



Revista Iberoamericana de Micología

www.elsevier.es/reviberoammicol



Ponencias

Las técnicas moleculares en la investigación epidemiológica y en el diagnóstico de la infección por *Pneumocystis jirovecii*

Enrique J. Calderón

Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), CIBER de Epidemiología y Salud Pública, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España
Pneumocystis jirovecii, conocido previamente como *Pneumocystis carinii* f. spp. *hominis*, representa un ejemplo paradigmático de microorganismo patógeno en el que la aplicación de técnicas moleculares ha resultado fundamental para conocer su naturaleza y poder estudiar su epidemiología ya que no se dispone aún de ningún método para su cultivo de forma mantenida.

Los microorganismos del género *Pneumocystis*, descritos por primera vez a comienzos del siglo xx con el nombre de *Pneumocystis carinii*, fueron considerados, debido a sus características morfológicas y resistencia a los antifúngicos clásicos, como protozoos pertenecientes a una única especie capaz de infectar a toda clase de mamíferos incluido el ser humano. Esta idea se mantuvo hasta finales de los años ochenta del siglo pasado, cuando diversos estudios genéticos comparativos lograron identificarlo como un hongo atípico próximo a la familia de los ascomicetos¹.

Una vez establecida la naturaleza fúngica de *Pneumocystis*, nuevos estudios realizados con técnicas moleculares revelaron la existencia de una gran heterogeneidad genética en *Pneumocystis*, heterogeneidad que estaba clara y estrictamente correlacionada con la especie del mamífero del que se aislaba el microorganismo, demostrándose además que no era posible la infección cruzada entre especies. Todo ello ha llevado a que actualmente se reconozca la existencia de numerosas especies diferentes dentro del género *Pneumocystis*, que están comenzando a ser descritas². En este sentido, se ha identificado a *P. jirovecii* como la única especie hasta ahora conocida que infecta al ser humano, y ha quedado claro que la neumocistosis no es como se creía una zoonosis sino una antroposis, noción que tiene importantes implicaciones tanto en el campo de la prevención como de nuestra comprensión de la historia natural de la infección por *Pneumocystis* en el hombre³.

Por otra parte, las técnicas moleculares han hecho posible también identificar la presencia de diversos polimorfismos en diferentes loci de genes de *P. jirovecii* que han permitido definir genotipos cuya identificación resulta útil para estudiar la epidemiología y las vías de transmisión de este patógeno^{3,4}. En este sentido, la constatación de que las recidivas de neumonías por *P. jirovecii* (PcP) en sujetos con sida se producían por microorganismos con genotipos diferentes de los iniciales cuestionó la idea tradicional de que la PcP se producía por reactivación de una infección latente al evidenciarse la existencia de infecciones *de novo* y haberse observado además en modelos animales que el microorganismo desaparecía de los pulmones tras la curación de una neumonía^{5,6}. En la misma línea, se describió la existencia de variaciones geográficas en los genotipos de *P. jirovecii* que se relacionaban con el lugar de residencia pero no con el lugar de nacimiento de los sujetos con PcP, lo que apoyaba la idea de una

transmisión persona a persona en contra de la hipótesis de la reactivación de una infección latente⁷.

La presencia de brotes de PcP entre sujetos inmunodeprimidos hospitalizados en unidades de trasplante, causadas por un genotipo predominante o único de *P. jirovecii*, así como la detección de fragmentos de ADN de *P. jirovecii* en muestras ambientales obtenidas a través de filtros de aire en habitaciones de hospital ocupadas por pacientes con PcP, han servido para corroborar la importancia de la vía aérea en la transmisión de este patógeno en la especie humana y el papel de los pacientes con PcP como fuentes de infección^{8,9}.

