que los médicos sospechen que cursa con infección por *Aspergillus* se le tomará una muestra de tres mililitros de sangre venosa por punción para realizar la búsqueda de galactomananos. De preferencia esta muestra se tomará en el momento que se le tome otra muestra de rutina (muestra que de igual modo se le iba a tomar). En caso de ser negativo se

le pedirá otra prueba similar cada 7 días en dos ocasiones más o hasta que se descarte o confirme el diagnóstico.
Su hijo continuará sus estudios diagnósticos así como su tratamiento establecidos para su enfermedad de base.

¿Qué efectos indeseables pueden pasarle a mi hijo al participar en el estudio?

Dolor o moretón asociado a la toma de muestra de sangre que se irá quitando lentamente en aproximadamente cinco días

¿Qué debo de hacer en caso de que tenga (mi hijo) alguna molestia o complicación?

Debe comunicarse con el Dr. Mario Augusto Melgar Toledo a la jefatura de Infectología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, al teléfono 52289917 extensión 1245 o al celular 5520468841 con el Dr. Mario Augusto Melgar Toledo.

¿Qué beneficio puedo tener (mi hijo) en la este estudio?

Ya que se trata de una prueba diagnóstica, la participación de mi hijo ayudara al conocimiento de lo útil que es para el diagnóstico de aspergilosis y estos mismos resultados ayudaran en un futuro a la d4etección de esta enfermedad en pacientes que como mi hijo tenga neutrófilos bajos, para así dar un tratamiento mas rápido.

¿Cómo y cuándo puedo tener acceso a los resultados de los exámenes?

Los estudios llevan un tiempo de procesamiento para poder llegar a un resultado. Se le informará tanto a usted como a los médicos a cargo del servicio de su hijo el momento en que se le entregarán estos resultados. Independientemente de lo acordado, podrá acudir al Dr. Mario Augusto Melgar Toledo en cualquier momento a través de la jefatura del departamento de Infectología del Hospital Infantil de México teléfono 52289917 extensión 1295 o al celular 5520468841

¿A quien debo llamar en caso de tener preguntas?

Si hay dudas sobre los derechos de su hijo(a) como participante del estudio, puede dirigirse al comité de ética del Hospital Infantil de México Federico Gómez (tel. 52 28 99 17) o bien con el Dr. Mario A. Melgar T.

¿Tiene algún costo la participación en este estudio?

El ingreso para participar en este estudio no tiene ningún costo. Esta investigación no cubre el costo de los métodos diagnósticos usuales o medicamentos empleados para el manejo de su enfermedad de base.

¿Qué pasa si no quiero participar?

La participación de su hijo (a) es totalmente VOLUNTARIA y en cualquier momento puede negarse a participar o decidir no continuar dentro de este estudio, sin que esto afecte de ninguna manera los derechos que actualmente tiene su hijo (a) como paciente de este Hospital, ni la atención de sus médicos.

He leído este formato de consentimiento y he tenido la oportunidad de hacer preguntas y han sido respondidas. Entiendo que la participación es voluntaria. Doy permiso para que se usen y compartan los datos de salud de mi hijo, según lo descrito en este formato. Puedo decidir libremente que mi hijo NO PARTICIPE en este estudio o que lo abandone en cualquier momento, avisando previamente al médico encargado del mismo. Ni mi hijo ni yo

estaremos sujetos a una penalidad ni perderemos cualquiera de los beneficios a los que de otro modo hubiéramos tenido derecho.

Mi hijo tendrá que abandonar el estudio sin necesidad de mi consentimiento si el/ella necesita otro tratamiento fuera de este centro, si no sigue el plan de estudio, si presenta alguna lesión relacionada con el estudio o por cualquier otra razón.

Investigadores responsables del protocolo.

Dr. Mario A. Melgar Toledo
Dra. Margarita Nava Ruiz
EBC. Jesús Reséndiz Sánchez

Nombre del Niño

Nombre y firma del Padre, Madre o Tutor

Nombre y firma de la persona que conduce la revisión del Consentimiento

Nombre y firma de testigo

Relación que tiene con el voluntario

Nombre y firma de testigo

Relación que tiene con el voluntario

Recibí copia de este consentimiento

Nombre y firma.