

La identificación del antígeno circulante de galactomanano de *Aspergillus* como factor pronóstico en pacientes con enfermedades hematológicas

Liliana Árias-Puente, Eduardo Garza-de-la-Peña, Gabriela Velásquez-Ramírez, Carlos Martínez-Barreda, Guillermo José Ruiz-Argüelles

RESUMEN

Antecedentes: la aspergilosis invasiva es una infección fúngica necrosante que se presenta en pacientes inmunodeprimidos. Ocasiona trombosis, necrosis isquémica y lesiones cavitarias. Su incidencia oscila entre 5 y 20% en grupos de alto riesgo. Histológicamente se presentan hifas anchas, con aspecto radiado e infiltración de neutrófilos. El diagnóstico de la aspergilosis invasiva debe basarse en la sospecha clínica inicial y debe confirmarse mediante la observación directa de la muestra clínica, cultivos y detección del antígeno galactomanano en suero.

Material y métodos: se seleccionaron pacientes sometidos a trasplante de medula ósea en el Centro de Hematología y Medicina Interna de la ciudad de Puebla entre julio de 2007 y agosto de 2009, en forma retrospectiva, mediante revisión de expedientes clínicos. Se incluyeron un total de 27 pacientes que cursaban con neoplasias hematológicas, neutropenia y fiebre; sus sueros fueron analizados por la técnica inmunoenzimática del paquete comercial Platelia® *Aspergillus* (Bio-Rad®, Francia).

Resultados: se observó la presencia del antígeno galactomanano en el 14.8% (n=4) del grupo de pacientes estudiados, de los cuales el 75% (n=3) fallecieron a causa de aspergilosis invasiva.

Conclusión: la identificación del antígeno galactomanano en el suero de pacientes inmunocomprometidos representa un factor de mal pronóstico.

Palabras clave: aspergilosis invasiva, galactomanano, neutropenia, trasplante de células hematopoyéticas, inmunosupresión, infecciones oportunistas.

ABSTRACT

Background: Invasive aspergillosis is a fungal necrotizing infection that occurs in immunocompromised patients. It causes vascular thrombosis, ischemic necrosis and cavitary lesions. The incidence ranges from 5-20% in high risk groups. Histologically, broad hyphae displayed in a radially fashion and neutrophils infiltration are founded. The diagnosis of invasive aspergillosis should be based on clinical suspicion and confirmation through direct observation of the clinical sample, cultures and by detection of the galactomannan antigen in serum.

Material and methods: Patients undergone bone marrow transplantation at Centro de Hematología y Medicina Interna of Puebla city between July 2007 and August 2009 were selected retrospectively by patient personal file consultation. A total of 27 patients were included, all of them presented hematologic neoplasms, neutropenia and fever. Serum samples from these patients were analyzed by the enzymatic immunoassay commercial kit Platelia® *Aspergillus* (Bio-Rad®, France).

Results: The presence of galactomannan antigen was detected in 14.8% (n=4) from the patient study group, of which 75% (n=3) died from invasive aspergillosis.

Conclusions: Serum galactomannan antigen identification in immunocompromised patients represents a bad prognostic factor.

Key words: Invasive aspergillosis, galactomannan, neutropenia, stem cell transplantation, immunosuppression, infections, opportunistic.

* Laboratorios Clínicos de Puebla. Clínica Ruiz, Puebla, Pue., México,

** Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla, Clínica Ruiz, Puebla, Pue., México.

Correspondencia: QC. Liliana Árias-Puente. Laboratorios Clínicos de Puebla. Blvd. Díaz Ordaz No. 808, 72530 Anzures, Puebla, Pue., México. Correo electrónico: bony117@hotmail.com

Recibido: junio, 2010. Aceptado: septiembre, 2010

Este artículo debe citarse como: Árias-Puente L, Garza-de-la-Peña E, Velásquez-Ramírez G, Martínez-Barreda C, Ruiz-Argüelles GJ. La identificación del antígeno circulante de galactomanano de *Aspergillus* como factor pronóstico en pacientes con enfermedades hematológicas. Rev Hematol Mex 2010;11(4):169-172.