Por otra parte, el desarrollo de técnicas moleculares muy sensibles ha permitido demostrar la presencia de este microorganismo en sujetos sin manifestaciones clínicas ni radiológicas de neumonía, utilizando muestras biológicas que no requieren técnicas invasivas para su obtención, como el esputo, los lavados orofaríngeos o los aspirados nasofaríngeos. Esta situación ha sido denominada como infección subclínica, estado de portador o colonización, y ha despertado un gran interés tanto por las implicaciones clínicas que pudiera tener como por su importancia para entender el ciclo completo de la infección por *P. jirovecii* en la especie humana^{4,10}. En este último aspecto, se ha podido demostrar con métodos moleculares, tanto en modelos animales como en el hombre, que los huéspedes inmunocompetentes colonizados por *Pneumocystis* pueden actuar como reservorios y fuentes de transmisión del microorganismo a sujetos susceptibles^{11,12}. Por otra parte, las técnicas moleculares también han servido para confirmar la capacidad de *P. jirovecii* de transmitirse verticalmente por vía transplacentaria en la especie humana, como se había demostrado previamente en el conejo^{13,14}.

Por otra parte, las técnicas moleculares pueden tener también interés clínico, ya que al ser más sensibles que las técnicas convencionales de diagnóstico permiten en muchas ocasiones obviar la necesidad de procedimientos invasivos para confirmar el diagnóstico de PcP¹⁵. En esta misma línea, la identificación de mutaciones puntuales en regiones conservadas del gen de la dihidropteroato sintetasa (DHPS) de *P. jirovecii*, similares a las descritas en otros microorganismos como *Streptococcus pyogenes* o *Plasmodium falciparum*, en los que confieren resistencia a las sulfamidas, podría tener aplicación clínica para el diagnóstico de posibles resistencias al tratamiento en los pacientes con PcP en los que al carecerse de métodos de cultivo los métodos tradicionales para medir la resistencia a fármacos no pueden emplearse. En este sentido, varios estudios han demostrado una asociación entre la presencia de mutaciones puntuales, 55Thr→Ala y 57Pro→Ser en el gen de la DHPS de *P. jirovecii* y fracaso de la profilaxis con cotrimoxazol o dapsona, mientras que aún no está clara la repercusión que la aparición de estas mutaciones pueda tener en la respuesta al tratamiento de la PcP¹⁶.

Bibliografía

- Calderón-Sandubete EJ, Varela-Aguilar JM, Medrano-Ortega FJ, Nieto-Guerrero V, Respalda-Salas N, de la Horra-Padilla C, Dei-Cas E. Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. Protist. 2002;153:303-10.

2. Aliouat-Denis CM, Chabé M, Demanche C, Aliouat el M, Viscogliosi E, Guillot J, Delhaes L, Dei-Cas E. *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. Infect Genet Evol. 2008;8:708-26.
3. Varela Aguilar JM, Medrano Ortega FJ, Calderón Sandubete E. *Pneumocystis jirovecii*: un nuevo nombre para un viejo patógeno. Rev Clin Esp. 2006;206:278-80.
4. Wissmann G, Morilla R, Friaiza V, Calderón E, Varela JM. El ser humano como reservorio de *Pneumocystis*. Enferm Infect Microbiol Clin. 2010;28:38-43.
5. Keely SP, Stringer JR. Sequences of *Pneumocystis carinii* f. sp. Hominis strains associated with recurrent pneumonia vary at multiple loci. J Clin Microbiol. 1997;35:2745-7.
6. O'Donnell WJ, Pieciak W, Chertow GM, Sanabria J, Lahive KC. Clearance of *Pneumocystis carinii* cysts in acute P carinii pneumonia: assessment by serial sputum induction. Chest. 1998;114:1264-8.
7. Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, et al. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. Emerg Infect Dis. 2000;6:265-72.
8. De Boer MG, De Fijter JW, Kroon FP. Outbreaks and clustering of *Pneumocystis* pneumonia in kidney transplant recipients: a systematic review. Med Mycol. 2011;49:673-80.
9. Olsson M, Lidman C, Latouche S, Björkman A, Roux P, Linder E, Wahlgren M. Identification of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis gene sequences in filtered air in hospital environments. J Clin Microbiol. 1998;36:1737-40.
10. Calderón EJ. *Pneumocystis* infection: seeing beyond the tip of the iceberg. Clin Infect Dis. 2010;50:354-6.
11. Chabé M, Dei-Cas E, Creusy C, Fleurisse L, Respaldiza N, Camus D, Durand-Joly I. Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: histological and rt-PCR data demonstrate active replication. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004;23:89-97.
12. Rivero L, De la Horra C, Montes-Cano MA, Rodríguez-Herrera A, Respaldiza N, Friaiza V, et al. *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. Emerg Infect Dis. 2008;14:1116-8.
13. Montes-Cano MA, Chabé M, Fontillon-Alberdi M, De-Lahorra C, Respaldiza N, Medrano FJ, et al. Vertical transmission of *Pneumocystis jirovecii* in humans. Emerg Infect Dis. 2009;15:125-7.
14. Cere N, Drouet-Viard F, Dei-Cas E, Chanteloup N, Coudert P. In utero transmission of *Pneumocystis carinii* sp. f. oryctolagi. Parasite. 1997;4:325-30.
15. Calderón EJ, Gutiérrez-Rivero S, Durand-Joly I, Dei-Cas E. *Pneumocystis* infection in humans: diagnosis and treatment. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010;8:683-701.
16. Matos O, Esteves F. Epidemiology and clinical relevance of *Pneumocystis jirovecii* Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations. Parasite. 2010;17:219-32.

