

Aspectos de la presentación clínica y diagnóstico de la Aspergilosis invasiva

MANLAB®
Diagnóstico Bioquímico y Genómico

 10 min.



Aspergillus spp es un género de hongos filamentosos de las cuales por lo menos 33 se asocian a patologías en el ser humano. La frecuencia y severidad del síndrome clínico causado por *Aspergillus* spp depende de factores ambientales, de la condición inmunológica del paciente y la respuesta a la terapéutica antifúngica instaurada. En este artículo el Dr. Cárdenas Delgado del Área de Inmunología de Laboratorios MANLAB nos presenta una breve revisión de la etiología, factores de riesgo, presentación clínica y herramientas para el diagnóstico de la Aspergilosis invasiva.



Cárdenas Delgado, Víctor Manuel
Área Inmunología
Laboratorio Manlab



E-mail: victor.cardenas@manlab.com.ar



Introducción

Aspergillus spp es un género de hongos filamentosos ubicuo en la naturaleza que comprende numerosas especies, de las cuales por lo menos 33 se asocian a patologías en el ser humano (Hope et al., 2005). Dentro del espectro de procesos infecciosos causados por miembros del género *Aspergillus* hay cuadros invasivos severos del parénquima pulmonar con diseminación a órganos vitales, síndromes semi-invasivos y reacciones de hipersensibilidad a esporas inhaladas en pacientes con condiciones subyacentes tales como el asma o la fibrosis quística (Kousha et al., 2011).

A pesar de la diversidad de especies descripta, *Aspergillus fumigatus* es el patógeno más frecuentemente aislado en el ser humano (Latge, 1999). La frecuencia y severidad del síndrome clínico causado por *Aspergillus* spp., esto es, la Aspergilosis, depende de factores ambientales, de la condición inmunológica del paciente y la respuesta a la terapéutica antifúngica

instaurada (Wald et al., 1997). En este artículo se pretende hacer una breve revisión de la etiología, factores de riesgo, presentación clínica y examinar herramientas para el diagnóstico de la Aspergilosis invasiva, condición asociada a significativa morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos (Barton, 2013).

Aspergilosis invasiva

La Aspergilosis invasiva (AI) es una micosis oportunista que afecta a pacientes con inmunodeficiencia severa. Entre los factores de riesgo más relevantes para su adquisición destacan la neutropenia y todo déficit sostenido cuali/cuantitativo o disfunción de la serie granulocítica, tal como el observado en poblaciones sometidas a regímenes de quimioterapia mieloablativa: pacientes con desórdenes hematológicos malignos o como parte del acondicionamiento para el transplante de médula ósea/ células progenitoras hematopoyéticas u órganos sólidos (Erjavec et al., 2009). En este contexto, la administración prolongada de corticosteroides o ciclosporina como

DIAGNOS MED S.R.L.

Conesa 859 (C1426AQR) CABA
Tel. 011 4552-2929 (Rot.) - Fax 011 4551-5296
info@diagnosmed.com - www.diagnosmed.com



EUROIMMUN



- Neurología
- Endocrinología
- Gastroenterología
- Reumatología

www.euroimmun.com

RSR

Diagnostics for Autoimmunity
www.rsrttd.com

- Acetylcholine Receptor Ab
- Steroid 21-Hydroxylase Ab
- Zinc Transporter 8 Ab
- Glutamic Acid Decarboxylase
- IA-2 Ab
- Aquaporin 4 Ab
- TSH Receptor Ab



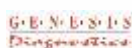
www.zentech.com

- Kits Screening Neonatal
- MSUD, Biotinidasa, G-6-PD, Fibrosis Quística

AnshLabs.

www.anshlabs.com

- Ultrasensitive AMH -Elisa-
- Inhibina B -Elisa-



www.elisa.co.uk



www.molecularmd.com



www.biovision.com



www.insitus.com



www.alpco.com



www.salimetrics.com



www.quidel.com



www.ebioscience.com



www.diasource-diagnostics.com



www.asuragen.com

medidas con el objetivo de prevenir el rechazo de los tejidos o la enfermedad injerto-contra-huésped mediante inmunosupresión predispone también a la AI (Lewis & Kontoyannis, 2009).