La aspergilosis invasiva es una de las complicaciones infecciosas más severas en pacientes con neutropenia prolongada así como en aquellos que son receptores de trasplante. Su incidencia oscila entre 5 y 20% en los grupos de alto riesgo, siendo estos los inmunodeprimidos. Las vías de entrada de las especies del género *Aspergillus* son el tracto respiratorio, las lesiones cutáneas, las heridas quirúrgicas, la córnea y el oído. Por lo general, la infección puede ocurrir en el sitio de entrada (fosas nasales, mucosa ocular, mucosa oral, tracto auditivo, etcétera) y localizarse o diseminarse ya sea por contigüidad o bien por invasión vascular produciendo enfermedad generalizada con afección de más de un órgano.¹⁻⁶

Las manifestaciones clínicas son diferentes según la enfermedad de base del paciente. *Aspergillus sp.* puede causar diferentes tipos de enfermedad: aspergilosis cutánea primaria, que es una forma de enfermedad localizada pero con la posibilidad de diseminación; aspergilosis pulmonar, que es la forma de presentación más frecuente en los pacientes neutropénicos (80-90%), sobre todo en la forma aguda invasiva; sinusitis por *Aspergillus*, también más frecuente en el paciente neutropénico (5-10%). Finalmente, desde los pulmones el hongo puede diseminarse a casi cualquier órgano del cuerpo, especialmente al cerebro, al hígado, al bazo y al tracto gastrointestinal produciendo una enfermedad diseminada mediante angioinvasión.⁸⁻¹²

La infección invasiva por *Aspergillus sp.* presenta una elevada mortalidad dependiendo de su localización que puede oscilar entre 37% en las formas traqueobronquiales hasta 80% o más en las formas diseminadas con afección del sistema nervioso central (SNC), a pesar de la utilización de antimicóticos de amplio espectro como la anfotericina B. *A. fumigatus* es la especie que con más frecuencia causa enfermedad invasiva en pacientes inmunodeprimidos. Otras especies implicadas son: *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. versicolor*, *A. glaucus*, etcétera.⁴⁻⁹

El diagnóstico serológico de la aspergilosis invasiva se basa en la detección de antígenos circulantes de *Aspergillus sp.* en diferentes muestras clínicas (suero, orina, lavado bronquio-alveolar, etcétera). Actualmente existen más de 100 componentes potencialmente antigénicos de *A. fumigatus* que pueden unirse a las inmunoglobulinas humanas. De estos el galactomanano, que representa el componente principal de la pared celular fúngica, es el único polisacárido caracterizado hasta la fecha y el primer

antígeno detectado en pacientes con aspergilosis invasiva. Actualmente, en diferentes líquidos orgánicos, únicamente el antígeno b 1-3 glucano del galactomanano ha logrado ser identificado consistentemente. Algunos otros antígenos diferentes (29, 18 y 11 kDa) han mostrado ser identificables en menor frecuencia.^{3,6}

La detección del antígeno galactomanano mediante inmunoensayo enzimático es positiva en las primeras fases de la infección, pudiéndose detectar de 2 a 3 semanas antes que la aglutinación de látex y casi siempre antes de la aparición de signos o síntomas de infección fúngica, lo que la convierte en una herramienta útil para la instauración de un terapia precoz. Otra de las ventajas de esta técnica radica en la posibilidad de monitorización de los niveles de antigenemia durante el tratamiento, asociándose un descenso de los mismos a la eficacia del tratamiento.^{12,13}

Para intentar disminuir la elevada mortalidad relacionada con la infección fúngica invasiva, es imprescindible realizar un diagnóstico precoz y administrar de inmediato un tratamiento antifúngico agresivo. Lamentablemente las pruebas diagnósticas tradicionales tales como el cultivo y el estudio histopatológico son tardadas y requieren de profesionales experimentados para obtener resultados confiables.^{7,8,14,15}

Conforme a lo mencionado anteriormente, el propósito de nuestro trabajo de investigación consistió en evaluar la identificación sérica del antígeno galactomanano en pacientes inmunodeprimidos, después de haber sido sometidos a trasplante, con el propósito de establecer dicho hallazgo como factor pronóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se consultó la cantidad total de resultados de la determinación del antígeno galactomanano en suero durante el periodo de julio de 2007 a agosto de 2009 de la base de datos electrónica de los Laboratorios Clínicos de Puebla. De los resultados consultados se incluyeron pacientes inmunodeprimidos que fueron sometidos a trasplante de médula ósea, portadores de neoplasias hematológicas que presentaron leucopenia (<4,000 leucocitos/mm³), neutropenia (<40% neutrófilos en la diferencial) o fiebre (>37.5°C) en el Centro de Hematología y Medicina Interna de la Ciudad de Puebla, durante el periodo mencionado, y a quienes se les realizó la detección del antígeno galactomanano dentro de los 90 días posteriores al trasplante.

