

**UTILIDAD DE LA DETECCIÓN ANTIGÉNICA DE
GALACTOMANANO DE *Aspergillus sp.* EN LAVADO
BRONCOALVEOLAR Y SUERO PARA DIAGNÓSTICO
PRECOZ DE ASPERGILOSIS INVASIVA EN PACIENTES CON
CÁNCER**

**JULIETH ALEJANDRA KIM LEAL
NATALY POLO OLIVAR**

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar el título de**

BACTERIÓLOGA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
Bogotá, D.C
2008**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

UTILIDAD CLÍNICA DE LA DETECCIÓN ANTIGÉNICA DE
GALACTOMANANO DE *Aspergillus sp.* EN LAVADO
BRONCOALVEOLAR Y SUERO PARA DIAGNÓSTICO
PRECOZ DE ASPERGILOSIS INVASIVA EN PACIENTES
CON CÁNCER

JULIETH ALEJANDRA KIM LEAL
NATALY POLO OLIVAR

APROBADO



PILAR RIVAS, Micóloga
DIRECTORA




SONIA CUERVO, Infectóloga
CODIRECTORA



MELBA LINARES, Bacterióloga
ASESORA


RICARDO SANCHEZ, Epidemiólogo
ASESOR



LEONARDO ENCISO, Hematólogo
ASESOR



ALFREDO SAAVEDRA, Neumólogo
ASESOR



MARY SANTAELLA, Bacterióloga
JURADO



EDGAR BERNAL, Infectólogo
JURADO

**UTILIDAD DE LA DETECCIÓN ANTIGÉNICA DE
GALACTOMANANO DE *Aspergillus sp.* EN LAVADO
BRONCOALVEOLAR Y SUERO PARA DIAGNÓSTICO
PRECOZ DE ASPERGILOSIS INVASIVA EN PACIENTES CON
CÁNCER**

**JULIETH ALEJANDRA KIM LEAL
NATALY POLO OLIVAR**

APROBADO


INGRID SCHULER, Ph.D.
Decana Académica – Facultad de
ciencias


LUZ AMPARO MALDONADO
Directora Carrera de Bacteriología

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
Bogotá, D.C
2008**

DESCRIPCIÓN TRABAJO DE GRADO

AUTORES

Apellidos	Nombres
Kim Leal	Julieth Alejandra
Polo Olivar	Nataly

DIRECTORES

Apellidos	Nombres
Rivas	Pilar
Cuervo	Sonia

ASESORES

Apellidos	Nombres
Linares	Melba
Sánchez	Ricardo
Enciso	Leonardo
Saavedra	Alfredo

TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE: Bacteriólogas

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Utilidad clínica de la detección antigénica de galactomanano de *Aspergillus sp.* en lavado broncoalveolar y suero para el diagnóstico precoz de aspergilosis invasiva en pacientes con cáncer.

FACULTAD: Ciencias

PROGRAMA: Pregrado

NOMBRE DEL PROGRAMA: Bacteriología

CIUDAD: BOGOTA, **AÑO DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO:** 2008

NÚMERO DE PÁGINAS: 111

TIPO DE ILUSTRACIONES:

Ilustraciones

Tablas, gráficos y diagramas

Fotografías

DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVES:

Antígeno de galactomanano, Aspergilosis invasiva, Fibrobroncoscopia, Lavado broncoalveolar.

RESUMEN DEL CONTENIDO:

La aspergilosis invasiva es una de las infecciones fúngicas más frecuentes en pacientes con cáncer, sobre todo hematológico y está relacionada con una mortalidad del 50%. El diagnóstico de aspergilosis invasiva es difícil, ya que las pruebas tradicionales de laboratorio resultan deficientes para la obtención propia del agente etiológico o la detección de su presencia por medio de una prueba serológica. Por esta razón se ha incrementado la necesidad de utilizar técnicas de detección precoz, como serían las técnicas de detección de antigénica, las cuales permiten detectar pequeñas cantidades de antígeno en suero, y la utilización de muestras como el LBA que ayudan a potencializar el diagnóstico de la infección por *Aspergillus sp* con el fin de anticipar la aparición de los síntomas. Por ello, cuantificar el GM no solo en suero si no también en LBA nos permite llegar a una aproximación diagnóstica más eficaz de la infección causada por el *Aspergillus sp*.

DEDICATORIA

Se culmina una etapa importante en nuestras vidas
Por esta razón dedicamos nuestro trabajo
A todas la personas que siempre
Nos apoyaron y nos guiaron.

Le agradecemos a Dios
Este momento de nuestras vidas,
Por llenarlas de bendiciones,
Sabiduría, responsabilidad, amor y bondad.

A nuestros amados padres
Helena Leal, Chang Young Kim, Lilia Olivar y Jorge Polo
Quienes siempre se preocuparon por nuestro bienestar,
Nos apoyaron y animaron a salir adelante.
Brindándonos todo de si, sin importar los sacrificios,
Para que lográramos culminar este largo camino.

A nuestros hermanos y familiares que nos apoyaron, acompañaron
Y muchas veces tuvieron que aguantarnos en momentos difíciles.

A Andres Mayorga, Jaime Lievano y sus familias
Quienes con amor y comprensión
Estuvieron a nuestro lado
Apoyándonos incondicionalmente.

A la facultad de Ciencias de la
Pontificia Universidad Javeriana
Por la formación integral basada en la ética profesional
Aportándonos sus cocimientos

Y a todas aquellas personas que nos brindaron
Su colaboración en nuestro trabajo

AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresan su agradecimiento a:

Dra. Pilar Rivas. Micóloga Laboratorio Clínico INC, Bogotá.

Dra. Sonia Cuervo. Infectóloga INC, Bogotá.

Dr. Ricardo Sánchez. Epidemiólogo INC, Bogotá.

Dr. Leonardo Enciso. Hematólogo INC, Bogotá.

Dr. Alfredo Saavedra. Neumólogo. INC, Bogota

Dr. Plutarco García Neumólogo. INC, Bogota

Dr. Jorge Mesa López de Mesa. Patólogo, INC, Bogotá

Dra. Maria Cristina Paredes. Coordinadora Laboratorio Clínico. INC, Bogotá.

Dra. Melba Linares. Bacterióloga PUJ, Bogotá

Johanni Carrillo Practicante de bacteriología, laboratorio de micología. INC. Bogota

Y a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1 Planteamiento del problema	11
2 Justificación	13
3 Objetivos	14
4 Marco teórico	15
4.1 <i>Aspergillus sp.</i>	15
4.2 Patogenia de <i>Aspergillus sp.</i>	16
4.3 Manifestaciones clínicas de la aspergilosis	17
4.4 Aspergilosis invasiva	17
4.4.1 Manifestaciones clínicas de aspergilosis invasiva	18
4.4.2 Diagnóstico de aspergilosis invasiva	19
4.4.2.1 Galactomanano de <i>aspergillus sp</i> en suero y LBA	20
4.4.2.2 Cultivo microbiológico	21
4.4.2.3 Broncoscopia para toma de LBA y citología del LBA	22
4.4.2.4 Biopsia pulmonar y coloración histo patológica para detección de <i>Aspergillus sp</i>	22
4.5 Incidencia de la aspergilosis invasiva en el Instituto Nacional de Cancerología	24
5 Diseño metodológico	25
5.1 Diseño del estudio	25
5.2 Preguntas de investigación	25
5.3 Definición de sujetos de estudio	25

5.3.2	Muestra	26
5.3.3	Criterios de elegibilidad	26
5.3.3.1	Criterios de inclusión	26
5.3.3.2	Criterios de exclusión	27
5.4	Variables y definiciones	27
5.5	Consideraciones éticas	34
6	Plan de análisis estadísticos	35
6.1	Tabulación	35
6.2	Plan de análisis	35
6.2.1	Análisis estadístico	35
6.2.2	Tamaño de la muestra	35
6.3	Descripción de las intervenciones	36
6.4	Procedimiento	36
6.4.1	Recolección de Muestras	36
6.4.2	En el momento de la toma de muestra	36
6.4.3	Procesamiento de la muestra de LBA y biopsia trasbronquiales	37
6.4.4	Procesamiento de la muestra de suero	38
6.4.5	Procesamiento de medios de cultivos	38
7	Resultados	39
8	Discusión de resultados	48
9	Conclusiones	54
10	Recomendaciones	55

11	Referencias	56
12	Anexos	62

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Riesgo de aspergilosis invasora En enfermos con cultivo positivo de <i>Aspergillus sp</i>	18
Tabla 2 Incidencia de la aspergilosis invasora según la enfermedad de base	24
Tabla 3 Características clínicas de los pacientes	40
Tabla 4 Medicamentos suministrados a los pacientes en estudio	40
Tabla 5 Cantidad de resultados positivo/negativos de citología de LBA para <i>Aspergillus</i> , cultivo e histopatología de biopsia	42
Tabla 6. Agente etiológico aislado de los cultivos positivos para <i>Aspergillus sp.</i> en el LBA	43
Tabla 7. Títulos antigénicos de galactomanano en LBA de pacientes en estudio	43
Tabla 8. Títulos antigénicos de galactomanano en suero de pacientes en estudio	43
Tabla 9 Relación de resultados de títulos de galactomanano en LBA y cultivos de LBA	45
Tabla 10 Resumen de pacientes con aspergilosis posible invasiva	47
Tabla 11 Tamaño de muestra ideal para determinar la sensibilidad y especificidad	53

TABLA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Morfología de <i>Aspergillus sp.</i>	16
Figura 2	Frecuencia de las patologías oncológicas de los pacientes en estudio	39
Figura 3	Hallazgos imagenológicos presentes en los pacientes en estudio	41
Figura 4	Resultados de cultivos de LBA de los pacientes en estudio	42
Figura 5	Títulos antigénicos de galactomanano en LBA y suero de los pacientes en estudio	44
Figura 6	Detección de los títulos antigénicos de galactomanano en LBA y suero	45
Figura 7	Relación entre títulos de antígeno de galactomanano Vs hallazgos radiológicos	46

TABLA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 Criterios <i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i> (EORTC)	62
Anexo 2 Definición de aspergilosis invasiva. Consenso EORTC Y <i>Mycoses Study Group del NIAID (National institute of Allergy and Infectious Diseases) de EE.UU</i>	64
Anexo 3 Detección antigénica de galactomanano de <i>Aspergillus</i> por ensayo inmunoenzimático (PLATELIA® <i>Aspergillus</i>)	69
Anexo 4 Técnica de lavado broncoalveolar	75
Anexo 5 Medios de cultivos para hongos	78
Anexo 6 Azul de lactofenol para visualización microscópica del <i>Aspergillus</i> sp.	83
Anexo 7 Claves taxonómicas de identificación	85
Anexo 8 Biopsia trasbronquial	89
Anexo 9 Citología en lavado broncoalveolar	91
Anexo 10 Coloraciones histopatológicas	94
Anexo 11 Definición para las infecciones fúngicas invasivas en pacientes con cáncer y receptores de trasplantes de celular progenitoras hematopoyéticas	98
Anexo 12 Hoja de recolección de datos	101
Anexo 13 Consentimiento informado paciente con capacidad para consentir	103
Anexo 14 Consentimiento informado paciente sin capacidad para consentir	105
Anexo 15 Protocolos de procesamiento	107
Anexo 16 Indicaciones por las cuales se realiza un fibrobroncoscopia	111

RESUMEN

El Galactomanano (GM) es un componente polisacárido de la pared celular de los *Aspergillus* sp(1) que se puede cuantificar por la técnica inmunoenzimática Galactomanano de *Aspergillus* (GA) La aspergilosis es una de las infecciones fúngicas más frecuentes en pacientes con cáncer, y está relacionada con una mortalidad del 50% en pacientes con leucemia o linfomas que presenten neutropenia(3). El diagnóstico de aspergilosis invasiva es difícil, ya que las pruebas tradicionales de laboratorio resultan deficientes para la obtención propia del agente etiológico o la detección de su presencia por medio de una prueba serológica (4).

Las infecciones invasivas por hongos especialmente por *Aspergillus* sp son cuadros difíciles de reconocer, ya que tanto los síntomas como los signos clínicos son, a menudo, inespecíficos (5) Por ello, cuantificar el GM no solo en suero si no también en LBA nos permite llegar a una aproximación diagnóstica más eficaz de la infección causada por el *Aspergillus* sp.

Se tomaron los pacientes sometidos a fibrobroncoscopia en el INC entre enero y mayo de 2008. Se analizaron un total de 40 pacientes en los que se observó que el cáncer de pulmón fue la neoplasia más prevalente con 32.5%, seguido de cáncer de tiroides y leucemias con 12.5% de los pacientes con leucemias 2 de ellos eran neutropénicos y uno neutropénico febril. Se revisaron los Rayos x de tórax y la tomografía de alta resolución encontrando que un 62.5% presentaban nódulos e infiltrados. Con relación al estudio histopatológico, de las muestras de biopsias (n:13) y citología del LBA, en su totalidad fueron negativas para estructuras micóticas compatibles con *Aspergillus* sp. En cuanto al aislamiento del agente etiológico en LBA sembradas en cultivo microbiológico se obtuvo un 10% de aislamientos positivos siendo el más frecuente *Aspergillus fumigatus*.

En relación al estudio de los títulos antigénicos tanto de LBA como de suero; 17,5% fueron intermedios en LBA y suero, y solo un paciente presentó los títulos de GA positivos en LBA y suero. Uno de los pacientes se encontraba en tratamiento con Piperacilina/Tazobactam, con títulos antigénicos positivos en LBA y suero, catalogado como falso positivo.

Al relacionar los títulos antigénicos de LBA y suero, el resultado del cultivo de LBA, la enfermedad de base, los hallazgos radiológicos y los resultados obtenidos en la histopatología y citología, podemos observar que hubo 3 pacientes que tenían alto riesgo de aspergilosis invasiva. Tenían como enfermedad de base cánceres hematológicos, presentaban neutropenia y uno de ellos fiebre, como hallazgos radiológicos infiltrados o nódulos pulmonares, los cuales fueron clasificados según los criterios EORTC dos de ellos como posibles y uno como probable. La detección de antígeno de GM en LBA y suero, en pacientes hematológicos y neutropénicos, es útil para la determinación de aspergilosis invasiva como criterio microbiológico determinado en los criterios EORTC y NIAID, en casos definidos como de alto riesgo para desarrollar aspergilosis invasiva

La detección de antígeno de GM en LBA, no es gran utilidad aplicarlo en una muestra heterogénea debido a la falta de criterios clínicos necesarios para evidenciar la aspergilosis invasiva, a diferencia de su gran utilidad al utilizarlo en una población en riesgo.

SUMMARY

The galactomannan (GM) is a polysaccharide component of the cell wall of *Aspergillus* sp. (1) which can be quantified by Immunoenzymatic techniques *Aspergillus* galactomannan (GA). Aspergillosis is one of the most common fungal infections in cancer patients, and is associated with a mortality rate of 50% in patients with leukemia or lymphoma presenting neutropenia (3). The diagnosis of invasive aspergillosis is difficult because traditional laboratory tests are inadequate for obtaining proper to the etiological agent or detect its presence through a serological test (4).

The invasive fungal infections especially by *Aspergillus* sp tables are difficult to recognize because both the symptoms and clinical signs are often unspecific (5) Therefore, not only to quantify the GM serum but also lets us in bronchoalveolar lavage (BAL) reach a more effective diagnostic indication of infection caused by *Aspergillus*

It took patients undergoing fibrobroncoscopia in the INC between January and May 2008. We analysed a total of 40 patients in whom it was observed that lung cancer was the most prevalent malignancy with 32.5%, followed by thyroid cancer and leukemia with 12.5%. of patients with leukemia 2 of them were neutropenic and one febrile neutropenic. We reviewed the chest x-ray tomography and high-resolution finding that a 62.5% presented nodules and infiltration. With regard to histopathologic study of samples from biopsies (n = 13) and cytology of the BAL, as a whole were negative for fungal structures compatible with *Aspergillus* sp. As for the isolation of the causative agent in BAL sown crop microbiological was obtained a 10% positive isolates the most frequent *Aspergillus fumigatus*

Referring to the study of both titles antigenic BAL as serum, 17.5% were intermediate in BAL and serum, and only one patient presented evidence of positive GA BAL and whey. One of the patients were treated with piperacillin /

tazobactam, with titles antigenic positive BAL and whey, catalogued as a false positive

In relating titles antigenic BAL and serum, the result of growing BAL, disease base, radiological findings and the results obtained in cytology and histopathology, we can see that there were 3 patients who had high risk of invasive aspergillosis. They had as a disease-based hematological cancers, neutropenia and had one fever, radiological findings as infiltrators or lung nodules, which were classified according to criteria EORTC one of them as probable and two as possible. The detection of antigen in GM LBA and serum, blood and neutropenic patients, it is useful for determining criterion as invasive aspergillosis microbiological criteria specified in the EORTC and NIAID, in cases defined as high risk for developing invasive aspergillosis. The detection of antigen in GM BAL, is not very useful in applying a sample heterogeneity due to lack of clinical criteria necessary to reveal invasive aspergillosis, unlike its very useful to use in a population at risk.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Galactomanano (GM) es un componente polisacárido de la pared celular de los *Aspergillus* sp.(1) que se puede cuantificar por la técnica inmunoenzimática Galactomanano de *Aspergillus* (GA). Esta técnica puede ser utilizada para el diagnóstico precoz de las aspergilosis invasivas, en pacientes que presenten alta sospecha de la infección fúngica según los criterios EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*) / NIAID (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases*) (2) (Anexo 1 y 2), que orientan más eficazmente al diagnóstico y a la instauración rápida de un tratamiento adecuado para la infección micótica.

La implementación de la técnica de detección del antígeno de Galactomanano (DGM) para *Aspergillus* en suero y su uso en muestras tomadas a través de procedimientos invasivos como los lavados broncoalveolares (LAB) se convierten en ayudas fundamentales debido a que contribuyen a detectar las aspergilosis en estadios tempranos cuando el estado general del paciente no se encuentra muy deteriorado.

La aspergilosis es una de las infecciones fúngicas más frecuentes en pacientes con cáncer, y está relacionada con una mortalidad del 50% en pacientes con leucemia o linfoma tratados con quimioterapia convencional, y superior al 80% en los aquellos pacientes receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos (3). El diagnóstico de aspergilosis invasiva es difícil, ya que las pruebas tradicionales de laboratorio resultan deficientes para la obtención propia del agente etiológico o la detección de su presencia por medio de una prueba serológica (4).

La finalidad de este trabajo es comparar los títulos antigénicos de galactomanano obtenidos de LBA y en suero de pacientes con cáncer y a los que por requerimiento médico se le practique una fibrobroncoscopia (FB), para establecer la utilidad clínica de la detección de este antígeno en este fluido comparado con la muestra sérica y determinar si es útil para ser utilizado para un diagnóstico precoz de la infección micótica en pacientes con cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (INC)

2. JUSTIFICACIÓN

Las micosis invasivas son cada vez más frecuente en la práctica clínica, afectando especialmente a aquellos pacientes con grados variables de inmunocompromiso. Las infecciones invasivas por hongos especialmente por *Aspergillus sp* son cuadros difíciles de reconocer, ya que tanto los síntomas como los signos clínicos son, a menudo, inespecíficos (5) La infección fúngica invasiva, se presenta en pacientes con cáncer del INC con una incidencia de aparición de entre el 1-2%, aunque dicho porcentaje de incidencia puede llegar a estar subvalorado, ya que las técnicas microbiológicas de recuperación del agente etiológico muchas veces no son capaces de establecer la infección micótica invasiva asociada en su forma precoz y el posible inicio de un tratamiento dirigido para la prevención de la mortalidad que se presenta por la infección micótica (6). Por esta razón se ha incrementado la necesidad de utilizar técnicas de detección precoz, como serian las técnicas de detección de antigénica, las cuales permiten detectar pequeñas cantidades de antígeno en suero, y la utilización de muestras como el LBA que ayudan a potencializar el diagnostico de la infección por *Aspergillus sp* con el fin de anticipar la aparición de los síntomas.(7) Por ello, cuantificar el GM no solo en suero si no también en LBA nos permite llegar a una aproximación diagnostica más eficaz de la infección causada por el *Aspergillus sp*.

3. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la utilidad clínica de la detección antigénica de galactomanano de *Aspergillus sp.* en lavado broncoalveolar y suero para un diagnóstico precoz de aspergilosis invasiva en pacientes con cáncer del INC.

ESPECIFICOS

Establecer el valor de los títulos de galactomanano por medio de la técnica inmunoenzimática tipo doble sándwich, presentes en el LBA en paciente con cáncer

Establecer el valor de los títulos de galactomanano por medio de la técnica inmunoenzimática tipo doble sándwich, presentes en suero en pacientes con cáncer

Establecer la relación existente entre títulos antigénicos séricos y los de LBA de GM en los pacientes en estudio.

Describir las características demográficas y clínicas de los pacientes.

Correlacionar pruebas diagnósticas como el antígeno de galactomanano obtenido en el LBA y suero, el cultivo microbiológico, los hallazgos histopatológicos, junto con las imágenes diagnósticas

4. MARCO TEÓRICO

4.1 *Aspergillus* sp.

