



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

REVISIÓN DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA
ASPERGILOSIS DE VÍAS RESPIRATORIAS

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

IRENE JAQUELIN PALACIOS VELÁZQUEZ



MÉXICO, D.F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: ABEL GUTIÉRREZ RAMOS**

VOCAL: **Profesor: JOSÉ ALEXANDRO BONIFAZ TRUJILLO**

SECRETARIO: **Profesor: MISAEL GONZÁLEZ IBARRA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: EDUARDO BONILLA ESPINOSA**

2° SUPLENTE: **Profesor: OCTAVIO RODRÍGUEZ CORTÉS**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Biblioteca de la Facultad de Química, Biblioteca de la Facultad de Medicina, Biblioteca Central UNAM, Ciudad Universitaria.

ASESOR DEL TEMA:

José Alejandro Bonifaz Trujillo

SUSTENTANTE:

Irene Jaquelin Palacios Velázquez

Agradecimientos

A mi madre, mi abuela, mamá Lala, mis tías Isabel y Columba, por ser las mujeres más maravillosas que he conocido en mi vida, por su esfuerzo incansable y amor incondicional.

A Diego, por su extraña forma de quererme y apoyarme.

A mis amigos Mara y Juan, por la abrazoterapia.

A la vida, porque soy muy afortunada.

Y otra vez, gracias a mi madre. Porque si bien, yo recorrí el camino, ella me puso en él, estuvo a mi lado y me apoyó hasta el final.

Mami, este logro es tan mío como tuyo. Gracias por ser mi amiga, mi compañera. Gracias por ser mi madre.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	5
II. METODOLOGÍA	7
III. INFORMACIÓN GENERAL	8
1. Definición de Aspergilosis.....	8
2. Etiología.....	9
3. Micología.....	11
4. Epidemiología.....	21
5. Patogenia.....	27
5.1 Aspergilosis alérgica.....	28
5.2 Aspergiloma pulmonar.....	31
5.3 Aspergilosis invasiva.....	33
6. Diagnóstico.....	36
6.1 Toma de muestra.....	36
6.2 Examen directo.....	36
6.3 Cultivo.....	40
6.4 Histopatología.....	44
6.5 Pruebas inmunológicas.....	50
6.6 Pruebas moleculares.....	64
6.7 Rayos X y tomografías.....	68
7. Tratamiento y profilaxis.....	81
IV. DISCUSIÓN	93
V. CONCLUSIONES	96
VI. BIBLIOGRAFÍA	97

I. INTRODUCCIÓN

Aspergillus es un hongo microscópico filamentoso ubicuo en la naturaleza y, por lo tanto, ampliamente distribuido en todo el mundo⁴. Representa entre el 0.1% y el 22% del total de los conidios cuantificados en muestras de aire²⁵. Existen aproximadamente 250 especies de *Aspergillus*, sin embargo, sólo unas cuantas son patógenos humanos³. Entre sus numerosas especies, *Aspergillus fumigatus* es el causante de la mayoría de las infecciones en humanos. El pulmón es el principal órgano afectado por *Aspergillus* debido a la alta capacidad esporulativa de este hongo y a que sus conidios son lo suficientemente pequeños para poder alcanzar el alvéolo. Dependiendo de la inmunidad del hospedero y de la virulencia del microorganismo, las enfermedades respiratorias causadas por *Aspergillus* se clasifican como saprofiticas (aspergiloma pulmonar, aspergilosis saprofitica o “pelota fúngica”), alérgicas (sinusitis alérgica aspergilar, aspergilosis broncopulmonar alérgica) e invasivas (aspergilosis pulmonar invasiva, aspergilosis pulmonar crónica necrozante)^{1, 3}.

En este trabajo únicamente se abordarán las aspergilosis que involucran las vías respiratorias, ya que representan las infecciones con mayor índice de mortalidad causadas por este microorganismo.

La frecuencia de infección con *Aspergillus* ha incrementado en años recientes debido primordialmente al aumento en el número de pacientes inmunosuprimidos encontrados en la práctica clínica, con el advenimiento de los trasplantes de órganos y de médula ósea, secuelas post-tuberculosas, el alto índice en el uso de corticosteroides y otras drogas moduladoras del sistema inmune y la epidemia de la infección con virus de inmunodeficiencia humana (VIH)^{3, 8, 10}.

La morbilidad y mortalidad asociada con el uso de ciertos antifúngicos ha hecho necesaria la búsqueda de mejores fármacos con actividad contra *Aspergillus*. Se

han desarrollado nuevos azoles (voriconazol, posaconazol y ravuconazol), y las equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina)³.

Para lograr el éxito de la terapia antifúngica y, por lo tanto, la mejora del paciente, es necesario un diagnóstico certero, obtenido con prontitud y, de preferencia, de carácter no invasivo.

El presente trabajo tiene como objetivo compilar y realizar un análisis exhaustivo de los métodos de diagnóstico disponibles para las infecciones de vías respiratorias causadas por *Aspergillus*.

II. METODOLOGÍA

Se buscaron artículos científicos en la base de datos de diversas fuentes, dentro de las más importantes: *PubMed*, *Revista Iberoamericana de Micología* y *Medical Mycology*. Así como bibliografía en la Biblioteca Central, la Biblioteca de la Facultad de Química y de la Facultad de Medicina de Ciudad Universitaria, con lo referido a la materia. Posteriormente se seleccionaron aquellos artículos más citados por otros autores y/o las obras publicadas en años recientes (no más de 5 años de antigüedad), manteniendo así un número limitado de artículos para su extensa revisión y compilación de la información más relevante acerca de la aspergilosis de vías respiratorias y los métodos de diagnóstico disponibles y los que aún se encuentran en desarrollo.

III. INFORMACIÓN GENERAL

1. Definición de Aspergilosis

El término aspergilosis involucra una serie de enfermedades causadas por especies oportunistas del género *Aspergillus*. Los tipos de aspergilosis más frecuentes son: pulmonar, diseminada, cutánea, ótica, oftálmica y estados de hipersensibilidad inmunológica (alergias)¹. Estas enfermedades infecciosas, la mayoría de las veces son de tipo oportunista, y en algunos casos el agente etiológico se comporta como patógeno primario. El género *Aspergillus* contiene una gran cantidad de especies ubicuas en la naturaleza, aunque para el hombre, sólo unas cuantas son patógenas, debido a que la mayoría de estos hongos son termosensibles².

El espectro de las enfermedades de vías respiratorias causadas por *Aspergillus* abarca desde enfermedades no invasivas, tales como la colonización del organismo o la presencia de aspergiloma pulmonar o aspergilosis saprofitica (pelota fúngica), o una respuesta alérgica responsable del síndrome de aspergilosis broncopulmonar alérgica y la sinusitis alérgica aspergilar, hasta infecciones invasivas tales como neumonía crónica necrozante y la aspergilosis pulmonar invasiva^{3,4}.

2. Etiología

Es producida por hongos *Hyphomycetes* de la familia *Trichocomaceae*, en la actualidad clasificada dentro de *Ascomycetes*. Las especies oportunistas son en promedio 20 y las más reportadas como causantes de cuadros patológicos son siete: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus glaucus* y *Aspergillus versicolor*¹.

Aspergillus fue descrito por primera vez en 1729 y recibió su nombre debido a su parecido a un aspergilo usado para esparcir agua bendita. Como miembro de la familia *Trichocomaceae*, las especies de *Aspergillus* se encuentran estrechamente relacionadas con otro hongo filamentoso, *Penicillium*. Sin embargo, la identificación del microorganismo causal, responsable de la mayoría de las infecciones, usualmente no es difícil³. *A. fumigatus* está considerada como la especie más virulenta y es la responsable de la gran mayoría de las aspergilosis primarias, especialmente de las pulmonares, donde suele producir cuadros muy graves que generalmente diseminan ampliamente. Es también la principal causa de procesos alérgicos bronquiales atribuidos a aspergilosis⁵. *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger* son los responsables de la mayoría de los casos restantes de aspergilosis invasivas (Tabla 1)³.

Especie	Frecuencia (%)
<i>A. fumigatus</i>	66
<i>A. flavus</i>	14
<i>A. niger</i>	7
<i>A. terreus</i>	4
Otros	9

Aunque *A. niger* es quizá el hongo prevalente en la formación de “pelotas fúngicas”, rara vez causa lesiones pulmonares primarias⁵.

A. fumigatus y *A. flavus* son los patógenos más comunes dentro del género⁶, sin embargo, *A. terreus*, el cual es resistente a anfotericina B, ha reportado un incremento como causa de infección en pacientes inmunocomprometidos⁷.

Otras especies menos patógenas pueden también causar infección invasiva en aquellos pacientes con inmunosupresión más pronunciada, incluyendo, *A. amstelodami*, *A. avenaceus*, *A. caesiellus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. chevalieri*, *A. clavatus*, *A. flavipes*, *A. glaucus*, *A. granulosis*, *A. lentulus*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. restrictus*, *A. sydowii*, *A. tetrazonus*, *A. ustus*, *A. versicolor* y *A. wentii*. El aislamiento de estas especies debe ser de significancia únicamente cuando la probabilidad de enfermedad invasiva sea compatible con el hospedero y con las características clínicas presentes³.

3. Micología

La familia *Trichocomaceae* está compuesta de aproximadamente 250 especies⁸; todas están incluidas hasta el momento dentro de *Ascomycetes*, debido a que algunas presentan estados teleomórficos (sexuados) ascospóricos, los cuales, con base en la clasificación de biología molecular, las ubican dentro de este grupo; así tenemos que la taxonomía actual es como se presenta en la Tabla 2¹.

Tabla 2 Taxonomía de <i>Aspergillus spp</i> ¹	
DIVISIÓN	<i>Ascomycota</i>
CLASE	<i>Eucomycetes</i>
ORDEN	<i>Eurotiales</i>
FAMILIA	<i>Trichocomaceae</i>
GÉNERO	<i>Eurotium</i> (fase teleomorfa o sexuada)*
ESPECIE	<i>herbariorum</i>
GÉNERO	<i>Emericella</i> (fase teleomorfa o sexuada)**
ESPECIE	<i>nidulans</i>
GENERO	<i>Aspergillus</i> (fase anamorfa o asexuada)*
ESPECIE	<i>glaucus</i> *
ESPECIE	<i>nidulans</i> **

A la mayoría de especies oportunistas como: *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. terreus* y *A. flavus*, no se les ha encontrado estado teleomórfico o sexuado. En la Tabla 3 se presentan las principales características micológicas de *Aspergillus* más frecuentes¹.

A continuación se describen las principales características de la morfología microscópica de *Aspergillus*:

Conidióforo y vesícula. El conidióforo o tallo que soporta las células conidiogénicas (formadoras de conidios), se ensancha en la punta para formar la vesícula, de forma variable, desde globosa hasta elongada en forma de clava, como la de *A. clavatus*, siendo una característica de identificación muy útil (Figura 1). La vesícula provee una amplia superficie para la producción de las células que soportan los conidios, las fiálides. Los conidióforos y vesículas pueden ser hialinos o pigmentados, lisos o rugosos, características que resultan útiles para propósitos de identificación. Los conidióforos y las vesículas son usualmente rectas, no obstante, en algunas especies pueden curvarse ligeramente hacia el sustrato (cabezas desviadas). En algunas especies, tales como *A. versicolor*, las vesículas con forma típica de “cuchara” (Figura 2), pueden estar acompañadas de cabezas conidiales pequeñas, las cuales pueden confundirse con las de *Penicillium* spp. (Figura 3), ya que estas carecen de la vesícula alargada en la punta del conidióforo⁸.

Célula base o troncal. En algunas especies de *Aspergillus* existe una célula obvia y fácilmente reconocible en la base del conidióforo. Son células de pared gruesa de las cuales el conidióforo es formado, usualmente en ángulos rectos al micelio⁸.

Métula. Es el nombre dado a la capa de células que rodea la vesícula y a partir de las cuales se forman las fiálides. No todas las especies de *Aspergillus* producen métula y su presencia o ausencia puede ser una característica muy útil en la identificación. Sin embargo, dentro de una misma cepa de algunas especies, por ejemplo, de *Aspergillus glaucus*, algunas cabezas sí producen métula, mientras que en otras, la fiálide es producida directamente de la vesícula. En orden de determinar si hay una sola (monoseriada) o doble capa de células (biseriada) entre la vesícula y el comienzo de la cadena de conidios, puede ser necesario variar el enfoque en el microscopio⁸.



Figura 1. Vesícula en forma de clava de *Aspergillus clavatus*, con una sola capa de fiálides. Pasqualotto AC (8)



Figura 2. *Aspergillus versicolor*, vesícula con forma de cuchara. Pasqualotto AC (8)



Figura 3. Cabezas "reducidas" o tipo *Penicillium*. Pasqualotto AC (8)

Fiálides. Son las estructuras con forma de botella, formadas directamente de la vesícula en la punta del conidióforo o separado de él mediante una capa de células conocidas como métula, a partir de las cuales largas cadenas de conidios enteroblásticos son producidas en sucesión basipetal (las más jóvenes en la base). Los conidios son formados a partir de la pared celular interna y son “empujados” a través de un poro en la punta de la fiálide (Figura 4)⁸.

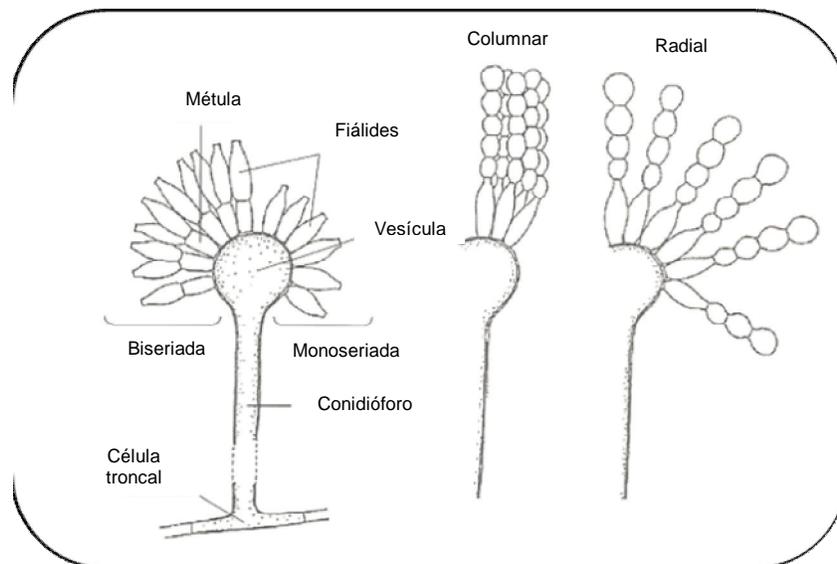


Figura 4. Diagrama de la terminología empleada para la identificación de las especies de *Aspergillus*.^{Pasqualotto AC (8)}

Conidios. Los conidios de las especies de *Aspergillus* son formados dentro de la fiálide, producidos en largas cadenas que facilitan su dispersión en el aire (anemófilos). Pueden presentar pigmentación, lo cual determina el color de las cabezas conidiales y, por lo tanto, el color de la colonia. Muestran diferentes grados de ornamentación superficial, desde liso hasta equinulado (con púas), características que deben ser visibles bajo microscopía de luz. Los conidios son formados en cadenas con regiones disyuntoras variables de cadena a cadena, esta característica no es útil para la separación entre especies. El color, forma y ornamentación de los conidios son características útiles a evaluar para la identificación fenotípica⁸.

Cleistotecio. O ascocarpos, son las estructuras sexuales formadas por los teleomorfos de las especies de *Aspergillus*. Son cuerpos fructíferos cerrados que contienen ascas, las cuales producen las ascosporas sexuales por meiosis. Cuando maduran, las paredes de los cleistotecios están compuestas de una delgada capa de células planas que se abren para liberar las ascas y ascosporas. En *Emericella nidulans*, el teleomorfo de *A. nidulans*, los cleistotecios son morado oscuro, de 150 μm de diámetro aproximadamente y a menudo rodeadas de células de Hülle, mientras que en el grupo de *A. glaucus*, son pequeños, amarillos y desnudos, soportados sobre una sola hifa. Los cleistotecios son usualmente perceptibles a simple vista. Con excepción de tres especies conocidas, los cleistotecios de las especies de *Aspergillus* son homotálicos⁸.

Ascosporas. Son las esporas sexuales, formadas por meiosis dentro de las ascas, presentes en los cleistotecios. Con pocas excepciones, las ascas contienen ocho ascosporas. En diferentes especies de *Aspergillus* presentan ornamentación variada: rugosa, equinulada o puntiaguda, a menudo con crestas ecuatoriales dobles o únicas en la unión de lo que parece una lente convexa doble. Sin embargo, estas características a menudo son visibles únicamente bajo microscopía electrónica⁸.

Células de Hülle. Son un tipo de clamidoconidios y, a menudo, son encontradas en grandes proporciones alrededor de los cleistotecios producidos por las especies ascospóricas de *Aspergillus*. Funcionan como una capa protectora contra la desecación y el ataque de animales que habitan los suelos, aunque su verdadera función es desconocida. Las células de Hülle son estructuras grandes, de pared gruesa y son elipsoidales, globosas o incluso con forma de herradura. Dado que las células de Hülle de los diferentes grupos asumen ciertas formas características, pueden ser útiles en el proceso de identificación fenotípica. Son células capaces de germinar, por lo que actúan como células reproductivas (Figura 5)⁸.

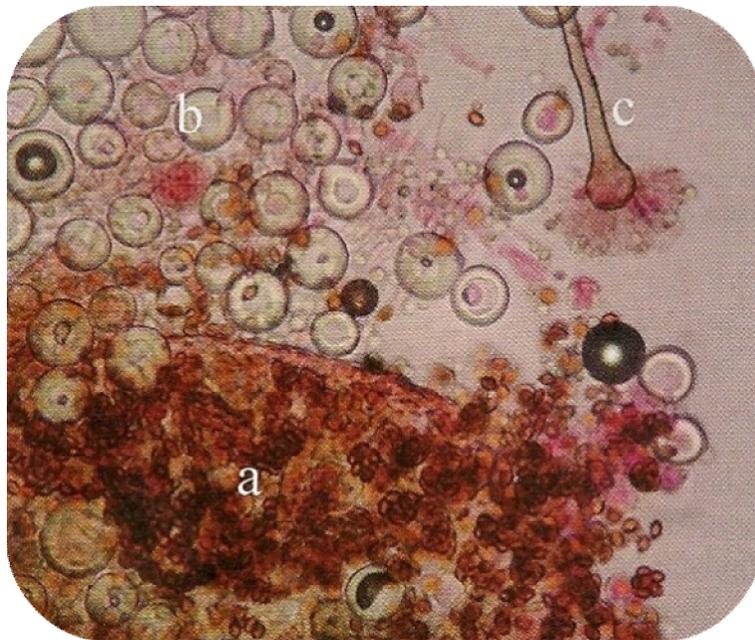


Figura 5. *Emericella nidulans* (a) cleistotecios conteniendo numerosas ascas; (b) células de Hülle rodeando las cleistotecios; (c) conidióforo pigmentado (notar los tamaños relativos de los cleistotecios y el conidióforo). Pasqualotto AC (8)

Coremia o *coremium*. La formación de coremia es una característica poco común ocasionada por la agregación de conidióforos erectos, lo cual puede observarse a simple vista como estructuras en forma de corona, producidas en la superficie de la colonia⁸.

Esclerote o *esclerotia*. Es formada por la agregación de células parenquimales, las cuales ocasionan masas compactas características. Son encontradas en algunos miembros de ciertos grupos, pero no en otros. Existen también estructuras pseudo-esclerotiales encontradas en algunos grupos y junto con los cuerpos escleróticos pueden aportar pistas para la identificación, pero no definitivas, dado que su presencia o ausencia está influenciada por las condiciones del cultivo⁸.

Las características generales, tanto microscópicas como coloniales, de las principales especies de *Aspergillus* son:

Aspergillus fumigatus. Crece en los medios ordinarios de Sabouraud y papa dextrosa agar (PDA) a 28°C; las colonias se desarrollan entre tres y cinco días, son planas, ilimitadas, polvosas o aterciopeladas, de color verde y en ocasiones presentan un halo micelial blanco alrededor de la colonia; al reverso raras veces se ve un pigmento de color ocre. Al microscopio se observan hifas de nutrición tabicadas de 2 a 4 μm de diámetro, e hifas reproductivas casi siempre cenocíticas de 4-6 μm , que terminan en las clásicas cabezas aspergiliares, las cuales son más pequeñas que las de *A. niger*; miden de 20-25 μm y presentan conidióforos cortos (20-30 μm), que terminan con una vesícula ligeramente alargada, de la que nace una sola serie de esterigmas o fiálides que miden de 80 a 100 μm de diámetro cada una, con tendencia a disponerse hacia arriba en un ángulo aproximado de 180° (como “pelos parados”); de los esterigmas nacen microconidios redondos de aproximadamente 2.5-3 μm . No se ha reportado estado teleomórfico¹.

Aspergillus flavus. Crece en los medios de cultivo ordinarios Sabouraud y PDA a 28°C, las colonias se desarrollan con rapidez de tres a cinco días, son ilimitadas, polvosas o aterciopeladas, de color verde amarillento; al reverso algunas cepas producen pigmentos café ligeramente difusible. Se ha reportado formación de esclerotes en colonias viejas o cuando se siembran en medios pobres. Al microscopio se observa micelio macrosifonado, tabicado (2-4 μm) y hialino, las cabezas aspergiliares llegan a medir hasta 100 μm de diámetro y están compuestas por conidióforos largos (80-100 μm), vesículas redondas (20 μm), de las que nacen dos series de esterigmas o fiálides, las primeras de 8-10 μm y las subsecuentes de 5-6 μm ; de estas últimas nacen microconidios redondos de 2-3 μm . Al igual que *A. niger* la disposición de los esterigmas es en un ángulo aproximado de 360°. No se ha reportado estado teleomórfico¹.

Aspergillus niger. Crece en los medios de cultivo ordinario como Sabouraud, y PDA a 28°C. Las colonias se desarrollan con rapidez, transformándose en colonias planas, granuladas, negras e ilimitadas; al reverso no presentan pigmento. Al microscopio se observan hifas tabicadas de 2-4 µm de diámetro (de nutrición), las hifas reproductivas son más anchas, de 4-8 µm, éstas terminan con las clásicas “cabezas aspergilaes” que miden en total de 80-100 µm de diámetro; están compuestas por conidióforos cenocíticos largos (100-200 µm), vesículas redondas (50-100 µm de diámetro), de donde nacen dos series de esterigmas o fiálides en un ángulo de casi 360°; los primeros esterigmas son más grandes (8-10 µm) que los segundos (5-7 µm), de éstos nacen microconidios redondos o elípticos de 2-3 µm. No se ha reportado estado teleomórfico¹.

Aspergillus nidulans. Crece en los medios de cultivo ordinarios como Sabouraud y PDA agar a 28°C, las colonias se desarrollan con rapidez entre tres y cinco días; son ilimitadas, granuladas o pulverulentas, de color amarillo, con un pequeño halo micelial blanco alrededor de la colonia; algunas colonias se tornan verde-gris y con pigmento púrpura. Al microscopio se observa micelio macrosifonado (2-4 µm) tabicado y hialino; las cabezas aspergilaes miden entre 40-60 µm y están compuestas por conidióforos largos (80-100 µm), vesículas redondas de donde nacen dos series de esterigmas o fiálides dispuestas en ángulo de 140-180°, las primeras de 5-6 µm y las segundas de 8 a 10 µm, de estas últimas nacen los microconidios redondos que miden de 1.5 a 2.5 µm. Presenta cúmulos de células redondas denominadas células de Hülle. Se ha reportado estado teleomórfico ascosporado que se denomina *Emericella nidulans*¹ (Figura 6).

