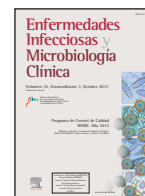




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Actualización en técnicas para diagnóstico microbiológico de infecciones fúngicas

Araceli Monzón de la Torre* y Alicia Gómez-López

Laboratorio de Referencia e Investigación en Micología, CNM-ISCIH, Majadahonda, Madrid, España

RESUMEN

Palabras clave:

Diagnóstico micosis
Infección fúngica
Medios de cultivo
Identificación
PCR
Aspergilosis
Candidiasis
Biomarcadores

Durante los últimos años se ha producido un incremento constante de las infecciones fúngicas, especialmente en pacientes inmunocomprometidos y sometidos a terapias invasivas, en los que un diagnóstico precoz es importante para su tratamiento y evolución debido a la alta mortalidad ocasionada por estas infecciones. Dadas las limitaciones del diagnóstico clásico, basado en la recuperación, cultivo y estudio de las características macroscópicas y microscópicas del hongo, se están desarrollando y aplicando nuevas técnicas basadas en la detección de diferentes metabolitos, antígenos y ácidos nucleicos fúngicos, así como anticuerpos producidos en respuesta a la infección, que facilitan el diagnóstico rápido de estas infecciones, en especial cuando varias de estas técnicas se utilizan combinadas. Algunos de estos nuevos métodos, en general dotados de buena sensibilidad y fiabilidad, requieren metodologías complejas, personal experimentado y están disponibles en muy pocos laboratorios. El presente trabajo muestra una revisión de las técnicas disponibles y otras en desarrollo para el diagnóstico de las infecciones fúngicas, su utilidad clínica y su posibilidad de utilización de forma rutinaria por los laboratorios clínicos y/o la necesidad de contar con laboratorios de referencia.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Microbiological diagnosis of fungal infections: an update

ABSTRACT

Keywords:

Diagnosis mycoses
Fungal infection
Culture media
Identification
PCR
Aspergillosis
Candidiasis
Biomarkers

Recent years have seen an increase in fungal infections, especially in immunocompromised patients undergoing invasive therapy. Conventional diagnosis methods based on culture are labour-intensive, time-consuming, have variable sensitivity, and in some cases are infeasible due to clinical factors. New assays such as detection of different metabolites, antigens, fungal nucleic acids and antibodies play an important role in the diagnosis and monitoring of response to therapy, especially when several of these techniques are used in combination.

Some of these new methods with good sensitivity and reliability require complex methodologies, experienced personnel and are available in very few clinical laboratories. We present a review of the available techniques and other investigational platforms that have recently emerged as promising tools for the diagnosis of fungal infections, their clinical utility and their potential routine use in clinical laboratories and/or the need to rely on reference laboratories.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: amonzon@isciii.es (A. Monzón de la Torre).

Introducción

Durante las últimas décadas, las infecciones fúngicas representan un papel cada vez más importante en la clínica, con un aumento constante en su prevalencia.

Todos los especialistas coinciden en señalar que el mayor número de pacientes inmunodeprimidos y la generalización de prácticas diagnósticas y terapéuticas agresivas son las principales causas del incremento de las micosis. A esto debemos añadir que algunas especies presentan una elevada tasa de resistencia a los antifúngicos, con lo que estas infecciones son cada vez más graves.

Estudios realizados en Estados Unidos y Europa indican que *Candida* spp. se encuentra entre los microorganismos aislados más frecuentemente en hemocultivos; representa un 5-10% de las sepsis nosocomiales y cada vez es más frecuente el aislamiento de especies distintas de *Candida albicans*.

Los hongos miceliales que con más frecuencia causan infecciones pertenecen al género *Aspergillus*, aunque en los últimos años también se está detectando un notable aumento en la incidencia de infecciones por otros géneros como *Scedosporium*, *Fusarium*, mucorales, etc. La mortalidad asociada a estas infecciones es muy elevada y, aunque está condicionada por el tipo de la enfermedad del huésped, se asume que para candidemia oscila entre el 25-45%, para aspergilosis invasiva (AI), entre el 30-90% y para otras especies, entre el 80-90%.

Con respecto a las infecciones fúngicas superficiales causadas fundamentalmente por dermatofitos, a pesar de su gran prevalencia, generan menos interés, quizá porque su diagnóstico y tratamiento no son muy complejos y, sobre todo, por su escasa capacidad para producir infecciones invasivas que pongan en peligro la vida del paciente.