Los *Aspergillus* sp. son hongos filamentosos ubicuos (presentan una capacidad de crecer a diferentes estadios de temperaturas sobre substratos de diversos contenidos de humedad). Se diseminan ampliamente en el ambiente (por esporas), normalmente se encuentra en suelo, aire, agua, plantas y materia orgánica en descomposición (8). El *Aspergillus* sp. es un hongo oportunista lo que significa que presenta infección cuando el paciente presenta inmunodepresión especialmente neutropenia causando la infección denominada aspergilosis (9). Su espectro clínico varía desde manifestaciones alérgicas a enfermedad invasiva, tanto local, como sistémica.

Se conocen más 90 especies de *Aspergillus*, que Rapper y Fennell clasifican en 18 grupos, de los que sólo algunas especies se encuentran involucradas con aspergilosis: *Aspergillus fumigatus* (85%) quien se presenta con mayor incidencia de infección micótica en pacientes con inmunosupresión, *A. flavus* (5-10%), *A. niger* (2-3%), *A. terreus* (2-3%), *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flavipes* y *A. ustus*. Esta clasificación se basa en las siguientes características morfológicas del hongo (Ver figura1):

1. Tamaño y forma de las cabezas conidiales
2. Morfología de los conidióforos
3. Fiálides
4. Métulas
5. Presencia de células de Hülle y de esclerocios. En la siguiente figura se muestran las principales estructuras morfológicas del género *Aspergillus* (10)

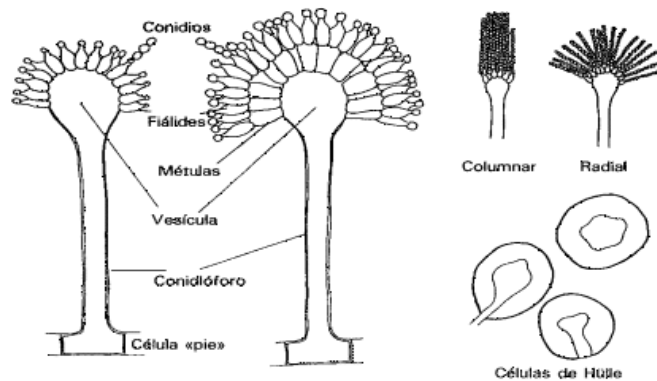


Figura 1. Morfología de *Aspergillus* sp. (11).

4.2 PATOGENIA DE *Aspergillus* sp.

El *Aspergillus* sp presenta diversos mecanismos de patogenicidad tales como:

El pequeño tamaño de sus conidias que permite que sean aspiradas y que pueda causar infección en el pulmón y en los senos paranasales.

Su capacidad de crecer a 37°C, lo que le hace idóneo para afectar al humano.

Su capacidad de adherencia a superficies epiteliales y posiblemente endoteliales y su gran tendencia a invadir los vasos sanguíneos.

La producción de un gran número de productos extracelulares tóxicos para las células de los mamíferos (elastasa, restrictocina, fumigatoxina, etc.).

Para el desarrollo de la infección por *Aspergillus* en el pulmón depende de diversos factores:

1. Virulencia del hongo anteriormente mencionado
2. Cantidad de exposición
3. Presencia de un enfermedad subyacente
4. Estado inmunológico del paciente (9)

El hombre tiene la capacidad de eliminar las esporas del *Aspergillus sp* cuando son inhaladas con ayuda de los macrófagos alveolares, el cual fagocita y destruye las esporas, pero si estas esporas no logran ser destruidas; estas germinan a hifas, los siguientes encargados para la eliminación son los neutrófilos, los cuales bloquean la proliferación del microorganismo. El *Aspergillus sp* logra realizar una invasión, cuando el paciente presenta una alteración en los neutrófilos y los macrófagos. (9)

4.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ASPERGILOSIS

La aspergilosis produce enfermedad pulmonar que varía en función del estado inmunológico de los pacientes, esta clasificados en cuatro formas: aspergiloma (se observa cuando se coloniza una cavidad preexistente en el pulmón, frecuentemente una secuela de tuberculosis), aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) (No se conoce bien la patogénesis de ABPA, pero hay evidencia de que sería una reacción de hipersensibilidad a los antígenos de *A. fumigatus*) (12), aspergilosis necrosante también denominada aspergilosis semi-invasiva (hay una invasión local del parénquima, con destrucción y formación de cavidades) y aspergilosis pulmonar invasiva

4.4 ASPERGILOSIS INVASIVA

Enfermedad es producida por del género *Aspergillus sp.* en paciente inmunocomprometido, especialmente neutropénico, la enfermedad adopta una forma invasiva y diseminada grave. La enfermedad se produce como consecuencia de la inhalación de esporas contenidas en el aire, por lo que los senos paranasales y los pulmones son los sitios donde con mayor frecuencia se asienta primariamente la enfermedad. En el inmunocomprometido neutropénico, la enfermedad suele ser invasiva, diseminada, grave y muchas veces fatal. (11). Los síntomas clínicos en la aspergilosis invasora son tardíos

e inespecíficos, por lo cual es fundamental estratificar a los enfermos por grupos de riesgo (13,14).

En la tabla, tomada de Perfect (Tabla 1) *et al* se muestra el riesgo de aspergilosis invasora en enfermos con cultivo positivo de *Aspergillus* sp. observándose que en los enfermos con riesgo alto, un cultivo positivo se asocia con aspergilosis invasiva en el 50-64% de los casos, mientras que si los enfermos tienen un riesgo intermedio ambos eventos se relacionan en el 8-28% de los casos (13)

Tabla 1. Riesgo de aspergilosis invasora
En enfermos con cultivo positivo de *Aspergillus* sp(11)

<p>Riesgo alto</p> <ol style="list-style-type: none">1. Trasplante de médula ósea alogénico 64%2. Neutropenia 64%3. Cáncer hematológico 50% <p>Riesgo intermedio</p> <ol style="list-style-type: none">1. Trasplante de médula ósea autólogo 28%2. Esteroides 20%3. VIH 19%4. Trasplante de órgano sólido 17%5. Diabetes 11%6. Enfermedad pulmonar 9%7. Cáncer no hematológico 8%

4.4.1 Manifestaciones clínicas de aspergilosis invasiva

Las puertas de entrada de *Aspergillus* en el ser humano incluyen el tracto respiratorio (árbol traqueobronquial y senos paranasales), piel gravemente dañada por traumatismos o heridas quirúrgicas, la córnea o el oído, lo que condiciona de forma importante el órgano afectado (15). Por lo general, la infección se sitúa en la puerta de entrada y puede quedar localizada o

diseminarse, bien por contigüidad, o bien por invasión vascular produciendo una enfermedad generalizada con afectación de más de un órgano(16)

Generalmente se presenta leucopenia y fiebre que no disminuye al tomar antibióticos, en la histología se presentan hifas anchas, septadas, con aspecto radiado e infiltración de neutrófilos, haciendo que se tapone la luz del vaso sanguíneo y por último en las radiografías pulmonares se visualizan infiltrados de variada naturaleza. Esta aspergilosis se puede extender a otros órganos teniendo consecuencias mortales en los pacientes.

4.4.2 Diagnóstico de aspergilosis invasiva: La Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer/Grupo Cooperativo de Infecciones Fúngicas Invasivas (EORTC/NIAID) y el Grupo de Estudio de Micosis (MSG) del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIH, Bethesda, Maryland) establecen tres niveles de probabilidad para las infecciones fúngicas invasivas: probada, probable y posible, que dependen de los factores predisponentes del huésped, factores microbiológicos y los criterios clínicos que pueden ser mayores o menores.

Las concentraciones de GM en suero son fluctuantes, y aunque no se conoce con exactitud su cinética, se sabe que en su aclaración intervienen las células de Kupffer. En enfermos con aspergilosis invasora el GM puede ser detectado en suero, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pericárdico/pleural y LBA. (1)

Puesto que los procedimientos microbiológicos tradicionales para establecer el diagnóstico de la aspergilosis invasora son tardíos y de poca rentabilidad, se han desarrollado una serie de marcadores de enfermedad invasora por *Aspergillus* sp. que permiten realizar un diagnóstico de forma precoz que conlleva la posibilidad de establecer un tratamiento anticipado.

4.4.2.1 Galactomanano de *Aspergillus* sp en LBA y suero: El GM es un antígeno del género *Aspergillus* sp, aunque los *Aspergillus* tienen más de 100 componentes antigénicos en la pared celular el GM es de mayor utilidad diagnóstica en enfermos con aspergilosis invasora pudiendo ser detectado en suero, LBA y otros fluidos corporales. En la actualidad el método comercial (Platelia *Aspergillus*, Bio-Rad, Francia) utiliza el anticuerpo monoclonal EB-A2 como captor y detector del GM, por una técnica ELISA de doble sándwich. (Anexo 3) (4).

La técnica de GM de *Aspergillus* puede ser utilizado como:

1. Técnica diagnóstica adyuvante para confirmar aspergilosis invasivas.
2. Herramienta diagnóstica para detectar anticipadamente la aspergilosis durante el periodo de riesgo antes de que haga su aparición el primer signo o síntoma clínico de aspergilosis.
3. Herramienta para monitorizar la respuesta al tratamiento antifúngico.
4. Criterio de inclusión de pacientes en ensayos clínicos.
5. Como herramienta diagnóstica para instituir un tratamiento antifúngico adelantado.
6. Como herramienta diagnóstica para establecer formas clínicas de AI excepcionales (17, 18).

La positividad del galactomanano en suero es un criterio diagnóstico de gran valor para la detección precoz de aspergilosis invasora en pacientes con cáncer.

Los pacientes con resultado positivo han sido estratificados en grupos de riesgo de desarrollo de aspergilosis invasora valorando diferentes factores (edad, enfermedad de base y estado de la misma, neutropenia intensa y

mantenida en el tiempo), también deben considerarse positivo aquellos pacientes que presentan cultivo positivo en LBA o quienes tengan el antígeno positivo en LBA o LCR o 2 GM positivos en muestras seriadas. Su detección presenta una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100%, con una eficacia global del 85%.(8)

4.4.2.2 Cultivo microbiológico: Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos, es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el Medio de Cultivo y el crecimiento de los microorganismos es el Cultivo. Para que los microorganismos crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: la temperatura, el grado de humedad y la presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante. (19)

Cultivo para hongos: Los hongos crecen bien en medios artificiales y tienen requerimientos nutritivos simples, una fuente de carbono orgánico, generalmente en azúcar, y de nitrógeno suelen ser los elementos suficientes para obtener un buen crecimiento. Junto a ellos, un soporte sólido, el agar, permite a los hongos filamentosos el desarrollo del micelio aéreo, donde se localizan las estructuras reproductoras y el desarrollo de colonias en el caso de las levaduras. El medio de cultivo más utilizado para los hongos es el medio glucosado de Sabouraud (Anexo 5), que reúne estas características y un pH de 5.6, que dificulta el crecimiento bacteriano.

Los medios de cultivo después de sembrados, se incuban en aerobiosis y la temperatura óptima suele ser 25-30°C para los agentes de micosis superficiales y los oportunistas y de 35-37°C para los que producen infecciones profundas (19). (Anexo 5)

4.4.2.3 Broncoscopia para toma de LBA y citología del LBA: La técnica de LBA, descrita inicialmente por Reynolds y Newball en 1974, fue concebida como procedimiento para analizar las células inmunes e inflamatorias del tracto respiratorio inferior, tanto del pulmón normal como de varios tipos de patología intersticial. Desde su descripción, su aplicabilidad ha ido aumentando progresivamente como técnica esencial en el aislamiento de patógenos oportunistas en pacientes inmunocomprometidos. Además, en los últimos años se tiende a incluir esta técnica entre las tradicionales en el diagnóstico y valoración de la patología intersticial difusa. (18) (Anexo 4)

El LBA, es una técnica de elección, para el estudio citológico de las enfermedades intersticiales pulmonares y se ha demostrado muy útil en el diagnóstico de las infecciones por gérmenes oportunistas en el pulmón. Para ello, se realiza una citología exfoliativa, que investiga las células atípicas, después de un lavado, escobillado o un raspado con instrumentos (cepillos, espátulas)(18). (Anexo 9)

4.4.2.4 Biopsia pulmonar y coloración histopatológica para detección de *Aspergillus sp*: Es el procedimiento que más comúnmente establece un diagnóstico histopatológico en pacientes con enfermedad pulmonar difusa y es el método de referencia para medir la sensibilidad y especificidad diagnóstica de cualquier técnica (20). Es necesaria en muchos casos de enfermedad pulmonar, para identificar una causa potencialmente tratable como infecciones o neoplasias y para certificar y evaluar la actividad de la enfermedad pulmonar difusa. Sin embargo, a pesar que técnicamente no es un acto quirúrgico complejo, no está exenta de morbi-mortalidad pues se realiza en un grupo de pacientes que presentan condiciones especiales por su patología de base (21) (Anexo 8)

La histopatología es fundamental para el diagnóstico etiológico de toda micosis ya que, a menudo, el material fijado para el estudio histológico es el único disponible para realizar el diagnóstico, bien por carecer de un material apropiado para el cultivo o bien por falta de viabilidad del hongo en la muestra hística. El éxito del diagnóstico anatomopatológico en las infecciones fúngicas invasoras depende del uso de tinciones apropiadas, así como de las características morfológicas que exhibe el hongo en la muestra estudiada. Para el diagnóstico histopatológico de las micosis se utilizan tinciones especiales que colorean específicamente las estructuras fúngicas, tales como la tinción argéntica o con metenamina de plata (tinción de Gomori-Grocott) o la del ácido peryódico de Schiff (tinción de PAS) (Anexo 10).

En la aspergilosis pulmonar invasora, la respuesta en los tejidos en estas infecciones se encuentra muy condicionada por el estado inmunológico del huésped. Cuando invaden los tejidos, las diferentes especies patógenas de *Aspergillus* producen hifas tabicadas hialinas, de 2 a 5 μm de diámetro, que se ramifican de manera dicotómica en ángulo agudo (de 45°). La presencia de conidióforos, vesículas, fiálides o conidios se observa muy raramente en los tejidos y pueden verse tan sólo en algunas lesiones cavitadas que comunican directamente con el árbol traqueobronquial. Por lo tanto, las distintas especies de *Aspergillus* no pueden distinguirse histológicamente entre sí.

En los pacientes inmunodeprimidos con infección por *Aspergillus* sp. Pueden observarse hifas en el interior de los vasos sanguíneos que provocan lesiones de infarto, edema y hemorragia. Incluso en áreas sin excesiva afectación vascular, también se observa una necrosis alrededor de las hifas. La aspergilosis también se disemina por vía hematógena provocando metástasis sépticas en múltiples órganos, la mayoría de estas metástasis presentan un

área de necrosis rodeando a un grupo de hifas dispuestas en una estructura radial. (21)

4.5 INCIDENCIA DE LA ASPERGILOSIS INVASIVA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

La aspergilosis invasora es una causa importante de morbi-mortalidad en enfermos inmunodeficientes, siendo la incidencia dependiente de la enfermedad de base (Tabla 2).

Tabla 2. Incidencia de la aspergilosis invasivas según la enfermedad de base (18)

INCIDENCIA DE LA ASPERGILOSIS INVASIVAS SEGÚN LA ENFERMEDAD DE BASE
1. Leucemia, linfoma 29%
2. Trasplante de médula ósea alogénico 25%
3. Trasplante de órgano sólido 9%
4. SIDA 8%
5. Trasplante de médula ósea autólogo 7%
6. Tumor de órgano sólido 4%

En el Instituto Nacional de Cancerología (INC), donde las infecciones micóticas asociadas a levaduras ocupa el tercer puesto de los aislamientos clínicos microbiológicos, después de los cocos Gram positivos y de los bacilos Gram negativos y las infecciones asociadas a los miceliales aun sigue siendo pobremente diagnosticadas, según datos epidemiológicos obtenidos de los grupos mencionados, Las infecciones micóticas asociadas a especies de *Aspergillus* tienen una incidencia de aparición entre el 1-2%. (Anexo 10)

5 DISEÑO METODOLÓGICO

5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Este es un estudio observacional descriptivo de serie de casos de pacientes con cáncer procedentes el INC

5.2. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la sensibilidad de la técnica de detección del antígeno de GM en lavado broncoalveolar?

¿Cuál es la especificidad de la técnica de detección del antígeno de GM en lavado broncoalveolar?

¿Cuál es utilidad clínica de comparar los títulos antigénicos de galactomanano en LBA y suero de pacientes con cáncer del INC?

5.3. DEFINICIÓN DE SUJETOS DE ESTUDIO

5.3.1. Población

POBLACIÓN BLANCO: Pacientes con cáncer pertenecientes al Instituto Nacional de Cancerología E.S.E (INC), a quienes se les realice un lavado broncoalveolar por medio de una fibrobroncoscopia.

POBLACIÓN DE ESTUDIO: Pacientes con cáncer o con sospecha de infección por aspergilosis a los cuales se les realice una

fibrobroncoscopia(FB) y se obtenga muestra LBA y/o biopsia de pulmón, junto con una muestra sérica (Anexo 11, 12, 13 y 14)

5.3.2 Muestra: El tamaño de la muestra fue de 40 pacientes a los cuales se les realizó lavado broncoalveolar por fibrobroncoscopia en el INC en un periodo comprendido de febrero a mayo de 2008.

EL análisis se basó en datos de 27 publicaciones donde la sensibilidad media de la detección del antígeno de GM en suero es de 61-71% con una especificidad en suero del 89-93%

Valor predictivo negativo de la detección del antígeno de GM en suero del 95-98%

Valor predictivo positivo bajo en la detección del antígeno de GM en suero (26-53%) en casos de AI probada y probable. (23) (Anexo 3 y 4)

5.3.3 Criterios de elegibilidad: pacientes a los cuales se le realice fibrobroncoscopia y se obtenga LBA y suero. Se tiene en cuenta pacientes con y sin sospecha de aspergilosis según los criterios EORTC y NIAID con el fin de evaluar la determinación de la utilidad clínica de la DGM de *Aspergillus* utilizando la técnica inmunoenzimática Platelia® *Aspergillus* en LBA realizando la comparación con los títulos obtenidos en suero y cultivo microbiológico.

5.3.3.4 Criterios de inclusión

1. Pacientes mayores de 18 años
2. Atendidos en el INC en el periodo de tiempo comprendido entre (febrero-mayo del 2008)
3. Pacientes a quienes se realice FB más LBA. En caso de biopsia

transbronquial debe tener cultivos microbiológicos y coloraciones histopatológicas.

4. Muestra de suero el mismo día de la realización de la FB para comparación de títulos antigénicos de GM.

5.3.3.5 Criterios de exclusión

1. Pacientes menores de edad
2. Pacientes que no pertenezca al INC
3. Pacientes que no se les logre tomar la muestra sérica el mismo día de la FB.
4. Pacientes que se les tome LBA y no se le realice cultivo microbiológico
5. Pacientes a quienes se realice FB (Anexo 4) más LBA en caso de biopsia transbronquial no realizarse cultivo microbiológico y coloraciones histopatológicas.