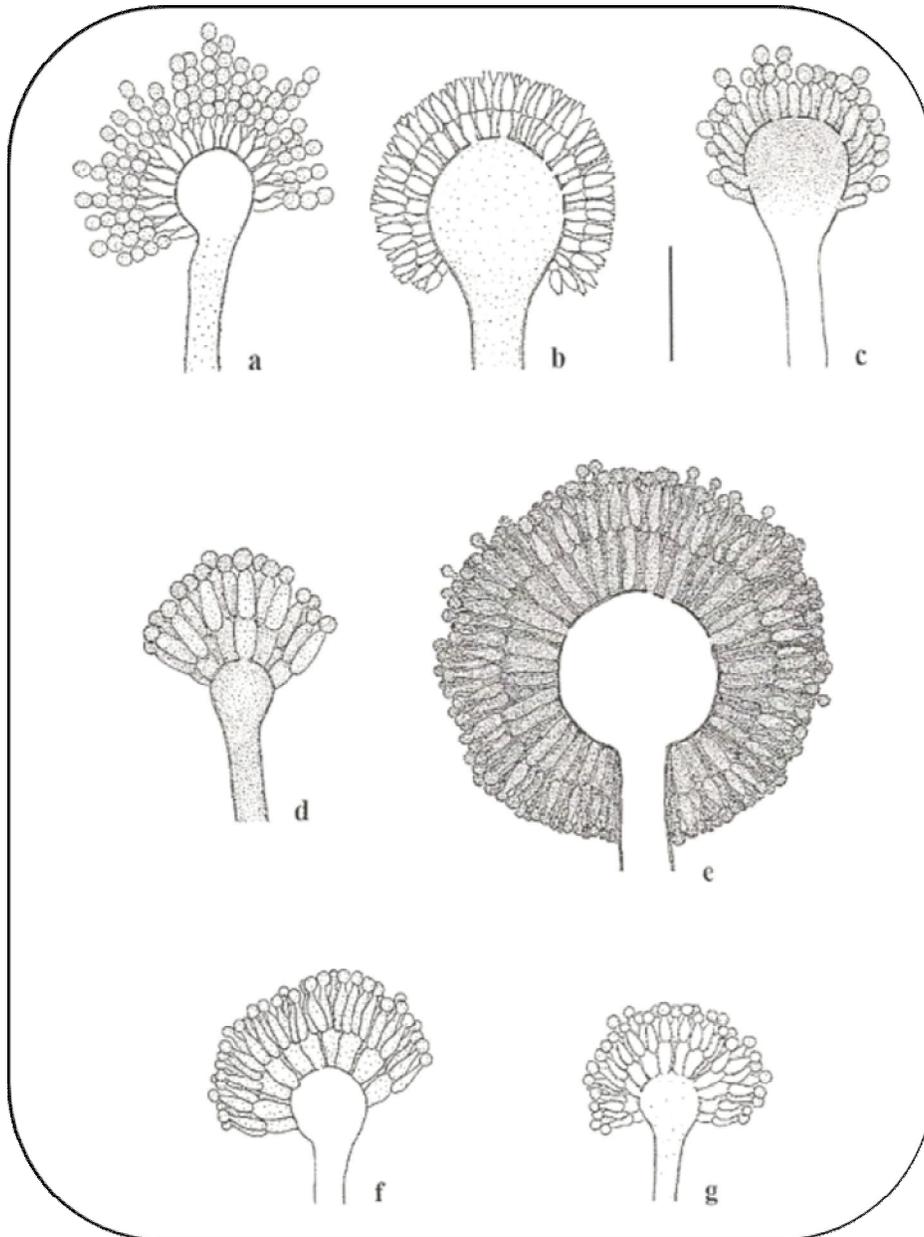


Figura 6. Parte superior de los conidióforos de especies de *Aspergillus* de interés clínico. (a) *A. flavus* (conidióforo monoseriado); (b) *A. flavus* (conidióforo biseriado); (c) *A. fumigatus*; (d) *A. nidulans*; (e) *A. niger*; (f) *A. terreus*; (g) *A. ustus*.^{Pasqualotto AC (8)}

Tabla 3
Características macromorfológicas y micromorfológicas de las principales especies de *Aspergillus*¹
Micromorfología

Espece	Anverso (colonias)	Reverso (pigmentos)	Micelio macrosifonado, tabicado (2-4 µm) e hifas reproductivas de 4-8 µm. Cabezas aspergulares que miden 150-250 µm de diámetro, con conidióforos largos cenocíticos, con vesículas clavadas de 40-60 µm, con una serie de esterigmas. Conidios elípticos de 2.3-3.7 µm
<i>A. clavatus</i>	Ilimitada, granulosa o pulverulenta, color verde-gris	Sin pigmentos	Micelio macrosifonado, tabicado (2-4 µm) e hialino. Cabezas aspergulares que miden 40-100 µm de diámetro, conidióforos largos, vesículas esféricas de 20 µm. Conidios equinulados de 3.5 µm
<i>A. flavus</i>	Ilimitada, plana, polvosa, aterciopelada, verde-amarillento brillante. Puede formar esclerotes.	Algunas cepas dan pigmento café difusible	Micelio macrosifonado, tabicado (2-4 µm) e hifas reproductivas de 4-6 µm. Cabezas aspergulares que miden 30-50 µm de diámetro, con conidióforos cortos cenocíticos, con vesículas subclávicas de 20-30 µm, con una serie de esterigmas con un ángulo aproximado de 180° de conidios redondos de 2.5-3 µm.
<i>A. fumigatus</i>	Ilimitadas, planas polvosas, seca, aterciopelada, de color verde con un halo blanco y ocasionalmente rosa.	Sin pigmentos. En ocasiones da pigmentos café-amarillo difusible	Micelio macrosifonado, tabicado (2-4 µm) e hifas reproductivas de 4-8 µm. Cabezas aspergulares que miden 40-80 µm de diámetro, conidióforos largos, vesículas semiesféricas de 8-20 µm.
<i>A. nidulans</i>	Ilimitada, aterciopelada, seca, color verde-amarillento, con halo blanco	Café-claro. Algunas cepas dan café-marrón	Micelio macrosifonado, tabicado (2-4 µm) e hifas reproductivas de 4-8 µm. Cabezas aspergulares que miden 100-200 µm de diámetro, con conidióforos largos cenocíticos, con vesículas subesféricas de 50-100 µm, con dos series de esterigmas (grandes y pequeños) en ángulo aproximado de 360°. Conidios subesféricos de 3.5-5.0 µm.
<i>A. niger</i>	Ilimitadas, planas, granulosas, negras.	Sin pigmentos	Micelio macrosifonado, hialino, tabicado (2-4 µm). Cabezas aspergulares que miden 40-60 µm de diámetro, con conidióforos largos cenocíticos, con vesículas subesféricas de 10-25 µm, con dos series (pequeñas y grandes) en un ángulo aproximado de 180° de conidios redondos de 1.5-2.5 µm.
<i>A. terreus</i>	Ilimitadas, pulverulentas, granulosas, de color beige-café, con un halo micelial blanco	Sin pigmentos	Micelio macrosifonado, hialino, tabicado (2-4 µm). Cabezas aspergulares que miden 40-50 µm de diámetro, con conidióforos largos cenocíticos, con vesículas subesféricas de 10-20 µm, con dos series (pequeñas y grandes) en un ángulo aproximado de 180° de conidios redondos equinulados de 2.0-3.0 µm. Células de Hülle pueden estar presentes.
<i>A. versicolor</i>	Ilimitada, aterciopelada, granulosa. Color variable al inicio (amarillo verdoso) y se transforma a rosa pálido o café-ocre.	Pigmento rojo y posteriormente rojo-pardo oscuro.	

4. Epidemiología

Distribución geográfica. Sin predilección geográfica³, la aspergilosis se ha reportado en prácticamente todas las partes del mundo^{1,9}.

Fuente de infección y hábitat. Ubicua en la naturaleza³, *Aspergillus* es encontrado en agua, comida, aire, suelo y materia vegetal en descomposición. Las diversas especies de *Aspergillus* ocupan el primero o segundo lugar dentro de los hongos contaminantes del ambiente; en especial contaminan alimentos, sobre todo los que contienen carbohidratos y fibras (pan, dulces, alimento de aves, granos, etc.)¹. Representa una importante amenaza de infecciones nosocomiales^{9,10}.

Vía de entrada. Las puertas de entrada de *Aspergillus* al tracto respiratorio van desde los senos paranasales hasta el árbol traqueobronquial¹. La enfermedad puede localizarse en la misma puerta de entrada o diseminarse, bien por contigüidad o bien por invasión vascular, produciendo una condición generalizada con afectación multiorgánica¹⁰ (Figura 7).

Sexo y edad. La aspergilosis se presenta en igual proporción en los dos sexos: se ha visto en todas las edades, pero la frecuencia en cada grupo etario puede variar de acuerdo con la forma clínica: por ejemplo, la aspergilosis pulmonar es propia de los adultos, en cambio, los estados de hipersensibilidad son más bien de adolescentes y adultos jóvenes¹. La infección pulmonar asociada a leucemia es propia de niños y menos frecuente en adultos¹¹.

Ocupación. La ocupación juega cierto papel en la adquisición de la enfermedad, por ejemplo, en personas que manejan granos (maíz, centeno, trigo, alimento de aves), porque están sujetas a inhalar grandes cantidades de conidios, ya que las especies de *Aspergillus* saprofitan estos productos¹.

Periodo de incubación. Indeterminado¹.

Factores de predisposición. Predominantemente todo aquel individuo con un estado inmunitario deficiente¹².

Entre los que se han asociado en los últimos años al aumento de las aspergilosis, destacan el desarrollo de nuevas pautas de quimioterapia antineoplásica (terapia citotóxica¹⁶) el incremento exponencial de los trasplantes de órganos, así como la utilización de fármacos inmunosupresores cada vez más potentes frente a enfermedades autoinmunes y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica¹³, esta última con una tasa de mortalidad elevada, entre 91-95%^{14, 15}. Alrededor del 70% de los enfermos con aspergilosis invasiva son pacientes con leucemia (principalmente leucemia mieloblástica aguda), linfoma o receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos. La incidencia de la aspergilosis invasiva es mayor en estos enfermos hematológicos (aproximadamente 10% en el trasplante de médula ósea alogénico, aproximadamente 3% en el trasplante de médula ósea autólogo) y menor en otro tipo de pacientes, como los receptores de trasplante de órgano sólido (aproximadamente 1%) o los ingresados en unidades de cuidados intensivos (< 0,5%)³.

Las fases de neutropenia debidas a una neoplasia hematológica o inducidas por la quimioterapia constituyen otro importante factor de riesgo (un tercio de las aspergilosis pueden aparecer durante el primer tratamiento quimioterapéutico). También lo son el tipo de donante, la edad del paciente y el desarrollo de la enfermedad injerto contra huésped (por el empleo de altas dosis de corticoides, ciclosporina A y agentes anti-TNF¹⁷). No obstante, cada tipo de trasplante plantea sus propios factores de riesgo particulares que deben ser valorados adecuadamente¹⁰. Las cambiantes prácticas oncológicas y de trasplante de médula ósea han disminuido tanto la duración como la frecuencia de la neutropenia, la cual puede ser reducida con protocolos que incluyen el empleo de factores estimulantes de granulocitos. La asociación temporal de la enfermedad invasiva ha cambiado a una distribución bimodal, con el riesgo más elevado observado justo después del trasplante (<20 días), y el segundo pico de incidencia

ocurre a más de 100 días pos-trasplante. Este pico tardío es debido principalmente a la terapia de corticosteroides, a elevadas dosis, para el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped, aguda o crónica³ (Figura 7).

Pacientes con VIH^{3, 18}, los que presentan extensas quemaduras, los enfermos respiratorios crónicos (tratados con corticoides), los enfermos sometidos a cirugía extensa (sobre todo, cardiovascular) y aquellos pacientes que padecen defectos congénitos poco frecuentes, como la enfermedad granulomatosa crónica, constituyen otro importante grupo de alto riesgo para desarrollar aspergilosis, principalmente de carácter invasivo^{10, 18, 19}.

Una vez adquirida, la mortalidad de la aspergilosis invasiva es muy alta, destacando sobre todo los receptores de hígado, de progenitores hematopoyéticos (87 y 92%, respectivamente), de páncreas (donde alcanza a la totalidad de los infectados¹⁰) y de pulmón³. Las razones de lo anterior incluyen la previa colonización con *Aspergillus* en el órgano trasplantado, una reducción en la capacidad de limpieza ciliar y la continua exposición al ambiente del órgano trasplantado³. En el resto de los pacientes, la mortalidad oscila entre el 62 y el 98%, dependiendo de la enfermedad de base y de los órganos afectados (más del 60% en aspergilosis pulmonar invasiva, 80% en la aspergilosis diseminada y casi de la totalidad de los pacientes con aspergilosis cerebral). La elevada mortalidad de la aspergilosis invasiva está condicionada, en gran parte, por la dificultad de su diagnóstico temprano, ya que más de la mitad (entre el 50 y el 80%) de las confirmadas en necropsia no se sospechan durante la vida del enfermo. Para mejorar el pronóstico de esta enfermedad es preciso identificar completamente a los grupos de riesgo elevado y perfeccionar las pruebas diagnósticas, tanto micológicas como inmunológicas y radiológicas, de tal forma que el diagnóstico sea lo más anticipado posible. Así, se podría instaurar un tratamiento precoz y la morbi-mortalidad de esta grave infección disminuiría notablemente¹⁰.

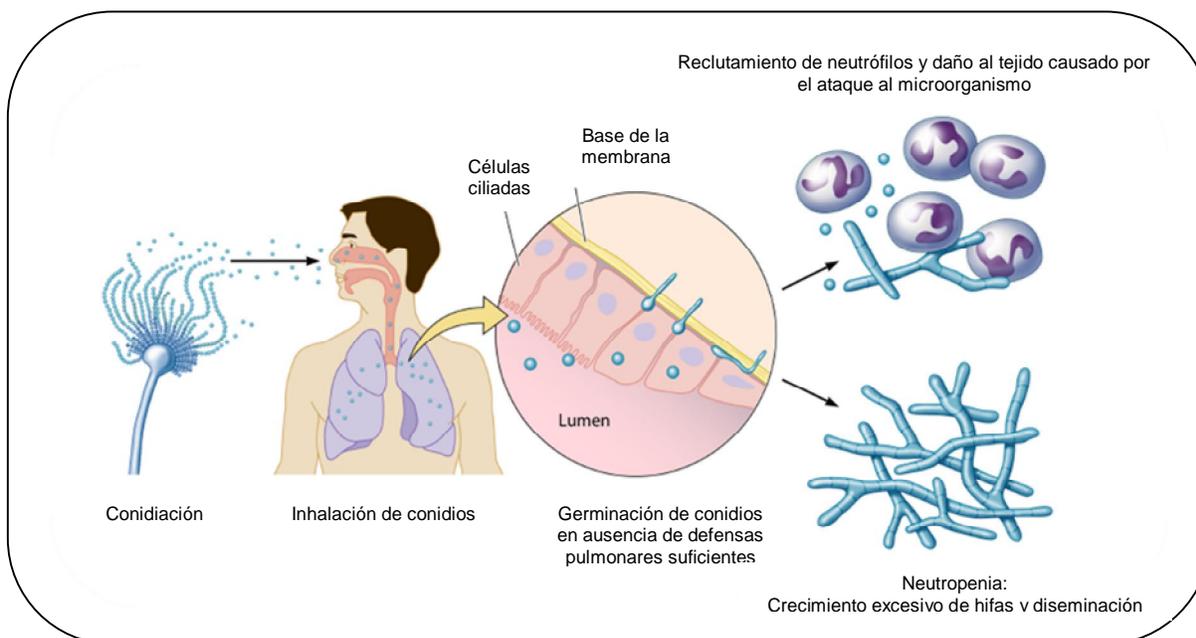


Figura 7. Ciclo infeccioso de *A. fumigatus*. *Aspergillus* es ubicuo en la naturaleza y su reproducción asexual conlleva a la producción de conidios que son fácilmente transportados por aire. La inhalación de conidios por pacientes inmunodeprimidos resulta en el establecimiento de los mismos en los pulmones, la germinación y, dependiendo del estado inmunitario del paciente, el control fúngico mediado por neutrófilos (originando inflamación), o el crecimiento incontrolado de hifas y, en casos severos, la diseminación debida a la neutropenia del paciente. ^{Taylor RT (22)}

Datos recientes sugieren que la incidencia de aspergilosis pulmonar invasiva (API) está incrementando en pacientes no inmunosuprimidos en la unidad de cuidados intensivos (UCI)³. Los signos clínicos y síntomas de la API, junto con las características radiográficas, a menudo son inespecíficas en pacientes en UCI y el hallazgo de *Aspergillus* spp en muestras del tracto respiratorio en estos pacientes no debe ser rutinariamente descartado como colonización, incluso si estos pacientes son inmunocompetentes. Posterior evaluación diagnóstica debe llevarse a cabo y la aplicación de terapia antifúngica temprana debe ser considerada una vez que API se sospecha en pacientes críticos. Los reportes sugieren que el aislamiento de *Aspergillus* del tracto respiratorio está asociado con un resultado desfavorable en pacientes en UCI, sin importar si el hallazgo representa API o colonización^{20, 21}.

Tabla 4

Factores de riesgo más frecuentemente asociados con el desarrollo de aspergilosis invasiva¹⁰

- Neoplasias hematológicas > neoplasias de órganos sólidos
- Fases de recaída > Fases de remisión
- Quimioterapia antineoplásica
- Trasplante de progenitores hematopoyéticos
- Trasplante de órganos sólidos (hígado, pulmón, corazón)
- Neutropenia profunda (< 100 neutrófilos/mm³ durante más de tres semanas o prolongada (< 500 neutrófilos /mm³ durante más de cinco semanas)
- Enfermedad injerto contra huésped
- Tratamiento con corticosteroides u otros inmunosupresores
- Diabetes
- Tratamiento antimicrobiano prolongado (profilaxis antibacteriana y antivírica)
- Infección por Citomegalovirus (incluida seropositividad) o infección vírica respiratoria
- Aumento de la concentración de conidios de *Aspergillus* en el ambiente: obras de construcción y remodelación, aerosoles asociados a duchas y otras instalaciones de agua
- Cirugía extensa (cardiovascular)
- Grandes quemaduras (> 50% de la superficie)
- Estancia en Unidades de Cuidados Intensivos
- Hemodiálisis

Hay una serie de factores asociados con la virulencia de las cepas, la mayoría de los cuales han sido estudiados, en particular en *A. fumigatus*. La virulencia de este hongo, como de otras especies, funciona de manera multifactorial. Son importantes las adhesinas o proteínas de superficie para la interacción de las células receptoras; la producción de pigmentos de melanina en forma de varillas (*rollets*); una variedad de enzimas dentro de las que destacan proteasas, peptidasas, catalasas, fosfolipasas y superóxido dismutasas, así como sustancias tóxicas o micotoxinas, como dos que producen lisis celular, la restrictosina ribonucleasa y hemolisina; recién se ha estudiado la gliotoxina que, produce inmunosupresión¹.

Tabla 5		
Metabolitos de <i>A. fumigatus</i> implicados en la patogénesis ²²		
Metabolito secundario	Asociación fúngica	Función potencial <i>in vivo</i>
Gliotoxina	Hifas	Induce apoptosis de células del hospedero Daño epitelial y movimiento ciliar abatido Inhibición de la fagocitosis y la liberación de especies reactivas de oxígeno Inhibe la respuesta de células T
Restrictosina	Hifas	Inhibición del daño a hifas mediado por neutrófilos
Verrucológeno	Conidios, hifas	Afecta la resistencia transepitelial e induce la hiperpolarización y vacuolización citoplasmática de células epiteliales
Fumagilina	Hifas	Daño epitelial y movimiento ciliar abatido; inhibición de la angiogénesis
Ácido helvólico	Hifas	Daño epitelial y movimiento ciliar abatido
Alcaloides ergot	Conidios, hifas	Desconocido
Fumitremorgina	Desconocido	Desconocido

5. Patogenia

Las manifestaciones clínicas de la aspergilosis son numerosas y dependen tanto del sitio, como de la severidad de desarrollo y el estatus del hospedero. A pesar de que la infección con *Aspergillus* involucra virtualmente todos los órganos, las vías respiratorias superiores, pulmones y estructuras anexas, son las más frecuentemente involucradas. Adicionalmente es importante reconocer el espectro de enfermedades de las vías respiratorias atribuidas a aspergilosis, que van desde enfermedades invasivas tales como la aspergilosis pulmonar invasiva, hasta las enfermedades no invasivas tales como aspergilosis saprofitica, aspergilosis broncopulmonar alérgica y la sinusitis alérgica fúngica³.

Los conidios, que se dispersan fácilmente en el aire, son inhalados y pueden permanecer en los senos paranasales o llegar a los pulmones, en donde se depositan en los bronquios, los espacios alveolares o lesiones cavitarias preexistentes. En un individuo sano, los conidios que no son removidos mediante la limpieza mucociliar, se encuentran con células epiteliales o macrófagos alveolares, que son los responsables de destruirlos e iniciar la respuesta inflamatoria. Los conidios que evaden la destrucción por los macrófagos y germinan, son blanco de los neutrófilos, capaces de destruir a las hifas. Sin embargo, el riesgo de desarrollar aspergilosis de vías respiratorias se debe al mal funcionamiento de las defensas del hospedero, siendo las razones variadas, como ya se ha mencionado, así como los atributos fúngicos que permiten a *Aspergillus* sobrevivir y crecer en el ambiente del organismo hospedero^{22, 23}. La aspergilosis invasiva es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunosuprimidos. Sin defensas efectivas del hospedador, seguida de exposición pulmonar, los conidios que se alojan en los alveolos comienzan a desarrollarse y germinar. La transformación de las hifas con invasión vascular y diseminación de la infección son secuelas potenciales³. La mortalidad de la aspergilosis en general es del 60% y, en las formas invasivas y diseminadas, llega al 85-90%²⁴.

5.1 Aspergilosis alérgica

Aspergilosis broncopulmonar alérgica

La aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) es una reacción de hipersensibilidad que ocurre después de que los bronquios se han colonizado con *Aspergillus*³. Este padecimiento se presenta en sujetos que inhalan con frecuencia conidios del agente etiológico², los cuales saprofitan las mucosas sin que puedan reproducirse¹. La severidad del cuadro clínico depende de la frecuencia y la cantidad de los conidios inhalados, así como del estado inmunológico del paciente². Se estima que la ABPA afecta del 1 al 2%^{3, 9} de los pacientes con asma y al 7% de los pacientes con fibrosis quística³.

La susceptibilidad de pacientes asmáticos para desarrollar ABPA no se comprende por completo. Algunos autores han reportado que la exposición a elevadas concentraciones de conidios de *A. fumigatus*, principalmente, causará ABPA²⁵. Los factores ambientales no son considerados como el factor patogénico primordial, debido a que no todos los asmáticos desarrollarán ABPA a pesar de estar expuestos al mismo ambiente que los que sí la desarrollan²⁶.

En un individuo predispuesto genéticamente (atópico), conidios inhalados de *Aspergillus*, persisten y germinan a hifas, con la consiguiente liberación de antígenos que comprometen la limpieza mucociliar, estimulan y desgarran la barrera epitelial de las vías respiratorias, activando la inmunidad innata de los pulmones y la inflamación^{25, 26}. La presentación de antígenos provoca la síntesis de IgE, degranulación de células cebadas y la promoción de una respuesta eosinofílica de gran intensidad²⁵. Así, el hongo causa déficit en la depuración mucociliar, sibilancias, infiltrados pulmonares (la pared bronquial comúnmente es infiltrada por células inflamatorias, principalmente, eosinófilos²⁵), bronquiectasis y fibrosis²⁷. Es decir, la calidad del moco impacta el bronquio, que se distiende de forma mecánica. En casos severos el epitelio es destruido y cubierto por una

membrana constituida por fibrina, células inflamatorias, restos tisulares y elementos fúngicos¹.

Las características de la ABPA que pueden emplearse para el diagnóstico son: (i) presencia de asma con bronquiectasis; (ii) reacción cutánea inmediata a *Aspergillus fumigatus*; (iii) concentración total en suero de la inmunoglobulina IgE >500 IU/mL; (iv) eosinofilia periférica en sangre y, (v) infiltrados visibles por rayos x³.