Infección fúngica en el paciente crítico: aspectos clínico-epidemiológicos

Ricardo Serrano García

Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital general Universitario de Alicante, Alicante, España

Epidemiología de la infección fúngica

La infección fúngica, principalmente la candidiasis invasora, en las unidades de cuidados intensivos, es uno de los procesos con mayor relevancia desde el punto de vista clínico, suponiendo la cuarta causa de infección del torrente sanguíneo en diferentes estudios en EE. UU. y Europa, con una mortalidad atribuible en torno al 15-25% de los casos en adultos, y suponiendo un importante impacto en cuanto al coste económico.

Dentro del diagnóstico de la infección fúngica existe una dificultad en cuanto a la diferenciación entre colonización e infección invasora, con grandes limitaciones diagnósticas (bajo rendimiento de cultivos procedentes de muestras biológicas). Así, la candidiasis invasora se puede definir como el conjunto de infecciones graves y oportunistas por las diferentes especies de *Candida*, con diseminación hematológica y con posible afectación de tejidos y líquidos corporales estériles, provocando, entre otros, casos de endocarditis, meningitis, endoftalmítis e infección de órganos profundos. Estos procesos deben diferenciarse de las denominadas colonizaciones, con aislamientos en cultivos de muestras no estériles, como pueden ser la cavidad orofaríngea, esófago y otras mucosas digestivas, y también en muestras cutáneas.

Los factores de riesgo de la candidiasis invasiva están asociados al desarrollo tecnológico, es decir, a la utilización de terapias y procedimientos en el contexto del paciente crítico, como puede ser la antibioterapia de amplio espectro, inmunosupresores, la inserción de catéteres venosos centrales, la administración de nutrición parenteral total, la utilización de técnicas de sustitución renal, o los dispositivos ortopédicos implantables. También cabe mencionar que cada

vez con más frecuencia se procede al ingreso en UCI de pacientes oncológicos y con diferentes grados de inmunodeficiencia, pacientes que cada vez presentan mayor esperanza vital al incorporarse nuevas terapias.