5.4 VARIABLES Y DEFINICIONES

VARIABLE	DEFINICION	TIPO	NIVEL OPERATIVO (código)
Edad	Número de años del paciente	Razon	Edad del paciente al momento de la recolección de datos.
Sexo	Genero biológico	Nominal	Hombre (1) Mujer (0)

Lugar de procedencia	Lugar de nacimiento del paciente	Razon	Lugar de nacimiento del paciente incluido en el estudio
Estancia hospitalaria	Días de hospitalización hasta al momento que el paciente se da de alta	Razon	Número de días
Prueba para la detección del antígeno galactomanano de Aspergillus	La DGM de <i>Aspergillus</i> es una técnica inmunoenzimática en un tiempo, de tipo sandwich en microplaca, que permite la detección semicuantitativa del antígeno circulante en suero humano (Anexo 2)	Numérica	(ng/dl)
Interpretación de la prueba antigénica	<p>Calculo del Índice: Para cada suero ensayado calcular la relación: I: DO muestra / Valor umbral</p> <p>Este cálculo permite limitar las variaciones de DO Inter.-ensayos en Inter.-laboratorios debidas a las diferentes condiciones de realización de la reacción inmunoenzimática (temperatura, ambiente, modos de lavado, etc.)</p>	Nominal	NEGATIVO (0) INTERMEDIO (1) POSITIVO (2)
Lavado broncoalveolar obtenido por fibrobroncoscopia	<p>La broncoscopia es un procedimiento médico que utiliza un sistema óptico para poder ver en el interior de las vías respiratorias.</p> <p>Consiste en la instilación y aspiración secuencial de solución fisiológica a través del broncoscopio enclavado en un subsegmento pulmonar. La infusión de al menos 100-120 ml (5 alícuotas de 20 ml)</p>	Numérica	(ng/dl)

	<p>independientes, procedentes de un tejido. Las extensiones citológicas nos permiten el examen de células sueltas y no estructuradas de un tejido al microscopio, tiene la capacidad de detectar enfermedades neoplásicas en estadios iniciales, identificar numerosas infecciones como las micóticas como las aspergilosis invasivas producidas por los <i>Aspergillus</i> sp</p>		
<p>Biopsia de pulmón</p>	<p>La biopsia pulmonar persigue la obtención de tejido pulmonar suficiente para su estudio anatomopatológico, esta consiste en la obtención de uno o varios fragmentos pulmonares para proceder a los estudios histológicos para que de esta manera se llegue a un diagnóstico del proceso que padece. Se lleva a cabo junto con la fibrobroncoscopia realizado por el neumólogo.</p> <p>Para sospecha de aspergilosis, de acuerdo con el diagnóstico histopatológico, se envía al laboratorio clínico para realizarse siembra en medios de cultivos microbiológicos</p>	<p>Nominal</p>	<p>Presente (1) Ausente (0)</p>
<p>Coloraciones histopatológicas</p>	<p>Se utilizan coloraciones especiales para la visualización de elementos fúngicos sospechosos, causante de infección, hay diversas coloraciones utilizadas tales como:</p> <p>Coloración de PAS Coloración de GOMORY Coloración de hematoxina – eosina Las lamina coloreada es observada por</p>	<p>Nominal</p>	<p>Presente (1) Ausente (0)</p>

	el patólogo quien es el encargado de ver la presencia de elementos fúngicos (Anexo 9)		
Uso de antibioticoterapia	Antibioticoterapia sistémica por tiempo mayor a 2 semanas	Nominal	Presente (1) Ausente (0)
Criterios de Infección Fúngica Invasiva según EORTC	<p>Patrón de referencia (<i>gold standard</i>) que permite establecer de forma probada en enfermos cancerosos e inmunodeprimidos la existencia de infección fúngica invasora por hongos filamentosos.</p> <p>FACTORES DEL HUÉSPED:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Neutropenia < 500 mm³ por mas de 10 días 2. Fiebre persistente > 96 horas refractaria a tratamiento antibacterial de amplio espectro apropiado 3. Temperatura corporal > 38°C o < 36°C con alguno de los factores predisponentes siguientes: <ul style="list-style-type: none"> - Neutropenia prolongada > 10 días en los últimos 60 días - Uso de agentes inmunosupresores en los últimos 30 días. - Infección fúngica invasiva en episodios previos. - Coexistencia con SIDA 4. Signo y síntomas de rechazo a trasplante de medula ósea 5. Uso prolongado de corticosteroides (> 3 semanas) 	Nominal	<p>Infección invasiva probada:</p> <p>Examen microbiológico o histopatológico que demuestre la presencia de hifas. cultivo de muestra obtenida de un sitio estéril y que concuerde con la sospecha clínica y radiológica como fuente de infección, excluyendo orina o membranas mucosas.</p> <p>Infecciones invasivas probables:</p> <p>Definida como uno de los criterios de la sección de huésped y un criterio microbiológico, y un criterio clínico mayor (o dos menores) de sitios anormales consistentes con infección</p>

	<p>FACTORES MICROBIOLÓGICOS:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 Cultivos positivos 2 Microscopia directa positiva 3 Antigenemia positiva para <i>Candida</i> y/o <i>Aspergillus</i> 4 Dos urocultivos positivos para levaduras en ausencia de catéter urinario 5 Hemocultivos positivos <p>3. CRITERIOS CLÍNICOS:</p> <p>Relacionado con el sitio del criterio microbiológico y relacionado temporalmente con el episodio actual</p>	<p>Infecciones invasivas posibles:</p> <p>Definida como un criterio del huésped más un criterio microbiológico o uno clínico mayor (o 2 menores) de sitios anormales compatibles con infección.</p> <p>Infección fúngica invasora probable por <i>Aspergillus</i> sp:</p> <p>Deben cumplirse al menos un criterio de factores del huésped + un criterio microbiológico + un criterio clínico mayor (o dos criterios clínicos menores) compatibles con infección.</p> <p>Infección fúngica invasora posible por <i>Aspergillus</i> sp:</p> <p>Deben cumplirse al menos un criterio de la sección factores del huésped + un criterio microbiológico o un criterio clínico mayor (o dos criterios clínicos menores) compatibles con infección</p>
--	---	---

<p>CRITERIOS NIAID (Anexo 2)</p>	<p>Las diferentes formas clínicas que puede adoptar la enfermedad pulmonar dependen del mecanismo patogénico de acción, el estado inmunológico y la respuesta del huésped. Básicamente se distinguen 4 formas de enfermedad bronco-pulmonar:</p> <p>Aspergilosis alérgica. Se observa particularmente en personas atópicas que desarrollan reacciones alérgicas de asma o rinitis siguiendo a la inhalación de esporas de <i>Aspergillus</i> sp. El mucus puede obstruir la vía aérea y causar atelectasia. A menudo la enfermedad evoluciona a la constitución de bronquiectasias y fibrosis.</p> <p>Aspergiloma. Es una pelota fúngica que resulta de la colonización y desarrollo del hongo dentro de cavidades preexistentes (cavidades tuberculosas, bronquiectasias, quistes, etc)</p> <p>Aspergilosis pulmonar invasiva Es una infección fúngica que ocurren en pacientes inmunodeprimidos. Como el germen tiene un importante tropismo vascular ocasiona trombosis y necrosis isquémica con la consecuente formación de cavidades. Según el grado de deterioro inmunitario puede adoptar la forma crónica o aguda.</p> <p>Aspergilosis necrotizante crónica del pulmón o forma semi-invasiva. Se observa en personas de edad avanzada enfermedad pulmonar</p>	<p>Nominal</p>	<p>Aspergilosis alérgica</p> <p>Aspergiloma</p> <p>Aspergilosis necrotizante</p> <p>Aspergilosis invasiva aguda del pulmón.</p>
---	---	----------------	---

	<p>subyacente como tuberculosis inactiva, EPOC, bronquiectasias, sarcoidosis, neumoconiosis</p> <p>Aspergilosis invasiva aguda del pulmón. Es una complicación grave de cierto grupo de pacientes inmunodeprimidos, a menudo fatal aunque su diagnóstico sea hecho en vida y el enfermo tratado. El factor de riesgo más importante para esta forma de enfermedad es la granulocitopenia severa y prolongada, lo que se observa especialmente en pacientes sometidos a tratamiento intensivo de leucemia aguda y en receptores de transplantes. La enfermedad es rápidamente progresiva.</p>		
--	---	--	--

5.5 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El estudio puede ser considerado como una investigación sin riesgo (Artículo 11, numeral A) según la resolución No. 008430 de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud (Constitución 1991, Ley 23 1981), debido a que es un estudio retrospectivo que emplea cepas, provenientes de aislamientos de muestras clínicas.

El protocolo se ceñirá a las normas establecidas por las instituciones participantes. El personal responsable de la investigación es competente y cuenta con experiencia en el campo investigativo. La información recolectada para fines del estudio será estrictamente confidencial y una vez se recojan los datos por medio de los formatos de reporte de caso, serán conservados por uno de los investigadores principales

6. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

6.1 TABULACIÓN

Monitorización de la calidad de los registros fue realizada por parte de un investigador (JPRP) mediante revisión aleatoria de registros (10% del total de registros). Para la grabación de los registros se diseñó una base de datos en formato Access. En esta base de datos se incorporaron reglas de validación. Cada formato de reportes fue grabado en la base de datos. Con base en los resultados de la verificación se realizaron los ajustes en la base de datos.

6.2 PLAN DE ANÁLISIS

Análisis estadístico, tamaño de la muestra, criterios de inclusión y criterios de exclusión de los pacientes con cáncer del INC.

6.2.1 Análisis estadístico:

Para el análisis de los datos se utilizarán en primera instancia herramientas de estadística descriptiva. La información de los pacientes para determinar los factores de riesgo será captada a través de un formulario de forma prospectiva e ingresada en una base de datos por una persona capacitada para realizar la vigilancia.

6.2.2 Tamaño de la muestra

Lavado Broncoalveolar, número de muestras: 40

Suero, número de muestras: 40

Biopsia pulmonar, número de muestras: 13

6.3 DESCRIPCIÓN DE LAS INTERVENCIONES

La detección de la aspergilosis invasiva se realizó con la prueba del GM de *Aspergillus* que es una técnica inmunoenzimática en microplaca de tipo sándwich, que permite la detección semicuantitativa del antígeno circulante en suero humano y lavados broncoalveolares.

6.4 PROCEDIMIENTO (Anexo 14)

6.4.1 Recolección de Muestras: Establecer el paciente candidato para el procedimiento fibrobronscopico (Anexo 15).

6.4.2 En el momento de la toma de muestra:

1. Verificar que el paciente cumpliera con los criterios de inclusión en el estudio. Se tuvo en cuenta el consentimiento informado para incluirlo en el estudio (Anexo 12 y13)

2. Llenar la ficha: Recolección de la información, por paciente con todos los datos requeridos (Anexo 11)

3. Rotular adecuadamente los tubos de las muestras y los frascos de los LBA con nombre completo, cedula, historia clínica aclarando el servicio de atención del paciente.

4. Las muestras se recolectaron de la siguiente manera:

1. Numero de tubos: 1

2. Numero de frascos: 1

3. Tipo de tubos: sin anticoagulante, preferiblemente con gel.
4. Tipo de frascos: estériles para LBA
5. Centrifugar las muestras de sangre a 3300 rpm durante 10 minutos, separar el suero en un criovial estéril para su almacenamiento posterior en refrigerador a -20°C.

6.4.3 Procesamiento de la muestra de LBA y biopsia transbronquiales:

1. Tomar la muestra de LBA por medio de la fibrobroncoscopio (FR) de acuerdo al procedimiento establecido, el médico especialista decidió si era necesaria la toma de biopsia pulmonar (Anexo 4)
2. Realizar el montaje de la prueba de detección del antígeno de GM.
3. Los resultados obtenidos con el montaje del GM, se analizaron junto con los demás datos obtenidos de otras muestras, para conocer como se comporta la prueba antigénica.
4. Se realizaron coloraciones histopatológicas con el fin de identificar la presencia del *Aspergillus* por medio de coloraciones especiales tales como: PAS, hemotoxilina- eosina y GOMORY (Anexo 7 y 8)
5. Se sembró en agar Sabouraud y agar PAPA. (Anexo 5)
6. Se realizaron lecturas micológicas de acuerdo al protocolo establecido en la sección de micología médica para medios de cultivos.
7. En caso de crecimiento con características de *Aspergillus* sp, se realizó identificación microscopía con la preparación de azul de lactofenol y se identificó la especie del *Aspergillus* causante de infección micótica.

6.4.4 Procesamiento de la muestra de suero

1. Tomar la muestra de sangre y obtener por centrifugación el suero durante el inicio del procedimiento o después de realizada la fibrobroncoscopia al paciente.
2. Montaje de la prueba GM.
3. Lectura y análisis de los resultados obtenidos en el montaje del antígeno de galactomanano (Anexo 3)

6.4.5 Procesamiento de medios de cultivos

1. Se realizaron lecturas micológicas de acuerdo al protocolo establecido en la sección de micología médica, semanalmente con el fin de verificar el crecimiento de colonias de *Aspergillus sp.* También se descartó la presencia de contaminación de acuerdo con los resultados obtenidos en la detección de GM en LBA y suero (Anexo 5)
2. Se montaron preparaciones de lactofenol para el reconocimiento microscópico de estructuras características del agente etiológico involucrado en infección teniendo en cuenta las claves taxonómicas de identificación (Anexo 7)

7. RESULTADOS

En este estudio, entraron de acuerdo a los criterios de elegibilidad un total de 40 pacientes. La descripción demográfica de este estudio demostró que un 55% (n=22) fueron mujeres con un rango de edad entre 18 y 87 años encontrándose una mayor prevalencia en las personas entre los 68-77 que equivale al 25% de los pacientes en estudio. En cuanto al lugar de procedencia el 27.5%(n=11) eran de Bogotá y el 72.5%(n=29) procedían de otros lugares del país.

En el estudio de los diagnósticos oncológicos de dichos pacientes se observó que el cáncer de pulmón (32.5%, n=13) fue la neoplasia mas prevalente, seguido de cáncer de tiroides y leucemias (12.5%, n=5) (Figura 2)

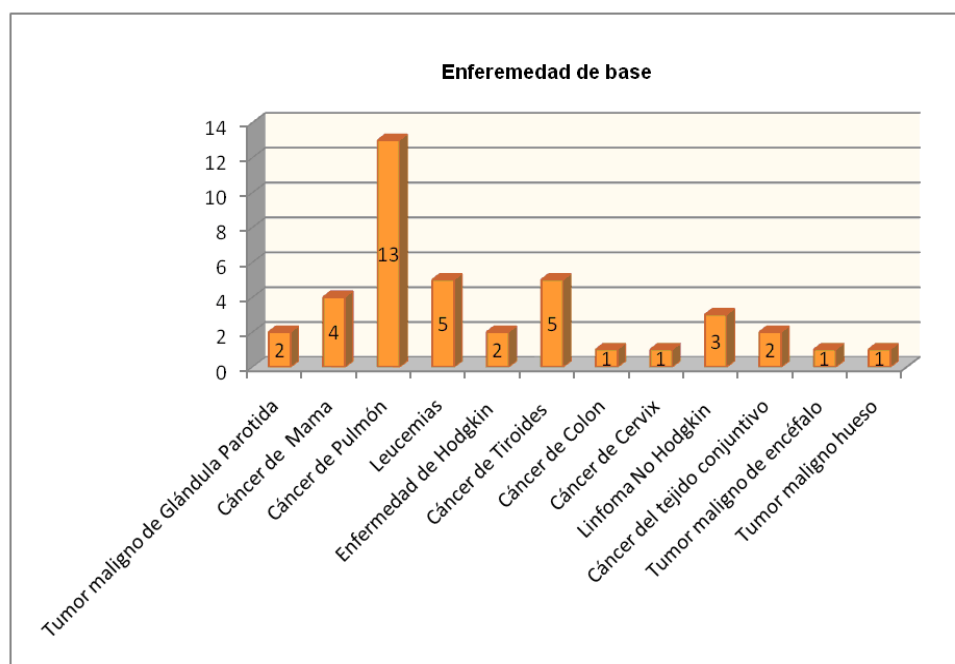


Figura 2. Frecuencia de las patologías oncológicas de los pacientes en estudio

*Leucemias: Promielocítica(n=1), Leucemia Mieloide Aguda (n=2), Leucemia Linfoide Aguda (n=2)

Siete de los 40 pacientes (17,5%) se encontraban hospitalizados en el momento del procedimiento, con una estancia hospitalaria promedio de 16 días (rango 8-40 días).

En el estudio de las características clínicas 7.5%(n=3) de los pacientes presentaban neutropenia y uno de ellos también presentó fiebre (Tabla 3).

Algunos de los pacientes estaban sometidos a tratamientos antibióticos (20%,n=8) como Meropenem que fue el más utilizado, seguido por Trimetropin/Sulfametazol, Ampicilina/Sulbactam y Piperacilina/Tazobactam (Tabla 4).

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes

CARACTERÍSTICA	SI	NO
Neutropenia	3	37
Fiebre	1	39
Antibiótico y/o Antifúngico	8	32

Tabla 4. Medicamentos suministrados a los pacientes en estudio

ANTIBIOTICO Y/O ANTIFUNGICO	FRECUENCIA
Meropenem (Neutropénicos)	3
Ampicilina/Sulbactam	2
Trimetropin/Sulfametaxazol	2
Anfotericina B	2
Voriconazol, Anfotericina B	1
Piperacilina/Tazobactam, Trimetoprim/Sulfametoxazol	1

Respecto a los factores que la literatura define como de riesgo (4), observamos que la totalidad de los pacientes neutropénicos tenían antibioterapia previa.

Se encontró una tendencia significativa a aumentar el nivel de asociación a medida que se incrementa el número de días con antibiótico (Prueba para OR de tendencias, $\chi^2(1)=4,75$; $P = 0,0294$) (chi cuadrado, $p>0,05$). Para los otros factores descritos como de riesgo, no se encontró asociación significativa (chi cuadrado, $p>0,05$)

También se observaron las imágenes radiológicas y la presencia o no de algún tipo de anomalía que reflejara una patología infecciosa. Se revisaron los Rayos x de tórax y la tomografía de alta resolución. Los hallazgos anormales se clasificaron en dos: nódulos o infiltrados, ya que suelen ser mas frecuentemente asociados a la infección micótica por *Aspergillus* sp; y otros hallazgos. Se observó que un 62.5%(n=25) presentan sus imágenes nódulos o infiltrados (Figura 3)



Figura 3. Hallazgos imagenológicos presentes en los pacientes en estudio

* Masa pulmonar (n=4), Atelectasia pulmonar (n=3), Aumento del volumen pulmonar (n=1), Edema pulmonar (n=1), Lesión metastásica (n=2), Derrame pleural (n=1), Engrosamiento de la pleura (n=1), Cambio por cirugía (n=1), Reforzamiento de la trama intersticial (n=1)

Con relación al estudio histopatológico, de las muestras de biopsias, la totalidad fueron negativas para estructuras micóticas compatibles con *Aspergillus sp.* Se hicieron un total de 13 biopsias, a las cuales se les realizó coloraciones histopatológicas PAS y Gomory (Tabla 5).

Tabla 5. Cantidad de resultados positivo/negativos de Citología de LBA para *Aspergillus sp* e histopatología de biopsia

EXAMEN	NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
Citología De LBA para <i>Aspergillus sp.</i>	40	0	40
Histopatología De Biopsia	13	0	13

En cuanto al aislamiento del agente etiológico de las 40 muestras sembradas en cultivo microbiológico para el aislamiento de hongos miceliales, tenemos un total de 10%(n=4) positivos (Figura 4) para *Aspergillus sp* aislados, que corresponden 75%(n=3) *A. fumigatus* y 15%(n=1) *A. niger* (Tabla 6).

De los cultivos negativos para *Aspergillus sp* (n=36) se aislaron en 3 de ellos levaduras correspondientes a *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae* y *Rhodotorula*, los demás aislamientos fueron negativos para microorganismos.

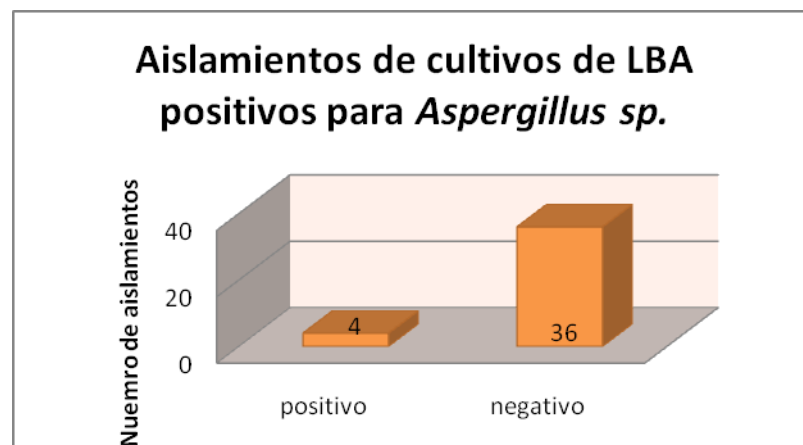


Figura 4. Resultados de cultivos de LBA de los pacientes en estudio

Tabla 6. Agente etiológico aislado de los cultivos positivos para *Aspergillus* sp. en el LBA

CULTIVO MICROBIOLÓGICO	Aislamientos positivos	%
<i>A. fumigatus</i>	3	75
<i>A. niger</i>	1	15
<i>A. flavus</i>	0	0
<i>A. terreus</i>	0	0

En relación al estudio de los títulos antigénicos tanto de LBA como de suero; 22.5%(n=9) fueron positivos en LBA (Tabla 7), 5%(n=2) en suero (Tabla 8) y solo un paciente tuvo los títulos de galactomanano en LBA y suero (Figura 5).

Tabla 7. Títulos antigénicos de galactomanano en LBA de pacientes en estudio

Antígeno de galactomanano en LBA	Pacientes	%
Negativo (< 0.200)	14	35
Intermedio (0.200 - 0.500)	17	42.5
Positivo (> 0.500)	9	22.5
TOTAL	40	100

Tabla 8. Títulos antigénicos de galactomanano en suero de pacientes en estudio

Antígeno de galactomanano en suero	Pacientes	%
Negativo (< 0.200)	27	67,5
Intermedio (0.200 - 0.500)	11	27.5
Positivo (> 0.500)	2	5
TOTAL	40	100

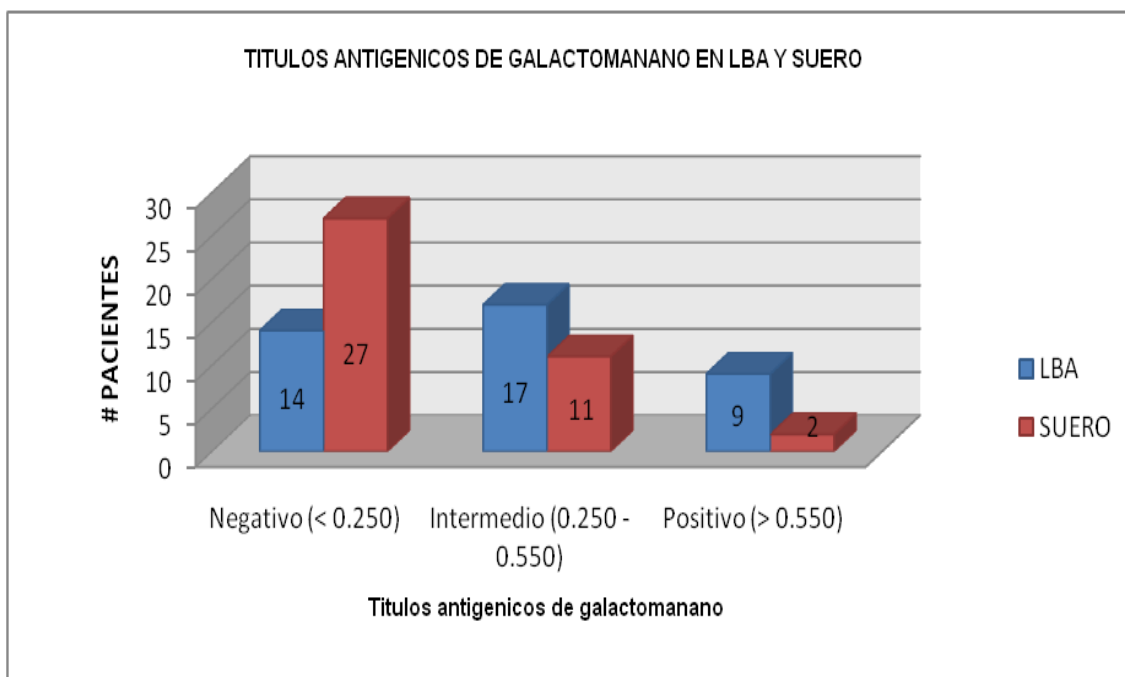


Figura 5. Títulos antigénicos de galactomanano en LBA y suero de los pacientes en estudio

En relación a un paciente que tuvo títulos positivos en LBA y suero se confirmó por los antecedentes clínicos, terapéuticos y los resultados de los títulos antigénicos para galactomanano, que estaba recibiendo tratamiento con piperacilina/tazobactam el día de la toma de muestras, clasificándolo como un caso de falso positivo.