Pacientes con ABPA típicamente presentan cursos de mejoría y recaída. Los corticosteroides se emplean comúnmente en el tratamiento de los síntomas de asma que se manifiestan durante las exacerbaciones³.

Sinusitis alérgica aspergilar

La sinusitis alérgica aspergilar es otra condición alérgica mediada por IgE (IgE sérica mayor a 150 IU/mL²⁸), con varias similitudes clínicas y patológicas con ABPA. Respecto al contenido del seno nasal se ha reportado la presencia de eosinófilos necróticos, cristales Charcot-Leyden, restos celulares, epitelio respiratorio descamado e hifas fúngicas²⁹.

Los pacientes que comúnmente sufren de esta condición son adolescentes atópicos o jóvenes adultos con historia de rinitis crónica que progresivamente se volvió más severa y deja de ser sensible a terapias contra rinitis y sinusitis. El bloqueo nasal se incrementa a medida que los pólipos intranasales se desarrollan. Los pacientes comúnmente se quejan de la expulsión de “bolitas gomosas” de la nariz. La masa fúngica en expansión puede causar dolor facial y deformaciones, proptosis con diplopia y alteraciones de la visión, erosión de la base craneal y parálisis de los nervios craneales. Comúnmente hay erosión y remodelación del hueso. El moco, provocado por la alergia, es frecuentemente descrito de color café verdusco y consistencia gomosa; constituido por epitelio respiratorio descamado,

prominente eosinofilia con cristales Charcot-Leyden e hifas fúngicas sin invasión del tejido. Típicamente no se reporta historia familiar de la enfermedad, es decir, la condición no se desarrolla en grupos familiares.²⁹

Tradicionalmente, las infecciones fúngicas de los senos paranasales han sido consideradas poco comunes y de ocurrencia sólo en individuos inmunocomprometidos. Sin embargo, la ocurrencia de las sinusitis fúngicas ha incrementado recientemente en la población inmunocompetente. La Academia Americana de Cirugía Otolaringológica de Cabeza y Cuello, lista cuatro tipos de sinusitis fúngica: (i) sinusitis-micetoma fúngico; (ii) sinusitis alérgica fúngica (SAF); (iii) sinusitis crónica indolora y, (iv) sinusitis fulminante. La SAF es la forma más común de sinusitis fúngica²⁹.

Las sinusitis fúngicas son comúnmente causadas por hongos del género *Aspergillus*. *A. fumigatus* es el aeroalérgeno más comúnmente encontrado en aspergilosis alérgicas, implicado también en rinitis y asma alérgico²⁸. Sin embargo, se han reportado SAF causadas por hongos mohos dematiáceos del género *Curvularia*, *Drechslera*, *Bipolaris*, *Exserohilum*, *Alternaria*, *Helminthosporium* y *Fusarium*²⁹.

Descrita por primera vez en 1981, la SAF se ha convertido en la sinusitis fúngica más diagnosticada y mejor comprendida. Sin embargo, se ha llegado a un consenso al listar sus particularidades: (i) la presencia de pólipos nasales; (ii) hipersensibilidad como lo indica la historia atópica, pruebas dérmicas y serológicas; (iii) particularidades histológicas del moco y, (iv) hifas fúngicas no invasivas²⁹.

5.2 Aspergiloma pulmonar

Un aspergiloma pulmonar se inicia por la aspiración de conidios¹, seguido de un crecimiento exacerbado del hongo³⁰, desarrollándose un conglomerado redondo

de hifas, moco y restos celulares³¹ (pelota fúngica de *Aspergillus*³), contenido en una gruesa pared fibrótica, que ocupa una cavidad preexistente. La causa de una cavidad preexistente es comúnmente debida a una vieja cavidad tuberculosa³⁰, cambios enfisémicos y adenocarcinoma³. Un aspergiloma puede complicar un amplio rango de otras enfermedades pulmonares, las cuales están asociadas con, o caracterizadas por la cavitación, entre las que se encuentran la sarcoidosis, histoplasmosis, quistes pulmonares, espondilitis anquilosante, tuberculosis, bronquiectasis, nódulos reumatoides y adenocarcinoma. La pelota fúngica típicamente es móvil y de tamaño variable a través del tiempo, al igual que el grado de la pleura adyacente y el engrosamiento de la pared de la cavidad. La mayoría de los aspergilomas son causados por *A. fumigatus*, sin embargo, algunos, especialmente en pacientes diabéticos, son causados por *A. niger*, en donde los cristales de ácido oxálico pueden ser observados en el esputo³¹.

A pesar de que es frecuentemente asintomática, la presencia de una pelota fúngica ocasionada por *Aspergillus*, puede provocar hemoptisis³ (en el 50-90% de los pacientes), que es infrecuente y de pequeño volumen, pero en ocasiones puede ser masiva y fatal³¹. El típico hallazgo de una pelota fúngica debida a *Aspergillus*, es una masa sólida redonda dentro de una lesión pulmonar cavitaria. La resección quirúrgica es la única terapia efectiva para estos casos. Cuando el tratamiento quirúrgico no puede ser ofrecido, la terapia fúngica a largo plazo, ha demostrado estabilizar e incluso mejorar los síntomas pulmonares³.

No obstante de la naturaleza saprobia del hongo, un aspergiloma puede provocar morbilidad significativa³⁰. El Aspergiloma, por lo general, es único y se localiza de preferencia en el lóbulo superior; al desarrollarse actúa mecánicamente como una válvula, provocando obstrucción bronquial. En raras ocasiones el hongo invade la pared de la cavidad y el pulmón adyacente¹.

La aparición de una pelota fúngica móvil en una cavidad pulmonar es altamente sugestiva en el diagnóstico. La precipitación de anticuerpos ante *Aspergillus* es

una prueba esencial en el diagnóstico para confirmar la etiología; rara vez un hongo que no sea del género *Aspergillus* es el responsable³¹.

El hongo está creciendo y muriendo continuamente dentro de la cavidad, lo cual está parcialmente regulado por las condiciones prevalentes de la cavidad misma. El deterioro del hongo es acompañado por cambios en el micelio, el cual es eliminado con el esputo. Rara vez ocurre la regresión espontánea de la pelota fúngica, representando únicamente el 10 % de los pacientes con la enfermedad. Ocasionalmente la lisis es asociada con infección piogénica. El curso de la patología del paciente está más relacionada con la condición subyacente que con la infección misma⁸. La dinámica de la enfermedad puede ser dividida en seis etapas: (i) etapa inicial, micelio en una gruesa capa que cubre la parte interna de la cavidad; (ii) forma abortiva, representa un intento frustrado del hongo de crecer y desarrollarse dentro de la cavidad; (iii) pelota fúngica desarrollada por completo, en donde el hongo está tanto creciendo como muriendo, mostrando zonación del crecimiento de las hifas y delicuescencia de las hifas del centro; (iv) pelota fúngica que contiene hongo muerto; (v) pelota fúngica calcificada y, (vi) etapa residual, abscesos que contienen fragmentos de micelio⁸.

5.3 Aspergilosis pulmonar invasiva

Las diferentes formas clínicas derivadas de la presencia de *Aspergillus* en la vía aérea deben verse como un proceso evolutivo que se inicia con la colonización de la vía, continúa con la ruptura de la barrera epitelial por las hifas del hongo (evento inicial de la invasión tisular), progresando a API, pudiendo posteriormente diseminarse al resto del organismo³².

La API es la más común de las enfermedades invasivas causadas por *Aspergillus*³, atacando severamente a pacientes inmunocomprometidos. Aquellos con mayor riesgo de contraer esta enfermedad, de elevada mortalidad, son individuos con elevada o prolongada neutropenia, por ejemplo, aquellos pacientes con cánceres hematológicos como la leucemia; pacientes trasplantados con órganos sólidos y células madre hematopoyéticas; pacientes con prolongada terapia corticosteroide, comúnmente empleado para la prevención y/o tratamiento de la condición injerto contra huésped en pacientes trasplantados; individuos con inmunodeficiencias genéticas tales como la enfermedad crónica granulomatosa; así como individuos infectados con el VIH^{3,32}. Tradicionalmente API ha sido vista de 10 a 14 días después del trasplante de células madre hematopoyéticas y ha sido asociada con granulocitopenia severa. Sin embargo, reportes recientes documentan un cambio en la epidemiología de esta infección, con menos de un tercio de todos los pacientes diagnosticados con API, que presentan neutropenia al momento del diagnóstico, lo cual impacta la presentación clínica y el periodo de alto riesgo de contraer la infección³. Actualmente, entre 30-50% de casos de API se diagnostican en pacientes no neutropénicos, con una mortalidad similar a los neutropénicos³³.

El daño pulmonar será distinto según el estado inmunológico de los pacientes. En los neutropénicos se produce angiainvasión, hemorragia intraalveolar e infartos pulmonares. En los no neutropénicos se producirá necrosis inflamatoria, pero sin invasión vascular, hemorragia o infarto³⁴.

Los corticosteroides favorecen el crecimiento de algunos *Aspergillus* (especialmente *fumigatus*), disminuyendo la actividad antifúngica de los macrófagos alveolares e inhibiendo a los neutrófilos y a las citocinas. En cualquier caso, es poco frecuente que se produzcan infecciones graves relacionadas con el tratamiento corticoide con dosis inferiores a 10 mg/día, o menos de 700 mg acumulados³⁵.

Se ha descrito que tanto infecciones bacterianas como víricas pueden favorecer el desarrollo de API. El mecanismo sería por depresión inmune transitoria y deterioro de la función ciliar, asociados a la infección precedente³⁵.

Los pacientes tratados con antibióticos de amplio espectro presentan mayor riesgo de presentar API. Posiblemente debido a que estos tratamientos modifican la microbiota habitual, así como los patrones de resistencia y colonización por patógenos³⁵.

La presentación clínica de la API incluye hemoptisis (12-15% de los casos), tos seca (26%), disnea (32-48%), fiebre (39%), sibilancias (8-28%). Los síntomas de hemoptisis y dolor pleurítico sirven como recordatorio de la naturaleza angioinvasiva de este tipo de aspergilosis. Los síntomas menos frecuentes son el dolor torácico y la expectoración³².

La presencia de *Aspergillus* en las vías respiratorias puede representar colonización o, rara vez, traqueobronquitis, típica infección en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) o quien se ha sometido a trasplante pulmonar. Hallazgos broncoscópicos incluyen lesiones pseudomembranosas y ulcerativas. Predominan los síntomas inespecíficos, siendo la tos, el dolor de pecho, la fiebre y la hemoptisis los más comúnmente reportados³.

Otras formas de aspergilosis pulmonar

El espectro de aspergilosis de vías respiratorias inferiores incluye otras formas formalmente denominadas como aspergilosis pulmonar semi-invasiva y aspergilosis pulmonar crónica necrozante³.

Tabla 6				
Comportamiento de las aspergilosis de vías respiratorias ^{1, 8}				
Variedad	Inmunidad humoral	Inmunidad celular	Parasitación	Agente etiológico principal
Alérgica	IgE↑ y puede estar IgG↑	Normal y eosinofilia (80%)	Generalmente no se observa	<i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i>
Saprofítica	IgG↑ y puede estar IgE↑	Normal (en ocasiones eosinofilia)	Bolas fúngicas	<i>A. fumigatus</i> <i>A. niger</i>
Invasiva	Normal	Deprimida	Granulomas crónicos con hifas tabicadas	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i>

6. Diagnóstico de laboratorio

6.1 Toma de muestra

Se manejan diversos tipos de muestras, como son esputo, lavado bronquioalveolar (LBA), exudados, fragmentos de biopsia¹ y sangre². Una parte de la pieza

se almacena en solución salina para cultivo, el resto se emplea para el examen directo²⁴.

La aspiración percutánea, broncoscopia o biopsia toracoscópica asistida por video, son los procedimientos más comúnmente empleados para obtener tejido³.

Se sugiere tratar los especímenes obtenidos de la toma de muestra con algún agente mucolítico para la recuperación del hongo atrapado en el moco del esputo o cualquier otra muestra que lo requiera³⁶.

6.2 Examen directo

La morfología microscópica de *Aspergillus* spp se observa mejor al realizar una preparación con lactofenol azul de algodón o lactofucsina del espécimen obtenido del paciente. La lactofucsina es más viscosa, por lo que facilita la separación de las hifas. La preparación debe observarse inicialmente bajo el objetivo 10x, sin embargo, la observación a 40x, 60x o 100x con aceite de inmersión, puede ayudar a revelar diferencias minúsculas en la textura de los conidióforos o la ornamentación de los conidios superficiales⁸.

El examen microscópico también suele llevarse a cabo colocando la muestra entre portaobjetos y cubreobjetos con hidróxido de potasio al 10% o solución salina¹. La muestra puede teñirse con hematoxilina –eosina, ácido peryódico de Schiff (APS), metamina argéntica (tinción de Gomori-Grocott)²⁴, llevarse a cabo la tinción de Gram⁸ o teñir las muestras con blancoflúor o calcoflúor más KOH al 10-20%³⁶ (Tabla 7).

Dependiendo del tipo de aspergilosis, al microscopio se observa lo siguiente: (i) en el caso de aspergiloma pulmonar, como es una simple saprofitación, se ven hifas, conidios y las clásicas cabezas aspergiliares (como en los medios de cultivo); (ii) cuando hay invasión pulmonar, en raras ocasiones se observan cabezas

aspergiliares (casos mixtos)¹, debido a la reducción morfológica², en general se ven hifas gruesas y tabicadas, esta imagen es propia también de aspergilosis diseminada y, (iii) en los casos alérgicos de aspergilosis, los hongos por lo general no se observan invadiendo ni saprofitando tejidos, por lo tanto los exámenes en fresco, cultivos y biopsias son de poca utilidad¹.

El examen directo puede realizarse siguiendo dos técnicas, principalmente:

Examen directo o en fresco. Es preparado recolectando una pequeña cantidad de muestra de la superficie de una colonia, con la punta de un asa micológica. La muestra se coloca sobre un portaobjetos y se añade una gota de fluido para montar (lactofenol azul de algodón o lactofucsina, generalmente), finalmente un cubreobjetos es colocado sobre la muestra con el fluido y es golpeado ligeramente con el extremo opuesto del asa con la que se colectó la muestra, con la finalidad de provocar movimiento en el fluido de la preparación, tal que ocasione la distribución del micelio⁸.

Este método es útil para cultivos que presentan elevada conidiación, en donde el asa se emplea para penetrar la capa superficial de conidios y coleccionar conidióforos, o para seleccionar cuerpos fructíferos visibles macroscópicamente⁸.

Tabla 7		
Algunos métodos y tinciones empleados de forma frecuente en la detección, por microscopía directa, de elementos fúngicos en muestras clínicas ³⁷ .		
Método/Tinción	Empleo	Comentarios
KOH (10-20%)	Detección de hongos	El hidróxido de potasio disuelve la queratina y permite visualizar los elementos fúngicos; destruye todas las células no micóticas, lo cual hace más fácil ver si hay cualquier hongo presente.
Tinción de Gram	Detección de bacterias y hongos	Se realiza con frecuencia en las muestras clínicas. Tiñe la mayor parte de las levaduras y las hifas presentes en las mismas. Casi todos los hongos son grampositivos, aunque algunos muestran un patrón moteado o aparecen como gramnegativos, como <i>Cryptococcus neoformans</i> .
Lactofenol azul de algodón	Detección de hongos	Los microorganismos suspendidos en la preparación mueren a causa de la presencia del fenol, el cual también ocasiona la desactivación de las enzimas líticas celulares, por lo que las células no se lisan. El ácido láctico presente conserva las estructuras fúngicas y el azul algodón tiñe la quitina de las paredes fúngicas.
Lactofucsina	Detección de hongos	El colorante se une a las paredes fúngicas tiñéndolas de rojo. Las preparaciones hechas con lactofucsina son similares a aquellas hechas con lactofenol azul de algodón, sin embargo, son superiores, dado que la pared celular destaca con mayor claridad.
Hematoxilina-eosina	Tinción histológica con fines generales	Tinción más adecuada para mostrar la reacción en el tejido infectado. Tiñe casi todos los hongos. Útil para revelar el pigmento natural de los dematiáceos. La hematoxilina, por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul-púrpura (núcleos celulares); la eosina tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida.
Ácido peryódico de Schiff (APS)	Tinción histológica de hongos	Tiñe tanto levaduras como hifas en los tejidos. Los artefactos positivos para esta tinción pueden remedar células de levadura. Conserva el detalle del fondo histológico, tiñendo las hifas de rosa-morado.
Metamina argéntica (Gomori-Grocott)	Tinción histológica de hongos	Tinción más adecuada para detectar hongos. Tiñe las hifas y las levaduras, que adoptan una coloración negra frente a un trasfondo verde.
Blanco calcoflúor	Detección de todos los hongos	Rápido (1-2 minutos); detecta quitina de pared fúngica por fluorescencia brillante. Empleada en combinación con KOH. Precisa de un microscopio de fluorescencia con filtros adecuados. La fluorescencia de fondo puede dificultar el estudio de algunas muestras.

Examen directo con cinta adhesiva. Este tipo de preparaciones tiene la ventaja de preservar intactas las estructuras del hongo. Cinta adhesiva de doble contacto es más fácil de manejar que una de contacto simple. Un pequeño trozo de cinta es adherido a la punta de un asa y es gentilmente colocada sobre la superficie de una colonia, ejerciendo un poco de presión. El asa con la cinta se separa de la colonia (se puede observar material fúngico adherido, micelio y conidios) y es colocada sobre un portaobjetos con una gota de fluido para montar, con el material fúngico hacia arriba. Una segunda gota de fluido es colocada en la superficie y finalmente un cubreobjetos se sitúa sobre esta preparación, siendo suavemente golpeado para eliminar burbujas de aire. El propósito de la gota inicial de fluido es mejorar la óptica, eliminando cualquier burbuja de aire debajo de la cinta adhesiva. Al poner la cinta con la muestra hacia arriba, las estructuras fúngicas pueden observarse directamente a través del portaobjetos sin tener que observar también a través de la capa de cinta, la cual puede opacar detalles. Si un cultivo esporula demasiado, la preparación debe realizarse a partir de los bordes de la colonia, donde el micelio es más joven y menor cantidad de conidios son producidos⁸.

Tabla 8 Características de la morfología microscópica útil en la identificación ⁸
<ul style="list-style-type: none">• Tamaño y forma de la vesícula• Color, textura y longitud del conidióforo• Célula troncal• Presencia o ausencia de métula• Forma de la cabeza aspergilar• Tamaño y forma de las conidios• Cleistotecio• Cuerpos escleróticos• Tamaño, forma y superficie de las ascosporas• Células de Hülle

6.3 Cultivo

Las especies de *Aspergillus* crecen rápidamente en la mayoría de los medios de cultivo y muchos pueden ser identificados con certeza a partir del análisis de la morfología colonial. La mayoría de los textos actuales contienen descripciones de las colonias cultivadas en medios de cultivo definidos comúnmente empleados en el laboratorio, tales como agar Sabouraud (glucosa peptona agar), agar Czapek, agar Czapek con lisado de levadura, agar avena, agar papa dextrosa o agar extracto de malta con o sin glucosa adicional. Como la composición del medio puede afectar las características coloniales, tales como el color y la velocidad de crecimiento, es importante estar al tanto del medio de cultivo que se está empleando. Es importante también considerar la edad del cultivo que se está examinando, ya que ciertas estructuras sólo se desarrollan a determinado tiempo. La temperatura de incubación puede también ayudar a distinguir entre especies, a pesar de que muchas son reconocidas por ser termotolerantes, una temperatura de 42 °C puede ayudar a distinguir a las especies más patógenas de *Aspergillus*, como *Aspergillus fumigatus*. Las muestras bajo diagnóstico rutinariamente deben ser cultivadas de 30-37 °C³⁶, lo que puede aumentar la velocidad de crecimiento de algunos *Aspergillus*³², pero para lograr una identificación de mayor precisión, la incubación prolongada a 25 °C, puede ser necesaria para algunas especies⁸.

Se demostró que incubando los cultivos en un ambiente microaerófilico a 35°C, el cien por ciento presenta desarrollo. Mientras que los cultivos de los mismos organismos, incubados a 25°C sin CO₂, no desarrollan³⁶.

A cultivos que no esporulan, o lo hacen pobremente, se les debe promover la esporulación mediante el subcultivo a medios ricos tales como el agar extracto de malta o el agar papa sacarosa e incubar en un área en donde sean expuestos a ritmos naturales de luz y oscuridad. Tales manipulaciones consumen mucho tiempo e, incluso bajo estas condiciones, puede tomar varias semanas para que los cultivos comiencen la reproducción, si es que llegan a hacerlo⁸.

El aislamiento en cultivo y la identificación fenotípica de aislados clínicos comunes de *Aspergillus* es usualmente rápido y fácil, sin embargo, el cultivo es a menudo descrito como lento, creando dudas acerca de su valor en la detección de *Aspergillus*. *A. fumigatus* se desarrolla rápidamente; la típica colonia aterciopelada, verde azulada, con cabezas conidiales uniseriadas, desarrolla en 24-48 h en medios específicos para hongos filamentosos. Otros *Aspergillus*, asociados con aspergilosis invasiva, específicamente, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* y *A. terreus* tienen tasas de crecimiento similares a *A. fumigatus* a 25 y 37 °C⁸ (Figura 8).

También se deben reconocer los aislados atípicos de *Aspergillus*. Cepas de *A. fumigatus* que presentan pobre esporulación (blancas), con disminuida susceptibilidad a diversos antifúngicos, se han reportado. Estas cepas blancas tienen una secuencia genética diferente a la cepa silvestre (wild-type) de *A. fumigatus* y no desarrollan las típicas cabezas aspergilaes verde azuladas hasta 10-12 días después de la incubación⁸.

Tabla 9 Características de la morfología colonial útil en la identificación ⁸
<ul style="list-style-type: none">• Color de la superficie y reverso• Velocidad de crecimiento (diámetro colonial)• Textura• Pigmentos difusibles• Coremia• Olor (sólo cuando evidencia corroborativa se encuentra disponible)

A pesar de que muchos laboratorios no lo llevan a cabo rutinariamente, aquellos con interés en la identificación fenotípica de *Aspergillus*, pueden encontrar que el análisis de la producción de extrólitos es de gran ayuda en conjunto con las observaciones morfológicas. Comúnmente es el análisis de metabolitos secundarios, aunque también se analizan micotoxinas: aflatoxina, gliotoxina y ocratoxina, a partir de cultivos puros que han probado ser confiables y consistentes en sus características y son útiles en la diferenciación de especies. Varios métodos analíticos para llevar a cabo este análisis se han desarrollado, fundamentándose en la espectrometría de masas, sin embargo, no se ha validado su uso por completo para especies fúngicas⁸.

El microcultivo, una modificación del cultivo tradicional, también suele emplearse en la identificación fenotípica de *Aspergillus*. El microcultivo consume aún más tiempo y requiere de subcultivo, en vez de proceder al examen microscópico de un cultivo disponible. Suele realizarse cuando la conidiación es lenta o atípica. Un bloque de agar de aproximadamente 1 cm² se corta de un plato de cualquier agar designado para promover la producción de conidios y se coloca en la superficie de un portaobjetos estéril. Con la ayuda de un asa micológica o una aguja, se inoculan los cuatro costados del cubo de agar con el hongo moho bajo estudio. Un segundo portaobjetos estéril es situado sobre el agar y la preparación se incuba en una cámara húmeda por una semana o más, hasta que haya crecimiento visible en los bordes del bloque de agar y este se haya extendido, en una fina capa, a ambos portaobjetos. El bloque de agar se desprende cuidadosamente y se descarta, sobre ambos portaobjetos se coloca una gota de fluido de preparación (lactofenol azul de algodón o lactofucsina) y se cubren con cubreobjetos. Esto resulta en la obtención de dos preparaciones del mismo cultivo en las cuales las estructuras fúngicas han sido sometidas a una mínima manipulación y, por lo tanto, permanecen intactas y en un mismo plano para ser observadas⁸.