En estudios pioneros se determinó que dos líneas de defensa independientes de acción secuencial en el pulmón son importantes para erradicar el micelio de *Aspergillus fumigatus*: las células del sistema retículo endotelial previenen la germinación de las esporas inhaladas mientras que los leucocitos polimorfo nucleares protegen contra el desarrollo de las hifas (Schaffner *et al.*, 1982). Estas observaciones coinciden con los datos epidemiológicos que indican que la intensidad y duración de la neutropenia es el principal determinante de la frecuencia de la AI en pacientes inmunocomprometidos (Gerson *et al.*, 1984). Por otro lado, los déficits de la inmunidad adaptativa tales como la disminución moderada del recuento de linfocitos T CD4+ en pacientes HIV+ no parecen representar factores de riesgo significativos (Barton, 2013) a menos que ya esté establecido el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Mylonakis *et al.*, 1998).

La exposición a las diminutas esporas ambientales de *A. fumigatus* facilita su acceso a las vías aéreas. En este sentido, la estrategia de mantener a los pacientes en riesgo en salas con flujo de aire laminar/filtros HEPA ha demostrado ser efectiva para prevenir brotes de AI (Wald *et al.*, 1997), pese al elevado costo que implican dichas medidas preventivas. Por otro lado, si bien *A. fumigatus* es el agente etiológico más frecuente, también se han aislado de muestras clínicas las especies *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*. La tipificación a nivel de especie tiene interés no solo desde el punto de vista epidemiológico sino también terapéutico ya que las especies de *Aspergillus no-fumigatus* exhiben distinta sensibilidad a los agentes antifúngicos debido a mecanismos de resistencia intrínsecos. Tal es el caso de la resistencia a anfotericina B que presentan *A. terreus* y *A. nidulans* (Kontoyannis *et al.*, 2002).

El cuadro clínico de la AI no posee ningún signo patognomónico sino que, por el contrario, las manifestaciones respiratorias inespecíficas con las que se presenta son semejantes a la neumonía: tos productiva, hemoptisis y disnea con fiebre

persistente que no responde a los esquemas empíricos de terapia antibacteriana (Kousha *et al.*, 2011). El desarrollo de las hifas puede conducir a la invasión de vasos sanguíneos pulmonares con producción de infartos distales al sitio de oclusión causando intenso dolor pleurítico. Además, *Aspergillus* puede diseminarse al SNC por vía hematogénay producir fiebre, convulsiones, meningitis y abscesos cerebrales.

El diagnóstico de la AI es complejo: el procedimiento "Gold Standard" consiste en demostrar la invasión del parénquima pulmonar mediante un examen histopatológico y un cultivo positivo a partir de material derivado de la misma biopsia. Si bien *Aspergillus* puede crecer en la mayoría de medios microbiológicos de rutina, el cultivo demora 48-72 hs. y es poco sensible (Tarrand *et al.*, 2003) ya sea que se trate de muestras de sangre o material del tracto respiratorio. Por otro lado, la neutropenia característica de la población de riesgo suele asociarse a trombocitopenia, lo que hace que la biopsia esté generalmente contraindicada, teniéndose que optar por abordajes no invasivos como las técnicas de imagen y/o detección de marcadores séricos (Pfeifer *et al.*, 2006).

Entre los marcadores serológicos de suma utilidad la determinación del antígeno galactomanano (GM) por un inmunoensayo enzimático comercial de tipo sandwich (Platelia® *Aspergillus*, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). El GM es un constituyente inmunogénico de la pared celular de *Aspergillus* que se incorpora y libera a la circulación durante la fase logarítmica de crecimiento del microorganismo. Estructuralmente, el GM es un polisacárido que circula en forma libre o asociado a péptidos, glicoproteínas o anticuerpos cuya inmunogenicidad reside en las cadenas laterales de galactofuranósido unidas por enlaces β (1 \rightarrow 5) a un núcleo de manano (Hope *et al.*, 2005). Además, el curso de la antigenemia correlaciona con la invasión de vasos sanguíneos por las hifas de *A. fumigatus* (Hope *et al.*, 2007), precediendo la aparición de signos clínicos y manifestaciones de AI (Pfeifer *et al.*, 2006). En el ensayo comercial, la captura y revelado del GM en muestras de suero y lavado broncoalveolar se lleva a cabo mediante el anticuerpo monoclonal EBA-2 de clase IgM según el esquema de la Figura 1. Si bien se ha documentado una sensibilidad variable de