De la detección de títulos de galactomanano en LBA que se obtuvieron positivos y la observación de los cultivos de LBA en los que se aisló *Aspergillus sp.* Se observó que de los 9 pacientes con títulos antigénicos positivos, solo un paciente presentó positivo el cultivo y el GM en LBA (Tabla 9)

Tabla 9. Relación de resultados de títulos de galactomanano en LBA y cultivos de LBA

Cultivo de LBA	GA EN LBA			TOTAL
	Neg.	Int.	Pos.	
Negativo	14	15	7	36
Positivo	1	2	1	4
TOTAL	15	17	8	40

Al comparar los resultados obtenidos de galactomanano en LBA y suero encontramos, que de un total de 40 muestras analizadas se presentaron 13 (32,5%) negativas en LBA y suero, 7 (17,5%) intermedias para LBA y suero, y solo un paciente presenta los títulos de GA positivos en las dos muestras siendo únicamente el 2,5% del total de pacientes en estudio (Figura 6).

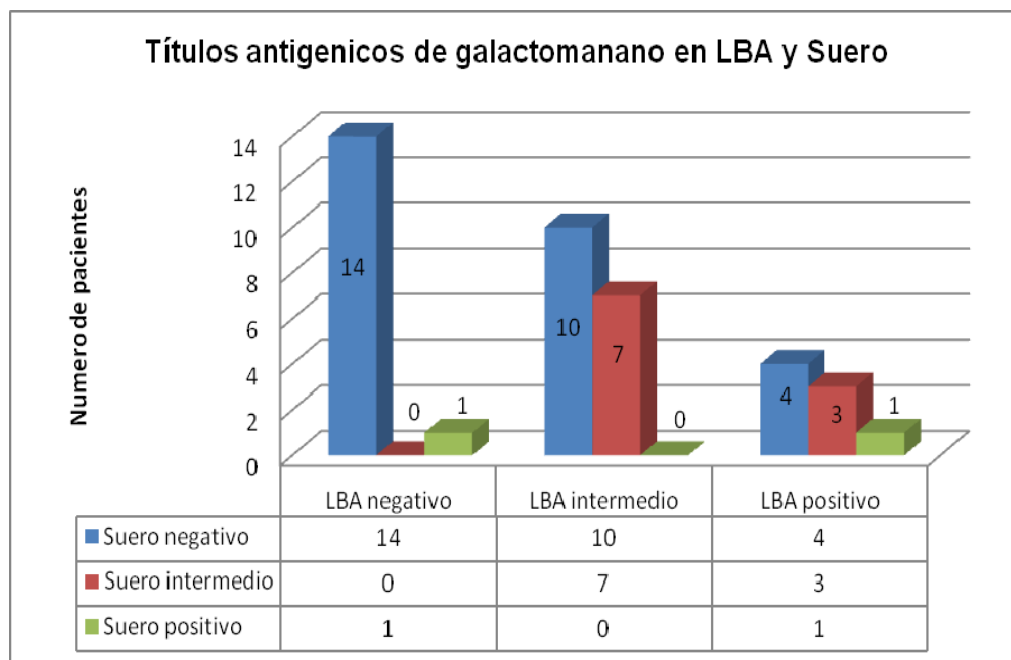


Figura 6. Detección de los títulos antigenicos de galactomanano en LBA y suero de los 40 pacientes en estudio

En cuanto a los hallazgos imagenológicos en los pacientes que presentaban nódulos o infiltrados (n=25) y los resultados de los títulos antigénicos de LBA, se observó que de los 8 LBA con títulos positivos, 5(20%) presentaron como hallazgo nódulos o infiltrados en la y los dos pacientes con títulos positivos en suero tenían como hallazgo radiológico nódulos o infiltrados (Figura 7).

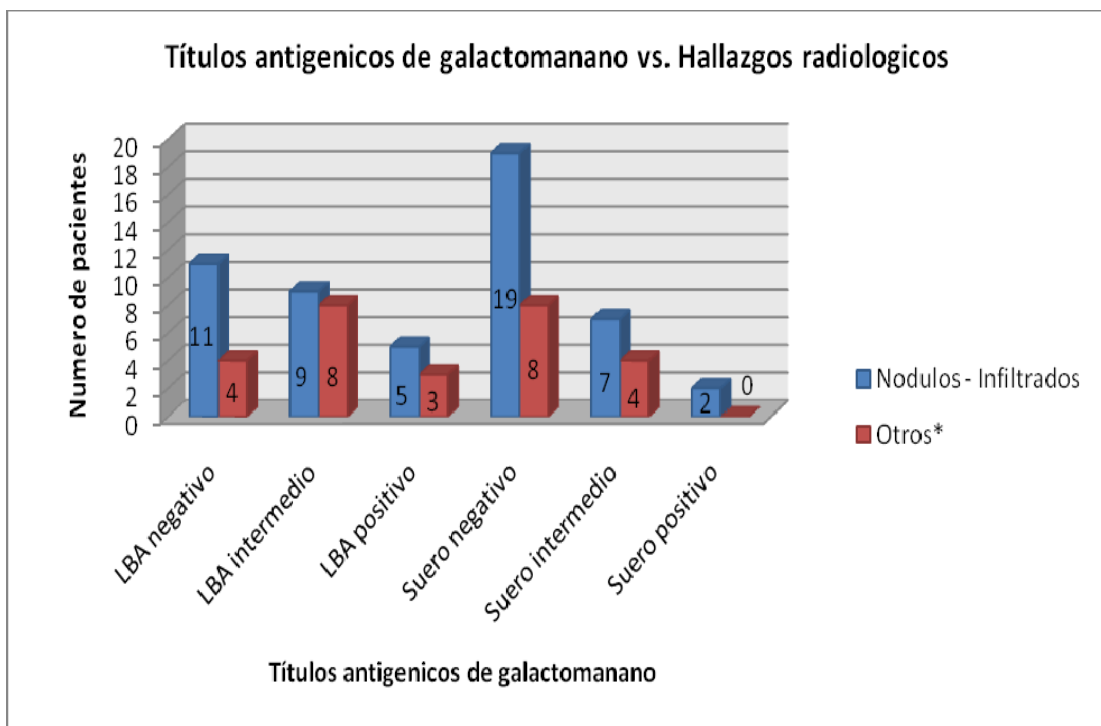


Figura 7. Relación entre títulos de antígeno de galactomanano e imágenes radiológicas

Respecto a los 3 pacientes neutropénicos que presentaron riesgo de aspergilosis, se puede observar la siguiente tabla (Tabla 10) resumen con los resultados obtenidos.

El paciente 5 era neutropénico febril, presentaba títulos positivos en LBA e intermedios en suero a pesar de estar sometido a tratamiento antimicótico.

El paciente 14 tenía una aspergilosis posible, a pesar que presento títulos negativos de galactomanano era neutropénico y estaba bajo tratamiento con 2 antimicóticos diferentes.

Tabla 10. Resumen de pacientes que presentaron riesgo de aspergilosis invasiva

PACIENTE	PATOLOGÍA DE BASE	IMAGEN	PIPTAZ*	GM EN LBA	GM EN SUERO	CULTIVO LBA	CRITERIO EORTC	ANTIMICOTICO
5	Leucemia promielocítica Neutropenia Febril (420neu/mm ³)	Infiltrados	Ausente	Positivo 0.564	Intermedio 0.326	Negativo	Posible	Anfotericina B 50 mg polvo inyección 50 MG EN 250 CC DAD EN SEIS HORAS (7d)
6	Leucemia mieloide aguda Neutropenia (210neu/mm ³)	Nódulos	Ausente	Positivo 0.523	Intermedio 0.407	Negativo	Probable	Anfotericina B 50 mg polvo inyección 50 mg iv en 250 cc DAD 5% pasar en 6 horas (5 dias)
14	Leucemia mieloide aguda Neutropenia (380neu/mm ³)	Infiltrados	Ausente	Negativo 0.213	Negativo 0.213	Negativo	Posible	Anfotericina B 50 mg polvo inyección(7d) +Voriconazol 200mg tableta-12h (4d)

*Piptaz: Piperacilina/Tazobactam

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En estos últimos años se ha estudiado el diagnóstico (con independencia del cultivo) de la aspergilosis invasiva mediante una técnica tipo ELISA que detecta galactomanano (Platelia®*Aspergillus*)(18,22). Las muestras accesibles podrían permitir establecer el diagnóstico por cultivo, ya que los síntomas clínicos y muchas veces los radiológicos son poco específicos y es necesario que en los pacientes, se instaure un tratamiento en forma inmediata (50).

En los últimos tiempos la detección antigénica de galactomanano es una de las formas de diagnóstico más útil en suero y según algunos estudios en LBA, que en muchos casos nos permite comparar los datos y adelantarnos hasta 5 días en el diagnóstico de las aspergilosis invasivas (25). Otra de las ventajas de esta técnica radica en la posibilidad de monitorización de los niveles de GM durante el tratamiento, asociándose un descenso de los mismos a la eficacia del tratamiento (2).

El diagnóstico de la AI se basa en la detección de antígenos circulantes de *Aspergillus* sp en diferentes muestras clínicas (suero y LBA). La detección de galactomanano mediante ELISA presenta, según la literatura consultada, una especificidad de 87- 99% y sensibilidad de 50-90% cuando se utiliza 0.5 como punto de corte (46, 50, 51). A pesar de esto se pueden presentar falsos positivos cuando se suministran antibióticos como piperacilina/tazobactam (52, 53). En nuestro estudio uno de los pacientes estaba en tratamiento con este antibiótico, por lo tanto se tubo en cuenta el estado clínico del paciente y los demás resultados obtenidos en este estudio, lo que nos contribuyó a

mostrar, al igual que otros estudios, que se trataba de falsos títulos positivos de galactomanano en LBA y suero.

Según Husain S y colaboradores, utilizando como índice de corte 0,5 para la detección en galactomanano en LBA, en la determinación de dichos títulos establecieron que la sensibilidad del 60% y una especificidad del 95%, siendo mayores a las halladas en suero en su estudio, permitiéndole un mayor rendimiento diagnóstico la detección galactomanano en el LBA (22). En nuestro estudio el 22.5% de los LBA tuvieron títulos antigénicos positivos y solo un 5% de sueros positivos, de estos porcentajes los pacientes que presentaron riesgo de contraer aspergilosis presentaron 5% con títulos positivos en LBA e intermedios en suero, lo que nos indica que los títulos de GM en LBA pueden presentarse más altos y ser significativo su resultado si hay existencia de riesgo de contraer aspergilosis.

En relación a la enfermedad de base podemos señalar que solo un 25% de los pacientes presentaban como enfermedad de base cánceres hematológicos, que según Verweij y colaboradores, la aspergilosis invasiva es una importante amenaza en pacientes con leucemia que reciban terapia que induzca neutropenia y en receptores de transplante con altas dosis de corticosteroides (44). En nuestro estudio únicamente un 7% de los 40 de los pacientes, presentaba neutropenia y un paciente de dicho porcentaje present'o estado febril, presentado los tres enfermedades hematológicas.

El cultivo de muestras estériles procedentes de una fibrobroncoscopia en este caso LBA y biopsias de pulmón, son útiles en pacientes en riesgo por que de estar presente el agente etiológico acusante de aspergilosis invasiva en los cultivos, confirma la enfermedad micótica (4,50). En las aspergilosis invasivas los cultivos son positivos para hongos del genero *Aspergillus sp* (6). En nuestro estudio se obtuvo un 10% positivo para crecimiento de

miceliales compatibles con *Aspergillus* sp que corresponde el 75% *A. fumigatus*. Esto se correlacionó con los estudios internacionales, que muestran que al igual que en nuestro estudio, el agente etiológico más comúnmente aislado es el *A. fumigatus*, seguido de *A. flavus* y *A. niger* (5,22) La identificación de la especie es importante no sólo por su trascendencia epidemiológica, sino también por la diferente sensibilidad que algunas especies de *Aspergillus* sp pueden presentar ante los antifúngicos sistémicos, lo que facilita la elección del tratamiento adecuado según sea la especie aislada (9).

La presencia de *Aspergillus* en el LBA de pacientes neutropénicos es sugestiva de infección pulmonar, en caso de aislamiento en otras circunstancias como en las de nuestro estudio en las que el 93% de los pacientes no eran neutropénicos, debe considerarse como colonizadores del tracto respiratorio bajo (*Candida* sp o *Aspergillus* sp)(20).

El diagnóstico de la aspergilosis debe basarse como en todo proceso infeccioso, en la sospecha clínica inicial y acompañarse de técnicas de imagen lo suficientemente sensibles (15) tales como radiografía de tórax o tomografía de alta resolución. El *Aspergillus* sp es un común agente etiológico en anomalías en imágenes radiológicas, presentándose con infiltrados y nódulos pulmonares en ocasiones rodeados por un área de baja atenuación lo que le confiere un aspecto conocido como el signo de halo(8,22). En nuestro estudio el 62% de los pacientes presentaron como hallazgo radiológico nódulos o infiltrados, de este porcentaje 12.5% ellos tuvieron los títulos antigénicos de GM en LBA positivos y 7.5% presentaron alto riesgo de parecer aspergilosis invasiva.

Observamos que los títulos de galactomanano de *Aspergillus* en LBA y suero están muy relacionados, viendo que los títulos en LBA pueden aparecer antes y ser más altos que los títulos séricos, por estar más directamente en contacto con el sitio de la infección micótica, pero se deben tener otros hallazgos clínicos, para poder llegar al diagnóstico de las aspergilosis invasivas, puesto que los signos son inespecíficos (4,15,51).

Al relacionar los títulos antigénicos de LBA y suero, el resultado del cultivo de LBA, la enfermedad de base, los hallazgos radiológicos y los resultados obtenidos en la histopatología y citología, podemos observar que hubo 3 pacientes que tenían alto riesgo de aspergilosis invasiva. Tenían como enfermedad de base cánceres hematológicos, presentaban neutropenia y uno de ellos fiebre, como hallazgos radiológicos infiltrados o nódulos pulmonares y se presentaron títulos de GM en LBA positivos y suero intermedios, probablemente no fueron positivos en el momento de la toma de muestra porque los pacientes tenían tratamiento con anfotericina B y Voriconazol.

Los pacientes hematológicos presentan distintos tipos de inmunodepresión (neutropenia) dependiendo de la enfermedad que padecen, del momento evolutivo y del tratamiento que hayan recibido. Cada tipo de inmunodepresión genera un riesgo de infección distinto y predispone a tipos relativamente seleccionados de agentes etiológicos. Los gérmenes responsables son habitualmente ubicuos y no suelen producir infección en sanos, por lo que se conocen como gérmenes oportunistas (aspergilosis), en estudios realizados por M.C. Mateos, y colaboradores, en pacientes oncohematológicos no trasplantados, del 5-25% de los pacientes con neutropenia presentaron aspergilosis invasiva (56) estando los pacientes no neutropénicos, sin riesgo de aspergilosis invasiva.

La adición de tratamiento antifúngico empírico al régimen antimicrobiano redujo la incidencia de esta complicación. Desde entonces es una práctica habitual añadir antifúngico a todo paciente neutropénico que continúa con fiebre tras un tratamiento antibiótico de amplio espectro durante 4-6 días (All). El factor de riesgo más importante para el desarrollo de una micosis invasiva es la neutropenia prolongada. El voriconazol se metaboliza en el hígado vía citocromo P450, lo que explica su elevado potencial de interacciones medicamentosas(56). Tiene un amplio espectro antifúngico. Se ha demostrado que al comparar la eficacia de voriconazol frente a anfotericina B en pacientes con aspergilosis invasiva, el voriconazol era más eficaz y además reducía de manera significativa la mortalidad en los pacientes que lo recibieron, utilizándose como tratamiento primario(55). En nuestro estudio encontramos que uno de los pacientes se encontraba en tratamiento con voriconazol y anfotericina B y dos se encontraban en tratamiento solo con anfotericina B, por esa razón los títulos de galactomano estaban disminuidos.

La Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas, han realizado numerosos ensayos de la detección de galactomanano en suero permite además realizar un seguimiento del tratamiento antifúngico, ya que el aumento de su valor ($>1,0$ ng/ml) sobre el inicial en la primera semana de tratamiento predice un fallo terapéutico con una sensibilidad del 44%, una especificidad del 87% y un valor predictivo positivo del 94% (23). Por ello, se puede considerar al galactomanano como un marcador que permite establecer el pronóstico de tratamiento de la aspergilosis invasiva y puede servir para modificarlo o añadir un segundo fármaco con el objeto de potenciar o mejorar la eficacia del antifúngico inicialmente elegido (23). En el estudio uno de los pacientes con un cáncer hematológico y neutropénico presentaba el título antigénico de GM en suero y LBA negativos, con tratamiento de anfotericina B y voriconazol, comprobando de tal manera lo

visto en la literatura, indicándonos que el tratamiento antifúngico instaurado está teniendo éxito.

En un estudio realizado por Martin J. Becker, basado en la detección de antígeno de GM en LBA en pacientes con riesgo de presentar aspergilosis, clasificados en según los criterios EORTC y NIAID, un total de 10.6% probable y 11.1% con aspergilosis probada, en nuestro estudio obtuvimos un total de 5% probable y 2.5% posibles, la población es muy pequeña debido a que la mayoría de pacientes, no presentaban riesgo de tener aspergilosis, criterio necesario para poderlos clasificar dentro de los EORTC. No obtuvimos ninguna aspergilosis probada de los pacientes en riesgo, ya que a ninguno se le tomo biopsia transbronquial para confirmarla, pero a pesar de ello se les instauro tratamiento antimicótico(4,55).

El tamaño de la muestra ideal, fue calculado con el programa Epidat 3.0, para hallar la cantidad de pacientes necesarios para determinar una sensibilidad de 90% y especificidad del 95%, con grados de error entre el 5 y 7%.

Tabla 11. Tamaño de muestra ideal para determinar la sensibilidad y especificidad

Precisión (Grado de error)	Enfermos	Sanos	Total
5%	114	342	456
6%	79	237	316
7%	58	174	232

9. CONCLUSIONES

La detección de antígeno de GM en LBA, por medio de la técnica Platelia®*Aspergillus*, no es gran utilidad para diagnóstico de aspergilosis en una muestra heterogénea debido a la falta de criterios clínicos necesarios para evidenciar la aspergilosis invasiva.

La detección de antígeno de GM en LBA y suero, en pacientes hematológicos y neutropénicos, es útil para la determinación de aspergilosis invasiva como criterio microbiológico determinado en los criterios EORTC y NIAID, en casos definidos como de alto riesgo para desarrollar aspergilosis invasiva.

Con respecto a la sensibilidad y especificidad encontrada en la literatura de la detección de antígeno de galactomanano en LBA utilizando como índice de corte 0,5, la sensibilidad del 60% y una especificidad del 95%, permitiéndole un mayor rendimiento diagnóstico en la detección galactomanano en el LBA unido a la detección de títulos en suero.

La presencia de *Aspergillus* sp en cultivos microbiológicos como se citó en la bibliografía, aún sigue siendo cuestionada debido a los colonizadores del tracto respiratorio bajo, aunque se puede comprobar la colonización, porque los títulos antigénicos de galactomanano en LBA y suero se pueden presentar negativos.

A igual que se demostró con nuestros pacientes, como en la literatura, que al suministrar antibióticos como piperacilina/tazobactam a los pacientes pueden presentar falsos positivos, en los títulos de antígeno de galactomanano en LBA y suero.

10. RECOMENDACIONES

La continuidad con el análisis de la detección de antígeno de galactomanano por medio de la técnica Platelia®*Aspergillus* en pacientes a quienes se les realice una fibrobroncoscopia y estén en riesgo de tener aspergilosis invasiva.