Los datos fueron obtenidos de los expedientes clínicos. Se estudió retrospectivamente un total de 27 pacientes cuyos sueros fueron analizados con el paquete de inmunoensayo enzimático doble sándwich Platelia® *Aspergillus* (Bio-Rad®, Francia).

A continuación se describe la secuencia de pasos seguidos para el análisis de las muestras de suero de los pacientes:

Se estabilizaron los reactivos a temperatura ambiente (18-25°C) al menos durante 15 minutos antes de su uso. Se preparó la solución de lavado, la solución de sustrato-cromógeno y los controles negativo, positivo y del punto de corte. Se preparó un diagrama para identificar los sueros y controles en estudio en cada microplaca. Se usó un pocillo para el suero de control negativo, dos pocillos para el suero de control del valor umbral y otro para el suero de control positivo. Se extrajo el soporte de la placa y las tiras de micropocillos de la bolsa de placas. Como tratamiento se mezcló el contenido del frasco de conjugado invirtiéndolo antes de su uso. Se añadieron 50 µL del sobrenadante tratado del suero en cada pocillo, como se indicó anteriormente. Se cubrió la placa con su sellador, para evitar evaporación y se comprobó que toda la superficie estuviera cubierta y que fuera hermética al agua. Se incubó la microplaca durante 90 ± 5 minutos a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Se retiró el sellador de la placa. Se aspiró el contenido del pocillo hacia una botella de residuos (con hipoclorito sódico). Se lavó la placa 5 veces usando como mínimo 370 µL de la solución de lavado. Después del último lavado se invirtió la placa para golpearla suavemente sobre papel secante y garantizar que se hubiera eliminado todo el líquido. Se añadieron rápidamente 200 µL de solución de sustrato-cromógeno a cada pocillo evitando la exposición a la luz brillante. Se incubó la microplaca en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 ± 5 minutos. Posteriormente se agregaron 100 µL de la solución de parada a cada pocillo en el mismo orden en que se agregó la solución de sustrato mezclando bien. Las placas fueron secadas y sometidas a un lector de absorbancia de microplacas ELX800 (Biotek Instruments E.U.A) para leer la densidad óptica (D.O.) a 450 nm (filtro de referencia de 620 nm).

Los resultados de la lectura de cada pocillo fueron establecidos a través del cociente del promedio de los 2 valores de corte de la corrida (de acuerdo con las instrucciones del paquete) y del valor del índice (I) de cada paciente,

($I = \text{D.O.}/\text{media del valor de corte}$) definiendo como positivos para la presencia del antígeno galactomanano aquellos con índice mayor o igual a 0.50 D.O.

El análisis de los datos observados fue realizado mediante la aplicación de estadística descriptiva.

RESULTADOS

En cuanto a la distribución por sexo 48.4% fueron mujeres en un intervalo de edad entre los 14 y los 70 años, encontrándose mayor incidencia entre los 40 y 50 años, lo que equivale a 37% de los pacientes estudiados. De éstos, 48.1% ($n=13$) procedían de la ciudad de Puebla y el resto de distintas ciudades de la república mexicana.

Con respecto a las características clínicas de los pacientes 62.9% ($n=17$) presentó neutropenia y 18% ($n=5$) fiebre.

De las 27 muestras analizadas para la detección del antígeno galactomanano 14.8% ($n=4$) fueron positivos y 85.2% ($n=23$) negativos para la identificación (Cuadro 1).

De acuerdo con la revisión de los expedientes clínicos de los pacientes 3 (75%) de los 4 que resultaron positivos fallecieron en un periodo de 2 a 3 semanas posteriores a la solicitud de la prueba.