Para comprender el problema de la infección fúngica en UCI es importante conocer qué es lo que ocurre a nivel internacional, nacional y local para poder afrontar de manera eficaz la terapia empírica precoz. Entre los estudios más amplios a nivel internacional se encuentran los realizados por el NNSI (*National Nosocomial Surveillance System*, EE. UU., 1992-1998) en 205 unidades UCI médico-quirúrgicas, con inclusión de casi 500.000 pacientes, en los que se describió un 12,2% de candidemias primarias por *Candida* spp., y el denominado EPIC (*International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units*, 1992), donde se estudió la prevalencia de infección nosocomial en 1.417 unidades UCI europeas pertenecientes a 17 países, describiéndose una tasa de candidiasis invasora del 17%. En el estudio realizado por el ECMM Working Group on *Candidaemia* en 106 centros sanitarios a nivel europeo (septiembre 1997-diciembre 1999), se realizó el aislamiento de diferentes especies de *Candida* en 2.089 hemocultivos, correspondiendo el 56,4% a *C. albicans*, y observándose un incremento de otras especies del género. Este mismo estudio delimitado a su repercusión en 19 hospitales españoles, se aislaron especies de *Candida* en 293 hemocultivos, suponiendo *C. albicans* un 43% de los casos, con incremento de *C. parapsilosis* con el estudio a nivel internacional.

A nivel nacional, el Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial en Servicios de Medicina Intensiva (ENVIN HELICS) demuestra una estabilidad del año 2006 al año 2010 en el porcentaje de infecciones fúngicas en torno al 11-12%, aunque con un claro incremento de aislamientos de especies de *Candida* y con casos de aspergilosis invasora (entre 7 y 13 anuales). Específicamente, en el año 2010, el 12,15% de la infecciones descritas en las UCI participantes fueron por especies fúngicas. La resistencia global de *C. albicans* a fluconazol e itraconazol es del 6,25%. Llama la atención que las fungemias primarias y asociadas a catéter suponen el 9,84% del total y las fungemias secundarias el 9,79%.

También a nivel nacional hay que destacar el *Nationwide Sentinel Surveillance of Bloodstream Candida Infections in 40 Tertiary care Hospitals in Spain* (R. Cisterna et al., *Journal of Clinical Microbiology* 2010), donde también se describe un predominio de aislamientos de *C. albicans* (49,08%), con una resistencia global a fluconazol de los aislamientos de *Candida* spp. del 7%. Por último, el estudio FUNGEMYCA (Peman et al, *Revista Iberoamericana de Micología*, 2011) confirma los resultados anteriores, llegando a la conclusión de que la distribución de especies varía según la unidad de hospitalización, el hospital y la comunidad autónoma.

A nivel intrahospitalario (Hospital General Universitario de Alicante), en el estudio de resistencias correspondiente a los años 2008-2009, la incidencia de infección fúngica global fue del 7%, siendo *C. albicans* el segundo germen más frecuentemente aislado en UCI (13%, suponiendo el 4,8% de los casos de aislamientos en sangre), el tercer germen más frecuente aislado en la UCI pediátrica (13% del total, 7% aislamientos en muestras sanguíneas) y, lo más llamativo, el germen más frecuentemente aislado en reanimación (13% del total, causante del 17% de los aislamientos en sangre). Además, las cepas de *Candida* aisladas en UCI eran más resistentes a fluconazol en relación con los aislamientos del resto del hospital, con un 14% de resistencia a este antifúngico, lo que podría estar relacionado con la realización probablemente de antifungigrama a especies de *Candida* no *C. albicans* o a aislamientos de *C. albicans* con sospecha de resistencia por la mala evolución clínica de los pacientes.

Tras revisión de los estudios anteriormente descritos, y fundamentalmente basándonos en las conclusiones del estudio FUNGEMYCA, decidimos realizar nuestro propio registro intra-UCI, que hemos resumido en un artículo pendiente de publicación. Nuestra intención

fue describir el perfil epidemiológico y el patrón de sensibilidad antifúngica de los aislamientos de hongos en nuestro medio, así como identificar los principales factores de riesgo relacionados con el desarrollo de IFI. Estudiamos los aislamientos fúngicos desde enero de 2007 hasta diciembre de 2010, con descripción de 20 casos de IFI en ese periodo. El grupo IFI presentó una elevada mortalidad hospitalaria y mayor puntuación en las escalas de estratificación de infección fúngica, así como de gravedad al ingreso. Se identifican como factores de riesgo asociados al desarrollo de IFI el antecedente de EPOC y de cirugía digestiva, así como la administración de nutrición parenteral total y la corticoterapia sistémica prolongada. La especie fúngica predominante en ambos grupos fue *C. albicans*. La tasa de resistencia a azoles fue similar a la de series más amplias.