Utilizar solo una subpoblación de pacientes (oncohematológicos y receptores de trasplantes de precursores hematopoyéticos) ya que, en otras poblaciones no se pueden aplicar rigurosamente los criterios (enfermos críticos no neutropénicos, receptores de trasplante de órganos sólidos, pacientes con SIDA o con enfermedad granulomatosa crónica, etc)

11. REFERENCIAS

1. Palacio A. 2003. Definiciones de aspergilosis invasora (consenso EORTC y NIAID). Aspergilosis invasora. Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid Rev iberoamericana de micología 21-26
2. Jarque I, Andreu R, Salavert M 2003. Valor de la detección del antígeno galactomanano de *Aspergillus* en el diagnóstico y seguimiento de la aspergilosis invasora en pacientes hematológicos. Rev Iberoam Micol; 20: 116-118.
3. Palacio A. Cuétara S, Pontón J. 2004 Microbiología médica. Universidad del País Vasco, Bilbao. España.
4. 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.
5. Pazos C .Marzo del 2004. Diagnóstico de micosis invasoras, detección de antígeno de galactomanano. Hospital universitario de madridm revista vol 17 nº1 : 79-82 Pag 1-4
6. Perez J. 2000; Diagnóstico de la aspergilosis invasiva. Unidad de Micología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Rev Iberoam Micol Pág. 1-3
7. Palacio A, Cuétara M, Pontón J. 2003, La aspergilosis invasora. El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora Rev Iberoam Micol; 20: 77-78
8. España P. Diagnóstico de aspergilosis pulmonar invasiva y semiinvasiva. Sociedad Vasco Navarra de Patología Respiratoria, Servicio de Neumología del Hospital de Galdakao. Pag 1- 13
9. Martín J, Sevilla R. 1994 Guías de procedimientos de lavado brocoalveolar, Neumosur: revista de asociación de neumólogos del sur.VolL.6, No 2, Sep
10. Alcalá L, Muñoz P, Peláez T y Bouza E. 2005 Servicio de Microbiología Clínica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid; *Aspergillus* y aspergilosis, Control de Calidad SEIMC

11. Zambrano A, Biere A, Isamitt D 2007. Instituto Nacional del Tórax, Aspergilosis necrotizante crónica en un paciente con secuelas de tuberculosis pulmonar Instituto Nacional del Tórax. Rev Chil Enf Respir; 23: 43-48)
12. Braselli A. Directora de Clínica de Enfermedades Infecciosas; Aspergilosis Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay <http://www.infecto.edu.uy/espanol/revisiontemas/tema8/aspertema.htm>
13. Montejo M 2002. Infección invasora por *Aspergillus* y otros hongos filamentosos en enfermos con trasplante de órgano sólido. Rev Iberoam Micol; 19: 9–12. Abarca
14. Lourdes M. 2000; Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Rev Iberoam Micol 17: S79-S84 S79
15. Sulahian A, Tabouret M, Ribaud P 1996. Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for detection of galactomannan in the diagnosis of invasive aspergillosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 15: 139.
16. Saballs P, López J, Gimeno J y Knobel H 2000 Tratamiento de la aspergilosis invasiva; Rev Iberoam Micol; 17: S93-S96
17. Palacio A, Alhambra A, Cuétara S y Pontón J. 2007 Estado actual del diagnóstico precoz de las infecciones invasoras causadas por *Aspergillus* y otros hongos filamentosos emergentes; Rev Iberoam Micol; 24: 187-197
18. Merz W, Roberts G. 2002 Algorithms for detection and identification of fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al editors. Manual of Clinical Microbiology. 8th edition. Washington DC, American Society for Microbiology: 1668-85.
19. Ruiz E, Pérez F, Córdón J, Torres A 2004. Fibrobroncoscopia. Revista española de neumología; 6: 273-279
20. Borja F, Del Campo C, Cuero E, Diaz M 2007. Procesamiento y tinción de lavado broncoalveolar. IX Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica y II Congreso de preparaciones Virtuales por Internet. Foto técnica No 978.
21. Penan J, 2003 Diagnóstico anatomopatológico de aspergilosis invasora. Revista Iberoamericana de micología. Asociación española de micología. 42-46.

22. Husain S, Paterson D, Studer S, Crespo M, Pilewski J, Durkin M., Wheat J, Johnson B, McLaughlin L, Bentsen C, R. McCurry K, Singh N. Aspergillus Galactomannan Antigen in the Bronchoalveolar Lavage Fluid for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Lung Transplant Recipient
23. Vargas S, Silva V. Aspergillus y aspergilosis. Aspergilosis. Revista iberoamericana de micología. Capitulo XX V. 348 Micología
24. Perez J, Perez E, Cordon A. Fibrobroncoscopia pediátrica. BSCP Can Ped 2004; 28 – N°1
25. Marr K, Balajee S, McLaughlin L, 2004. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis, J Infect Dis; 190: 641.
26. Valdivia, Pedro Laboratorios linsan S.A. 2006. Agar papa dextrosa para hongos y levaduras <http://www.lablinsan.cl/productos/page20.htm>
27. Microscopia Azul de lactofenol en solución Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 2004 <http://www.newsabo.merck.de/servlet/PB/show/1234910/113741es.pdf>
28. Ellis D. Aspergillus fumigatus The University of Adelaide Last Modified 2008 Microdiagnóstica sistema desechable para cultivos microbiológicos medios selectivos - anaerobios - alimentos <http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/photos/aspergillus10.gif> (consulta 01/11/2008)
29. Thomas J. Volk, Aspergillus flavus Copyright 2003-2006 http://images.google.com.co/imgres?imgurl=http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/images/a-flavus.jpg&imgrefurl (consulta 01/11/2008)
30. Todar Kennet *Aspergillus nidulans* 2006. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology http://images.google.com.co/imgres?imgurl=http://www.bact.wisc.edu/the_microbialworld/Asp.nidulans.jpg (consulta 01/11/2008)
31. Friedman D. Aspergillus niger 2005. <http://images.google.com.co/imgres?imgur=http://www.inspect-ny.com/mold/Aspergillus-nigerDF2.jpg> Susceptibilidad in vitro de hongos miceliales aislados de pacientes con cáncer en el instituto nacional de cancerología, anexo 4 (consulta 01/11/2008)

32. Chávez J. 2004 Cundinamarca Susceptibilidad in vitro de hongos miceliales aislados de pacientes con cáncer en el instituto nacional de cancerología. Bacteriología de la Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias básicas, Bogota.
33. González R, Funke R, Saldías R, Alarcón E, Gyhra A, Stockins A, Seguel E, Gutiérrez G 2005. Resultados y utilidad de la biopsia pulmonar quirúrgica. Rev. Chilena de Cirugía volumen 58 n° 2 Pág. 109 - 112
34. Álvarez K, Algar A, Salvatierra V, López PI. Biopsia pulmonar en el diagnostico de la enfermedad pulmonar difusa: abierta versus videotoroscopia a. servicio de cirugía torácica. Córdoba y utilidad de la biopsia pulmonar quirúrgica cols 109
35. Puras M, Echegoyen A y Almudevar E 2005, La biopsia pulmonar transbronquial. Su utilidad diagnóstica. Servicio de Anatomía Patológica.- Hospital Virgen del Camino. Pamplona. 1- 5
36. Pemán J, 2003 ¿Qué se puede esperar del diagnóstico anatomopatológico de la aspergilosis invasora? Revista iberoamericana de micología 42-46
37. Borja F, Del Campo Clemente Consuelo, Cuero Ruiz Elisa, Diaz Foncea Maria Gloria, 2007 Procesamiento y tinción del lavado broncoalveolar Hospital de Galdakao. ESPAÑA IX congreso virtual hispanoamericano de anatomía patológica y II congreso de preparaciones por Internet http://www.conganat.org/9congreso/trabajo.asp?id_trabajo=978&tipo=3
38. Azur-eosina-azul de metileno según Giemsa para microscópica Coloración de giemsa Mayo 2004 1.00820 Metenamina kit de plateado según Gomori <http://www.merck.de/servlet/PB/show/1239500/109204109203es.pdf> Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
39. Sabillón N, Antúnez H, Berríos R, Diciembre; 2006 Departamento de Patología Aspergilosis invasiva: Reporte de un caso, Patólogo. Rev med homdur 1-4
40. Biopur diagnostic, Agosto 2004 Coloración de Pas Merck art. nro. 1.01646 <http://biopur.com.ar/htsp.htm> Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemania
41. Metenamina kit de plateado según Gomori para microscopia Mayo 2004 <http://www.financialreports.merck.de/servlet/PB/show/1248410/100820s.pdf> Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemania

42. Rivas P, Cuervo S, Mejía M, Grupo de Patología, Diagnóstico histopatológico de micosis invasivas en el paciente inmunocomprometido del Instituto Nacional de Cancerología. Bogotá, Colombia.
43. Verweij P, Latge J. 1995. comparison of antigen detection an PCR Assay Using Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients Receiving Treatment for Hematological Malignancies. Journal of clinical Microbiology. Vol 33, N° 12
44. Lumbreras C. Gabaldá J. 2003. Aspergilosis invasora: manifestaciones clínicas y tratamiento. Revista Iberoamericana de Micología; 20: 79-89.
45. López Y, Torres J, Jiménez T 2005. Estudio de la sensibilidad in-vitro de aislamientos clínicos de mohos y levaduras a itraconazol y voriconazol. Revista iberoamericana de Micología; 22: 105-109
46. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, 1998. Aspergillus galactomannan etection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. Clin Oncol 2002; 20:
47. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E. 2004 Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. Br J Haematol; 126: 852.
48. Bennett J, Friedman M, Dupont B 1987 . Receptor-mediated clearance of Aspergillus galactomannan. J Infect Dis; 155: 1005
49. Francis J, Wang K. Indications and contraindications in flexible bronchoscopy. Flexible Bronchoscopy. 2da Ed. Cap 8, 51 - 67
50. Musher B, Fredricks D, Leisenring W. 2004 Aspergillus Galactomannan Enzyme Immunoassay and Quantitative PCR for Diagnosis of Invasive Aspergillosis with Bronchoalveolar Lavage Fluid. Journal Of clinical Microbiology, Vol 42, N°12
51. Walsh T, Shoham S, Petraitiene R, Sein T, Schaufele R, Kelaher A, Murray H and Mya-San C. Detection of Galactomannan Antigenemia in Patients Receiving Piperacillin-Tazobactam and Correlations between In Vitro, In Vivo, and Clinical Properties of the Drug-Antigen Interaction. J Clin Microbiol, Oct. 2004, p. 4744–4748 Vol. 42, No. 10.
52. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, Bucci B, Bruzzi P, Van Lint M. T, and Bacigalupo A. False-Positive Galactomannan Platelia *Aspergillus* Test Results for Patients Receiving Piperacillin-Tazobactam. Clin Infect Dis,

2004; 38:913–6.

53. Caillot D, Casasnovas O, Bernard A, Couaillier JG, Durand C, Cuisenier B, Solary E and Piard F. Improved Management of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Neutropenic Patients Using Early Thoracic Computed Tomographic Scan and Surgery. *J Clin Oncol*, Vol 15, No 1 Jan, 1997: pp 139-147.
54. Becker M, Lugtenburg E, Cornelissen J, Van der Schee C, Hoogsteden H and De Marie S. Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage fluid and serum in haematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *British Journal of Haematology*, 2003, 121, 448–457.
55. Walsh T, Anaissie E, Denning D. Treatment of the Aspergillosis: Clinical Practice Guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *IDSA Guidelines for Aspergillosis*. *Cid* 2008:46 (1 february)
56. M.C. Mateos M, Arguiñano J, Ardaiz M, Oyarzábal F. Infecciones en pacientes oncohematológicos no trasplantados Servicio de Hematología y Hemoterapia. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2005 Vol. 28, N° 1, enero-abril

12. ANEXOS

Anexo 1. CRITERIOS EUROPEAN ORGANIZATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER (EORTC)

Patrón de referencia (*gold standard*) que permite establecer de forma probada en enfermos cancerosos e inmunodeprimidos la existencia de infección fúngica invasora por hongos filamentosos(2)

Tabla 1. Factores del huésped
<ol style="list-style-type: none">1. Neutropenia < 500 neutrófilos/mm³ > 10 días.2. Fiebre persistente (> 96 h) refractaria a antibióticos de amplio espectro en pacientes de alto riesgo.3. Temperatura > 38 °C o < 36 °C y alguno de los factores predisponentes:4. Neutropenia (> 10 días) en los 60 días anteriores5. Uso de inmuosupresores en los 30 últimos días.6. Infección fúngica invasora (probada o probable) durante un episodio neutropénico previo.7. Coexistencia de SIDA sintomático. Signos y síntomas de enfermedad injerto contra huésped severa (grado 2) o enfermedad extensa crónica.8. Uso prolongado (3 semanas) de corticosteroideos en los 60 días previos. (2)

Tabla 2. FACTORES MICROBIOLÓGICOS
<ol style="list-style-type: none">1. Cultivos positivos2. Microscopia directa positiva3. Antigenemia positiva para <i>Candida</i> y/o <i>Aspergillus</i>

Tabla 3. CRITERIOS CLINICOS
Relacionado con el sitio del criterio microbiológico y relacionado temporalmente con el episodio actual. (2)

Tabla 4 CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LAVADO BRONCOALVEOLAR
Cultivo microbiológico positivo para el lavado broncoalveolar
Antígeno de galactomanano positivo en lavado broncoalveolar
Citología y microscopia directa del lavado broncoalveolar (9)

ANEXO 2. DEFINICIÓN DE ASPERGILOSIS INVASORA. CONSENSO EORTC Y MYCOSES STUDY GROUP DEL NIAID (NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES) DE EE.UU.

Invasión tisular: La presencia histo/citopatológica de hifas tabicadas (Figura 1) procedentes de aspiración con aguja o biopsia (Figuras 2 y 3) con evidencia (microscópica o por imagen) de daño tisular asociado. (2)

Tabla 1. Aspergilosis invasora (consenso EORTC y NIAID)

Infección fúngica invasora probada por <i>Aspergillus</i> sp.	Cultivo positivo de <i>Aspergillus</i> sp. Procedente de una muestra (obtenida por procedimiento Estéril) de una localización habitualmente estéril donde existen datos clínicos o radiológicos compatibles (excluyendo orina y mucosas) (Figuras 4 y 5).
--	---

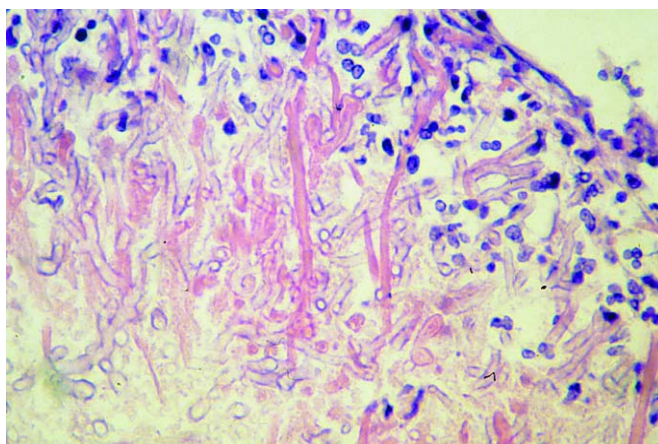


Figura 1. Infiltrado de la dermis con células de aspecto blástico con penetración intravascular de hifas tabicadas en aspergilosis cutánea primaria por *Aspergillus fumigatus*.

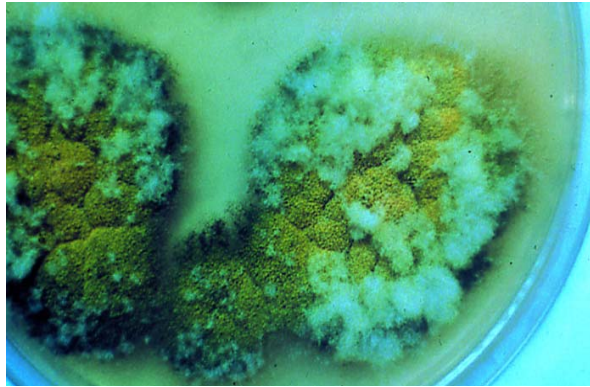


Figura 2. Aspecto macroscópico de cultivo de *Aspergillus flavus* en agar glucosado de Sabouraud con cloranfenicol. Incubación de 48h a 37 °C, procedente de biopsia de paladar blando.

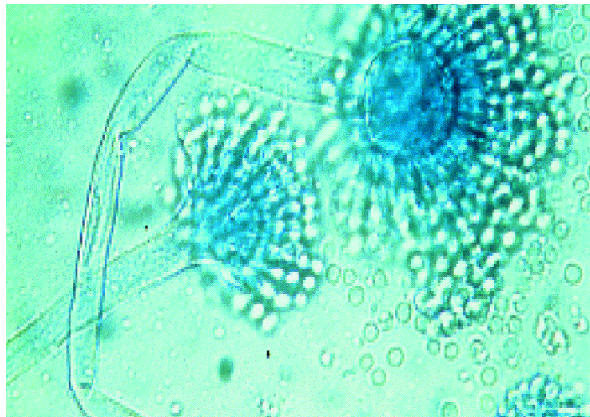


Figura 3. Aspecto microscópico de *Aspergillus flavus* (x400) con Tinción azul algodón de lactofenol.

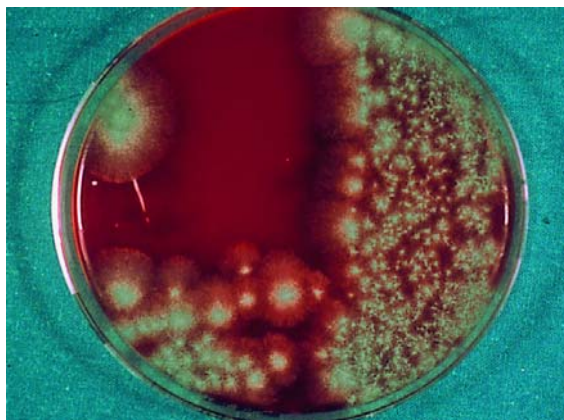


Figura 4. Aspecto macroscópico de cultivo de *Aspergillus fumigatus* en agar cerebro corazón (B H I) . Incubación de 48 h a 37°C procedente de lavado broncoalveolar de paciente neutropénico.

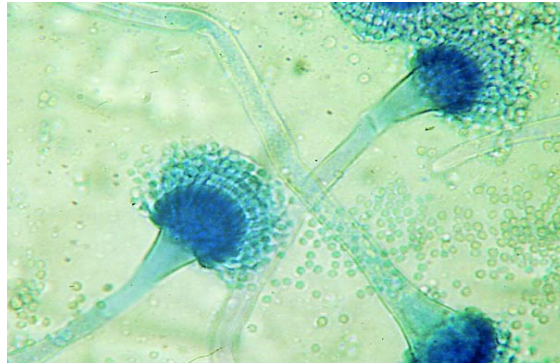


Figura 5. Aspecto microscópico de *Aspergillus fumigatus* (x 400), con tinción azul algodón de lactofenol.

Tabla 2. Aspergilosis invasora probable y posible por *Aspergillus* sp. (Consenso EORTC y NIAID)

<p>Infección fúngica invasora probable por <i>Aspergillus</i> sp</p>	<p>Deben cumplirse al menos un criterio de la sección factores del huésped (Tabla 3) + un criterio microbiológico (Tabla 3) + un criterio clínico mayor (o dos criterios clínicos menores) compatibles con infección (Tabla 5).</p>
<p>Infección fúngica invasora posible por <i>Aspergillus</i> sp</p>	<p>Deben cumplirse al menos un criterio de la Sección factores del huésped (Tabla 2) + un criterio microbiológico (Tabla 3) o un criterio clínico mayor (o dos criterios clínicos menores) compatibles con infección (Tabla 4). (8)</p>

Tabla 3. Factores predisponentes del huésped

<p>FACTORES PREDISPONIENTES</p>	<p>Neutropenia < 500 neutrófilos/mm³ > 10 días.</p> <p>Fiebre persistente (> 96 h) refractaria a antibióticos de amplio espectro en pacientes de alto riesgo.</p> <p>Temperatura > 38 °C o < 36 °C y alguno de los factores predisponentes:</p> <p>Neutropenia (> 10 días) en los 60 días anteriores</p> <p>Uso de inmunosupresores en los 30 últimos días.</p> <p>Infección fúngica invasora (probada o probable) durante un episodio neutropénico previo.</p> <p>Coexistencia de SIDA sintomático.</p> <p>Signos y síntomas de enfermedad injerto contra huésped severo o enfermedad extensa crónica.</p> <p>Uso prolongado de corticoste - roides en los 60 días previos. (9)</p>
--	---

Tabla 4. Criterios microbiológicos de aspergilosis invasiva por *Aspergillus* sp.