CONCLUSIONES

Es importante señalar que la población estudiada fue pequeña debido a que nuestra institución pertenece al sector privado, por lo que sólo se atendieron pacientes ambulatorios a quienes se les solicitó la investigación del antígeno galactomanano en el periodo posterior al trasplante de médula ósea.^{3,6,12,13}

Cuadro 1. Resultados de la densidad óptica leída de los sueros analizados

Resultado *(D.O.)	Pacientes	%
Negativo (≤ 0.200)	23	85.2
Intermedio (0.200-.500)	0	0
Positivo (≥ 0.500)	4	14.8
Total	27	100

*La densidad óptica (D.O.) fue establecida por el cociente de la lectura de la absorbancia del promedio de los 2 valores de corte (de acuerdo con las instrucciones del paquete) y la lectura individual de cada paciente.

De acuerdo con los resultados observados es posible concluir que la aspergilosis invasiva representa, claramente, un factor de mal pronóstico en pacientes sometidos a trasplante, ya que 75% de los casos positivos concluyeron en un desenlace fatal.

La utilización regular de este método en pacientes con riesgo alto de desarrollar aspergilosis puede afectar significativamente el pronóstico, la supervivencia y la calidad de vida. Por lo tanto, se sugiere que esta determinación sea considerada como una práctica de rutina, sobre todo en las unidades de trasplante de médula ósea y en los servicios de oncohematología; realizándola periódicamente cuando se presenten leucopenia, neutropenia, fiebre u otros factores de riesgo.

Asimismo, consideramos necesaria la creación de un estudio prospectivo longitudinal con pacientes de las mismas características que incluya, además, el estudio histopatológico de biopsia para establecer el desempeño diagnóstico de la prueba comparada con el estándar de oro. También se requiere de más estudios prospectivos con la finalidad de clarificar otros factores pronósticos.

REFERENCIAS

1. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzymelinked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1—13)-beta- D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 2004;42:2733–2741.
2. Kwak EJ, Husain S, Obman A. Efficacy of galactomannan antigen in the Platelia Aspergillus enzyme immunoassay for diagnosis of invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2004;2:435–438.
3. Ulusakarya A, Chachaty E, Vantelon JM. Surveillance of Aspergillus galactomannan antigenemia for invasive aspergillosis by enzyme-linked immunosorbent assay in neutropenic patients treated for hematological malignancies. *Hematol J* 2000;1:111–116.
4. Becker MJ, Lugtenburg EJ, Cornelissen JJ, Van der Schee C, Hoogsteden HC, De Marie S. Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho- alveolar lavage fluid and serum in haematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br J Haematol* 2003;121:448–457.
5. Boutboul F, Alberti C, Leblanc T. Invasive aspergillosis in allogeneic stemcell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease. *Clin Infect Dis* 2002;34:939–943.
6. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis* 2002;186:1297–1306.
7. Verweij PE, Brinkman K, Kremer HPH. Aspergillus meningitis: diagnosis by non-culture-based microbiological methods and management. *J Clin Microbiol* 1999;37:1186–1189.
8. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L, Chapman SW, et al. The impact of culture isolation of Aspergillus species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2005;33:1824–1833.
9. Junghanss C, Marr KA, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, et al. Incidence and outcome of bacterial and fungal infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a matched control study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8(9):512–520.
10. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* 2002;100:4358–4366.
11. Boutboul F, Alberti C, Leblanc T. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease. *Clin Infect Dis* 2002;34:939–943.
12. Lombardi G, Farina C, Andreoni S. Multicenter evaluation of an enzyme immunoassay (Platelia® *Aspergillus*) for the detection of Aspergillus antigen in serum. *Mycopathologia* 2002;155:129–133.
13. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B. Detection of circulating Aspergillus fumigatus galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003;41:2184–2186.
14. Ascioglu S, de Paw B, Bennett JE. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002;34:7–14.
15. Yeghen T, Kibbler CC, Prentice HG, Berger LA, Wallisby RK, McWhinney PH, et al. Management of invasive pulmonary aspergillosis in hematology patients: A review of 87 consecutive cases at a single institution. *Clin Infect Dis* 2000;31:859–68.