Utilidad de las escalas de riesgo de infección fúngica

En las UCI se determinan fundamentalmente el *Candida score* (una puntuación superior a 2,5 puntos ayuda a seleccionar a aquellos pacientes que se beneficiarían de un tratamiento empírico precoz) y el llamado *Sevilla score* (que valora el riesgo de infección invasiva por *Candida*), ya que el principal problema que se nos plantea es iniciar un tratamiento empírico precoz ante la sospecha de infección fúngica grave, y cuyo retraso de instauración aumenta las posibilidades de fracaso terapéutico y, por lo tanto, de mortalidad asociada.

Tratamiento empírico de la IFI en UCI

Habitualmente, nos basamos en las guías IDSA para el abordaje de la candidiasis invasora y de la aspergilosis broncopulmonar. Así se abordará el tratamiento empírico de la candidemia en pacientes no neutropénicos y en neutropénicos respectivamente, el tratamiento empírico de candidiasis invasiva también diferenciando entre pacientes neutropénicos y no neutropénicos, tratamiento para la candidiasis neonatal. También revisaremos la profilaxis quirúrgica para receptores de trasplante de órgano sólido, pacientes hospitalizados en UCI, pacientes neutropénicos que reciben quimioterapia y receptores de trasplantes de células madre con riesgo de contraer candidiasis. Por otro lado, también se realizará de forma esquemática una revisión de las guías IDSA para el tratamiento de la aspergilosis. Por último, realizaremos una valoración de la utilización de las diferentes candidinas disponibles en el mercado viendo su perfil de interacciones medicamentosas y detallando sus características diferenciales: anidulafungina: metabolización periférica, no interacciones farmacológicas, indicada en hepatopatías, estudios en HFVVC (20% absorción de membranas); caspofungina: indicada en neutropenia febril y rescate en aspergilosis, niños por encima de los 12 meses; micafungina: no requiere dosis de carga, no necesita ajuste de dosis por sobrepeso o I. hepática. Estudios en HFVVC (4% absorción de las membranas). Utilidad en niños de edad inferior a 12 meses.

Diagnóstico de la infección fúngica en el paciente crítico

Julio García Rodríguez

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España

La infección fúngica invasora (IFI) en pacientes de Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) es un problema emergente. Los principales responsables son, fundamentalmente, especies del género *Candida* y, en menor medida, *Aspergillus*. El pronóstico de estas infecciones depende de la instauración precoz de un tratamiento adecuado y para ello se necesitan pruebas diagnósticas rápidas, seguras y fiables que ayuden al clínico a la hora de decidir administrar o retirar un tratamiento antifúngico.

Diagnóstico de IFI por *Candida* spp.

El género *Candida* es el principal responsable de IFI en UCI. El estudio epidemiológico ENVIN en su informe de 2010 sitúa a *Candida albicans* como el quinto patógeno más frecuentemente aislado en pacientes críticos. Considerando todas las especies de *Candida*, en conjunto llegan a alcanzar el 11,2% de los casos de infección en UCI. Desde el

servicio de microbiología se puede ofertar diferentes soluciones para el diagnóstico precoz de las infecciones profundas por *Candida* spp.

1. Métodos convencionales (tinción y cultivo)

Las infecciones por *Candida* spp. pueden afectar a diferentes órganos o sistemas: digestivo, genitourinario, sistémico, cutáneo, sistema nervioso central, incluso respiratorio. Y en casi todas estas situaciones, un examen directo previo de la muestra, ya sea mediante un examen en fresco o con tinciones de Gram en microscopio óptico, o con tinciones fluorescentes como el blanco de calcoflúor, puede aportar gran información de forma rápida, barata y segura a pesar de su baja sensibilidad.