<p>CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Cultivo positivo para <i>Aspergillus</i> spp. a partir de esputo o lavado broncoalveolar. 2. Cultivo positivo o citología o microscopía directa positiva para <i>Aspergillus</i> spp. de aspirado sinusal (Figuras 6 y 7), esputo (Figura 8) o lavado broncoalveolar. 3. Antígeno de <i>Aspergillus</i> spp. positivo en muestras de lavado broncoalveolar, líquido cefalorraquídeo o dos o más muestras de sangre. 4. Citología o microscopía directa positiva para <i>Aspergillus</i> spp. en muestras habitualmente estériles. (9)
---	---

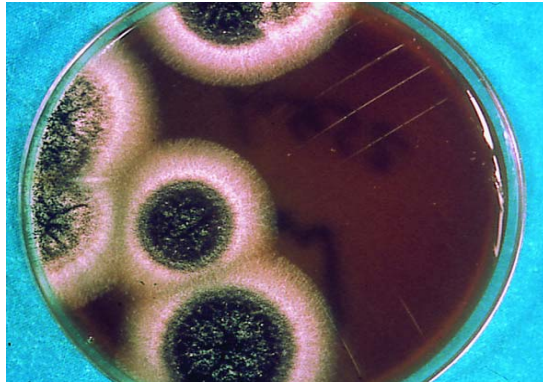


Figura 6. Cultivo en BHI de *Aspergillus niger* procedente de tejido rinosinusal

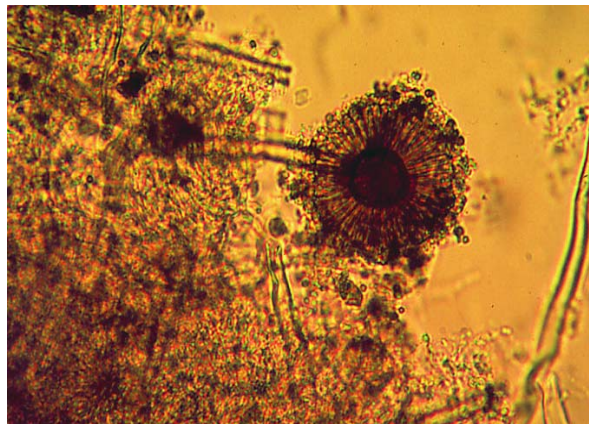


Figura 7. Aspecto microscópico de *Aspergillus niger* (x 400), con tinción azul algodón de lactofenol.

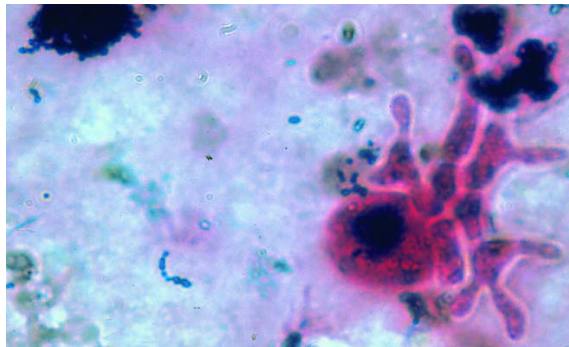


Figura 8. Tinción de Gram de esputo (x1000) procedente de paciente neutropénico con aspergilosis pulmonar invasora por *Aspergillus fumigatus*.

IMAGENES TOMADAS DE: Ascoglu S, de Paw B, Bennett JE, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. Clin Infect Dis 2002; 34: 7-14.

Anexo 3. DETECCIÓN ANTIGÉNICA DE GALACTOMANANO DE *Aspergillus* sp POR ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (PLATELIA® *Aspergillus*) (22)

Aspectos técnicos del Platelia®*Aspergillus*

Actualmente se utiliza un ELISA de doble sándwich que emplea un anticuerpo monoclonal de rata EBA-2 dirigido contra el galactomanano de *Aspergillus* que es utilizado como captor y detector del antígeno. Esta prueba está comercialmente disponible en Europa y desde hace un mes en EE.UU. denominándose Platelia *Aspergillus*® (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, Francia). Es una técnica sencilla, reproducible y rápida (aprox.- 4 horas) cuyo punto crítico radica en el tratamiento del suero con calor en presencia de EDTA, para disociar los inmunocomplejos y precipitar las proteínas séricas que podrían interferir con el ELISA. El límite de detección es de 0,5-1 ng/ml (23-24).

PROCEDIMIENTO:

1. Seguir estrictamente el protocolo propuesto.
2. Aplicar las buenas prácticas de laboratorio.
3. Antes de la utilización, dejar que todos los reactivos se equilibren a temperatura ambiente (18-30C).

TRATAMIENTO DE LOS SUEROS

Todos los sueros control:

Negativo (R3), Positivo (R5) y el suero umbral (R4) deben ensayarse al mismo tiempo que las muestras de los pacientes de la siguiente forma:

- a. Depositar 300 µl del suero a ensayar en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.

- b. Añadir 100 µl de la solución tratamiento (R7)
- c. Homogeneizar energéticamente con vortex.
- d. Cerrar herméticamente el tubo para evitar su apertura durante el calentamiento: utilizar una pieza de bloqueo. No perforar el tapón.
- e. Incubar el tubo durante 3 minutos en un baño maria a 100°C comprobando que el tapón este bien cerrado.
- f. Centrifugar a 10.000rpm durante 10 minutos.
- g. El sobrenadante se utiliza par la detección del antígeno galactomanano. Una vez tratado, el suero debe ser sometido a ensayo lo antes posible (el mismo día).

REACCIÓN INMUNOENZIMÁTICA

- a. Establecer cuidadosamente el plan de distribución de los sueros control, del suero umbral y de las muestras de pacientes.
- b. Sacar el marco y las tiras (R1) del embalaje protector. Guardar las tiras no utilizadas en el embalaje y cerrarlo cuidadosamente.
- c. Homogeneizar el contenido del frasco (R6) por inversión antes de su utilización.
- d. Distribuir sucesivamente en los pocillos (respetando el orden de los reactivos).

1. 50ul del conjugado (R6).
2. 50ul del sobrenadante del suero tratado.

e. Prever (como mínimo): 1 pocillo para el suero control negativo (R3), dos pocillos para el suero umbral (R4) y un pocillo para el suero control positivo (R5).

Los sueros control y el suero umbral pueden colocarse de la siguiente forma:

1. A1: suero control negativo (R3).
2. B1: suero umbral (R4).
3. C1: suero umbral (R4).
4. D1: suero control positivo (R5).

f. Cubrir la microplaca con una película adhesiva apretando bien toda la superficie para garantizar la estanqueidad.

g. Incubar la microplaca al baño maría con termostato o en una incubadora seca de microplacas durante 90 minutos a 37 C.

h. Prepara la solución de lavado diluida (Diluir 10 veces la solución R2 en agua destilada estéril. De este modo se obtiene la solución lista para usar. Prever 160ml de solución de lavado diluida por 2 tiras de 8 pocillos).

i. Retirar la película adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos en un contenedor para residuos contaminados (que contenga hipoclorito de sodio) y realizar como mínimo 5 lavados. Secar las tiras dándoles la vuelta sobre una hoja de papel absorbente y dar unos ligeros golpecitos para eliminar toda la solución de lavado.

j. Preparar la solución de revelado: R9 diluida a 1/50 en R8 (Diluir 50 veces la solución de cromógeno concentrado (R9) en el tampón sustrato R8. Preparar 4 ml de solución de revelado por tira). Distribuir rápidamente, protegida de la luz directa, 200ul en todos los pocillos. Dejar que la reacción se desarrolle en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente (+18-30 C). Durante esta incubación, no utilizar película adhesiva.

k. Detener la reacción enzimática añadiendo 100µl de solución de parada (R10) en cada pocillo. Adoptar la misma secuencia y el mismo ritmo de distribución que para la solución de revelado.

l. Limpiar cuidadosamente la parte inferior de las placas. Leer la densidad óptica a 450/620nm con un lector de placas en los 30 minutos siguientes a la parada de la reacción (las tiras siempre deben conservarse protegidas de la luz antes de la lectura).

m. Antes de transcribir los resultados, comprobar la concordancia entre la lectura y el plan de distribución de las placas.

INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA:

Calculo del Índice:

Para cada suero ensayado calcular la relación:

$$I: DO \text{ muestra} / \text{Valor umbral}$$

Resultado negativo: <0.250

Resultado intermedio: 0.250 - 0.500

Resultado positivo: >0.550

Definición de galactomanano positivo

Se considera que la prueba es positiva cuando se obtienen al menos dos determinaciones consecutivas positivas, siendo el punto de corte inicialmente recomendado en suero de 1,5 ng/ml en Europa, mientras que en EE.UU. la misma casa comercial recomienda 0,5 ng/ml. Como consecuencia práctica de esto será difícil extrapolar los resultados acumulados (25). Es destacable que la definición del punto de corte está en evolución y no se ha llegado todavía a un consenso.

La opinión más extendida es que la rentabilidad del galactomanano parece estar ligada a la obtención prospectiva y regular de suero (generalmente dos veces por semana) coincidiendo con el periodo en que el enfermo tiene más riesgo de desarrollar una aspergilosis invasora. Incluso este punto es debatido: se ha llegado a proponer el muestreo diario desuero debido a que no se conoce con exactitud el perfil de liberación del antígeno (23)

Falsos positivos y falsos negativos con el Platelia®Aspergillus

Un aspecto importante para conocer la utilidad de una prueba diagnóstica es el análisis de los resultados falsos negativos o positivos. La tasa de falsos negativos del Platelia ®Aspergillus oscila entre el 8% y el 10%, mientras que la tasa de falsos positivos oscila entre el 8% y el 14%(23-24)

Factores causales de falsos (-) y falsos (+) en la detección de galactomanano

Falsos (-)

1. Encapsulación de la infección
2. Formación de inmunocomplejos por anticuerpos anti-Aspergillus
3. Población no seleccionada

Falsos (+)

1. Población pediátrica
2. Receptores de trasplante de médula ósea
3. Enfermedad injerto contra huésped
4. Ciclofosfamida
5. Mucositis intensa (coexistencia con ingesta de cereales, leche maternizada)
6. Infección por *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Alternaria* y *Candida*

7. Colonización masiva intestinal por *Aspergillus*
8. Bacteriemias
9. Transfusiones
10. Piperacilina-Tazobactam (23-24)

ANEXO 4. TÉCNICA DE LAVADO BRONCOALVEOLAR

MATERIAL NECESARIO: Fibrobroncoscopio, alcohol, suero fisiológico, gasa y algodón estériles, recipiente estéril (de vidrio o plástico).

TÉCNICA: El broncofibroscopio se encaja, después de la anestesia, en el bronquio segmentario o subsegmentario elegido y, a través de su canal interno, se instila el suero salino en bolos de 20-50 ml hasta el volumen total deseado. Después de cada instilación, se aspira con la misma jeringa con la presión adecuada para no colapsar las paredes bronquiales. El líquido aspirado se coloca en frascos de plástico. Suele recuperarse más del 40% del líquido instilado. Se ha recomendado realizar el LBA en dos segmentos diferentes (con un total del 200-300 ml) para obtener una muestra más representativa de parénquima pulmonar. (25)

NÚMERO DE MUESTRAS Y/O VOLUMEN: Es suficiente con 5-10 ml de lavado broncoalveolar.

La broncoscopia tiene indicaciones diagnósticas y terapéuticas. Dentro de las primeras están hemoptisis, atelectasia, neumonía de lenta evolución, tos persistente de etiología desconocida, sospecha de neoplasia, estadificación tumoral, infiltrados radiológicos e origen incierto, enfermedades intersticiales, investigación de etiología infecciosa, parálisis diafragmática, parálisis de cuerdas vocales, traumatismos torácicos y fístulas broncopleurales.(10)

FIBROBRONCOSCOPIA

Desde principios de los años ochenta, la neumología infantil dispone de broncoscopios flexibles (fibrobroncoscopios) miniaturizados, capaces de explorar las vías aéreas en la casi totalidad de las situaciones clínicas que pueden presentarse en la patología respiratoria pediátrica. La sencillez y bajo riesgo de esta técnica, que además de no precisar anestesia general puede realizarse incluso a la cabecera del paciente en determinadas situaciones, ha propiciado un campo cada vez más extenso de indicaciones. (26)

INDICACIONES

La fibrobroncoscopia permite, sin requerir intubación ni anestesia general, la inspección de las vías aéreas en pocos minutos, proporcionando información anatómica y dinámica de la nariz, faringe, laringe y árbol traqueobronquial. Sus indicaciones son fundamentalmente la exploración de las vías aéreas ante la existencia de ciertos síntomas o signos respiratorios persistentes, y la obtención de muestras biológicas en determinadas patologías respiratorias. No obstante, también son posibles ciertas indicaciones terapéuticas (tabla 1) (26)

1. Exploración de las vías aéreas

1. Estridor persistente
2. Sibilancias persistentes
3. Hemoptisis
4. Anomalías fonatorias
5. Sospecha de cuerpo extraño
6. Atelectasias persistentes o recurrentes
7. Neumonías recurrentes o persistentes
8. Hiperclaridad (enfisema) localizada
9. Problemas relacionados con las vías

10. Aéreas artificiales

11. Miscelánea

2. Obtención de muestras biológicas (Lavado broncoalveolar, biopsia bronquial, cepillado bronquial)

1. Neumonías en pacientes inmunodeprimidos
2. Neumonía intersticial crónica
3. Patología obstructiva intralumina

3. Aplicaciones terapéuticas

1. Aspiración de secreciones Intrabronquiales
2. Instilación de fármacos
3. Asistencia como guía en las intubaciones difíciles
4. Extracción de cuerpos extraños distales (26)

ANEXO 5. MEDIOS DE CULTIVO PARA HONGOS

MEDIO SABOURAUD

Medio utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos. También es útil para el cultivo de levaduras.

FUNDAMENTO

Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos. En el medio de cultivo, la pluripeptona y la glucosa, son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, favorecen el crecimiento de hongos por sobre el de bacterias.

Además, al medio de cultivo, pueden agregarse otros agentes selectivos de crecimiento.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Pluripeptona	10.0	Suspender 65 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver. Distribuir y esterilizar 15 minutos a 118-121°C. Mantener en lugar fresco, pues la exposición al calor hidroliza los componentes. Distribuir en placas o en tubos con cierre hermético
Glucosa	40.0	
Cloranfenicol	0.05	
Agar	15.0	
pH final: 5.6 ± 0.2		

SIEMBRA

Depende del uso, puede ser tanto en tubo como en placa.

INCUBACIÓN

El tiempo de incubación dependerá del microorganismo que se esté buscando aislar.

RESULTADOS

Microorganismos	Crecimiento
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bueno
<i>Aspergillus sp.</i>	Bueno
<i>Candida albicans ATCC 10231</i>	Bueno

Características del medio

Medio preparado: ámbar claro, ligeramente opalescente sin ningún precipitado.

Almacenamiento

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.

AGAR PAPA DEXTROSA PARA HONGOS Y LEVADURAS (PDA)

Este medio se desarrolló por Brewer & Bolland en 1970 para el cultivo aislamiento y determinación del número o recuento de levaduras y hongos a partir de muestras de alimentos y otros materiales.(27)

Este medio de cultivo corresponde a las recomendaciones del American Public Health Association para el análisis de alimentos (1984) y de productos lácteos (1985) así también como a la United States Pharmacopeiae XX. (27)

Los hidratos de carbono y la infusión de papa favorecen el crecimiento de levaduras y hongos en tanto que por el bajo rango de pH , la flora acompañante se reduce significativamente.

Para la enumeración de hongos se recomienda bajar aún más el pH , haciéndolo descender hasta 3,5. (27)

Las características morfológicas típicas de los hongos se desarrollan muy bien en este medio de cultivo.

Después de la siembra este medio se incuba hasta por 5 días a temperatura ambiente o 22 °C. (27)

Útil para el cultivo. Aislamiento y determinación del número de gérmenes de levaduras y mohos, a partir de alimentos y otros materiales.

FORMULA

Infusión de papa 200g

D (+) – glucosa 20g

Agar-agar 15g

Agua destilada 1000 mL.

PREPARACION: Disolver en 1 litro de agua destilada 39g del medio en un Erlenmeyer, esterilizar y en autoclave por 15 a 20 minutos a 121°C. Después de esterilizado en medio verter en cajas de petri.

Tabla 1. Riesgo de aspergilosis invasiva en enfermos con Cultivo positivo de *Aspergillus* sp

<p>Riesgo alto</p> <p>Trasplante de médula ósea alogénico 64%</p> <p>Neutropenia 64%</p> <p>Cáncer hematológico 50%</p>
--

Riesgo intermedio

Trasplante de médula ósea autólogo 28%
 Esteroides 20%
 VIH 19%
 Trasplante de órgano sólido 17%
 Diabetes 11%
 Enfermedad pulmonar 9%
 Cáncer no hematólogo 8% (9)

Tabla 2. Características morfológicas más importantes de las especies de *Aspergillus* que afectan a la especie humana. (11)

Especie	Aspecto macroscópico		Aspecto microscópico		Comentarios
	Micelio	Reverso	Conidióforo	Fiálides	
<i>A. fumigatus</i>	Aterciopelado o aspecto de polvo. Color blanquecino que cambia a verde oscuro o gris	Blanco a marrón-rojizo	Cortos (<300µm) y lisos	Uniseriadas sobre el tercio superior de la vesícula, paralelos al eje del conidióforo	
<i>A. flavus</i>	Aterciopelado. Color amarillo verdoso o marrón	Dorado a marrón-rojizo	Longitud variable y rugosos	Uniseriadas o biseriadas que cubren completamente la vesícula	
<i>A. niger</i>	Lanoso. Color blanco-amarillento que cambia a negro	Blanco amarillento	Largos y lisos	Biseriadas que cubren completamente la vesícula	
<i>A. terreus</i>	Aterciopelado. Color canela	Blanco a marrón	Cortos (<250µm) y lisos	Biseriadas agrupándose en forma tubular	Aparecen células hialinas redondas en el micelio sumergido en el agar
<i>A. versicolor</i>	Aterciopelado.	Color blanco que cambia a amarillo, naranja, marrón-rojizo, verde o rosa Blanco, amarillo, naranja o rojo	Largos y lisos	Biseriadas y vagamente radiadas cubriendo la mayoría de las vesículas	En ocasiones se visualizan células de Hülle
<i>A. nidulans</i>	Aterciopelado. Color verde. Cuando	Púrpura oscuro	Cortos (<250µm), lisos y	Biseriadas	Cleistotecios con ascosporas de color rojizo. Habitualmente

	presenta cleistotecios color similar al del ante		marrones		se observan células de Hülle
<i>A. glaucus</i>	Aspecto similar al fieltro. Color verde con zonas amarillentas	Amarillo a marrón	Longitud variable y lisos	Uniseriadas que cubren toda la vesícula	Cleistotecios frecuentemente presentes
<i>A. clavatus</i>	Aspecto similar al fieltro. Color verde-azulado	Blanco que suele cambiar a marrón	Largo y liso	Uniseriadas	Gran tamaño de la vesícula (200x40 µm) y de forma alargada

ANEXO 6. AZUL DE LACTOFENOL PARA VISUALIZACIÓN MICROSCOPICA DEL *Aspergillus sp.*

Aplicación: El material se tiñe por tinción en un paso. Los elementos fungosos aparecen azul oscuro (28)

Material de examen: Material de examen pueden ser esputos, punciones de fluido pleural, lavado bronquial, sedimentos urinarios, FNAB (biopsia por aspiración con aguja fina), imprints, preparaciones de cultivos (28)

Técnica

1. Tratar/aclarar la muestra durante 1 a 15 minutos, en función de la consistencia con 1 a 5 gotas de los álcalis.
2. Añadir agua varias veces y succionar, p. ej. con papel de filtro
3. Añadir de 1 a 2 gotas de solución de azul de lactofenol, colocar el cubreobjetos y teñir así, después de 2 minutos observar al microscopio.

Nota: En caso de material de cultivo sin tratamiento previo añadir de 1 a 2 gotas de solución de azul de lactofenol, colocar el cubreobjetos y teñir así, después de 2 minutos observar al microscopio. (28)

Resultado: Elementos fúngicos

Diagnóstico

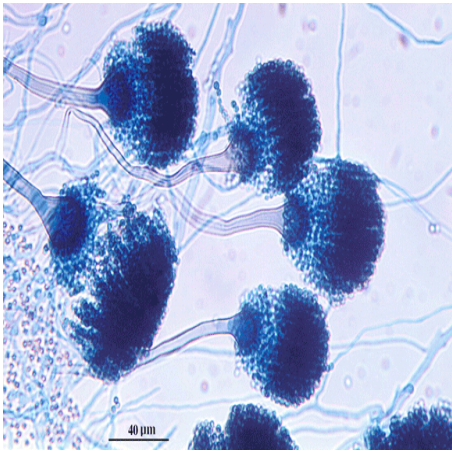
Los diagnósticos deberán ser establecidos solamente por personas autorizadas y cualificadas. Deberán emplearse terminologías vigentes. Deberán elegirse y realizarse ensayos ulteriores según métodos reconocidos.

Almacenamiento Solución de tinción debe almacenarse entre +15°C y +25°C. Después de abrir el frasco por primera vez, el reactivo almacenado entre +15°C y +25°C es estable hasta la fecha de caducidad indicada. (30)

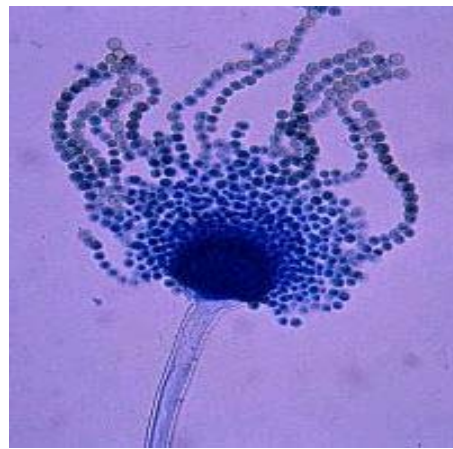
Estabilidad

Solución pueden usarse hasta la fecha de caducidad indicada.