El cultivo permite realizar antifungigrama y confirmar el diagnóstico. En algunos casos, el cultivo puede no evidenciar microorganismos viables (zigomicosis) o puede ser muy lento (feohifomicetos), el caso de las infecciones por *Aspergillus*²⁴. De igual forma, como se ha mencionado anteriormente, *Aspergillus* spp son hongos que se encuentran en el suelo, en vegetales en descomposición y son contaminantes habituales de muestras de laboratorio, por lo que la relevancia de un cultivo positivo debe establecerse correlacionándolo con el cuadro clínico del paciente³⁸.



Figura 8. Morfología colonial de los principales agentes etiológicos de aspergilosis de vías respiratorias. Izquierda: *A. niger*; centro: *A. fumigatus*; derecha: *A. nidulans*.^{Pasqualotto AC (8)}

6.4 Histopatología

Aspergilosis alérgica

Sinusitis alérgica. Las pruebas de tinción específica para hongos (Metamina argéntica o de plata y PAS) demuestran abundante mucina (secreción mucosa espesa, como resultado de la respuesta inflamatoria, con elevadas concentraciones de eosinófilos, de color amarillento verdoso, que se describe de aspecto similar a la “mantequilla de maní”), elevada cantidad de eosinófilos³⁹ y cristales de Charcot-Leyden²⁹; se observan hifas septadas que se ramifican a 45° y conidios de hongos compatibles con *Aspergillus* sp³⁹, sin invasión del tejido²⁹ (Figura 9, 10 y 11).

Aspergilosis broncopulmonar alérgica. Los hallazgos histopatológicos muestran lumen bronquial conteniendo mucina con abundantes hifas, eosinófilos necróticos y cristales de Charcot-Leyden; ocasionalmente se observan hifas septadas, granulomatocis broncocéntrica y reemplazo del epitelio bronquial por histiocitos²⁵ (Figura 12).

Aspergiloma pulmonar

Por definición no hay invasión fúngica del tejido. Infiltrado inflamatorio crónico o agudo puede estar presente en la mucosa adyacente, los granulomas típicamente están ausentes. Los restos encontrados en las pelotas fúngicas microscópicamente consisten en densos ovillos de hifas con calcificaciones y cristales de oxalato⁸.

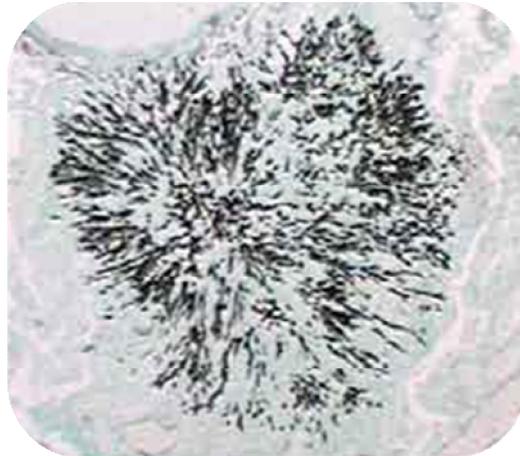


Figura 9. Abundantes hifas en la mucina. Hope WW (39)

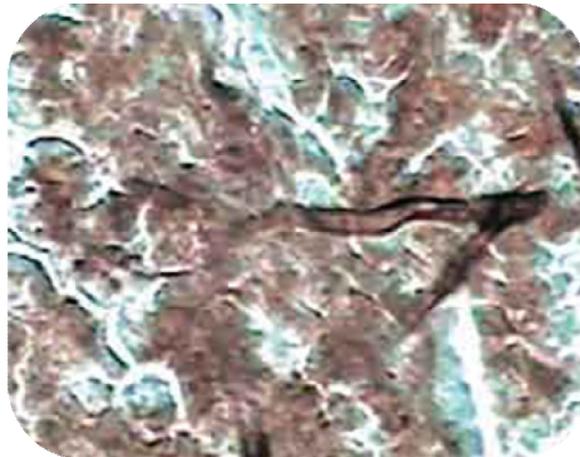


Figura 10. Hifas ramificadas (45°) rodeadas de abundantes eosinófilos (septos en las hifas). Hope WW (39)

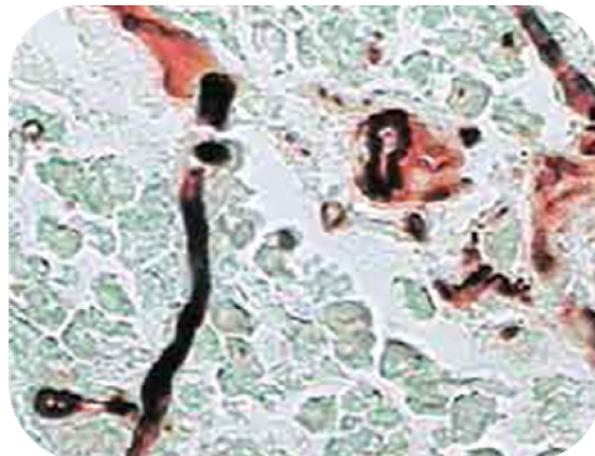


Figura 11. Conidios e hifas magnificadas. Hope WW (39)

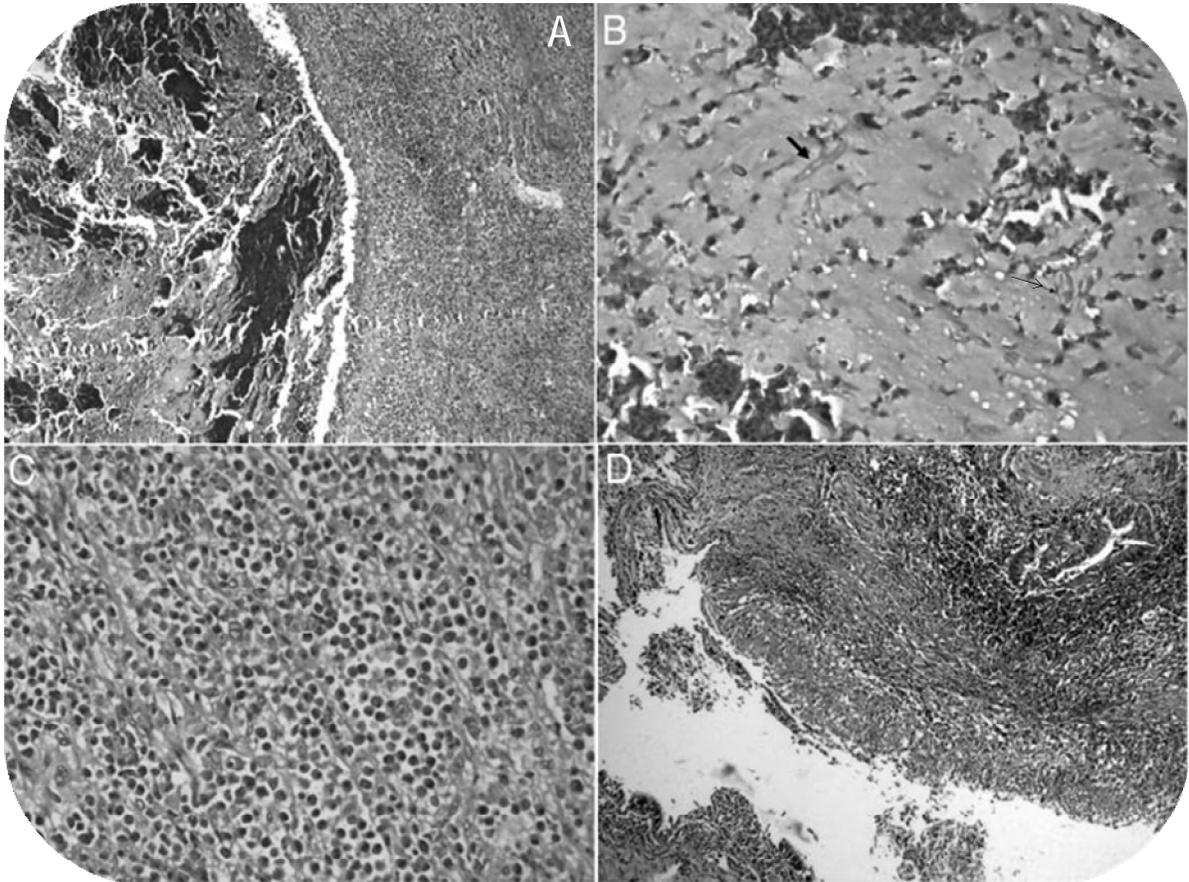


Figura 12. Hallazgos histopatológicos en pacientes con ABPA. (A) Lumen bronquial conteniendo mucina con gran cantidad de hifas (tinción de hematoxilina-eosina 100x); (B) Mucina con apariencia variegada, eosinófilos necróticos y cristales de Charcot-Leyden señalados con una flecha delgada, e hifas septadas ocasionales, señaladas con una flecha gruesa (tinción de hematoxilina-eosina 200x); (C) neumonía eosinofílica (tinción de hematoxilina-eosina 200x); (D) Granulomatosis broncocéntrica (tinción de hematoxilina-eosina 100x).^{Agarwal R (25)}

Aspergilosis pulmonar invasiva

Todos los tejidos de los pacientes con sospecha de enfermedad fúngica invasiva deben ser procesados con tinciones fúngicas. En las preparaciones directas, la tinción de Gram o de hematoxilina-eosina, los hongos pueden perderse o malinterpretarse sus estructuras. Las hifas se visualizan mejor con tinciones fúngicas especiales: material broncoscópico y/o tejido de biopsia debe ser examinado por la reacción de APS o la técnica de metamina de plata. Las estructuras fúngicas necróticas se visualizan mejor con la tinción de Gomori-Grocott que con la reacción de APS. El uso de un resaltador óptico, tal como el calcoflúor (también en combinación con KOH al 10%) o blancoflúor, es un método importante que puede permitir el rápido diagnóstico. Estos agentes blanqueadores se unen selectivamente a la celulosa y a la quitina, demostrando ser un método en extremo sensible⁸.

Los parámetros importantes a examinar en la microscopía directa incluyen la formación de septos, diámetro y ramificación de las hifas. *Aspergillus* prolifera como una hifa septada con 2.5-4.5 μm de diámetro y pueden ser caracterizadas como dicotómicamente ramificadas (ángulo aproximado de 45°). Aún no es posible especificar el hongo mediante estas observaciones⁸. Las características histopatológicas de la aspergilosis son útiles para documentar la invasión del tejido y puede mostrar angioinvasión típica de la infección invasiva (Figura 13). Sin embargo, la apariencia histológica no es específica de *Aspergillus*, ya que condiciones histopatológicas similares son encontradas en otros hongos filamentosos (incluyendo *Fusarium*, *Scedosporium*, entre otros), por lo tanto, deben emplearse cultivos para confirmar la identificación del microorganismo³.

Recientemente se ha demostrado que los hallazgos histopatológicos asociados con API difieren de acuerdo a la situación subyacente del paciente. En pacientes con trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas y enfermedad injerto contra huésped, hay inflamación intensa con infiltración neutrofílica, mínima

necrosis coagulativa y baja carga fúngica. La API en pacientes neutropénicos está caracterizada por ligera inflamación, extensa necrosis coagulativa con angioinvasión y elevada carga fúngica (Figura 14). La diseminación a otros órganos es igualmente elevada en ambos grupos⁸.

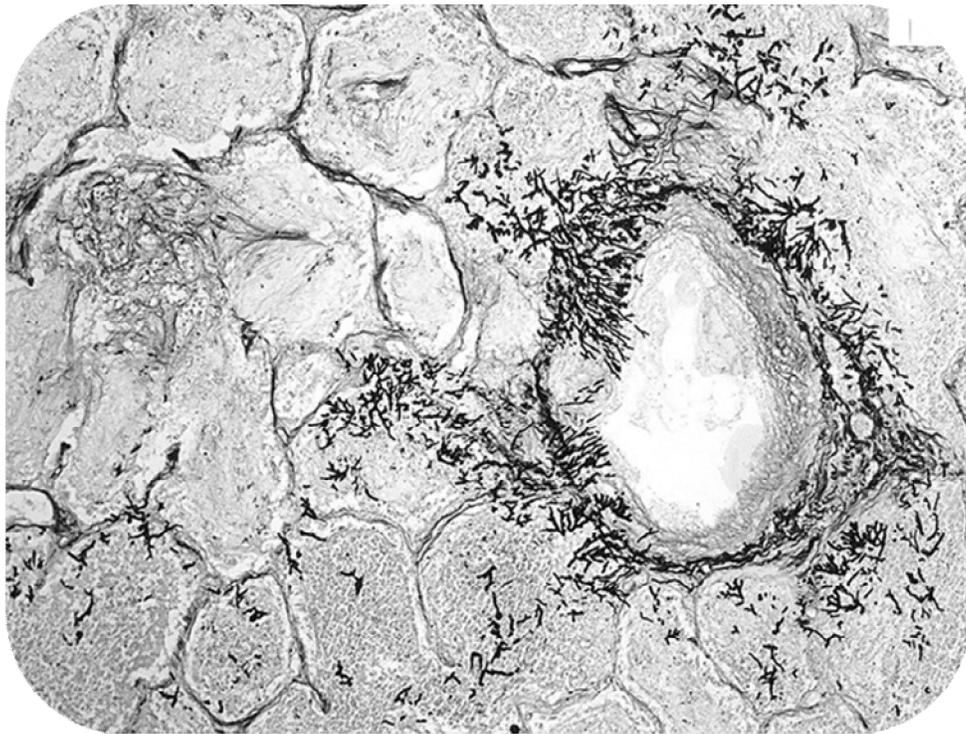


Figura 13. Hifas de *Aspergillus* en los alvéolos, invadiendo la luz de estructuras vasculares. Valle JM (32)

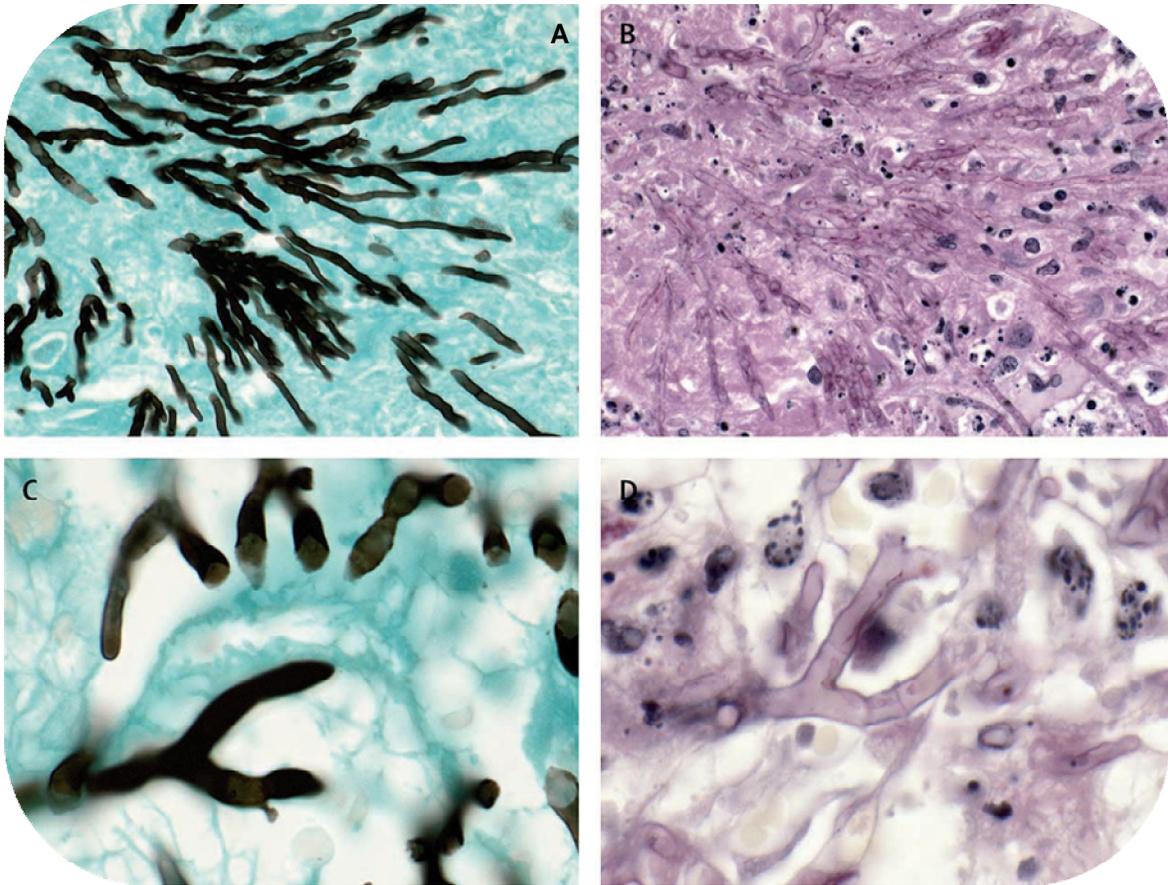


Figura 14. (A) Sección de tejido pulmonar que muestra hifas gruesas (tinción Gomori metamina de plata x400); (B) Invasión fúngica de tejido pulmonar (tinción de APS 400x); (C) y (D) Muestran hifas gruesas dicotómicamente ramificadas en ángulo agudo, típicas de *Aspergillus* spp (630x). La tinción de metamina de plata tiñe prominentemente las hifas confiriéndoles apariencia rígida. En contraste, con la tinción de APS se conserva el detalle del fondo histológico y la morfología de las hifas, aunque estas resaltan menos sobre el fondo.
Vides Lemus R (40)

6.5 Pruebas inmunológicas

En aspergilosis invasiva se ha realizado detección de los antígenos galactomanano y (1,3)- β -D-glucano en suero. La determinación del galactomanano tiene elevada sensibilidad y especificidad. El descenso en sus niveles se relaciona con buena respuesta al tratamiento, aunque puede observarse un incremento inicial. Puede haber falsos negativos si el paciente está en tratamiento antifúngico, y puede haber falsos positivos durante tratamiento con betalactámicos²⁴.

El antígeno (1,3)- β -D-glucano puede ser positivo en aspergilosis, entre otras micosis. Puede dar falsos positivos en pacientes con bacteremia o en tratamiento con amoxicilina-clavulánico²⁴.

Galactomanano

La baja sensibilidad y bajo valor predictivo de la detección de anticuerpos en sangre, hizo necesario el desarrollo de inmunoensayos para la detección de antígenos fúngicos circulantes. La antigenemia de *Aspergillus* fue detectada y caracterizada a finales de 1970. Después de inmunizar conejos sanos con el suero de un conejo experimentalmente infectado, el cual presentaba aspergilosis diseminada. El suero resultante formaba un inmunoprecipitado con un antígeno presente en un extracto de hifas de *Aspergillus*. Un análisis fisicoquímico demostró que este componente inmunoreactivo era el galactomanano (GM), un heteropolisacárido termoestable presente en la pared celular de la mayoría de las especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. La molécula de GM está compuesta de un centro no inmunogénico de manano, con cadenas laterales de longitudes variables de unidades de galactofuranosil (Galf), componente inmunodominante⁴¹ y que funciona como marcador de la diseminación hematogena del hongo³².

El método comercial de detección de GM en sangre, Platelia *Aspergillus*, Bio-Rad Francia, utiliza el anticuerpo monoclonal EB-A2 como captor y detector del GM,

siendo una técnica ELISA de doble sándwich, con la ventaja de ser reproducible entre laboratorios⁴¹.

El inmunoensayo enzimático Platelia *Aspergillus* detecta moléculas circulantes en fluidos corporales, que contienen Galf. El anticuerpo monoclonal EB-A2, obtenido de ratas, es empleado para cubrir los pozos de los microplatos para unirse al antígeno y actúa como anticuerpo detector del reactivo conjugado. Usando el anticuerpo como captador y detector, el límite de detección del galactomanano es de 0.5-1.0 ng/mL de líquido corporal, resultando en una detección temprana, comparado con el ensayo previamente disponible de aglutinación en látex (Figura 15)^{8,10}.

Las muestras son tratadas con calor en presencia de 4% de EDTA, con la finalidad de disociar complejos y precipitar proteínas que puedan interferir con la prueba. Las muestras tratadas y conjugadas son añadidas a los pozos cubiertos con el anticuerpo monoclonal; el plato es incubado. En presencia de antígenos de *Aspergillus*, el complejo anticuerpo monoclonal-GM-anticuerpo monoclonal-peroxidasa, se forma. Las capas son lavadas para remover cualquier material no unido. Posteriormente, la solución del sustrato es añadida, la cual reaccionará con los complejos unidos a los pozos, particularmente con la enzima, desarrollando color azul. La reacción enzimática es detenida mediante la adición de ácido, el cual provoca el cambio de color azul a amarillo. La absorbencia óptica de los especímenes y controles es determinada espectrofotométricamente⁸. La prueba tarda 3 horas en arrojar resultados⁴¹. Se considera positiva (punto de corte) si arroja resultados de 0.5 ng/mL del antígeno¹⁰. Si después del tratamiento antifúngico, se obtienen resultados de, por ejemplo, 0.3 ng/ml de antígeno, se considera que la infección ya no se encuentra activa.

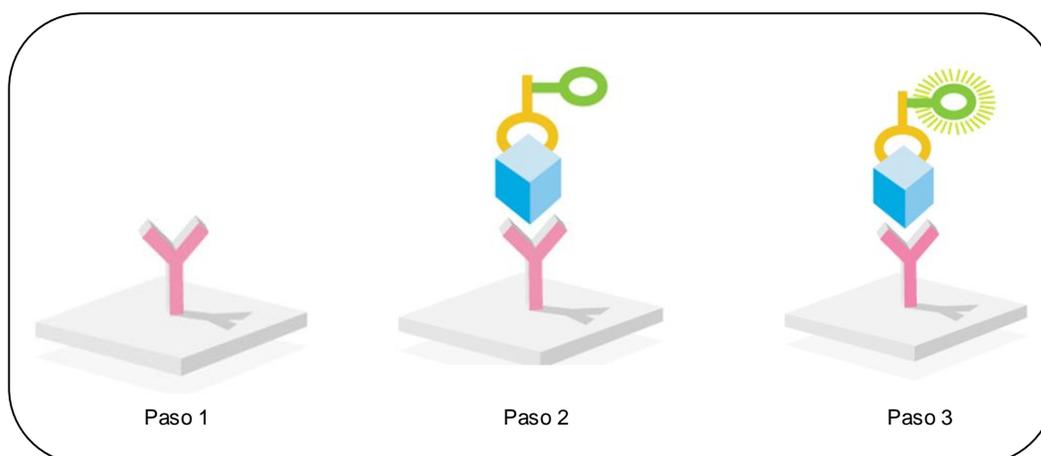


Figura 15

Paso 1. Los anticuerpos monoclonales anti-galactomanano (anti-GM mAb) son empleados para cubrir los pozos del microplato.

Paso 2. La muestra de suero tratada y el reactivo conjugado (anti GM mAb marcado con una enzima) son añadidos a los pozos. En presencia del antígeno GM en el suero del paciente, el anti-GM mAb se une al antígeno GM y el complejo anticuerpo-GM-anticuerpo marcado es formado.

Paso 3. La adición del sustrato permite revelar la presencia de cualquier complejo formado, mediante una reacción que genera color azul. www.bio-rad.com (42)

El GM puede ser utilizado como: (i) técnica diagnóstica adyuvante para confirmar aspergilosis invasiva (AI); (ii) herramienta diagnóstica prospectiva (de cribado) para detectar anticipadamente la aspergilosis durante el periodo de riesgo antes de que haga su aparición el primer signo o síntoma clínico de aspergilosis y, (iii) herramienta para monitorear la respuesta al tratamiento antifúngico.

La detección de GM en suero, LBA y en otros líquidos corporales (orina o líquido cefaloraquídeo³²) posee buena precisión diagnóstica en enfermos neutropénicos oncohematológicos adultos^{41, 43}. En un meta-análisis de varias publicaciones se obtuvo que la sensibilidad del método es del 71%, con una especificidad del 89% y un valor predictivo negativo del 92-98% y un valor predictivo positivo bajo, 25-62%⁴⁴. La prueba es muy sensible en adultos con cáncer hematológico o receptores de trasplante alogénico (neutropénicos), mientras que en receptores de trasplante de órgano sólido, pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, población pediátrica y pacientes con SIDA (no neutropénicos) hay poca experiencia y los estudios existentes no parecen demostrar que el GM sea una herramienta sensible^{41, 45}.