El cultivo de las muestras sigue siendo, a pesar de sus limitaciones, el referente en el diagnóstico de las candidiasis profundas. Cualquier muestra puede cultivarse: líquidos estériles, biopsias, muestras de tejidos, abscesos, etc. Las muestras respiratorias de vías bajas, como esputos, aspirados bronquiales y lavados broncoalveolares, tienen un valor controvertido porque muchos expertos consideran que las neumonías o infecciones respiratorias por *Candida* spp. son excepcionales. El hemocultivo destaca como técnica de referencia para la mayoría de las candidiasis profundas. A pesar de que su sensibilidad es baja, la mayor parte de las candidiasis invasoras se diagnostican de esta manera. Los nuevos sistemas automatizados de lectura continua y los viales que contienen resinas que secuestran antibióticos, permiten una mayor recuperación de levaduras en sangre. Además, hoy en día, el tiempo transcurrido desde la obtención del hemocultivo hasta la identificación del agente etiológico se ha acortado considerablemente gracias a la realización directa sobre el hemocultivo crecido de técnicas moleculares, espectrometría de masas o métodos de hibridación fluorescente de ácidos nucleicos. Sin embargo, a pesar de todo lo que se ha avanzado para acelerar el procedimiento de identificación, todavía hay que esperar al menos un día más para poder interpretar los estudios de sensibilidad. Estos tiempos no son asumibles en los pacientes con candidemia, en especial en pacientes críticos, por lo que se están desarrollando nuevas técnicas no convencionales que intentan detectar componentes o metabolitos del hongo directamente en la muestra con el fin de acelerar el diagnóstico.

2. Métodos no convencionales

En general se pueden distinguir entre aquellas técnicas serológicas que detectan componentes metabólicos o estructurales de las levaduras y las que detectan genoma fúngico.

2.1. Marcadores serológicos. Entre los principales métodos podemos destacar:

Detección de antígenos:

– Enolasa: sensibilidad (S), 13-78%.

– Manano: S 25-65%.

– *Heat Shock Protein*: S 87,5%.

Detección de anticuerpos:

– Antienolasa: S 74%.

– Antimicelio: S 84,4%. Se ha observado que este test puede tener no solo valor diagnóstico sino pronóstico para valorar la respuesta al tratamiento.

Combinación de antígeno y anticuerpo:

– Manano. Con el fin de incrementar la sensibilidad, especialmente en pacientes neutropénicos, estas técnicas detectan tanto antígenos como anticuerpos específicos.

Detección de β -D-glucano. Es una técnica serológica menos específica ya que detecta un componente estructural de la pared del hongo que es común a muchos géneros distintos. Los estudios realizados en pacientes críticos revelan una alta sensibilidad pero menor especificidad para el diagnóstico de candidiasis invasora.

2.2. Biología molecular. Las técnicas que amplifican el genoma de especies de *Candida* directamente de la muestra se están aplicando con resultados dispares dependiendo del tipo de PCR que sea llevada a cabo, diana amplificada, muestra, sistema de extracción, etc. Con

todo, los diferentes estudios muestran sensibilidades que oscilan entre el 70 y el 100% y especificidades entre el 66 y el 100%.

2.3. Otros marcadores. La ausencia de un test diagnóstico «definitivo» para la candidiasis invasora, ha propiciado la aparición de otras soluciones basadas en el empleo de marcadores inespecíficos de sepsis, como la procalcitonina, que parece que en estas infecciones no se eleva todo lo que se esperaría en un paciente séptico, o la utilización de *scores* clínicos que, combinando diferentes variables que incluyen colonización por *Candida* spp., situación clínica del paciente y antecedentes patológicos, pretenden identificar a los pacientes de mayor riesgo de presentar esta enfermedad que se beneficiarían de un tratamiento antifúngico precoz.