29-100%, la especificidad del ensayo es superior al 90% (Ascioglu *et al.*, 2002; Marr *et al.*, 2004). Dado que la diseminación al SNC a partir del pulmón es frecuente se suele determinar la antigenorraquia pese a no estar recomendado por el fabricante del kit ni existir consenso acerca del criterio de positividad a adoptar en esta clase de muestras (Barton, 2013).



Figura 1. Detección del antígeno GM en el inmunoensayo Platelia® *Aspergillus*. La muestra se calienta a 100 °C durante 3 minutos en presencia de 4 % de EDTA, luego de lo cual el sobrenadante se mezcla con el anticuerpo EBA-2 de detección acoplado a una enzima. Esta mezcla es incubada en pocillos recubiertos con el anticuerpo EBA-2 de captura. Luego las placas se incuban con un sustrato cromogénico, tetrametilbencidina/H2O2(TMB). De estar presente el antígeno, se desarrolla color, que es medido a una $\lambda=450/620$ nm usando un lector de microplacas (Wheat & Walsh, 2008).



Existen una serie de cuestiones relacionadas a la especificidad de la prueba de detección del GM que deben considerarse al interpretar los resultados del ensayo. En primer lugar, el anticuerpo monoclonal IgM EBA-2 reconoce al GM presente en los hongos de los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, e *Histoplasma*, ocasionando resultados falsos positivos (Swanink *et al.*, 1997). En segundo lugar, el tratamiento antibacteriano empírico de inmunosuprimidos con piperacilina/tazobactam y amoxicilina/clavulánico podría ser también fuente de falsos positivos: la piperacilina es un antibiótico β -lactámico semisintético derivado de un producto natural sintetizado por el hongo *Penicillium* (Adam *et al.*, 2004), y se piensa

**Los bioquímicos de todo el país
cuentan con nosotros**

Somos Socios Complementarios



Informes: (5411) 4508 2091 - www.manlab.com.ar  www.facebook.com/manlab

MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

que la contaminación con GM persiste en el producto final luego de completado el proceso de producción. En tercer lugar, la amplia distribución del antígeno GM en alimentos como cereales, vegetales y fórmulas lácteas para neonatos (Gangneux et al., 2002) es causa potencial de falsos positivos, particularmente en poblaciones de pacientes pediátricos con permeabilidad aumentada de la mucosa gastrointestinal por inmadurez en su constitución o tratamiento con quimioterápicos. Finalmente, se ha demostrado que antígenos de origen bacteriano derivados de *Bifidobacterium spp* tales como el lipoglicano pueden generar reacción cruzada con el anticuerpo IgM EBA-2. Este género no sólo es componente de la microflora intestinal del adulto sino también del neonato, y se usa como probiótico y/o aditivo en alimentos fermentados como el queso, la manteca, la leche, etc (Mennink-Kersten et al., 2005), pudiendo así translocar desde el intestino y ganar acceso a la circulación siempre que la permeabilidad de la mucosa lo permita. Esto explica la relativa falta de especificidad del ensayo en neonatos e infantes alimentados con fórmulas lácteas, población en la que se observa positividad en ausencia de signos compatibles con AI.

Conclusiones

La sección Serología de MANLAB asiste en el diagnóstico de AI a través de la determinación del antígeno GM en muestras de suero/lavado broncoalveolar/LCR por el método Platelia® *Aspergillus*. Si bien el ensayo presenta algunas limitaciones en relación a la especificidad, la detección del antígeno GM tiene indudable valor diagnóstico y pronóstico por cuanto el GM es un marcador precoz de AI probable según lo establecido en los criterios EORT/MSG (Puaw et al., 2008), además de ser usado con éxito para monitorear la eficacia de la terapia antifúngica en pacientes infectados.