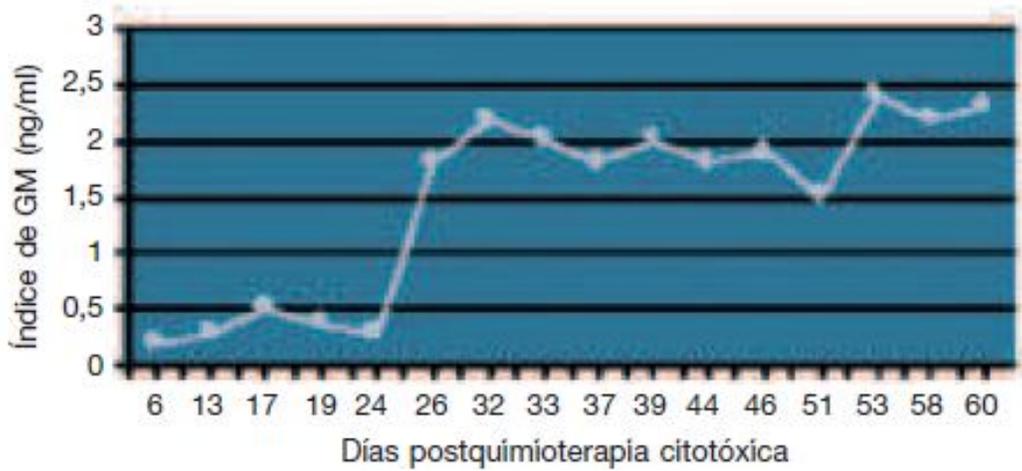


Figura 16. Cinética de la antigenemia de galactomanano en un paciente neutropénico que presentó mortalidad atribuible a AI y no respondió al tratamiento con amfotericina B. ^{del Palacio A (41)}

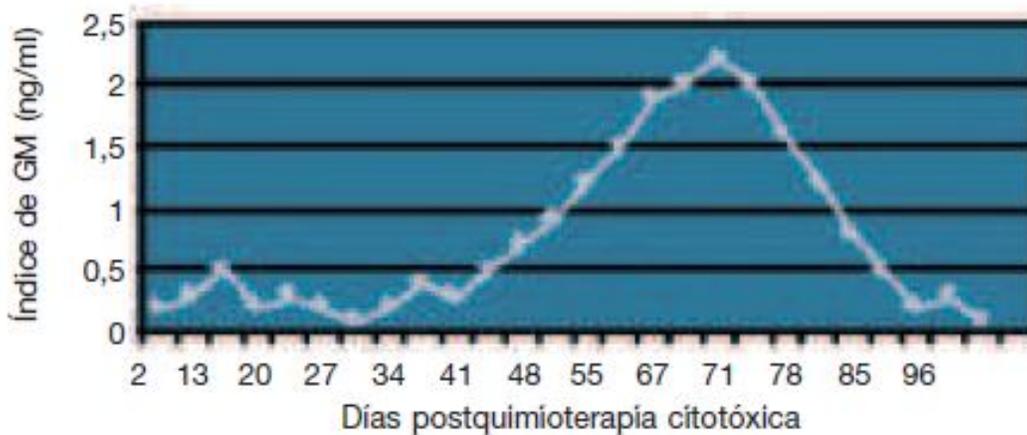


Figura 17. Cinética de la antigenemia de galactomanano en un paciente neutropénico con AI con respuesta satisfactoria clínico-radiológica tras el tratamiento con amfotericina B. ^{del Palacio A (41)}

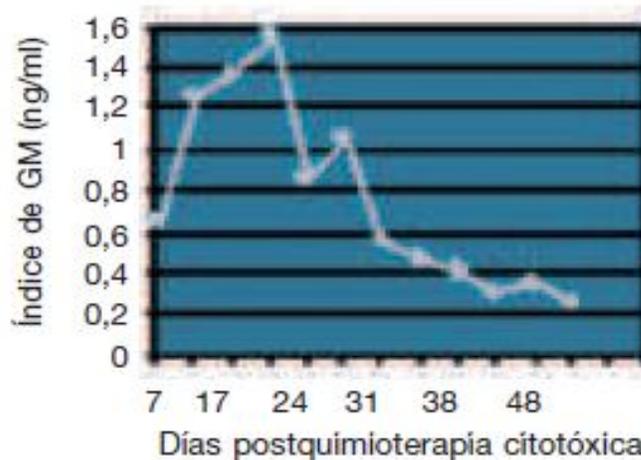


Figura 18. Cinética de la antigenemia de galactomanano en un paciente neutropénico con síndrome mielodisplásico y AI que mostró buena respuesta clínico-radiológica tras el tratamiento con voriconazol. ^{del Palacio A (41)}

Es conocido que los índices cuantitativos de GM se correlacionan con la respuesta al tratamiento (Figuras 16-18) y hay datos de que cuando hay reconstitución de la inmunidad y recuperación del número de neutrófilos puede haber deterioro transitorio clínico y, en esta situación, el GM permite anticipar y correlacionarlos con respuesta favorable⁴¹.

Existen ciertas limitaciones del GM en el diagnóstico de AI. Los resultados falsos positivos pueden aparecer como consecuencia del tratamiento antibiótico con piperaciclina-tazobactam y amoxicilina-clavulánico. El GM baja al parar el tratamiento antibiótico, pero en enfermos con insuficiencia renal y en pacientes sometidos a hemodiálisis puede continuar elevado durante varios días. Otra causa de falsa reactividad puede ser debida a la alimentación parenteral con Racol, que contiene proteínas de soya, así como a la colonización gastrointestinal, frecuente en niños pequeños con *Bifidobacterium* y a infección con *Cryptococcus neoformans*, que contiene epítomos con reacciones cruzadas con el GM de *Aspergillus*⁴¹.

Los falsos positivos también se reportan en aquellos pacientes infectados con los hongos dimórficos *Histoplasma capsulatum* o *Blastomyces dermatitidis*⁴⁶. Otra posible fuente de falsa reactividad es la ingesta de cereales y derivados ricos en galactofuranosa y de leches maternizadas. Los pacientes con alteración de la barrera intestinal, situación común en los enfermos neutropénicos con mucositis intensa debida a la quimioterapia, pueden presentar falsa reactividad⁴¹.

Otros hongos que dan lugar a invasión fúngica invasiva como *Penicillium*, *Alternaria* y *Paecilomyces* tienen reactividad con los anticuerpos monoclonales EB-A2 utilizados en la prueba comercial de Platelia *Aspergillus*. Es de destacar que estas especies se implican con poca frecuencia en la infección fúngica en el hombre⁴¹.

La positividad del GM antecede a los hallazgos clínicos y radiológicos, permitiendo establecer un tratamiento antifúngico adelantado. De cara al futuro son necesarios estudios sobre la relación entre el costo y efectividad cuando se monitoriza prospectivamente el GM⁴¹.

La mortalidad de los pacientes con AI es muy elevada, habiéndose observado que a partir del año 2002, la supervivencia es significativamente mayor. Entre los factores asociados a un menor riesgo de mortalidad se citan como muy relevantes el diagnóstico más temprano por la utilización conjunta de GM y tomografía computarizada (TC), así como el tratamiento con voriconazol⁴⁷.

(1,3)-β-D-Glucano

La utilización del marcador panantígeno (1,3)-β-D-Glucano (BG) permite, cuando se determina en sangre (suero), hacer un diagnóstico de infección fúngica invasiva (IFI). El BG es un polisacárido de la pared celular de los hongos excepto de *Cryptococcus neoformans*, los mucorales y los dematiáceos. La presencia de BG en suero y otros líquidos corporales indica la existencia de IFI. Los procariotas, virus y las células de los mamíferos están desprovistos de BG⁴¹.

La detección de BG es posible por la existencia de pruebas comerciales⁴¹. Todas las pruebas comerciales disponibles siguen el mismo fundamento, con ligeras variaciones en la técnica y algunos componentes⁸ (Tabla 10).

La prueba desarrollada más recientemente y aprobada por la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos), Fungitell⁸, mide los niveles de (1,3)-β-D-Glucano en suero mediante la modificación de la cascada de coagulación de *Limulus polyphemus* (cangrejo herradura norteamericano), a partir de un lisado de amebocitos de *Limulus*, un extracto de células sanguíneas que reaccionan con endotoxinas y lipopolisacáridos. En el reactivo de Fungitell (Figura 19), el Factor C, componente de la cascada de coagulación, es eliminado, evitando la formación del

Factor B Activado y provocando que únicamente el (1,3)- β -D-Glucano reaccione con el Factor G, un zimógeno serin proteasa. Lo anterior ocasiona que la vía tenga alta afinidad por el (1,3)- β -D-Glucano y no reaccione con otros polisacáridos, incluyendo β -glucanos con diferentes uniones glicosídicas^{8, 48}.

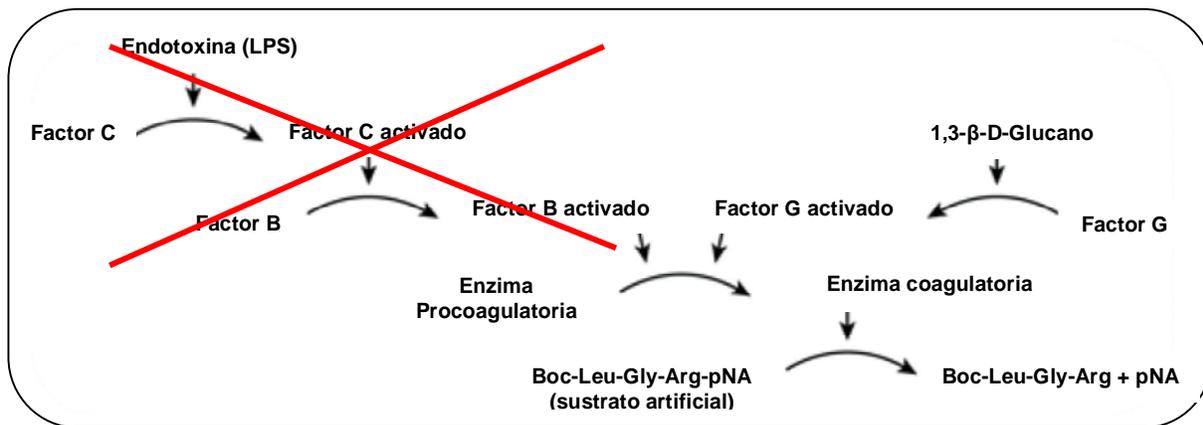


Figura 19. Fundamento de la prueba Fungitell. <http://www.accuisa.com/clinical/fungitell/index.html> (48)

El Factor G Activado convierte la enzima procoaguladora inactiva a su forma activa, la cual se une a un péptido de ácidos nucleicos (pNA, por sus siglas en inglés) presente en el sustrato peptídico cromogénico, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, creando un cromóforo que absorbe la luz a 405 nm. Los resultados de éste ensayo se obtienen en una hora aproximadamente⁴⁸.

El BG puede detectar la presencia de IFI causadas por *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Scedosporium*, *Pneumocystis jirovecii*, etc⁴¹.

Hay que resaltar que la molécula de BG es ubicua en el entorno, por lo que las contaminaciones de laboratorio son frecuentes. El BG es insoluble en agua y diversas bacterias, la mayoría de las plantas superiores y muchas plantas inferiores contienen BG⁴¹.

Hay que tener en cuenta que es necesario utilizar material (tubos, pipetas, jeringas, etc.) libres de BG (endotoxinas de bacterias y BG de hongos) que pueden dar lugar a falsos positivos. La manipulación sucesiva de tubos y material de laboratorio son fuente frecuente de contaminación, por lo que se recomienda mínima manipulación de las muestras para evitar contaminarlas⁴¹.

<i>Kit</i>	G-test ^a	Fungitec G test-MK	Test β -Glucano WAKO	Fungitell
Fabricante	Corporación Seikagaku	Corporación Seikagaku	Industria Química Wako Pure	Cape Cod Inc.
Lisado	<i>Tachypleus tridentatus</i>	<i>Tachypleus tridentatus</i>	<i>Limulus polyphemus</i>	<i>Limulus polyphemus</i>
Pre-tratamiento de la muestra	Ácido perclórico	Alcalino	Dilución-calentamiento	Alcalino
Método	Punto final cromogénico	Cinética cromogénica	Turbidimetría cinética	Cinética cromogénica
Glucano estándar	Paquiman (<i>Poria cocos</i>)	Paquiman (<i>Poria cocos</i>)	Curdlan (<i>Alcaligenes faecalis</i>)	Paquiman (<i>Poria cocos</i>)
Rango de detección	2-60 pg/mL	3.9-500 pg/mL	6-600 pg/mL	31.25-500 pg/mL
Año de lanzamiento	1995	1996	1996	2004

^a El test fue retirado del mercado y reemplazado por la formulación cinética (Fungitec G test-MK)

En la actualidad, la cinética de BG en el hombre es todavía poco conocida; no hay datos sobre su producción, paso al torrente circulatorio, metabolismo y vías de excreción. La presencia o ascenso de niveles de BG en sangre, a pesar del tratamiento antifúngico, parece indicar, según datos preliminares, la falta de respuesta al tratamiento en casos de AI. Así mismo, valores descendentes de BG también se correlacionan con una mejoría o curación clínica. Estos datos parecen indicar que el BG es un marcador útil para monitorear el tratamiento antifúngico, aunque es necesario ampliar la experiencia clínica disponible⁴¹.

Las limitaciones del BG en el diagnóstico de IFI se basan en la aparición de falsos positivos que pueden ocasionarse en enfermos sometidos a hemodiálisis con membranas de celulosa, tratados con inmunoglobulinas humanas intravenosas, polisacáridos antitumorales, enfermos quirúrgicos curados con gasas o esponjas que contengan glucano, inhalación de glucano fúngico del aire, así como en los tratamientos con albúmina, factores de coagulación y proteínas plasmáticas. La mucositis debida a quimio o radioterapia puede permitir el paso a la sangre de BG de origen alimentario, así como de *Candida* que colonizan el tracto gastrointestinal⁴¹. Así mismo, los enfermos con bacteremias y los tratados con amoxicilina-clavulánico pueden dar también falsos positivos⁴⁹. La presencia de hemólisis en los sueros ocasiona falsos positivos y los niveles altos de bilirrubina y triglicéridos dan lugar a falsos negativos con ciertas pruebas comerciales. Como ya se mencionó, hay que tener en cuenta que la manipulación sucesiva con tubos y material de laboratorio no libres de BG pueden dar lugar a contaminaciones y por consiguiente a una falsa positividad⁴¹.

Se ha reportado que en pacientes con leucemia mieloide aguda y síndrome mielodisplásico, la eficacia diagnóstica de BG al parecer no se vería influida (disminuida) por el tratamiento antifúngico profiláctico o empírico, aunque es una afirmación que no puede generalizarse a los enfermos con AI⁴¹.

La detección de BG es una herramienta diagnóstica de AI con una sensibilidad del 87,5%, especificidad 89,6%, valor predictivo positivo del 70%, valor predictivo negativo del 96,3% y con una tasa de falsos positivos del 10,3%. La positividad temporal es significativamente más temprana con BG que con GM en relación a la aparición de fiebre, signos clínicos, imágenes radiológicas con TC etc. Se dispone de pocos datos clínicos y micológicos prospectivos sobre si el BG discrimina entre colonización e infección fúngica⁴¹.

Puesto que el BG es un marcador panantígeno, cuando se estudien pacientes con riesgo de IFI en los que aparezcan determinaciones positivas de BG, es necesario realizar maniobras exploratorias (TC de alta resolución, ecografías, LBA, biopsias, etc.) para descartar o afirmar la existencia de IFI⁴¹.

Ambas pruebas diagnósticas, GM y BG, tienen limitaciones y discrepancias cuando se comparan entre sí, y por ello es útil emplearlas conjuntamente en el diagnóstico de AI. La utilización conjunta de ambos marcadores permite aumentar la especificidad y el valor predictivo de la prueba positiva al 100% y, por consiguiente, aumentar la rentabilidad diagnóstica⁴¹.

Intradermorreacción

Clínicamente, una vez que se sospecha el diagnóstico de aspergilosis alérgica, el primer paso es buscar hipersensibilidad a *Aspergillus*, la cual es definida por la presencia de reactividad cutánea inmediata al antígeno de *Aspergillus*. Lo anterior se realiza mediante una inyección intradérmica del alérgeno *Aspergillus*. La reacción en piel es clasificada como tipo I si una “roncha” o eritema 3 mm más grande que el control positivo (1.0 mg de fosfato de histamina/mL) se desarrolla 1 minuto después de la inyección, alcanzando un máximo después de 10-20 minutos y resolviéndose en 1-2 h. Una reacción de tipo III es leída después de 6h y cualquier cantidad de edema subcutáneo es considerado como un resultado

positivo. La reacción tipo IV es leída después de 72 h y una pápula >5 mm en el área de inyección es considerado positivo⁸.

La intradermorreacción (IDR) se lleva a cabo usando antígeno de *A. fumigatus*, ya sea comercial (por ejemplo, Aspergillin; Hollister-Stier Laboratories; Spokane, WA) o preparado localmente⁵⁰.

Determinación de IgG e IgE

El poder del sistema inmunológico como órgano para la defensa del huésped y como fuente de reactivos de laboratorio depende de la existencia de un enorme número de especificidades de unión diferentes que se encuentran en el repertorio de la respuesta inmunológica y que se expresan en distintas moléculas de anticuerpo. Se ha calculado que un individuo puede sintetizar 10^6 - 10^8 anticuerpos, cada uno con una especificidad de unión diferente. Estos anticuerpos llevan a cabo una serie de funciones efectoras dirigidas específicamente por la interacción de unión con el antígeno⁵¹.

La concentración de antígeno o anticuerpo en disolución se determina en un inmunoanálisis midiendo el grado de unión entre anticuerpo y antígeno. Las técnicas de inmunoanálisis más frecuentes en los laboratorios clínicos se pueden dividir en dos grupos. Dentro del primer grupo de técnicas relativamente insensibles se encuentran métodos basados en la dispersión de la luz y la precipitación en gel, en los que la señal generada (por ejemplo, formación de precipitado) es un cambio biofísico real que se produce por la unión del anticuerpo al antígeno. En el segundo grupo de técnicas se encuentran los radioinmunoensayos, los inmunoanálisis ligados a enzimas y los inmunoanálisis con fluorescencia que requieren una modificación del reactivo, antígeno o anticuerpo, con un radionúclido, una enzima o un fluorocromo, para poder detectar la unión de anticuerpo y antígeno. Independientemente del tipo de técnica, la conversión de la señal de unión, a medidas cuantitativas de concentración

requiere el uso de una curva estándar en la que se introduce un reactante en cantidades conocidas⁵¹.

Cuando los anticuerpos se difunden a través de un gel de agar o agarosa, de un pozo, se encuentran con antígenos que se difunden de un pozo adyacente y se unen con suficiente avidéz, el resultante complejo anticuerpo-antígeno precipitará y se visualizará como una línea en el gel entre los dos pozos. Este método de inmunodifusión pasiva (Método de Ouchterlony) fue una popular aproximación para detectar la respuesta de anticuerpos contra *Aspergillus* durante muchos años. Recientemente, se ha hecho énfasis en la estandarización del extracto de antígenos empleados y en la observación de que las respuestas de los antígenos provenientes de varias especies de *Aspergillus* eran comúnmente observadas cuando la etiología de la enfermedad era desconocida, a pesar de que las precipitinas contra *A. fumigatus* eran las más comunes. Se ha debatido acerca de la significancia del título contra o en adición al conteo del número de líneas provocadas por las precipitinas entre los dos pozos. Las moléculas de inmunoglobulinas que participa en una reacción de precipitación contra los antígenos de *Aspergillus* se ha asumido que, en la mayoría de los casos, representan moléculas de IgG, aunque la participación de moléculas de IgE contra los antígenos de *A. fumigatus* también se ha demostrado⁸.

Existen numerosas variaciones en la reacción de doble difusión (DD) o precipitación de Ouchterlony. Muchas involucran la mejora de la difusión pasiva mediante electroforesis. La electroforesis de oposición involucra la adición de antígeno y suero en pozos adyacentes en una plancha de agarosa, posteriormente se expone el gel a un campo eléctrico. Empleando un buffer con un pH que iguale el punto isoeléctrico de las inmunoglobulinas, 8.2, la mayoría de los antígenos migran hacia el ánodo mientras que los anticuerpos son transportados mediante endoosmosis hacia el cátodo. Se distinguen dos etapas en el proceso: (i) la muestra de proteínas, se somete a separación electroforética y, (ii) terminada la electroforesis, las proteínas son precipitadas con antisueros poli o

monoespecíficos, aplicados en el agar en un canal paralelo al eje de migración. Luego de un período de difusión en cámara húmeda (24 horas), se observan arcos de precipitación cuya forma y posición dependen de las características inmunoquímicas y de la concentración de cada proteína. Numerosos estudios indican que la electroforesis de oposición es más sensible, produce resultados equivalentes más rápido y genera mayor número de bandas de precipitinas que la reacción de DD en pacientes con alguna forma de aspergilosis (Figura 20)⁸.

La necesidad de métodos con mayor sensibilidad y de carácter cuantitativo conllevó al desarrollo de radioinmunoensayos en fase sólida (RIA) para la detección específica de anticuerpos IgG contra *Aspergillus*. Sin embargo, los métodos que emplean reactivos radiactivos son menos seguros y tienen desventajas técnicas⁸. Los principios de RIA fueron descritos por primera vez en 1960 para la medición de la insulina. En un RIA típico, el antígeno purificado se marca radiactivamente y, tras ser incubado con el anticuerpo, el antígeno marcado unido al anticuerpo se separa del antígeno no unido y se mide la radiactividad. Si se introduce antígeno no marcado al mismo tiempo que el antígeno marcado, el antígeno no marcado compite por el número limitado de zonas de unión de los anticuerpos, de modo que se unen menos antígenos marcados radiactivamente a los anticuerpos disponibles. Se construye una curva estándar mediante la introducción de concentraciones crecientes de antígeno no marcado a los tubos que contienen cantidades fijas de antígeno y de anticuerpo marcados. La mayoría de los RIA utilizan ¹²⁵I como isótopo radiactivo y contador de centelleo gamma para detectar la radiactividad emitida. Los RIA son útiles por su gran sensibilidad, pero tienen el inconveniente de una corta duración derivada de la utilización de radionúclidos⁵¹.

En 1975 el uso, por primera vez, de un ensayo basado en una reacción enzimática (ELISA), para la detección tanto de anticuerpos IgG como de IgE contra los antígenos de *A. fumigatus* fue descrito, representando un método sensible, cuantitativo y operacionalmente simple que continúa siendo ampliamente utilizado

hasta el día de hoy. Se demostró que los antígenos de *A. fumigatus*, polisacáridos y proteínas, pueden ser adsorbidos a la superficie de platos plásticos para microtítulos; el suero del paciente permite la unión a los antígenos y ser detectados por anticuerpos secundarios contra IgG e IgE humano, conjugado con una enzima fosfatasa alcalina, cuya presencia puede ser detectada mediante la adición de un sustrato apropiado. ELISA ha demostrado ser un método más sensible que la electroforesis de oposición⁸.