Los frascos deben mantenerse siempre bien cerrados. (28)



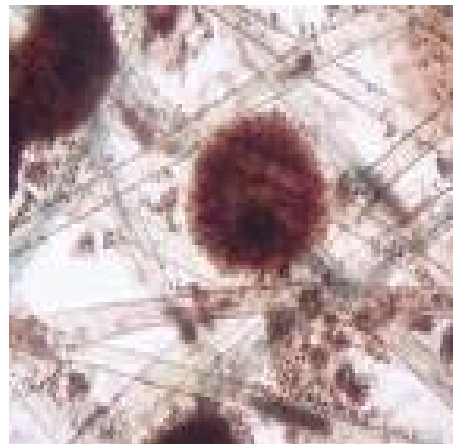
Aspergillus fumigatus (29)



Aspergillus flavus (30)



Aspergillus nidulans (31)



Aspergillus niger (32)

ANEXO 7. CLAVES TAXÓNOMICAS DE IDENTIFICACIÓN DE *Aspergillus* sp (33)

Aspergillus flavus

Ecología: cosmopolita, aislado principalmente de plantas y tierra.

Apariencia Macroscópica de la Colonia

1. Crecimiento rápido
2. Textura Polvorienta
3. Superficie de tonos Color verde – amarillosa.

Características Microscópicas:

1. **Conidióforo:** rugoso poco coloreado.
2. **Vesícula:** hemisférica, columnar o globosa
3. **Fíalides:** biseriadas a menudo variando en la misma cabeza y rodeando toda la vesícula

Conidios: más o menos rugosos variando de color como la colonia

Aspergillus fumigatus

Ecología: cosmopolita, termo tolerante, aislado frecuentemente de material en descomposición y plantas. Uno de los más comunes de la naturaleza. Es la de mayor importancia médica.

Características Microscópicas de la Colonia:

1. Crecimiento rápido
2. Textura polvorienta
3. Superficie de Tonos azul-verdoso, amarillo y café.

Características Microscópicas:

1. **Conidióforo:** liso y ligeramente pigmentado de verde.
2. **Esterigmatas o Fálides:** una sola hilera en la mitad superior de la vesícula.
3. **Cabeza conidial:** es de columnas compactas y de color verde
4. **Conidias:** redondas en cadenas.

Aspergillus terreus

Ecología: cosmopolita, pero es mas común en áreas tropicales o subtropicales. Asilado principalmente del suelo, abono y plantas.

Características Macroscópicas de la colonia.

1. Crecimiento rápido
2. Textura arenosa y polvorienta o aterciopelada.
3. Superficie tonos color canela en el centro a café, y el reverso va desde amarillos a marrón.

Características Microscópicas.

1. **Conidióforo:** lisos sin color
2. **Vesícula:** hemisférica, similar a una cúpula, a veces llega a ser imperceptible en el Conidióforo.
3. **Fálides:** biseriadas
4. **Conidios:** globosos a elípticos.

Aspegillus niger

Ecología: Cosmopolita, aislado frecuentemente de la tierra y plantas en descomposición.

Características Microscópicas de la colonia:

1. Crecimiento rápido
2. Textura granulosa (cuncho de café) ó polvorienta.
3. Superficie de tonos color negro.

Características Microscópicas:

1. **Conidióforo:** lisos, pocos coloreados o matizados con color amarillo-marrón.
2. **Vesículas:** grande, globosa, pero también algunas capas pueden producir vesículas pequeñas.
3. **Fálides:** biseriadas rodeando toda la vesícula.
4. **Conidios:** color negro-carbón, marrón-negro, o púrpura-marrón. NUNCA BLANCAS.

Aspergillus nidulans

Ecología: cosmopolita, aislado principalmente del suelo (tierra).

Características Microscópicas de la Colonia:

1. Crecimiento de moderadamente rápido a rápido
2. Textura polvorienta
3. Superficie de tonos verde oscura, reverso de la colonia va desde rojo púrpura y se vuelve oscura con la edad.

Características Microscópicas:

1. **Conidióforo:** lisos color marrón.

2. **Vesícula:** hemisférica
3. **Fíalide:** biseriada
4. **Conidios:** globosos, rugosos, de color verde.

ANEXO 8. BIOPSIA TRASBRONQUIAL

La biopsia trasbronquial quirúrgica (BTQ) es útil en el diagnóstico de un grupo heterogéneo de enfermedades pulmonares, representando un potencial impacto terapéutico. Es el procedimiento que más comúnmente establece un diagnóstico histopatológico en pacientes con enfermedad pulmonar difusa y es el método de referencia para medir la sensibilidad y especificidad diagnóstica de cualquier técnica de biopsia pulmonar (34)

Biopsia por aspiración con aguja fina, biopsia por aspiración transtorácica con aguja, aspiración percutánea con aguja. (35)

Propósito de la prueba: Obtener una muestra de tejido para efectuar diagnóstico en caso de masas pulmonares localizadas tales como cáncer de pulmón o infecciones. (35)

Procedimiento de la prueba:

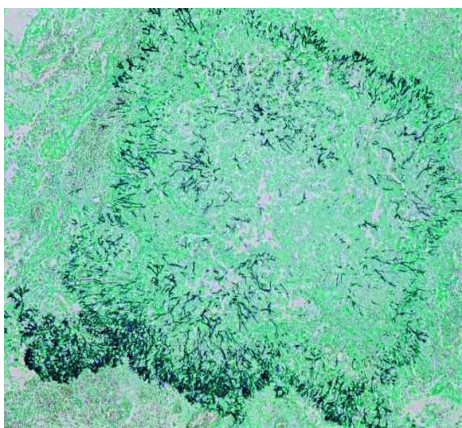
1. paciente ubicado en decúbito lateral o ventral
2. Ubicar la aguja en la zona se obtiene una muestra por aspiración con una jeringa.
3. Se utiliza como ayuda un aparato de tomografía computada o una pantalla de radioscopia para guiar la aguja hasta el lugar deseado.
4. La muestra obtenida es enviada al laboratorio de patología para su examen microscópico, y se efectúa también un cultivo bacteriológico para identificar microorganismos (búsqueda de *Aspergillus sp*).

5. El paciente permanece en reposo durante algunas horas con control periódico de temperatura, frecuencia respiratoria y presión arterial. Luego se recomienda un reposo relativo por un lapso de 24 horas. (34)

En los pacientes inmunocomprometidos: la biopsia resulta útil en estos pacientes con la siguiente finalidad:

1. Búsqueda del tipo de infección.
2. Diagnóstico de tumor.
3. Estudio de probable yatrogenia (36)

En la aspergilosis pulmonar invasora, las muestras obtenidas mediante biopsia abierta de pulmón (Figura 1) o mediante punción guiada por ecografía o tomografía axial computarizada son las más rentables para el diagnóstico, tanto microbiológico como histológico. No obstante, en la mayoría de los pacientes neutropénicos la obtención de este tipo de muestras suele estar contraindicada debido a la precaria situación clínica (sobre todo hemostática) de los enfermos. (37)



Biopsia pulmonar. Disposición característica de las hifas de *Aspergillus* en el parénquima pulmonar (Tinción de Gomori-Grocott, x100). Imagen reproducida con la autorización de Aspergillus Web Site©, Universidad de Manchester.(37)

ANEXO 9. CITOLOGÍA EN LAVADO BRONCOALVEOLAR

DESCRIPCIÓN MACROSCOPICA

Es de gran utilidad la descripción macroscópica, anotando la cantidad y el aspecto de la muestra (color y consistencia).

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

1. Tomar una cantidad de al menos 20 mL
2. Centrifugar a 1500 R.P.M. durante 10 minutos
3. Retirar el sobrenadante y con
4. Realizar un citocentrifugado al sedimento resultante con el Cytospin a 1500rpm durante 5 minutos.

FIJACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las preparaciones citopatológicas deben sé fijadas, para interrumpir los procesos de degradación que aparecen tras la muerte celular:

1. Alcohol etílico 96°
2. Metanol 100°, Propanol 80°, Isopropanol 80°.

Las muestras coloreadas con coloración de GIEMSA se deben secar al aire, no en alcohol.

TINCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las coloraciones de rutina son de carácter policromo, permiten distinguir distintos matices (basofilia, anfofilia y eosinofilia) en las estructuras celulares a teñir. (38)

COLORACIÓN DE GIEMSA

Denominada panóptica de Pappenhein, se realiza sobre material secado al aire, proporciona una percepción de los finos detalles citológicos, sobre los que se sustenta el diagnóstico de malignidad, con detalles citológicos (vacuolas, granos de mucina), componente de fondo (matriz mixoide, colágeno).

Utiliza:

1. Eosina-azul de metileno en solución según May-Grunwald modificado. (Merk)
2. Azul-eosina-azul metileno según Giemsa en solución. (Merk)
3. Tampón Sorensen (fosfato monosódico monohidrato y fosfato disódico dihidrato).

Procedimiento:

1. Eosina-azul de metileno en solución según May-Grunwald modificado (Merk).	3 minutos
2. Eosina-azul de metileno en solución según May-Grunwald modificado. (Merk) al 50% en tampón Sorensen.	3 minutos
3. Azul-eosina-azul metileno según Giemsa en solución. (Merk) al 10% en tampón Sorensen.	15 minutos
4. Lavar en agua corriente	
5. Tampón Sorensen (fosfato monosódico monohidrato y fosfato disódico dihidrato).	2 minutos
6. Alcohol 96°.	20 segundos
7. Alcohol absoluto	20 segundos
8. Xileno	20 segundos
9. Montar	

Resultados

Gránulos neutrófilos: rosa

Gránulos eosinófilos: marrón rojizo.

Nucleolo: rosa.

Eritrocitos maduros: naranja rosados.

Núcleos celulares: azul violáceo.

Citoplasma: azul claro a rosa. (39)

ANEXO 10. COLORACIONES HISTOLÓGICAS

Para el diagnóstico histopatológico de las micosis se utilizan tinciones especiales que colorean específicamente las estructuras fúngicas, tales como la tinción argéntica o con metenamina de plata (tinción de Gomori-Grocott) o la del ácido peryódico de Schiff (tinción de PAS). La tinción de Gomori-Grocott tiene la ventaja de teñir también los elementos fúngicos más viejos o no viables. Las tinciones histológicas habituales, como la tinción de Hematoxilina-Eosina, no tiñen adecuadamente las estructuras fúngicas pero resultan muy útiles para visualizar la respuesta tisular en estas infecciones. Por lo que es aconsejable combinar ambos tipos de tinciones cuando se sospeche la existencia de una micosis invasora (43)

COLORACIÓN DE PAS PARA LA DETECCIÓN DE ALDEHÍDO Y MUCOSUSTANCIA

Principio

La tinción PAS (periodic acid-Schiff) es uno de los métodos químicos más empleados en histología. En la tinción PAS se trata el material con ácido peryódico, que oxida los 1,2-glicoles formándose grupos aldehído. Con el reactivo de Schiff, los aldehídos reaccionan dando un color rojo luminoso.

Con polisacáridos no substituidos, mucopolisacáridos neutros, mucoproteínas y glucoproteínas, glucolípidos y fosfolípidos, la tinción PAS da una reacción de color específica. Combinando la tinción PAS con azul alcian pueden identificarse además mucosustancias ácidas (glucosaminoglicanos). (40)

Material

Como material de partida se emplean cortes de tejido fijado en formalina e incluido en parafina o bien extensiones celulares. Cortes parafínicos de 3-5 μm de espesor. (40)

Reactivos

Componentes en el kit de tinción PAS, Merck art. nro. 1.01646.

Solución 1: Ácido peryódico 0,5 %, acuoso 500 ml

Solución 2: Reactivo de Schiff 500 ml

Preparación

1. Solución de azul alción al 1%

Se disuelven, revolviendo, 5 g de azul alción 8 GX Certistain® en 500 ml de ácido acético al 3%. El valor del pH es aprox. 2,5.

2. Solución de ácido acético al 3%

Mezclar cuidadosamente 485 ml de agua destilada con 15 ml de ácido acético del 100%. (40)

Etapas Tiempo

1. Desparafinar en forma típica los cortes y rehidratar.
2. Enjuagar en agua destilada.
3. Ácido peryódico 5 min.
4. Agua corriente del grifo, fuente 3 min.
5. Enjuagar en agua destilada.
6. Reactivo de Schiff 15 min.
7. Agua corriente del grifo, fuente 3 min.
8. Enjuagar en agua destilada.
9. Solución de hematoxilina modificada según Gill III 2 min.
10. Agua corriente del grifo, fuente 3 min.
11. Serie creciente de alcoholes, 2 x Neo-Clear® o xileno
12. Montar con Neo-Mount® o Entellan® Nuevo (40)

Cubrir con Entellan® Nuevo los preparados humedecidos con xileno, o con Neo-Mount® y cubreobjetos los preparados humedecidos con Neo-Clear®.(39)

Resultado

Azul: Núcleos

Purpura: Polisacáridos, glucógeno, mucopolisacáridos neutros, mucoproteínas y glucoproteínas, glucolípidos, fosfolípidos, membrana basal, colágeno (Figura 1)

Nota técnica

El microscopio usado debería corresponder a los requisitos de un laboratorio de diagnóstico médico. (40)

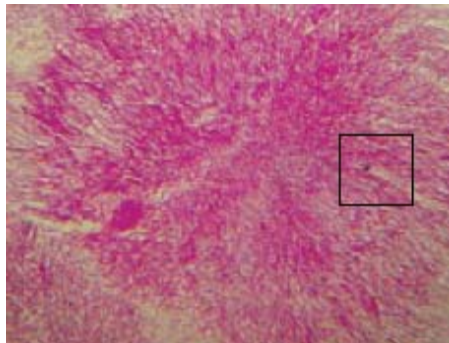


Figura 1. Histología del absceso señalado odo lo rosado que señalado en el cuadro son hifas de Aspergillus sp. Tinción PAS. (41)

COLORACIÓN DE GOMORI-GROCOTT

Se trata de una solución acética estabilizada que contiene Chromotrope 2R, Azul de Anilina y Acido Fosfotúngstico. Listo para usar. No requiere dilución. Colorante Histológico. Tiñe citoplasma y fibras musculares de rojo, mientras que el colágeno toma un color azulado. (43)

Principio: Con la tinción de metenamina para plateado se pueden representar bien estructuras argentafines en células enterocromafines y membranas basales. Con el método las estructuras buscadas se representan en color pardo oscuro a negro. Todas las demás estructuras se representan en color verde. (43)

Preparación: Preparación de la solución de metenamina de plata: El comprimido de borato de metenamina es suficiente para 30 ml de solución argéntica. El comprimido debe estar completamente disuelto en la solución argéntica. La solución está lista para el uso. La solución de nitrato de plata/borato de metenamina, junto con el preparado a teñir, se coloca en el baño de agua precalentado a 55 °C y se tiñe constantemente a esta temperatura durante 35-45 minutos hasta alcanzar la intensidad deseada. Utilizar inmediatamente la solución y desecharla después del uso.(43)

Importante: Para preparar la solución argéntica usar sólo recipientes de vidrio o de plástico limpios. No poner en contacto objetos metálicos (p. ej. soportes de portaobjetos o pinzas) con la solución argéntica. (43)

Resultado: Hongos pardos oscuros a negro; Membranas pardas oscuras a negro (Figura 2)

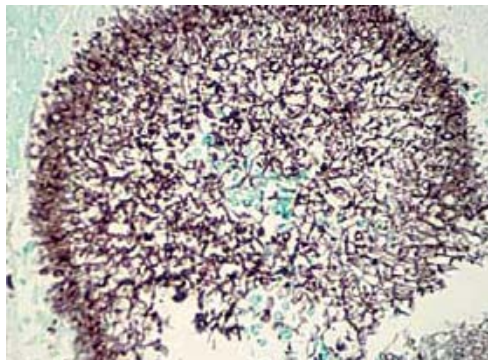


Figura 2. Biopsia de pulmón. 10X. Tinción de plata-metenamina de Gomori. Se observan hifas con ramificación dicotómica, con proyección radiada compatible con *Aspergillus sp.* (42)

ANEXO 11.

TABLA 1. Definiciones para las infecciones fúngicas invasivas en pacientes con cáncer y receptores de trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas.(44).

Infección fúngica invasiva probada

Daño de tejido infectado

Miceliales¹

Examen histopatológico o citopatológico de muestras como lavado broncoalveolar, biopsia vevidenciando hifas o tejido dañado, cultivo positivo obtenido de muestras estériles, signos clínicos o radiológicos anormales consistentes con la infección.

Levaduriformes¹

Examen histopatológico o citopatológico de muestras como aspirados, biopsias, excluyendo membranas mucoides, evidenciando células levaduriformes (especies de *Candida* la mayoría mostrando seudohifas o hifas verdaderas) cultivo positivo obtenido de muestras estériles, signos clínicos o radiológicos anormales consistentes con la infección

Fungemia

Miceliales¹

Hemocultivo positivo, acompañado de signos y síntomas clínicos compatibles con la revelación del microorganismo

Levaduriformes¹

Hemocultivo positivo para *Candida* u otras levaduras, acompañado de signos y síntomas clínicos compatibles con la revelación del microorganismo.

Infección fúngica endémica²

Sistémica o confinada a pulmones

Cultivo probado del sitio afectado con síntomas atribuidos a la infección fúngica, cultivo con resultado negativo, en examen histopatológico evidencia microscópica de hongos dimórficos (*Blastomyces*, *Coccidioides* y especies de *Paracoccidioides*)

Diseminada

Hemocultivo positivo o detección antigénica positiva.

Infección fúngica invasiva probable

Por lo menos 1 criterio de alto riesgo (Tabla 2); 1 criterio microbiológico y 1 criterio clínico mayor (o menor) anormal, consistente con la infección

Infección fúngica posible³

Por lo menos 1 criterio de alto riesgo; 1 criterio microbiológico ó 1 criterio clínico mayor o menor anormal, consistente con la infección.

¹. Identificación del género y especie por medio del cultivo.

². Histoplasmosis, blastomycosis, coccidioidomycosis, y paracoccidioidomycosis.

³. En esta categoría es recomendable no comenzar tratamiento empírico.

Tabla 2. Criterios de alto riesgo, microbiológicos y clínicos para infecciones fúngicas invasivas en pacientes con trastornos hematológicos y trasplante de medula ósea. (45) criterios EORTC

Alto Riesgo	Neutropenia (<500 neutrófilos/mm ³ por 10 días) Fiebre persistente >96 h en pacientes con alto riesgo y que están siendo tratados con antibiótico de amplio espectro. Temperatura corporal >38 ⁰ C ó <36 ⁰ C, con factores predisponentes; neutropenia prolongada mayor de 10 días, administración de agentes inmunosupresores en 30 días previos, es un índice de infección fúngica invasiva probable o posible en un episodio de neutropenia, o coexistente con SIDA. Prolongado uso de corticoesteroides (>3 SEM) en los anteriores 60 días.
Microbiológicos	Cultivos positivos para hongos miceliales (aislando gérmenes como <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Scedosporium</i> o algunas especies de Zygomycetos) o de muestras como esputo, lavado broncoalveolar. Evidencia microscópica de morfología compatible con hongos miceliales, obtenida del germen aislado en el cultivo. Evidencia microscópica de morfología compatible con especies de <i>Cryptococcus</i> en muestras como esputo o lavado broncoalveolar. Títulos antigénicos positivos para <i>Aspergillus</i> en lavado broncoalveolar, LCR o 2 muestras serológicas seriadas positivas. Títulos antigénicos positivos para <i>Cryptococcus</i> en sangre. Evidencia microscópica directa para elementos fúngicos en muestras estériles. Títulos antigénicos positivos para <i>Histoplasma Capsulatum</i> , en suero, orina o LCR. Dos urocultivos positivos para <i>Candida</i> . Hemocultivos positivos para especies de <i>Candida</i> .
Clínicos	
Infección del tracto respiratorio bajo	
Mayor	Nuevos infiltrados observados en la Tomografía Axial Computarizada.
Menor	Síntomas indicativos de infección en el tracto respiratorio bajo, (tos, dolor en el pecho, disnea)
Síntoma nasal infección	
Mayor	Evidencia sugestiva radiológica de infección fúngica invasiva en sinuses (erosión o extensión en las paredes sinusales evidente de infección).
Menor	Síntomas respiratorios (congestión nasal), ulceraciones nasales, epistaxis, hinchazón periorbital, lesiones necróticas o perforación en el paladar.

Infeción del Sistema Nervioso Central

Mayor	Evidencia radiológica sugestiva de una infección en el SNC (mastoiditis u otros focos infecciones, enfisema extradural).
Menor	Signos y sintomatología menor de foco Neurológico, cambio mental, irritación Meningea, anormalidades en la bioquímica y celularidad del LCR (con cultivo negativo en LCR y negativo para malignidades).
Diseminación de la infección fúngica	Diseminación papular o nodular, provocando lesiones.
Diseminación crónica de candidiasis	Abscesos pequeños, periféricos, en hígado y/o Bazo demostrado por un TAC, ultrasonido, elevación sérica de los niveles de fosfatasa alcalina. También soportado por un criterio microbiológico.

ANEXO 12.

Hoja de recolección de datos.