Diagnóstico de IFI por *Aspergillus* spp.

Las infecciones por *Aspergillus* spp. son un problema emergente dentro de las UCI, especialmente entre los pacientes hematológicos y pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), que suelen estar tratados con corticoides durante mucho tiempo antes de su ingreso, y que en ocasiones ya ingresan colonizados por una o varias especies de *Aspergillus*. En estos últimos pacientes, la mortalidad suele ser mayor que en los hematológicos porque hay una gran respuesta inflamatoria a expensas de neutrófilos que implica una mayor destrucción tisular. Todo ello en un contexto de función ventilatoria ya limitada.

1. Diagnóstico convencional

Al igual que con *Candida* spp., los métodos clásicos de diagnóstico microbiológico implican los exámenes directos en fresco o con tinciones fluorescentes y los cultivos de las muestras obtenidas. Sin embargo, la sensibilidad global de ambos métodos no supera el 50%. Es por ello que se han desarrollado otras técnicas que tratan de incrementar no sólo la sensibilidad, sino la precocidad del diagnóstico.

2. Diagnóstico no convencional

El diagnóstico microbiológico no convencional se basa en la detección de marcadores serológicos, como el antígeno de galactomanano y el 1-3 β -D- glucano, y las técnicas de biología molecular.

– Galactomanano. Se trata de un antígeno polisacárido que se libera de las hifas de *Aspergillus* spp. cuando está creciendo y que se puede detectar en suero. Esta prueba se ha mostrado muy útil en pacientes neutropénicos con trasplantes alogénicos de médula ósea o leucemias mieloides agudas. En esta población, los estudios señalan una sensibilidad en torno al 85%. Sin embargo, en pacientes inmunocompetentes, aunque estén en estado crítico, la sensibilidad de la técnica no supera el 40 %. Por ello se están desarrollando modificaciones de la técnica entre las que destaca su utilización para detectar el antígeno en lavados broncoalveolares. En este tipo de muestras, sí que parece tener una mayor utilidad cuando se aplica a pacientes críticos no inmunodeprimidos. Los estudios así parecen confirmarlo con sensibilidades del 88% y, lo que es muy importante, elevado valor predictivo negativo, especialmente con dos muestras consecutivas negativas. – β -D-glucano. Al igual que para el diagnóstico de candidiasis invasora, su detección ha mostrado cierta utilidad cuando se ha utilizado para el diagnóstico de aspergilosis en pacientes críticos. Sin embargo, la especificidad parece ser su principal debilidad.

– Biología molecular. Esta tecnología está tardando en su aplicación para el diagnóstico de la aspergilosis invasora. Diferentes problemas en la estandarización de la técnica y la determinación de la mejor muestra han ralentizado su implantación en la rutina diagnóstica. En los últimos años han aparecido diferentes pruebas comerciales basadas en la PCR a tiempo real, que detectan el genoma de *Aspergillus* spp. en suero o muestras respiratorias, así como sistemas de PCR múltiple tipo Septi-Fast®, que detectan *Aspergillus fumigatus* en sangre completa. Recientemente se ha estudiado la eficacia de uno de estos test (Myc Assay®) en muestras de lavado broncoalveolar de pacientes críticos con resultados al menos tan buenos como el galactomanano.

Las nuevas tecnologías aportan rapidez respecto a las técnicas basadas en cultivo para el diagnóstico de IFI.

La reciente incorporación de la proteómica en este campo y la aparición de técnicas que combinan amplificación genómica con espectrometría de masas, auguran un futuro fascinante en el diagnóstico microbiológico y, en especial, en el de la IFI. Sin embargo, como en otras áreas de la microbiología, siempre tenemos que intensificar los esfuerzos para intentar aislar el hongo, ya que ello nos permitirá realizar estudios fenotípicos de sensibilidad y estudios poblacionales, hoy por hoy imposibles sin el cultivo.