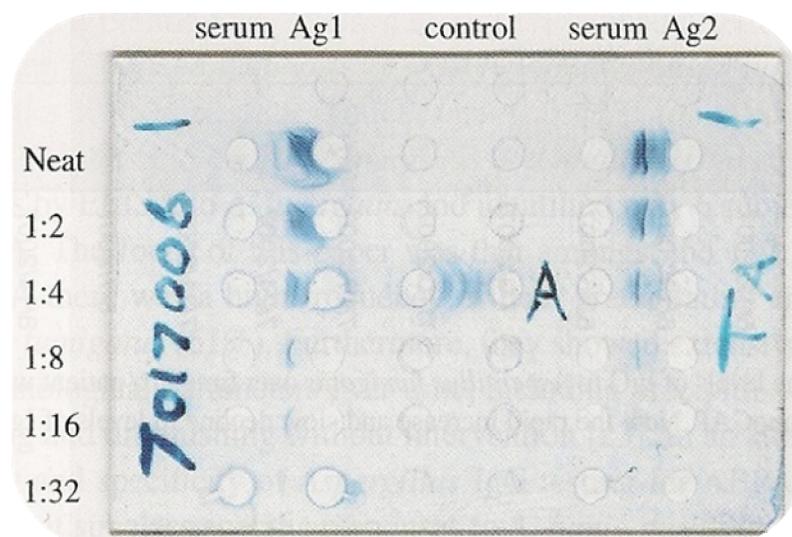


Figura 20. Gel de inmunolectroforesis de oposición; muestra la precipitación de anticuerpos del suero de un paciente contra dos diferentes antígenos de *Aspergillus fumigatus*. El suero del paciente con una pelota fúngica, presentó un título de 1:32 para el Ag1 y 1:16 para el Ag2. Pasqualotto AC (8)

El uso de la técnica *Western blot*, donde el perfil proteico de células de *Aspergillus* es separado mediante electroforesis, proteínas que posteriormente son adheridas a una membrana que es probada con suero de los pacientes con varias formas de aspergilosis, se emplea en orden de determinar qué antígenos son inmunodominantes. En un esfuerzo de estandarizar la medición de IgG contra *Aspergillus*, se ha puesto mucho interés en el sistema comercial de inmunoensayo automatizado, tal como InmunoCAP, el cual genera lecturas de concentración absoluta de anticuerpos a partir de determinaciones de densidad óptica. Las ventajas de los métodos estandarizados incluye la facilidad de monitorear los niveles de IgG de los pacientes a lo largo del tiempo⁸.

6.6 Pruebas moleculares

La aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) como método diagnóstico de la aspergilosis, no es un concepto nuevo. Los primeros manuscritos fueron publicados hace 15 años y nuevos artículos respecto al tema son presentados regularmente. A pesar de la abundante literatura al respecto, el método aún no se ha estandarizado, sin embargo, ya existen varios *kits* comerciales para el diagnóstico de *Aspergillus* mediante PCR⁸.

Con las personas inhalando cientos de conidios al día, el sitio de infección es usualmente el tracto respiratorio. Evaluar especímenes del tracto respiratorio puede prevenir la enfermedad invasiva. El tipo de aspergilosis (alérgica, saprofitica o invasiva) juega un rol crítico en la selección del espécimen⁸.

No se ha llegado a un consenso sobre qué muestra es la ideal para realizar el ensayo, sin embargo, se recomienda emplear dos especímenes diferentes en combinación, por ejemplo, LBA y muestra de sangre⁸.

Los beneficios de usar especímenes del tracto respiratorio se contrarrestan debido a la contaminación, colonización y la naturaleza invasiva de la obtención de la muestra. En pacientes con riesgo de hemorragia (por ejemplo, con trombocitopenia) es menos posible que especímenes de LBA sean rutinariamente obtenidos, lo que resulta particularmente problemático si se requieren análisis frecuentemente. Comparando, mediante PCR, un área en donde se sospecha infección, contra un área libre de infección, se ha demostrado que la carga fúngica en áreas de infección es más elevada que en áreas sin infección. El desarrollo de PCR cuantitativo puede ser útil para distinguir entre infección y contaminación⁸.

Los volúmenes de la muestra de sangre van de los 200 μ L a 10 mL. Como la carga fúngica en la circulación sanguínea de un paciente puede ser menos de un genoma por mL, se recomienda el uso de 3 a 5 mL, que corresponde al volumen

de sangre colectado por la mayoría de los tubos con EDTA que convencionalmente emplean los hospitales⁵².

Evaluar especímenes de suero mediante PCR, conlleva a la detección de DNA libre de *Aspergillus*, mientras que el uso de sangre sin fraccionar, contenida en tubos con EDTA permite la detección de conidios, fragmentos de hifa y/o DNA libre. El DNA es el ácido nucleico que se prefiere evaluar debido a su estabilidad sobre el RNA⁵².

Se ha encontrado que la sangre sin fraccionar es un mejor espécimen para la extracción de DNA fúngico que el plasma, debido a que este DNA se encuentra asociado a células presentes en la sangre (macrófagos que ingieren conidios, hifas atacadas por neutrófilos o fragmentos fúngicos libres que sufren el ataque de plaquetas). Aunado a lo anterior, se ha reconocido que el EDTA inhibe las DNAsas naturalmente presentes en la sangre, sin interferir con la PCR, lo que sí ocurre con el citrato, reactivo disponible en otros tubos en donde puede almacenarse la muestra de sangre. La heparina ha sido evitada debido a que provoca la inhibición de la *Taq* polimerasa⁵².

Especímenes de plasma y suero, en donde el DNA puede encontrarse libre en solución, permite protocolos más rápidos y menos complejos para la extracción del DNA, comparado con la sangre sin fraccionar, en donde la presencia de hifas y conidios hacen que los protocolos sean más largos y complejos ya que la pared fúngica es difícil de romper en orden de liberar el DNA. En la sangre sin fraccionar (se usa buffer hipotónico para mantener intactos a los glóbulos blancos y rojos), se enriquece el DNA fúngico decantando el DNA humano con el sobrenadante, lo que incrementa la sensibilidad. Métodos físicos (empleando perlas de vidrio) y enzimáticos (líticas) se emplean para la ruptura de la pared celular fúngica. La extracción de DNA toma de 3 a 6 h, dependiendo de la naturaleza de la muestra, plasma, suero o sangre sin fraccionar⁵².

La fracción de DNA que se evalúa para el ensayo comúnmente es la región de DNA ribosomal 28 S y 18 S⁵⁰, aunque el DNAr 28 S es más específico que el 18S, ya que este último se amplifica si existe DNA humano presente en la muestra⁵³.

El ensayo de PCR puede ser empleado como: (i) herramienta diagnóstica únicamente; (ii) para el diagnóstico temprano de AI, idealmente antes de manifestarse los síntomas y, (iii) como herramienta para monitorear la terapia antifúngica⁵⁴.

El riesgo de contaminación durante la manipulación de la muestra, propia del ensayo (obtención de la muestra, extracción de DNA), representa desventaja sobre la técnica⁵⁴.

A pesar de que la PCR ha sido evaluada y parece ser una prometedora modalidad de diagnóstico⁵⁴. Así, la falta de estandarización de la técnica ha impedido que la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento de Cáncer y Micosis, incluyera a la PCR en la reciente lista publicada respecto a los criterios de diagnóstico para AI^{52, 55}.

En Estados Unidos se reporta que los métodos de diagnóstico para micosis es 89% cultivo y análisis microscópico, 16% serología y menos del 5% emplean métodos moleculares³⁶.

Tabla 11

Comparación de métodos serológicos para el diagnóstico de aspergilosis

Determinación	Método de determinación	Sensibilidad	Especificidad	Ventajas	Desventajas
IDR	Reacción cutánea ante inyección intradérmica del alérgeno <i>Aspergillus</i>	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> • Discierne entre alergia (reacción tipo I) e infección (reacción tipo IV) 	<ul style="list-style-type: none"> • Incapacidad de discernir inmunológicamente entre los diferentes antígenos de superficie
	Precipitación del complejo antígeno-anticuerpo por DD	↓↑*	↓	<ul style="list-style-type: none"> • Posibilidad de discriminar entre diversos patrones de precipitación • Buen método de escrutinio 	<ul style="list-style-type: none"> • Interpretación subjetiva • Baja sensibilidad • Difícil de estandarizar • No es posible la automatización
	Inmunoelctroforesis (IEF)	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> • Posibilidad de discriminar entre diversos patrones de precipitación • Produce resultados equivalentes más rápido y genera mayor número de bandas de precipitinas que la reacción de doble difusión. 	<ul style="list-style-type: none"> • Es necesario emplear una muestra control especial • Equipo necesario: cámara electroforética y cámara húmeda
IgG/IgE	Radioinmunoensayo (RIA)	↑↑↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada sensibilidad, especificidad, precisión y exactitud del método • Empleo de cantidades relativamente modestas de antígenos purificados 	<ul style="list-style-type: none"> • Método costoso y peligroso • Empleo de isótopos radiactivos • La vida media del isótopo es muy corta, por ejemplo el ¹²⁵I tiene 57 días de vida media. • Requiere un equipo especial que es el contador gama para medir la radiación. • Este método requiere siempre la elaboración de una curva estándar para la lectura.
	Reacción enzimático-colorimétrica (ELISA)	↑↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> • Método estandarizado y que permite la automatización confiriéndole objetividad a la lectura. • Cuantitativo y de fácil análisis de resultados. • No requiere de una infraestructura compleja ni de personal altamente calificado 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevado costo • Los resultados se obtienen en 24 h
BG	Modificación de la cascada de coagulación de <i>Limulus polyphemus</i>	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> • La positividad temporal del BG es significativamente más temprana que con GM en relación a la aparición de fiebre, signos clínicos, imágenes radiológicas con CT. 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja especificidad • No se ha determinado si discrimina entre colonización e infección. • Elevada cantidad de factores que desarrollan falsos positivos
GM	ELISA doble sándwich	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> • Método rápido, barato estandarizado y reproducible entre laboratorios • Herramienta cuantitativa que permite monitorear la respuesta al tratamiento antifúngico • Detección posible en varios líquidos corporales • Excelente en pacientes neutropénicos adultos 	<ul style="list-style-type: none"> • Valor predictivo positivo bajo • Sin definir su utilidad en pacientes no neutropénicos
PCR	Replicación y detección de DNA	↑	↑↓**	<ul style="list-style-type: none"> • Discrimina entre infección y contaminación • Permite el diagnóstico temprano de AI, antes de la declaración de los síntomas. • Herramienta para monitorear la terapia antifúngica 	<ul style="list-style-type: none"> • Método no estandarizado • Elevado costo de reactivos y equipo especial necesario • Protocolos demasiado largos cuando la extracción de DNA es necesaria

* Depende de lo que se tenga en los pozos, anticuerpos o antígeno purificado.

** Depende de la zona de DNA que se analice y sus posibles similitudes con DNA de otros organismos que pueden actuar como contaminantes

6.7 Rayos X y tomografías

Rayos X

La radiografía de tórax en sus proyecciones habituales posteroanterior y lateral continúa siendo la técnica radiológica más usada en los pacientes con sospecha de infección respiratoria. Las ventajas de esta técnica son fundamentalmente las de ser una exploración fácilmente disponible y la de utilizar unas dosis de radiación baja. No obstante, también tiene inconvenientes. Por ejemplo, los pacientes con sospecha de IFI, con frecuencia, son pacientes postrados en los que la radiografía de tórax ha de hacerse en decúbito supino. Además, en muchos servicios de radiología, este tipo de exploraciones no están digitalizadas. En estas circunstancias, la sensibilidad de la exploración es muy baja (inferior al 50%)⁵⁶.

Otro de los inconvenientes de la radiografía de tórax es que, una vez detectada una anomalía, las posibilidades de caracterización que ofrece la semiología radiológica son muy escasas⁵⁶.

Todos estos motivos hacen que cuando se sospeche una infección fúngica invasiva del aparato respiratorio, las técnicas de elección sean la tomografía computarizada de alta resolución o, cuando sea disponible, la tomografía computarizada helicoidal⁵⁶.

Tomografía axial computarizada de alta resolución (TACAR)

La TACAR es una técnica que hoy en día puede considerarse rutinaria en el estudio de los pacientes con infección fúngica invasiva. Uno de las desventajas que podría argüirse en contra de su uso es la mayor irradiación que supone para el paciente. La dosis efectiva de radiación de la TACAR es aproximadamente cinco veces superior a la de la radiografía de tórax (0,2 y 0,9 mSv respectivamente). Este hecho no constituye una limitación para el uso de la

técnica porque siempre hay que ponerlo en contexto. Por ejemplo, muchos de los pacientes con infección fúngica invasiva son pacientes hematológicos que han recibido o van a recibir radioterapia durante los regímenes de acondicionamiento del trasplante en dosis superiores a 1.000 veces las utilizadas durante las exploraciones diagnósticas. Además, la quimioterapia *per se* tiene efectos citotóxicos muy superiores a la radiación usada en la TACAR⁵⁶.

La TACAR es una media de cinco días más precoz que la radiografía de tórax en el diagnóstico de infección. En pacientes con infiltrados en la TACAR, fue posible comprobar la infección respiratoria en los siguientes cinco a diez días en la mayor parte de los casos. El procedimiento tiene una sensibilidad del 87% y una especificidad del 88% como técnica de cribado en el diagnóstico precoz en el paciente inmunodeprimido⁵⁶.

Es importante resaltar que la TACAR permite un mejor uso de otras técnicas de diagnóstico como el LBA ya que permite al broncoscopista realizar un estudio más dirigido y, por lo tanto, aumentar la rentabilidad diagnóstica⁵⁶.

Resonancia magnética (RM)

La resonancia magnética es una de las técnicas que más se ha desarrollado en los últimos años. Aunque en estados avanzados, la sensibilidad de TC y de la RM son similares, la mayor disponibilidad y rapidez de la TC han favorecido en mayor uso de ésta. En la actualidad se están desarrollando nuevas técnicas de RM que permiten el estudio del parénquima pulmonar en un tiempo aceptable para el paciente y con sensibilidades parecidas a la TC⁵⁷.

La radiología es fundamental en el manejo clínico de los pacientes con sospecha de IFI. El papel del radiólogo no es el de establecer un diagnóstico microbiológico, que es la función del micólogo, sino el de detectar la infección y, en muchos casos, limitar las posibilidades del diagnóstico diferencial. El rendimiento que se

pueda obtener de las exploraciones radiológicas depende de la mayor o menor coordinación y colaboración entre los distintos servicios clínicos, radiológicos y microbiológicos⁵⁶.

Los principales hallazgos radiológicos de aspergilosis de vías respiratorias son:

Aspergilosis alérgica

Sinusitis aspergilar. Imágenes de los senos nasales muestran que múltiples senos están involucrados en la enfermedad, a menudo, con predominancia unilateral, mostrando también áreas serpiginosas de atenuación incrementada²⁸. Con TC se observan áreas de hiperatenuación²⁹ (Figura 21); masa de tejido blando expansiva, la cual remodela el hueso y lo erosiona, principalmente el de la lámina papirácea. En la mayoría de los casos se observan calcificaciones en su interior (Figura 22); cuando el origen de la enfermedad es fúngica tiene posición central (95%) y cuando se debe a otras causas es periférica (81%)³⁹.

Tabla12	
Hallazgos radiográficos de un paciente con rinosinusitis fúngica alérgica ³⁹	
Hallazgos en la TAC	Hallazgos en la resonancia magnética
<ul style="list-style-type: none"> • Un seno paranasal opacificado totalmente. • Expansión del seno afectado. • Atenuación-erosión de los márgenes óseos afectados • Señales de heterogeneidad dentro del seno dañado • Distribución asimétrica o unilateral de la enfermedad • Desplazamiento de los compartimientos anatómicos adyacentes 	<ul style="list-style-type: none"> • Daño mínimo de un seno paranasal • Expansión del seno afectado • Desplazamiento de los compartimientos anatómicos adyacentes: <p>T1:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Realzamiento periférico del seno dañado (indica el edema de la mucosa) • Intensidad variable de la señal del seno afectado. <p>T2:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Realzamiento periférico del seno afectado (indica el edema de la mucosa) • Señal de hipointensidad dentro del seno paranasal afectado con secuestro de la imagen central (alto contenido proteico y baja concentración de agua en la mucina)



Figura 21. TC coronal sin contraste de un paciente con sinusitis fúngica alérgica unilateral. Nótese las típicas áreas de “hiperatenuación” dentro de los senos nasales y cómo el tabique es empujado hacia la derecha. ^{Surayie HA (29)}

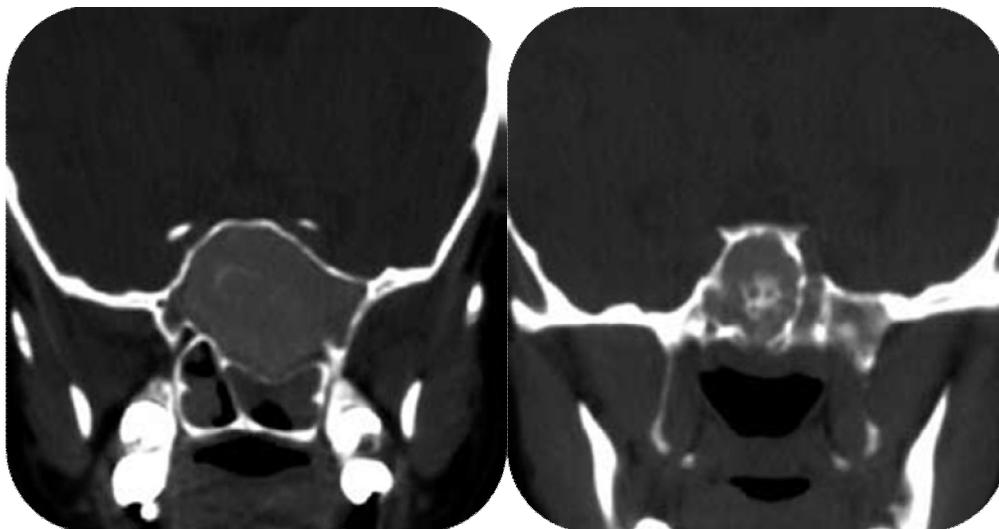


Figura 22. Tomografía coronal sin contraste. Izquierda, se aprecia la pseudomasa en el seno esfenoidal. Derecha, remodelación ósea con calcificaciones centrales. ^{Hope WW (39)}

Aspergilosis broncopulmonar alérgica

Los hallazgos radiográficos pueden ser normales durante la etapa temprana de la enfermedad. Durante su exacerbación, infiltrados pulmonares pasajeros son una singular característica de la enfermedad, tendiendo a encontrarse en el lóbulo superior y de localización central⁵⁸. Los hallazgos radiográficos de ABPA en pecho incluyen opacidades fijas o transitorias (Figura 23), las cuales comúnmente son descritas como “consolidación”, sombras paralelas (como vías de tren)⁸ o en forma de anillo, opacidades semejantes a una mano enguantada y sombras semejantes a pasta dental, son signos radiológicos que representan el engrosamiento, la inflamación de los bronquios²⁹ y la concentración de moco en las cavidades bronquiales. En un seguimiento de los pacientes, puede observarse fibrosis y colapso, afectando primordialmente los lóbulos superiores de los pulmones, lo cual puede conllevar a aspergilosis pulmonar cavitaria. A pesar de que no existen imágenes radiográficas específicas para definir una etapa en particular de la enfermedad, la bronquiectasis central, con el adelgazamiento periférico de los bronquios, es altamente sugestivo de ABPA. La prevalencia de la bronquiectasis central va del 69 al 78% en diferentes estudios. La TC ha reemplazado la broncografía como la modalidad de imagen de elección para el diagnóstico de la bronquiectasis. Los hallazgos de la TC incluyen bronquiectasis central, acumulación de moco, atenuación en mosaico, presencia de nódulos centrilobulares y opacidades que semejan un árbol en brote⁸. La acumulación de moco en ABPA puede ser de densidad normal o elevada. La acumulación de moco que resulta en elevada atenuación, se visualiza con mayor densidad que el músculo paraspinal^{59, 60}. Las manifestaciones radiológicas poco comunes incluyen opacidades peri-hiliares, que simulan linfaadenopatía ciliar, efusiones pleurales y masas pulmonares⁸.

Aspergiloma pulmonar

El hallazgo típico radiográfico de las “pelotas fúngicas” causadas por *Aspergillus* es una masa sólida, redonda, dentro de una lesión pulmonar cavitaria (Figura 24). La imagen radiológica casi siempre se observa localizada en el lóbulo superior, en un inicio como una opacidad con un halo claro alrededor en forma de media luna (signo de Monod, “air-crescent” o de aire creciente), zona curviforme y radiotransparente, como una media luna de aire, rodeada por material pulmonar viable³; cuando el aspergiloma está bien formado se ve una radioopacidad redonda bien limitada, que puede localizarse bilateralmente, pero casi siempre se encuentra en el lóbulo superior derecho¹.

Las pelotas fúngicas pueden ser divididas en simples y complejas. Las pelotas fúngicas simples ocurren en una cavidad sin inflamación del parénquima. Mientras que las complejas resultan en la formación de cavidades de pared gruesa con inflamación de la parénquima y presentan mayor morbilidad y mortalidad⁸.

La pelota a menudo se mueve cuando el paciente cambia de posición. Si la pelota fúngica ocupa la cavidad pulmonar por completo, el signo de Monod puede no observarse. El engrosamiento de la pleura adyacente puede estar acompañado o anteceder a la aparición de una pelota fúngica intracavitaria, a menudo mejor demostrado en tomografías que en imágenes radiográficas. Cualquier engrosamiento de la pleura puede ser el signo más temprano que evidencie el desarrollo de una pelota fúngica y se debe posiblemente a la difusión de material tóxico desde la cavidad o al resultado de una reacción antígeno-anticuerpo en la pleura⁸.



Figura 23. Radiografía de pecho mostrando opacidades pulmonares transitorias en el lóbulo derecho (izquierda) en un paciente con ABPA que desaparecieron espontáneamente (derecha).^{Agarwal R (25)}

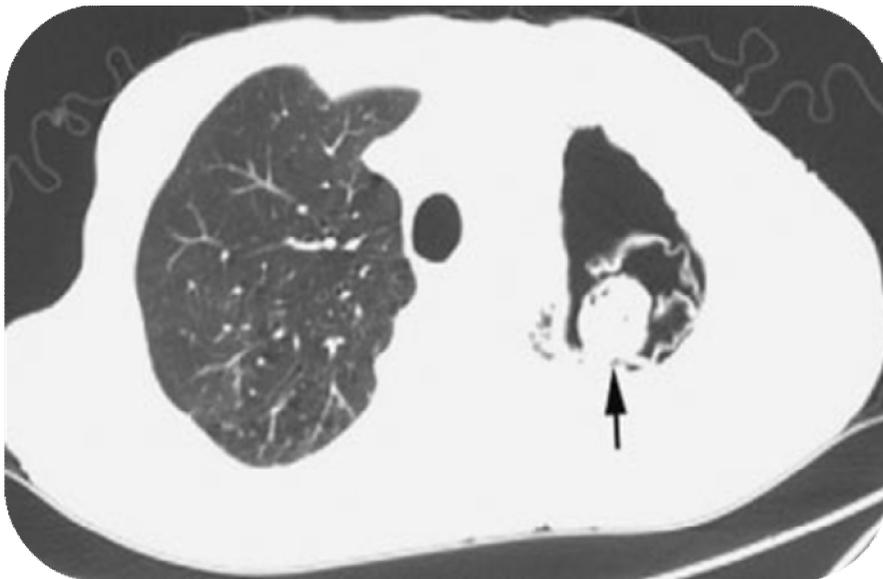


Figura 24. TC de pecho mostrando una pelota fúngica de *Aspergillus* en una cavidad pulmonar.^{Thompson III GR (3)}

Aspergilosis pulmonar invasiva

Imágenes radiográficas muestran infiltrados nodulares difusos, densidades con forma de cuña en la base pleural o lesiones cavitarias y efusiones pleurales. La enfermedad invasiva puede también revelar un “halo”, un área de baja atenuación alrededor del nódulo pulmonar, originado debido a la hemorragia que rodea al nódulo^{3, 58} (Figura 25). Estas áreas pueden ser después cavitadas y dar paso al signo de Monod⁶¹, dato no característico (Figura 26). A pesar de que los hallazgos radiográficos no son específicos para el diagnóstico y pueden ser vistos en una gran variedad de otras infecciones fúngicas y bacterianas, pueden ser de ayuda en la evaluación de pacientes de alto riesgo³.

Se espera que ocurra hemorragia pulmonar cuando nódulos cavitarios de gran tamaño o consolidaciones se localizan cerca de grandes vasos sanguíneos⁵⁸.