Referencias

- Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B (2002) "Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus." *Clin Infect Dis.* 34:7-14. Adam O
- Aupérin A, Wilquin F, Bourhis JH, Gachot B, Chachaty E (2004) "Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive *Aspergillus galactomannan* antigen test results for patients with hematological malignancies." *Clin Infect Dis.* 38(6): 917-920.
- Barton RC (2011) "Laboratory Diagnosis of Invasive Aspergillosis: From Diagnosis to Prediction of Outcome" *Eur Respir Rev.* 20(121):156-174.
- Barton RC
- (2013) "Laboratory Diagnosis of Invasive Aspergillosis: From Diagnosis to Prediction of Outcome." *Scientifica.* 2013:459-405.
- Erjavec Z, Kluin-Nelemans H, Verweij PE (2009) "Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis," *Clinical Microbiology and Infection* 15(7):625-633.
- Gangneux JP
- Lavarde D, Bretagne S, Guiguen C, Gandemer V (2002) "Transient aspergillus antigenaemia: think of milk." *Lancet.* 359(9313):1251.
- Gerson SL
- Talbot GH, Hurwitz S, Strom BL, Lusk EJ, Cassileth PA (1984) "Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia." *Ann Intern Med.* 100(3): 345-351.
- Hope WW
- Walsh TJ, Denning DW (2005) "Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis." *Lancet Infect Dis.* 5(10): 609-622.
- Hope WW, Kruhlak MJ, Lyman CA et al., (2007) "Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an in vitro model of early invasive pulmonary aspergillosis: implications for antifungal therapy." *J Infect Dis.* 195(3): 455-466.
- Kontoyannis DP, Lewis RE, May GS, Oshero N, Rinaldi MG (2002) "*Aspergillus nidulans* is frequently resistant to amphotericin B." *Mycoses* 45:406-407.
- Kousha M
- Tadi R, Soubani AO (2011) "Pulmonary aspergillosis: a clinical review." *Eur Respir Rev.* 20(121):156-174.
- Latge JP (1999) "*Aspergillus fumigatus* and aspergillosis," *Clinical Microbiology Reviews* 12: 310-350.
- Lewis RE, Kontoyannis DP (2009) "Invasive aspergillosis in glucocorticoid-treated patients," *Medical Mycology* 47(1): 271-281.
- Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ (2004) "Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance." *J Infect Dis.* 190: 641-49.

Mennink-Kersten MA

- Ruegebrink D, Klont RR, Warris A, Gavini F, Op den Camp HJ, Verweij PE (2005) "Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity." *J Clin Microbiol.* 43(8): 3925-3931.
- Mylonakis E
- Barlam TF, Flanigan T, Rich JD (1998) "Pulmonary aspergillosis and invasive disease in AIDS: review of 342 cases." *Chest.* 114(1):251-262.
- Pfeiffer CD
- Fine JP, Safdar N (2006) "Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis." *Clin Infect Dis.* 42(10): 1417-1427.
- Schaffner A
- Douglas H, Braude A (1982) "Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes." *J Clin Invest.* 69(3): 617-631.
- Swanink CMA, Meis JFGM, Rijs AJMM, Donnelly JP, Verweij P (1997) "Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus galactomannan*," *Journal of Clinical Microbiology* 35 (1): 257-260.
- Tarrand JJ, Lichterfeld M, Warraich I, et al. (2003) "Diagnosis of invasive septate mold infections." *Am J Clin Pathol.* 119:854-58.
- Wald A
- Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA (1997) "Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation." *J Infect Dis.* 175(6):1459-1466.
- Wheat LJ
- Walsh TJ (2008) "Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 27(4):245-251.
- Puaw BD, Walsh TJ, J. Donnelly P (2008) "Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group," *Clinical Infectious Diseases* 46: 1813-1821.