N° _____

Utilidad clínica de la detección antigénica de galactomanano de *Aspergillus spp* en lavado broncoalveolar y suero para diagnóstico precoz y seguimiento de aspergilosis invasiva en pacientes con cáncer

Datos del paciente

Historia Clínica: _____

Lugar de procedencia: _____

Edad paciente: _____ años. Género: Masculino Femenino

Fecha Ingreso paciente: _____

Fecha Egreso paciente: _____

Recolector de Información: _____

Servicio:

Piso _____

Estancia Hospitalaria _____ días

Datos de egreso:

Estado vital de egreso Vivo Muerto

Día de realización de la fibrobroncoscopia _____

1. Patología de base _____

2. Parámetros clínicos

ANTIGENO DE GM EN BAL	Título antigenico		POSITIVO NEGATIVO
ANTIGENO DE GM EN SUERO	Título antigénico		POSITIVO NEGATIVO

3. FACTORES DE RIESGO

4 IMAGEN RADIOLÓGICA: Si No

Tipo: _____

Impresión Diagnostica: _____

5 TERAPIA CON ANTIBIOTICOS: Si No

Nombre: _____

6 TERAPIA CON ANTIMICOTICOS Si No

Nombre _____

7 CITOLOGIA PARA ASPERGILLUS EN LBA: Si No

Diagnóstico histopatológico _____

8 CULTIVO MICROBIOLÓGICO LAVADO BRONCOALVEOLAR:

Tipo: _____

Agente etiológico aislado _____

9 HISTOPATOLOGÍA PARA BIOPSIA PULMONAR: Si No

Diagnostico histopatológico _____

10 Criterio EORTC y NIAID

Diagnostico infección probada Si No

Diagnostico infección probable Si No

Diagnostico infección Posible Si No

11.Observaciones: _____

Aprobado por: Dra. Pilar Rivas (Micóloga INC) y Dr, Leonardo Enciso (Hematólogo INC)

ANEXO 13



República de Colombia
MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA
EMPRESA SOCIAL DEL ESTADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTE CON CAPACIDAD PARA CONSENTIR

FECHA Y HORA			TOMA DE MUESTRA DE SANGRE
DIA	MES	AÑO	

PRIMER NOMBRE	SEGUNDO NOMBRE	PRIMER APELLIDO	SEGUNDO APELLIDO

LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO		
LUGAR	DIA	MES
AÑO		

TIPO DE IDENTIFICACION	NUMERO	NUMERO DE REGISTRO DE ARCHIVO
CC ___ CE ___ TI ___ RC ___		

NOMBRE TECNICO DEL PROCEDIMIENTO QUE SE VA A REALIZAR
Toma de muestra sanguínea

DECLARACIÓN

Me han explicado reiteradamente y persistentemente y he comprendido satisfactoriamente la naturaleza y propósito de este procedimiento. También me han aclarado todas las dudas. Se me dio a conocer ampliamente el procedimiento que será realizado por el profesional de salud del Instituto Nacional de Cancerología.

Doy mi consentimiento para que practiquen el procedimiento arriba descrito.

Entiendo que en caso de no aceptar el procedimiento aquí propuesto, puedo continuar recibiendo atención médica en la institución.

Hago constar que el presente documento ha sido leído y entendido por mí en su integridad y lo suscribo libre y espontáneamente, certificado además que he adquirido cualificado: profundo e integral sobre la naturaleza del procedimiento, efectos y riesgos.

Puedo revocar este consentimiento cuando en mi bien se presuma oportuno

Firma del paciente

--

CC. No.

--

Firma del testigo:

--

CC. No.

NOMBRE COMPLETO:

--

ANEXO 14



República de Colombia
MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA
EMPRESA SOCIAL DEL ESTADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTE SIN CAPACIDAD PARA CONSENTIR

FECHA Y HORA			TOMA DE MUESTRA DE SANGRE
DIA	MES	AÑO	

PRIMER NOMBRE	SEGUNDO NOMBRE	PRIMER APELLIDO	SEGUNDO APELLIDO

LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO		
LUGAR	DIA	MES
AÑO		

TIPO DE IDENTIFICACION	NUMERO	NUMERO DE REGISTRO DE ARCHIVO
CC ____ CE ____ TI ____ RC ____		

NOMBRE TECNICO DEL PROCEDIMIENTO QUE SE VA A REALIZAR
Toma de muestra sanguínea

DECLARACIÓN

Me han explicado reiteradamente y persistentemente y he (mos) comprendido satisfactoriamente la naturaleza y propósito de este procedimiento. También me (nos) han aclarado todas las dudas. Se me (nos) dio a conocer ampliamente el procedimiento que será realizado por el profesional de salud del Instituto Nacional de Cancerología.

Doy (damos) mi consentimiento para que practiquen el procedimiento arriba descrito.

Entiendo (mos) que en caso de no aceptar el procedimiento aquí propuesto, puedo continuar recibiendo atención médica en la institución.

Sé (sabemos) que el paciente _____ considerado por ahora incapaz de tomar por sí mismo la decisión de aceptar o rechazar el procedimiento descrito arriba. El profesional de la salud ha explicado en forma satisfactoria qué es, cómo se hace y para qué sirve el procedimiento. He (mos) comprendido todo lo anterior perfectamente por ello yo (nosotros):

Nombre del (los) representante (s) legal (es) para menores de edad o adulto en capacidad de otorgar el consentimiento informado			
PRIMER NOMBRE	SEGUNDO NOMBRE	PRIMER APELLIDO	SEGUNDO APELLIDO
Tipo y número de identificación		Tipo y número de identificación	

Doy (damos) mi consentimiento para que practiquen el procedimiento arriba descrito.

Hago constar que el presente documento ha sido leído y entendido por mí en su integridad y lo suscribo libre y espontáneamente, certificado además que he adquirido cualificado: profundo e integral sobre la naturaleza del procedimiento, efectos y riesgos.

Puedo (podemos) revocar este consentimiento cuando en mi bien se presuma oportuno.

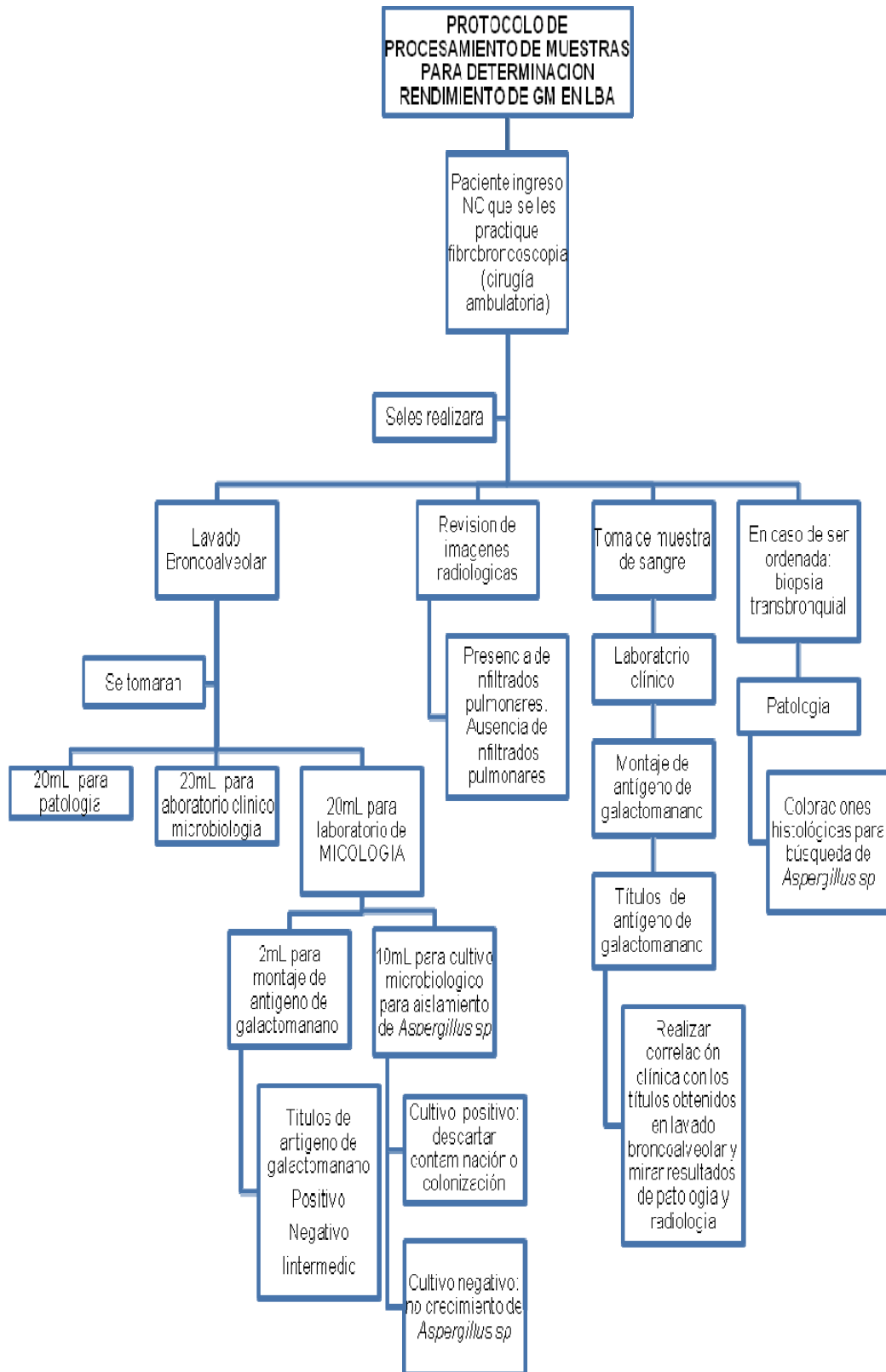
Firma del (los) representante (s) legales

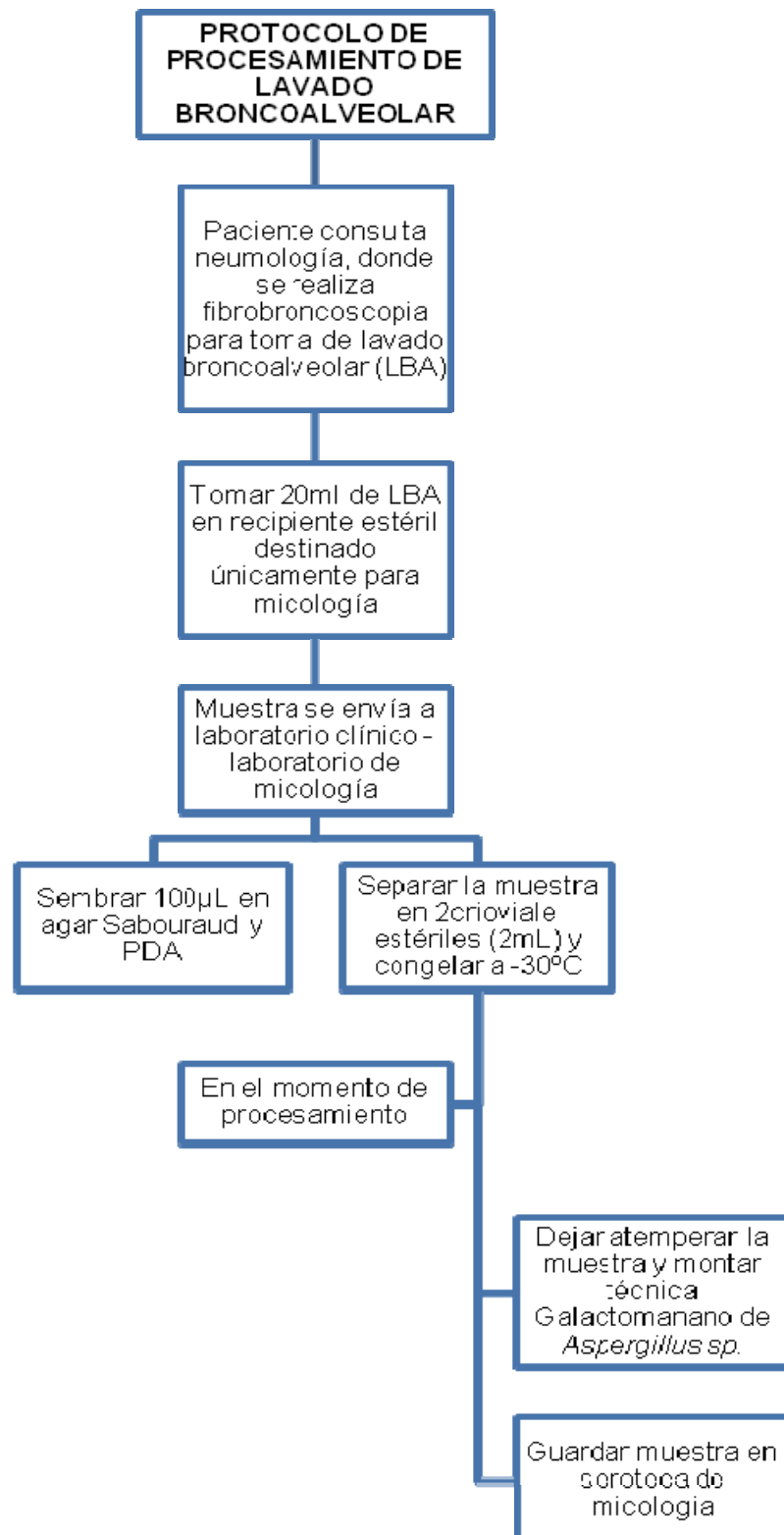
CC. No.	CC. No.

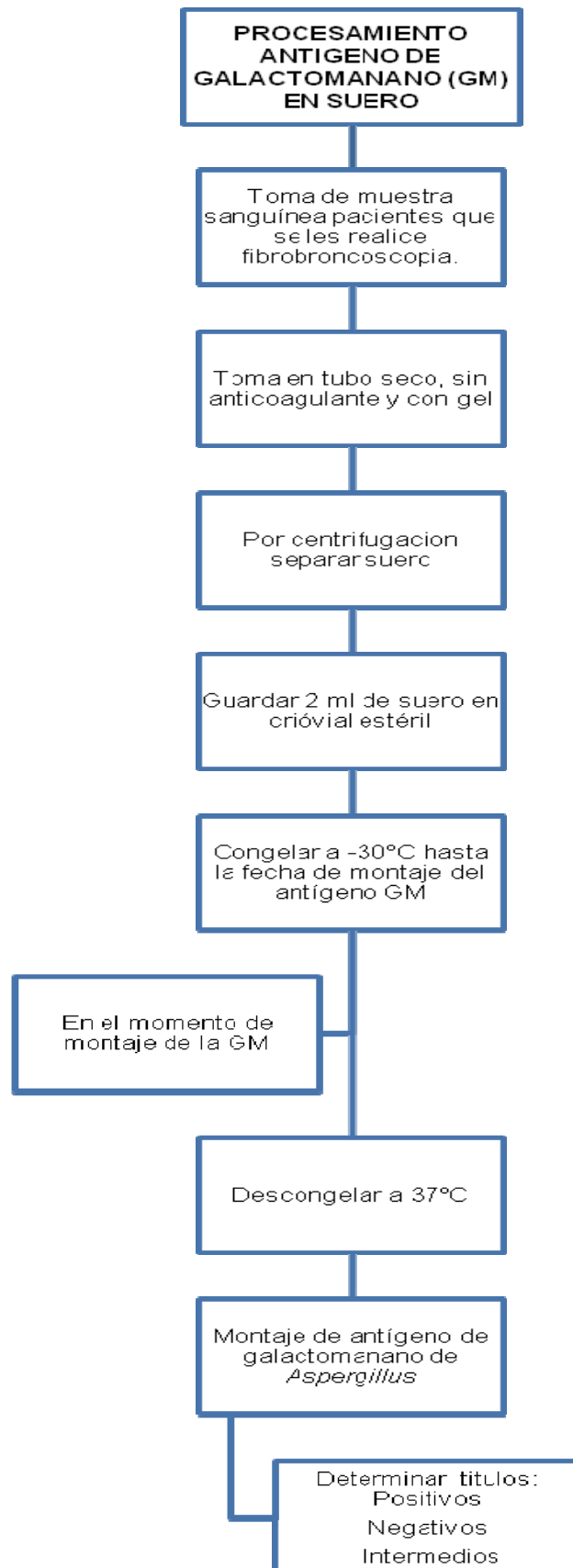
Firma del coadyuvante del paciente menor adulto (relativamente capaz)

Tipo y numero de identificación

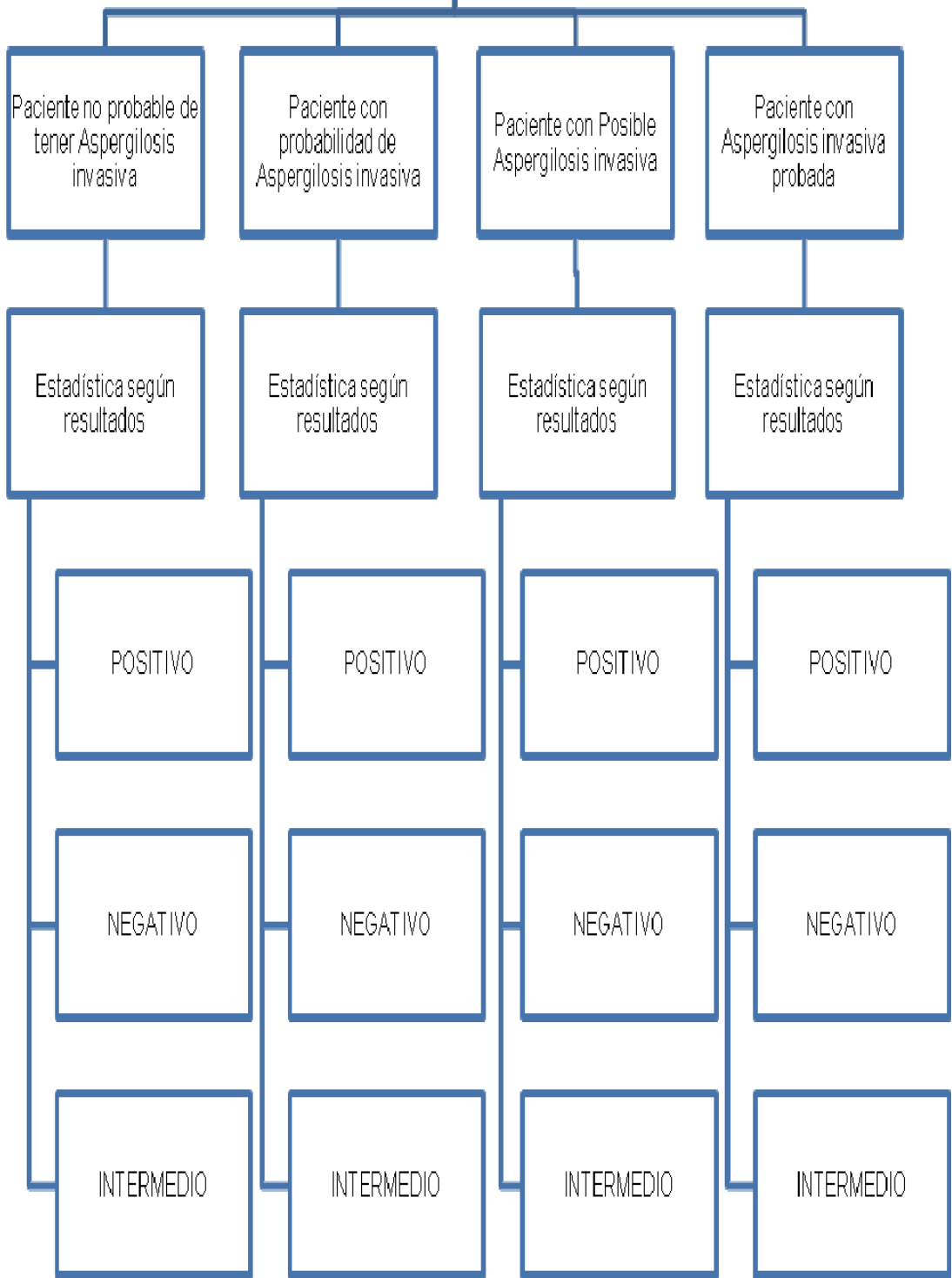
ANEXO 15. PROTOCOLOS DE PROCESAMIENTO







**PROTOCOLO
DECLASIFICACION de
AI SEGÚN CRITERIOS
EORTC/NIAD DE
RESULTADOS DE
GALACTOMANANO**



ANEXO 16. INDICACIONES POR LAS CUALES SE REALIZA UNA FIBROBRONCOSCOPIA.

Malignidad
Diagnostico de carcinoma broncogénico
Estado de carcinoma broncogénico
Citología anormal de esputo
Seguimiento después de tratamiento de carcinoma
Evaluación de pacientes con malignidad en cabeza y cuello
Evaluación de pacientes con malignidad esofágica
Carcinoma metastasico
Masa mediastinal
Infección
Neumonía sin tratar o recurrente
Infiltrados en pacientes inmunocomprometidos
Lesión en la cavidad
Colapso inexplicado de pulmón
Enfermedad intersticial del pulmón
Hemoptisis
Tos crónica inexplicable
Aspiración forzosa
Trauma en el pecho
Efusión pleural inexplicable
Evaluación del paciente después de trasplante de pulmón
Intubación endotraqueal
Confirmar posición del tubo
Evaluar para no causar lesión
Confirmar posición del catéter de oxígeno
Síndrome de vena cava superior
Fistula
Broncopleural
Traqueo – o broncoesofagica
Traqueo – o broncoaortica
Pneumotorax persistente (52)