Las radiografías son importantes en detectar y monitorear la API. Un escaneo de pecho con TACAR es mucho más sensible que una radiografía completa del mismo, siendo la técnica de imagen preferida tanto para el diagnóstico temprano como para el monitoreo del curso de la enfermedad durante el tratamiento (Figura 27). Los nódulos, la consolidación, las cavidades, los broncogramas aéreos (visualización del aire dentro de los bronquios), las efusiones pleurales, las opacidades y pequeñas lesiones de las vías respiratorias han sido todas descritas como características radiográficas de API. En un estudio a gran escala de imágenes, radiográficas y TC de API, el hallazgo radiográfico más comúnmente encontrado corresponde a uno o más macronódulos (>1.0 cm de diámetro), encontrados en el 94% de los pacientes. Múltiples nódulos se encontraron en el 79% de los casos (Tabla 12). Los nódulos se encontraron equitativamente distribuidos en los lóbulos del pulmón. Veintisiete por ciento de los nódulos lindaban con la pleura y presentaban síntomas de infarto, lo cual no es sorprendente debido a la naturaleza angioinvasiva de API. La señal de un halo, un denso nódulo rodeado por un perímetro opaco (debido a edema o hemorragia)

que se extiende por al menos 75% de la circunferencia del nódulo, fue notado en el 61% de los casos. La presencia de nódulos en pacientes con API es tan común que los autores han sugerido que la ausencia de al menos un macronódulo debe levantar la sospecha de que otro agente etiológico causa el síndrome pulmonar. Sin embargo, debe ser notado que la mayoría de los pacientes incluidos en este estudio presentaban cáncer hematológico subyacente o habían sido sometidos a trasplante de células madre hematopoyéticas. Los macronódulos son observados con menor frecuencia en otras poblaciones de pacientes, tales como los pacientes bajo tratamiento esteroideo, con enfermedad pulmonar obstructiva crónica o aquellos trasplantados con órganos sólidos⁸.

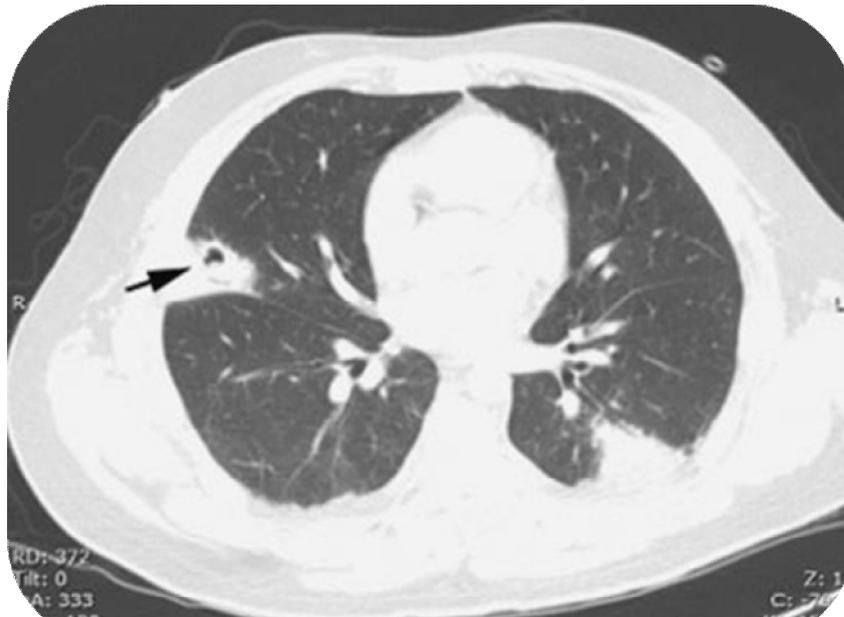


Figura 25. CT de pecho que muestra el signo de "halo" de baja atenuación, rodeando una lesión nodular pulmonar en API temprana. ^{Thompson III GR (3)}

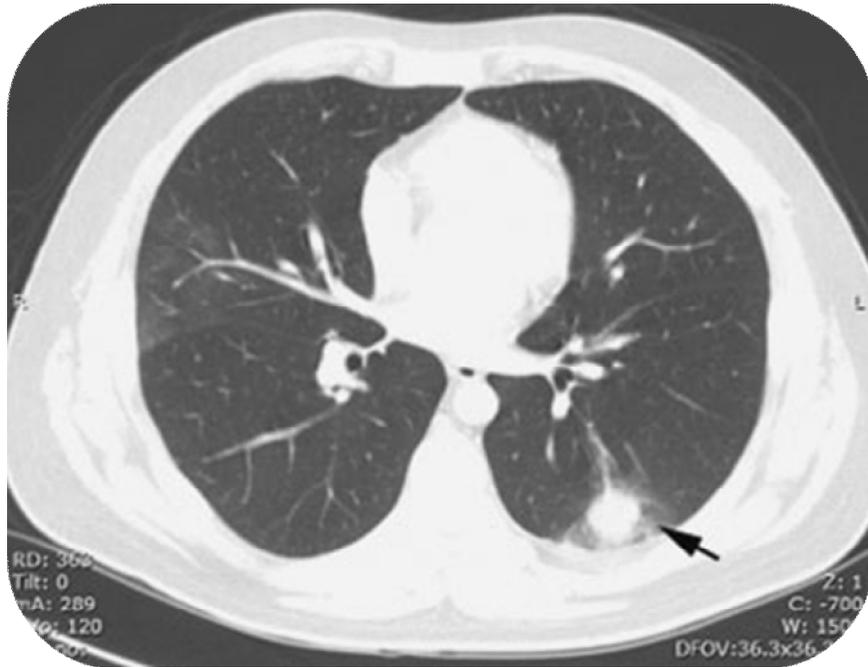


Figura 26. TC de pecho que muestra el signo de Monod en API. ^{Thompson III GR (3)}

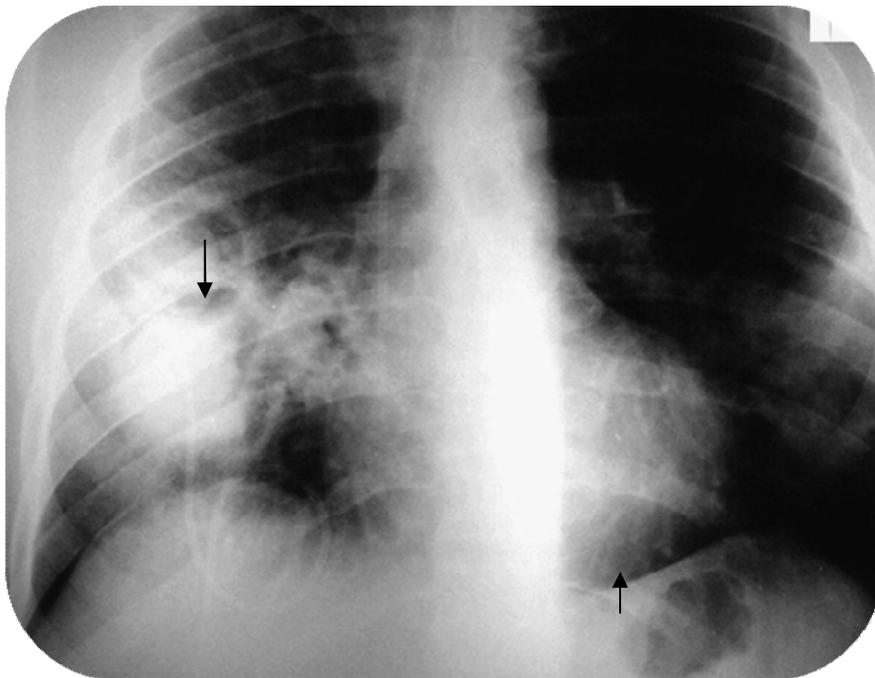


Figura 27. Radiografía de tórax de paciente inmunodeprimido con aspergilosis invasiva. ^{Valle JM (32)}

Hallazgo	Porcentaje de pacientes
Uno o más macronódulos (>1.0 cm de diámetro)	94
Dos o más macronódulos	79
Signo de halo	61
Consolidación	30
Macronódulos con signos de infarto	27
Lesiones cavitarias	20
Broncogramas aéreos	16
Grupos de pequeños nódulos (<1.0 cm de diámetro)	11
Efusión pleural	11
Signo de Monod	10
Opacidad no específica	9
Consolidación con signos de infarto	8
Pequeñas lesiones de las vías aéreas	7
Atelectasis	3
Lesiones hiliares y del mediastino	2
Efusión pericardial	1

La manifestación radiográfica de consolidación fue encontrada en 30% de los pacientes con API al momento del diagnóstico. Ocho por ciento de las consolidaciones mostraron apariencia de infarto. La cavitación se encontró sólo en el 20% de los pacientes y sólo 10% presentaron el signo de Monod. Otros hallazgos radiográficos se encontraron sólo en bajas proporciones en los pacientes⁸.

Las imágenes obtenidas varían con el tiempo. En un estudio en el cual escaneos con TACAR fueron llevados a cabo en pacientes neutropénicos, tratados por

cánceres hematológicos, el típico signo de “halo” fue encontrado en todos los pacientes al momento del comienzo de API. Tres días después el signo de halo fue notado en el 68% de los pacientes. Después de una semana el halo fue observado sólo en el 22% de los casos y después de dos semanas, sólo en el 19%. Por lo tanto, es claro que el signo de halo es un signo transitorio y aparece más comúnmente en el curso temprano de API, sobre todo en individuos neutropénicos. Mientras que la ocurrencia de lesiones inespecíficas aumenta, tales como la consolidación de espacios de aire, en un 31, 50 y 18% a 3, 7 y 14 días, respectivamente. Escaneos con TACAR llevados a cabo durante la segunda semana de API fueron menos útiles en proveer características particulares de API. El signo de Monod no estuvo presente al inicio, fue más probable observarlo en el curso tardío de API: 8, 28 y 63% a 3, 7 y 14 días después de declarar la enfermedad. Hallazgos radiográficos adicionales obtenidos durante la evolución temporal de la enfermedad, mostraron aumentos progresivos en el volumen de los infiltrados durante los primeros 7-14 días. Este incremento ocurrió incluso en la fase de terapia antifúngica, fue independiente del tiempo de tratamiento, por lo que no parece ser un marcador confiable en determinar la respuesta fallida al tratamiento⁸.

A pesar de que la mayoría de los estudios radiográficos de API han sido realizados en pacientes neutropénicos, hallazgos similares se han descrito en pacientes no neutropénicos trasplantados con células madre hematopoyéticas, en quienes el signo de halo fue notado en el 60% de los pacientes. Los infiltrados de API en pacientes no neutropénicos, excluyendo los trasplantados con células madre hematopoyéticas, son menos propensos a exhibir áreas de consolidación y el signo de halo no es observado⁸.

7. Tratamiento y profilaxis

A continuación se describen los principales antifúngicos y sus características más sobresalientes en el tratamiento de API. Posteriormente se abordará el tratamiento recomendado para el resto de las enfermedades de vías respiratorias causadas por *Aspergillus*.

Anfotericina B

Hasta hace poco la anfotericina B (AMB) deoxicolato era el antifúngico de elección contra la AI. La AMB es un fungicida poliénico que se une al ergosterol, el esteroide primario que se encuentra presente en las membranas celulares fúngicas. Esto causa la formación de canales iónicos, con la consiguiente muerte celular. La AMB ha demostrado actividad contra la mayoría de los *Aspergillus* aislados con excepción de *A. terreus*, el cual es resistente. Efectos secundarios significativos de la terapia con AMB deoxicolato, han sido bien descritos. Reacciones relacionadas con la infusión, incluyendo fiebre, escalofríos, rigor, mialgia, artralgia, broncoespasmos, náuseas y vómitos, han sido reportadas. La nefrotoxicidad de la AMB incluye azotemia, acidosis tubular renal, hipocalcemia e hipomagnesemia, con una incidencia de toxicidad renal aproximadamente del 30%³.

La morbilidad y mortalidad asociada con el uso de AMB ha hecho necesaria la búsqueda de mejores antifúngicos con actividad contra *Aspergillus*. Se han desarrollado formulaciones lipídicas de AMB, los nuevos azoles (voriconazol, posaconazol y ravuconazol), y las equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina)⁶².

Las formulaciones lipídicas de AMB, tales como la dispersión coloidal de AMB (DCAB), el complejo lipídico AMB (CLAB) y la formulación liposomal de vesícula pequeña unilamelar [anfotericina liposomal (L-AMB)], ha demostrado reducida neurotoxicidad en comparación con la AMB deoxicolato tradicional. En estas

formulaciones, la anfotericina debe ser liberada de los fosfolípidos sintéticos, necesitando dosis más elevadas de la formulación lipídica para lograr la eficacia antifúngica equivalente a AMB deoxicolato. Los efectos secundarios que se presentan con las formulaciones lipídicas de AMB son menos frecuentes que aquellas con AMB deoxicolato, sin embargo, molestias en el pecho, dificultad respiratoria e hipoxia, particularmente con la formulación DCAB, pueden presentarse; por lo que la formulación DCAB es rara vez empleada en la práctica clínica⁶².

Cuando se emplea en el tratamiento de AI, CLAB es administrada en dosis de 5 mg/kg/d. L-AMB ha sido empleada para terapia de mantenimiento contra aspergilosis invasiva a dosis de 3 a 5 mg/kg/d o 3 mg/kg/d cuando terapia antifúngica empírica es requerida en pacientes con neutropenia febril. Un estudio reciente de la terapia primaria para aspergilosis invasiva, compara una dosis inicial de L-AMB de 10 mg/kg/d por dos semanas, contra una dosis inicial de 3 mg/kg/d, cada una precedida de una dosis de 3 mg/kg/d. Los resultados mostraron eficacia similar y mayor toxicidad en el grupo de pacientes que recibió la dosis inicial más elevada de L-AMB, sugiriendo que, en esta población específica de pacientes con aspergilosis pulmonar temprana, dosis más elevadas no son benéficas⁶².

Triazoles

Los antifúngicos triazólicos inhiben la síntesis de ergosterol a través de la inhibición de la enzima fúngica, citocromo P450. Esto resulta en el fallo de la membrana celular fúngica, inhibición del crecimiento celular y finalmente, la muerte. Los efectos secundarios de los triazoles son predominantemente hepáticos, relacionados con la inhibición de la enzima P450 humana, y se debe tener especial cuidado cuando se le han prescrito al paciente otros fármacos que comparten la vía metabólica de la P450. La resistencia de *Aspergillus* a los triazoles ha sido reportada, sin embargo, ninguna de las especies posee

resistencia predecible a estos agentes y la validación clínica con la finalidad de determinar los puntos de inflexión, en este respecto, han sido establecidos³.

Itraconazol

El itraconazol se encuentra disponible en cápsulas, en solución oral y en formulación intravenosa (IV). La absorción de las cápsulas es variable y se afecta por la acidez gástrica. Comida o bebidas ácidas son recomendadas cuando se prescriben las cápsulas. Esta formulación no es recomendada en pacientes con infecciones severas que amenacen su vida, a pesar de la disponibilidad en suero del fármaco. Los efectos secundarios que se presentan con el itraconazol son, aumento de las transaminasas hepáticas, hipertrigliceridemia, hipocalcemia, náusea y vómito. Dosis orales de 400 mg/d (cápsulas) o de 2.5 mg/kg dos veces al día (solución) son recomendadas para la aspergilosis invasiva. Cuando las formulaciones intravenosas son preferidas, se emplean dosis de 200 mg dos veces al día por 2 días, seguida de 200 mg diarios por 12 días. La errática biodisponibilidad y potencial toxicidad del itraconazol limitan su uso en pacientes con enfermedades invasivas, mientras que la formulación IV posee limitada información que avale su uso. Para síndromes alérgicos y enfermedades no invasivas, el itraconazol es una alternativa útil³.

Voriconazol

El voriconazol se encuentra disponible tanto en formulación oral como IV. La formulación IV se presenta con vehículo de ciclodextrina que puede acumularse en pacientes con deficiencias renales. Los efectos de la acumulación de la ciclodextrina no son claros, pero se advierte precaución en el uso de la formulación IV en pacientes con insuficiencia renal. Otro efecto secundario del voriconazol incluye la disfunción hepática, erupciones cutáneas, desórdenes hematológicos, dolor de cabeza, náuseas, vómito y diarrea. La alteración de la visión es única para el voriconazol entre los triazoles, con pacientes que han

reportado fotopsia (parpadeo de luces) un efecto secundario pasajero y autolimitante⁶³.

Una dosis inicial, de 6 mg/kg vía IV, cada 12 horas (dos dosis), seguida de 4 mg/kg/d cada 12 horas, es recomendada para el tratamiento de la aspergilosis invasiva. La terapia oral consiste en 12 mg cada 12 horas, sin embargo, la terapia se puede optimizar mediante la administración de 4 mg/kg/d; la determinación de los niveles en suero ha sido recomendada en aquellos pacientes que reciben voriconazol por vía oral. Los pacientes pediátricos eliminan el voriconazol más rápidamente que los adultos, por lo que se recomienda una dosis de mantenimiento de 7 mg/kg³.

El voriconazol es el fármaco de elección para tratar pacientes con API, siendo significativamente más efectivo que la AMB, ya que presenta mejores respuestas clínicas³.

Posaconazol

Uno de los triazoles más nuevos, el pozaconazol, es similar en estructura al itraconazol. Es bien tolerado, sin embargo, niveles estacionarios no son obtenidos hasta los 7 días de administración, lo que potencialmente disminuye su eficacia. Los efectos secundarios más comúnmente reportados son diarrea, náusea y dispepsia, con posible elevación de la transaminasa hepática, similar a lo que sucede con otros antifúngicos azólicos. No es metabolizado por el hígado, por lo que la toxicidad hepática puede ser menor que aquella vista con otros azoles. Sin embargo, el pozaconazol es un inhibidor de la enzima citocromo P450 3A4 y presenta interacciones de significancia clínica con otros fármacos que comparten la misma vía metabólica, tal como la ciclosporina y el tacrolimus. La formulación IV no se encuentra clínicamente disponible. Se ha encontrado que la ingesta concomitante de alimento, aumenta los niveles séricos del pozaconazol hasta 4 veces. La suspensión oral debe administrarse a 200 mg, tres veces al día cuando

se emplea para la profilaxis, y a 800 mg en dos o cuatro dosis cuando es empleada como terapia de mantenimiento³.

El pozoconazol fue evaluado en dos estudios de profilaxis en pacientes de alto riesgo que se sometieron a trasplante de células madre hematopoyéticas con enfermedad injerto contra huésped y en pacientes con leucemia mielógena aguda o síndrome mielodisplástico^{64, 65}. En estos estudios el pozoconazol reduce el progreso de la aspergilosis, y en el estudio que involucró pacientes con leucemia mielógena aguda o síndrome mielodisplástico, mejoró la supervivencia, comparado con otros regímenes de profilaxis estándar⁶⁵.

Equinocandinas

Las equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina) son una nueva clase de agentes antifúngicos con un mecanismo de acción único. Estos fármacos inhiben la síntesis del (1,3)- β -glucano, polisacárido presente en la pared celular de muchos hongos filamentosos patógenos. Los efectos secundarios de las equinocandinas incluyen el aumento de las transaminasas hepáticas, dispepsia, dolor de cabeza y síntomas parecidos a los que se presentan con la histamina, si la infusión se administra rápidamente. A pesar de que las tres equinocandinas actualmente disponibles han demostrado actividad contra *Aspergillus*, la caspofungina es la única aprobada por la FDA, como tratamiento de segunda elección para la aspergilosis invasiva. La actual dosis recomendada es, una dosis inicial de 70 mg vía IV, seguida de 50 mg diarios durante la duración de la terapia. Con significativa disminución de la función hepática, una reducción de la dosis a 35 mg diarios, debe ser empleada. Las dosis óptimas para micafungina y anidulafungina aún no se han establecido. A pesar de que las equinocandinas han sido ampliamente utilizadas como terapia de rescate en aspergilosis invasiva, su característico mecanismo de acción lo coloca como potencial fármaco administrado en combinación con otros agentes antifúngicos. La combinación de voriconazol con caspofungina ha demostrado eficacia mejorada³.

Caspofungina

Se trata de un lipopéptido anfipático, inhibidor de la enzima (1,3)- β -D-glucano sintetasa de la pared celular fúngica. Se obtuvo como derivado semisintético de la Pneumocandina B, producto del proceso de fermentación del hongo *Glarea lozoyensis*, aislado del agua del río Manzanares, España⁶⁶.

La pared celular de los hongos superiores está constituida por manosa, N-acetilglucosamina, quitina y polímeros de glucosa, entre ellos, el glucano, microfibrilla lineal, que se encuentra en una proporción del 30-60% en la pared. Así, el mecanismo de acción de la caspofungina es la rotura de la pared celular como resultado de una lisis osmótica que conduce a la muerte de la célula⁶⁶.

Existen varios ensayos que valoran el efecto *in vitro* e *in vivo* de las asociaciones entre caspofungina y otros antifúngicos como la AMB y los triazoles, habiéndose encontrado efecto sinérgico o aditivo en el caso de *Aspergillus*⁶⁶.

La caspofungina sólo se puede administrar por vía iv. Luego de administrar una dosis de 70 mg se alcanzan de 1.3 a 12 μ g/mL. Posteriores dosis de 50 mg mantienen el fármaco a niveles plasmáticos ≥ 1 μ g/mL, por lo que en el adulto, esta es la dosis de mantenimiento indicada⁶⁶.

La penetración en el LCR con meninges normales, es muy escasa, aún no existen datos suficientes sobre la penetración en otros tejidos. La caspofungina se une a las proteínas plasmáticas en más de un 95%⁶⁶.

No es necesario modificar las dosis terapéuticas en el anciano, por insuficiencia renal o hepática moderada, pero sí en la severa. Si se administran fármacos inductores hepáticos, como la fenitoína, carbamazepina, rifampicina, dexametasona o antirretrovirales como el efavirenz y la nevirapina, es necesario incrementar la dosis de caspofungina de 50 a 70 mg. No interacciona con los

triazoles ni la AMB, mientras que se desaconseja administrar conjuntamente con la ciclosporina⁶⁶.

Se considera un fármaco bastante seguro, con efectos adversos encontrados en 1-12% de los pacientes, relacionados con la infusión iv, pero sin causar nefrotoxicidad ni hepatotoxicidad. Se puede producir fiebre, eritemas, náuseas, vómitos y febrilitis. Es un fármaco liberador de histamina. Por su efecto embriotóxico en el ratón, no se recomienda su uso en mujeres embarazadas⁶⁶.

Anidulafungina

Dentro de las equinocandinas, la anidulafungina es la última en ser introducida comercialmente, habiendo sido aprobada recientemente por la FDA para el tratamiento de candidosis, aunque se reconoce su aplicación potencial en el tratamiento de aspergilosis invasiva. Mientras que para especies de *Candida*, la anidulafungina es fungicida, para especies de *Aspergillus* es fungistática⁶⁶.

A pesar de que no se ha establecido la dosis ideal de anidulafungina para el tratamiento de aspergilosis invasiva, se sabe que, cuando se comparan entre sí las concentraciones mínimas inhibitorias de las equinocandinas, la anidulafungina distintivamente tiene unos valores más bajos que la caspofungina y la micafungina⁶⁶.

La anidulafungina es bien tolerada, estando disponible únicamente en formulación IV (hecho común a todas las equinocandinas), siendo su vida media de 26 h⁶⁶.

Son hechos distintivos que diferencian a la anidulafungina de las otras equinocandinas: (i) que no necesita ajuste de dosis en pacientes con insuficiencia hepática y/o renal; (ii) la anidulafungina es auto-biodegradable, más del 90% se degrada en la sangre sin que en este proceso participen los enzimas del citocromo P450, eliminándose los productos degradados, que carecen de actividad

antifúngica, en las heces, a través del árbol biliar (siendo menos del 10%, anidulafungina activa). Por estas características únicas, podría afirmarse que la anidulafungina, por ser auto-biodegradable, es un antifúngico biológicamente sostenible y, (iii) la anidulafungina no posee interacciones con el voriconazol, tacrolimus, ciclosporina, rifampicina (inductores y/o inhibidores del P450), ni con la AMB⁶⁶.

Tabla 14 Tratamientos antifúngicos contra aspergilosis ²⁴		
Antifúngico	Vía de administración	Interacciones Efectos secundarios
Anfotericina B Anfotericina B liposomal Anfotericina B, complejo lipídico Anfotericina B suspensión coloidal	IV	Nefrotoxicidad. Reacciones a la infusión (70-90%): náuseas, vómitos, fiebre, hipotensión, escalofríos, hipopotasemia. La anfotericina B liposomal es la que presenta menor frecuencia de toxicidad renal y reacciones adversas. El complejo lipídico presenta reacciones a la infusión poco frecuentes. La suspensión coloidal presenta menor nefrotoxicidad; reacciones a la infusión igual de frecuentes que con anfotericina B.
Itraconazol	Oral	CYP3A4: CyA, tacrolimus, indinavir, ritonavir, saquinavir Hepatotoxicidad Riesgo de interacción con antirretrovirales e inmunosupresores. Absorción oral errática.
Voriconazol	Oral/IV	Inhibe CYP3A4 Hepatotoxicidad
Posaconazol	Oral	Fármacos metabolizados por CYP3A4: rifampicina, fenitoína, carbamacepina, fenobarbital, efiravenz, cimetidina
Caspofungina	IV	Aumento de las transaminasas hepáticas, dispepsia, dolor de cabeza y síntomas parecidos a los que se presentan con la histamina

Tratamiento recomendado para aspergilosis de vías respiratorias

Sinusitis aspergilar

La mayoría de los casos son tratados con una combinación de cirugía y agentes antifúngicos, sin embargo, el tratamiento ideal no se ha dilucidado⁸.

El primer objetivo de la cirugía en sospecha de sinusitis aspergilar es asegurar el diagnóstico, ya que el diagnóstico diferencial es muy extenso. Mediante la endoscopía, mucosa nasal congestionada, pólipos, masa de tejido blando, áreas ulceradas, purulencia y restos fúngicos deben ser observados. La endoscopía quirúrgica permite un examen completo, de donde se puede obtener una biopsia. Cultivos del tejido y exudado deben ser realizados para facilitar el establecimiento de la terapia antifúngica. El recurso final para el diagnóstico es la histología⁸.

No se ha llegado a un consenso sobre cuándo es necesario llegar a la cirugía, pues existen casos en donde la terapia antifúngica demostró ser suficiente. Por ejemplo, el reporte de un caso con invasión de la órbita ocular, pérdida de la visión, telecanto y diplopía se trató únicamente con terapia antifúngica prolongada, anfotericina B e itraconazol. Después de varios meses, los síntomas oculares se resolvieron por completo. Incluso se especula aún entre las ventajas y desventajas de una resección parcial únicamente⁸.

Parece racional remover todo el tejido gravemente dañado si es posible, sin alterar tejido esencial y sin sacrificar estructuras importantes, como la periórbita o la duramadre, que pueden actuar como barreras contra la diseminación de la enfermedad. Abrir por completo los senos nasales y remover los pólipos, otras masas de tejido suave inflamado (granulomas) y restos fúngicos o mucina, permitirá el posterior seguimiento post-operatorio⁸.

La cirugía radical debe reservarse para los casos más agresivos. Dada la naturaleza crónica de este padecimiento, la disponibilidad de darle seguimiento clínico y radiológico y la disponibilidad de terapia antifúngica específica, hacen del tratamiento quirúrgico inicial, una técnica apropiada⁸.

Aspergilosis broncopulmonar alérgica

El tratamiento de ABPA tiene como objetivo tratar las exacerbaciones de la enfermedad y limitar la enfermedad pulmonar progresiva y la bronquiectasis. Los corticosteroides orales para combatir la hipersensibilidad han constituido el principal aspecto del tratamiento de ABPA. Los corticosteroides suprimen la respuesta inflamatoria provocada por *A. fumigatus* sin erradicar al microorganismo. El tratamiento con corticosteroides conlleva al alivio de los broncoespasmos, se observan mejoras en los hallazgos radiográficos respecto a los infiltrados, y la reducción en suero de IgE total y la eosinofilia periférica. Dos semanas de terapia diaria con prednisona oral (0.5 mg/kg/día), con la disminución gradual de la dosis, ha sido recomendada. La duración de la terapia debe ser individualizada de acuerdo a la condición clínica del paciente. Sin embargo, la mayoría de los pacientes requieren de terapia prolongada de corticosteroides a bajas dosis para controlar sus síntomas y disminuir la tasa de recaída. El IgE total en suero sirve como un marcador de la actividad de la enfermedad y debe ser evaluado de 6-8 semanas después del inicio de la terapia, después cada ocho semanas por un año, con la finalidad de determinar el comportamiento específico de la enfermedad en cada paciente⁵⁸.

Los corticosteroides inhalados pueden ayudar en el control de los síntomas de asma, sin embargo, los estudios realizados al respecto han fallado en demostrar su eficacia en la prevención de la progresión del daño pulmonar en pacientes con ABPA⁵⁸.

Varios estudios han sido realizados para evaluar la utilidad del itraconazol en el manejo de los pacientes con ABPA. Este antifúngico ha demostrado eficacia en el mejoramiento de los síntomas, facilitando el retiro gradual de los corticosteroides, disminuyendo el título de anticuerpos anti-*Aspergillus* y mejorando las anormalidades observadas por radiografía y la función pulmonar. Es importante mencionar que se sospecha que el itraconazol aumenta la actividad de los corticosteroides mediante la inhibición de su metabolismo, lo que puede conllevar a la estimulación anormal de la hormona adenocorticotrópica y la insuficiencia renal⁵⁸.

El uso de voriconazol contra ABPA ha sido poco estudiado, aunque ha reportado mejoras clínicas y serológicas⁵⁸.

Aspergiloma

No existe consenso en el tratamiento de aspergiloma. El tratamiento es considerado sólo cuando los pacientes se vuelven sintomáticos, usualmente con hemoptisis. Instilaciones inhaladas, intracavitarias y endobronquiales de agentes antifúngicos han sido evaluadas en pocos pacientes sin mostrar éxito consistente⁵⁸.

La administración de AMB percutáneamente, guiada por TC, puede ser efectivo, especialmente en pacientes con hemoptisis masiva, demostrando la resolución de la hemoptisis en pocos días. El rol de la AMB administrada intravenosamente es poco certero, y los pocos estudios que se han llevado a cabo al respecto han fallado en demostrar su beneficio⁵⁸.

El itraconazol es un agente útil en el manejo de aspergiloma, debido a que posee alta capacidad para penetrar el tejido. Un estudio demostró la presencia de niveles significativos de itraconazol dentro del aspergiloma, después de emplear la dosis estándar del antifúngico (100-200 mg/día). La principal limitación del itraconazol es

que trabaja lentamente y puede no ser útil en casos de hemoptisis que pongan en peligro la vida⁵⁸.

La resección quirúrgica de la cavidad y remoción de la pelota fúngica es usualmente indicada en pacientes con hemoptisis recurrente, si su función pulmonar es suficiente para permitir la cirugía. El tratamiento quirúrgico está asociado con tasas de mortalidad relativamente elevadas, que van desde el 7% hasta el 23%. Las causas más comunes de muerte post-operatoria son, severa enfermedad pulmonar subyacente, neumonía, infarto agudo al miocardio e API. Otras complicaciones postoperatorias incluyen hemorragia, espacio pleural residual, fístulas broncoalveolares, empiema y fallo respiratorio⁵⁸.

La embolia de las arterias bronquiales debe ser considerada como una medida temporal en pacientes con hemoptisis que amenaza la vida, ya que la hemoptisis usualmente ocurre debido al colapso masivo de vasos sanguíneos. El papel de nuevos antifúngicos azólicos, tal como el voriconazol en el tratamiento de aspergiloma aún no se ha determinado⁵⁸.

IV. DISCUSIÓN

La identificación fenotípica se basa en un examen cuidadoso de la morfología colonial, incluyendo la tasa de crecimiento, las características microscópicas de los conidios y las estructuras de soporte, en orden de ayudar a la diferenciación. El análisis de extrolitos puede proveer información útil, a pesar de que el análisis rutinario de estos se emplea con mayor frecuencia para aislados empleados en la industria de alimentos o aquellos que provocan el deterioro de alimentos que para aquellos que causan infección. La microscopía de luz usualmente es suficiente para identificar un aislado, aunque la microscopía electrónica puede ser necesaria para detectar diferencias sutiles, incluso entre especies de un mismo género, sólo es posible a nivel molecular.

Cabe destacar que la disponibilidad de microscopía electrónica es prácticamente nula en el sistema nacional de salud, utilizándose únicamente para fines de investigación y no clínicos, debido al elevado costo de los equipos, su mantenimiento y a la desventaja que representa el tratamiento que debe darse a las muestras sometidas a examen mediante este tipo de microscopía.

La confirmación de los hallazgos microscópicos mediante el cultivo es siempre deseable y, en la mayoría de los casos que involucra hongos oportunistas, esencial para la identificación definitiva del patógeno. Dado que *Aspergillus* es ubicuo en la naturaleza, comúnmente contamina muestras y medios de cultivo, por lo que determinar la significancia de *Aspergillus* creciendo en un cultivo es a menudo un reto, sobre todo cuando el examen microscópico del espécimen es negativo. A pesar de la presencia de hallazgos visuales, la identificación de *Aspergillus*, sólo microscópicamente, puede ser engañosa.

En conjunto, tanto cultivo como hallazgos microscópicos, mejorarán el valor diagnóstico de la histopatología.

El diagnóstico definitivo de la aspergilosis invasiva, por ejemplo, necesita la visualización de las características hifas ramificadas y septadas, bajo el examen microscópico del tejido. Las especies de *Aspergillus* crecen bien en medios estándar; sin embargo, los especímenes deben ser inoculados en medios fúngicos, que permitan el óptimo crecimiento.

La pobre candidatura de muchos pacientes con supuesta aspergilosis invasiva, para someterse a cirugía u otros procedimientos de diagnóstico, ha hecho que se adquiriera interés en procedimientos no invasivos para el diagnóstico. El ensayo de anticuerpos en suero es a menudo ineficiente para detectar infecciones invasivas, ya que la mayoría de los pacientes que padecen aspergilosis invasiva (pacientes con severa inmunodeficiencia) a menudo fallan en establecer una respuesta de anticuerpos adecuada ante la infección. El inmunoensayo enzimático de galactomanano ha demostrado confiabilidad en pacientes con cáncer hematológico. El GM es de gran valor en la búsqueda serial de paciente de alto riesgo, ya que en el hombre existe una fuerte concordancia (cualitativa y cuantitativa) entre el GM y la supervivencia, aunado a que sus valores se correlacionan con la carga fúngica, lo que resulta en un monitoreo efectivo del comportamiento de la terapia antifúngica.

Otro ensayo del suero disponible para el diagnóstico, es el marcador fúngico, (1,3)- β -D-glucano. Desafortunadamente la presencia del BG, no es específica para *Aspergillus*, pero es indicativo de infección invasiva fúngica debida a varios posibles patógenos.

La determinación de GM es de mayor significancia clínica y terapéutica que un ensayo de BG, el cual se limita a determinar la naturaleza del agente etiológico, la cual puede aseverarse mediante exámenes directos, cultivos o histopatologías. Como síntesis, puede afirmarse que el GM es un procedimiento no invasivo, barato, estandarizado, reproducible y los valores de GM se correlacionan con la

carga fúngica, siendo un procedimiento diagnóstico que puede calificarse de excelente en pacientes neutropénicos adultos.

La reacción en cadena de la polimerasa ha sido también evaluada y parece ser prometedora como potencial modalidad de diagnóstico, sin embargo, la PCR aún no se reconoce como un método de diagnóstico validado a nivel internacional, a pesar de que varias pruebas se encuentran comercialmente disponibles para el diagnóstico de *Aspergillus*.

En el paciente inmunocomprometido, los conidios y/o hifas, así como el DNA libre puede ser liberado al torrente sanguíneo, desarrollando o no síntomas clínicos de enfermedad. La falta de síntomas no necesariamente indica la ausencia de enfermedad.

La elevada incidencia de aspergilosis invasiva es probable que sea resultado del elevado número de pacientes con alto riesgo de contraer la infección y un incremento en su reconocimiento como resultado de mejores pruebas de diagnóstico no invasivo.

El retraso sustancial en el establecimiento de un diagnóstico temprano sigue siendo el mayor impedimento de un tratamiento exitoso de las aspergilosis, principalmente de tipo invasivo, la cual posee el más alto índice de mortalidad entre las enfermedades causadas por *Aspergillus*. A pesar de que pueda haber signos y síntomas sugestivos de enfermedad, el diagnóstico oportuno es desafiante debido a la falta de manifestaciones clínicas específicas de la alergia o infección. Incluso, diferenciar API de otras micosis pulmonares, es difícil. A pesar de los avances significativos asociados con la reciente introducción de criterios diagnósticos estandarizados, en combinación con parámetros clínico-radiológicos, microbiológicos y serológicos, más de un tercio de las infecciones por *Aspergillus* no son diagnosticadas ante-mortem.

V. CONCLUSIONES

Aspergillus contiene un número importante de patógenos, muchos de los cuales son regularmente encontrados como contaminantes de cultivos. Dado que las diferentes especies de *Aspergillus* difieren en su patogenicidad y responden a diferentes agentes antifúngicos, es importante establecer una identificación precisa para un aislado clínico tan pronto como sea posible. A pesar de los recientes avances en la identificación molecular de las especies de *Aspergillus*, la microscopía y el cultivo siguen siendo una herramienta esencial para la rápida identificación de especies. Los métodos moleculares serán invaluable cuando el microorganismo no pueda ser aislado en cultivo, cuando diferencias sutiles en una infección compleja, no se puedan distinguir con microscopía óptica o cuando las características fenotípicas sean inestables, lo que suele suceder en infecciones crónicas. Los métodos moleculares ayudan también a elucidar las relaciones entre secciones taxonómicas reconocidas hasta el momento. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los métodos moleculares se aplican a un cultivo en desarrollo, los cuales consumirán mayor tiempo que un examen microscópico de dicho cultivo. Así mismo, mientras que las ventajas de emplear pruebas basadas en ácidos nucleicos son obvias, su estandarización y utilidad clínica no ha sido exitosa, debido a los elevados costos que representa.

Los métodos convencionales, basados en examen directo, cultivo, histopatología (cuando se trate de infección), radiología y serología, continúan siendo la piedra angular en el establecimiento del diagnóstico de aspergilosis de vías respiratorias. Además, debido a que los cultivos permiten la especiación y pruebas de susceptibilidad a antifúngicos, puede proveer información útil en el manejo terapéutico, dependiendo del tipo de aspergilosis del que se trate.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Bonifaz A. Aspergilosis en: *Micología Médica Básica*. Editorial McGraw-Hill, 3ª edición, México DF, 2010.
2. López Martínez R, Méndez Tovar L. *Aspergilosis en: Micología Médica, Procedimientos para el Diagnóstico de Laboratorio*. Editorial Trillas, 2ª edición, México DF, 2006.
3. Thompson III GR, Patterson TF. Pulmonary Aspergillosis. *Semin Respir Crit Care* 2008; 29(2): 103-10.
4. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Clin Infect Dis* 2008; 46(3):327-360.
5. Tay Zavala J, Velasco Castrejón O. *Aspergilosis en: Introducción a la Micología Médica*, Méndez Editores, 2ª edición, México DF, 2004.
6. Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA, et al. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Med Mycol* 2005; 43(Suppl 1):S49-S58.
7. Kauffman CA. Fungal infections. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:35-40.
8. Pasqualotto AC. *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*. Editorial Springer, 1st edition, Brazil, 2010.
9. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 2010; 36:1–53.
10. Pontón J (Ed). *Importancia de la aspergilosis invasora y Diagnóstico en: Guía de bolsillo de la Aspergilosis invasora*. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2ª edición, 2009.
11. Crassard N, Hadden H, Piens MA, et al. Invasive aspergillosis in a paediatric haematology department: a 15-year review. *Mycoses* 2008; 51:109-116.

12. Arcos-Zamora M, Pérez-Salame L, Halabe-Cherem J. Aspergilosis invasora: infección oportunista en el paciente inmunocomprometido. *Med Int Mex* 2006; 22:469-474.
13. Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20:545-561.
14. Bulpa P, Dive A, Sibille Y. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2007; 30:782-800.
15. Samarakoon P, Soubani AO. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with COPD: a report of five cases and systematic review of the literature. *Chron Respir Dis* 2008; 5: 19-27.
16. Segal BH, Walsh TJ. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:707–717.
17. Cordonnier C, Ribaud P, Herbrecht R, et al. Prognostic factors for death due to invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year retrospective study of consecutive patients at French transplantation centers. *Clin Infect Dis* 2006; 42:955–963.
18. Post MJ, Lass-Floerl C, Gastl G, et al. Invasive fungal infections in allogeneic and autologous stem cell transplant recipients: a single-center study of 166 transplanted patients. *Transpl. Infect Dis* 2007; 9:189-195.
19. Vandewoude KH, Blot SI, Depuydt P, et al. Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. *Crit Care* 2006; 10:R31.
20. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R. A validated clinical approach for the management of aspergillosis in critically ill patients: ready, steady, go! *Crit Care* 2006; 10:132.
21. Khasawneh F, Mohamad T, Moughrabieh MK, Lai Z, Ager J, Soubani AO. Isolation of *Aspergillus* in critically ill patients: a potential marker of poor outcome. *J Crit Care* 2006; 21:322–7.
22. Taylor RT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(3):447-465.

23. Falvey DG, Streifel AJ. Ten-year air sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital. *J Hosp Infect* 2007; 67:35-41
24. Pereiro M, Gómez- Bernal S, Rodríguez-Pazos L, et al. Micosis más frecuentes en inmunodeprimidos. *Piel* 2010; 25(2):91-99.
25. Agarwal R. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *CHEST* 2010; 135(3):804-826.
26. Knutsen AP. Genetic and respiratory tract risk factors for aspergillosis: ABPA and asthma with fungal sensitization. *Med Mycol* 2006; 44(Suppl 1):61-70.
27. Antunes J, Fernandes A, Miguel Borrego L, et al. Cystic fibrosis, atopy, asthma and ABPA. *Allergol Immunopathol* 2010; 6 (2):1-7.
28. Dolen WK. Risk factors for allergic *Aspergillus* sinusitis. *Med Mycol* 2006; 44:273-275
29. Surayie H Al-Dousary. Allergic fungal sinusitis: Radiological and microbiological features of 59 cases. *Ann Saudi Med* 2008; 28(1):17-21.
30. Shah R, Vaideeswar P, Pandit SP. Pathology of pulmonary aspergillomas. *IJPM* 2008; 51(3):342-345.
31. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. *Med Mycol* 2005; 43(Suppl 1):S207-S238.
32. Valle JM, González-Barcala FJ, Álvarez-Dobaño JM, et al. La aspergilosis pulmonar invasiva en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Rev Med Chile* 2010; 138:612-620.
33. Gangneux JP, Camus C, Philippe B. Epidemiology of and risk factors for invasive aspergillosis in nonneutropenic patients. *Rev Mal Respir* 2008; 25:139-153.
34. Stergiopoulou T, Meletiadis J, Roilides E, et al. Host-dependent patterns of tissue injury in invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Clin Pathol* 2007; 127:349-355.

35. Khasawneh F, Mohamad T, Moughrabieh MK, et al. Isolation of *Aspergillus* in critically ill patients: a potential marker of poor outcome. *J Crit Care* 2006; 21: 322-327.
36. McClenny N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. *Med Mycol* 2005; 43: 125-128.
37. Murray PR, Pfaller MA, *Microbiología Médica*, Editorial Elsevier, 5a edición, España, 2006, 737 pp.
38. Maschmeyer G, Hass A, Cornely OA. Invasive aspergillosis: Epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. *Drugs* 2007; 67:1567-1601.
39. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:609-622.
40. Vides Lemus R, Moreira HE, Serpas FA, et al. Rinosinusitis fúngica alérgica e inmunocompetencia. Reporte de un caso. *An Orl Mex* 2007; 52(3):116-121.
41. del Palacio A, Alhambra A, Cuétara MS, et al. Estado actual del diagnóstico precoz de las infecciones invasoras causadas por *Aspergillus* y otros hongos filamentosos emergentes. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24:187-197.
42. www.bio-rad.com
43. Maertens JA, Theunissen K, Deeren D, et al. Defining a case of invasive aspergillosis by serum galactomannan. *Med Mycol* 2006; 44:S173-S178.
44. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006; 42:1417-1427.
45. Maertens J, Theunissen K, Lodewyck T, et al. Advances in the serological diagnosis of invasive aspergillosis infections in patients with haematological disorders. *Mycoses* 2007; 50: S1-S17.
46. Verweij PE, Mennink-Kersten MA. Issues with galactomannan testing. *Med Mycol* 2006; 44(Suppl 1):S179-S183.

47. Upton A, Kirby KA, Carpenter P, et al. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 2007; 44:531-540.
48. <http://www.acciusa.com/clinical/fungitell/index.html>
49. Mennink-Kersten M, Warris A, Verweij P. (1,3)-beta-D glucan in patients receiving intravenous amoxicillin-clavulanic acid. *N Engl J Med* 2006; 354:2834-2835.
50. Agarwal R, Aggarwal AN, Gupta D, et al. Prevalence of *Aspergillus* hypersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma: a systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13(8):936-944.
51. Middleton E, Reed CE, Ellis EF, et al. Métodos de laboratorio en inmunología en: *Alergia: Principios y Práctica*. Editorial Salvat, 3ª edición, México DF, 1992.
52. Klingspor L, Loeffler J, *Aspergillus* PCR formidable challenges and progress, *Med Mycol* 2009; 47:241-247.
53. White PL, Barton R, Guiver M, et al. A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis: a United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections. *J Mol Diagn* 2006; 8: 376-384.
54. Donnelly JP. Polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis: getting closer but still a ways to go. *CLin Infect Dis* 2006; 42:487-489.
55. Lewis White P, Barnes RA. *Aspergillus*. PCR-Platforms, strengths and weaknesses. *Med Mycol* 2006; 44:S191-S198.
56. Hidalgo A, Radiología de las infecciones fúngicas invasoras del aparato respiratorio, *Rev Iberoam Micol* 2007; 24:14-18.
57. Eibel R, Herzog P, Dietrich O, et al. Pulmonary abnormalities in immunocompromised patients: Comparative detection with parallel acquisition MR imaging and thin section helical CT. *Radiology* 2006; 241:880-891.

- 58.Zmeili OS, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *Q J Med* 2007; 100:317-334. paleta
- 59.Agarwal R, Aggarwal AN, Gupta D. High-attenuation mucus in allergic bronchopulmonary aspergillosis: another cause of diffuse high-attenuation pulmonary abnormality. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 186:904.
- 60.Morozov A, Applegate KE, Brown S, et al. High-attenuation mucus plugs on MDCT in a child with cystic fibrosis: potential cause and differential diagnosis. *Pediatr Radiol* 2007; 37:592-595.
- 61.Greene R. The radiological spectrum of pulmonary aspergilosis. *Med Mycol* 2005; 42 (Suppl 1):S147-154.
- 62.Cornely OA, Maertens J, Bresnik M, et al. Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBiLoad trial). *Clin Infect Dis* 2007; 44:1289-1297.
- 63.Eiden C, Peyriere H, Cociglio M, et al. Adverse effects of voriconazole: analysis of the Frech Pharmacovigilance Database. *Ann Pharmacother* 2007; 41:755-763.
- 64.Ullman AJ, Lipton JH, Vesole DH, et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N ENGK J Med* 2007; 356:335-347.
- 65.Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 2007; 356:348-359.
- 66.Méndez Tovar LJ, López Martínez R, Hernández Hernández F. Actualidades en Micología Médica, Contenido temáticos del VII Diplomado en Micología Médica "Dr. Amado González Mendoza". Editorial de la Facultad de Medicina, 4ª edición, México DF, 2008.
- 67.del Palacio A. Anidulafungina: nueva equinocandina para el tratamiento de micosis. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25:74-77