También es importante reseñar que cada año se describen nuevas especies de hongos capaces de causar infecciones en humanos, principalmente en enfermos inmunodeprimidos.

Por otro lado, la aparición de nuevos compuestos y el desarrollo de pruebas estandarizadas para la detección de su actividad antifúngica conllevan la posibilidad de que los pacientes puedan ser tratados con varias alternativas, además de poder realizar cambios terapéuticos considerando la especie infectante y su sensibilidad. Otro punto a tener en cuenta es la identificación más precisa de las especies fúngicas debido al desarrollo y disponibilidad de técnicas moleculares, que han condicionado cambios taxonómicos importantes en los últimos años. Es el caso de algunas especies indistinguibles mediante métodos clásicos pero que presentan diferentes patrones de sensibilidad a los antifúngicos, lo que pone de manifiesto la importancia de una correcta identificación.

Como conclusión de todo lo anterior queda demostrada la importancia y necesidad de la identificación específica de los hongos, tanto levaduriformes como filamentosos.

Diagnóstico de micosis en el laboratorio

El diagnóstico correcto de las infecciones fúngicas debe basarse en una estrecha relación del clínico con el laboratorio, ya que una muestra mal recogida, transportada y/o procesada da lugar a errores en el diagnóstico y retrasos en un tratamiento que puede ser esencial para la vida del paciente, sobre todo en infecciones profundas en enfermos inmunocomprometidos causadas por hongos oportunistas.

En las infecciones superficiales pueden observarse lesiones más o menos típicas de un determinado agente etiológico, aunque estas lesiones también pueden indicar otra patología dermatológica y estar alteradas por tratamientos previos, sobre todo por corticoides.

Las micosis profundas presentan pocos signos o síntomas específicos y, a menudo, se requieren técnicas especiales, generalmente invasivas, para obtener muestras adecuadas, como humor vítreo en endoftalmitis, lavado broncoalveolar (LBA) y/o punción transtraqueal en infecciones pulmonares, líquido cefalorraquídeo (LCR), etc., para poder realizar el diagnóstico lo más rápido posible.

La función del laboratorio de micología en el diagnóstico de las infecciones fúngicas consiste en detectar, recuperar e identificar correctamente el hongo, de forma que se pueda aplicar el tratamiento adecuado lo más rápidamente posible, ya que cuanto antes se inicie el tratamiento específico más favorable será el resultado. En los últimos años se ha avanzado en el desarrollo de métodos rápidos y muy fiables que han contribuido a mejorar el manejo de la infección fúngica de gravedad. Los métodos clásicos de diagnóstico basados en el cultivo y en la observación directa del hongo en la muestra clínica, aunque siguen considerándose de referencia o *gold standard*, requieren de gran experiencia, índice de sospecha y, en general, adolecen de baja sensibilidad y especificidad^{1,2}, pero siguen siendo necesarios y de utilidad en la mayoría de los laboratorios asistenciales.

Los nuevos métodos no basados en el cultivo, en general dotados de buena sensibilidad y fiabilidad, requieren metodologías complejas, personal experimentado y están disponibles en muy pocos laboratorios.

A continuación se hace una breve descripción de los métodos más usados para el diagnóstico micológico.

Identificación clásica o convencional

La identificación clásica persigue la detección y el reconocimiento de estructuras específicas del hongo directamente en la muestra clínica y ahorran días o semanas en la recuperación e identificación de un hongo³. Los métodos utilizados para la recuperación e identificación del hongo causante de la infección se sustentan en:

- *Recogida, transporte y almacenamiento correcto de la muestra.* La cual siempre debería ir acompañada de la historia clínica del paciente (síntomas actuales, localización de la lesión, enfermedad de base, tratamientos con antimicrobianos, corticoides e inmunosupresores), incluyendo información sobre edad, sexo, profesión, nacionalidad, viajes y/o estancias en determinados países, contacto con animales, etc., ya que estos datos pueden sugerir la infección por determinados hongos, lo que permite dirigir el cultivo y las diferentes técnicas disponibles hacia ese grupo de hongos, facilitando su recuperación e identificación.

Algunas muestras deben tratarse como prioritarias dada su importancia. Son las denominadas "muestras nobles", como hemocultivos, biopsias, LBA, líquidos provenientes de broncoscopias, punción transtraqueal, LCR, etc.

- *Examen directo de la muestra.* Realizado por personal experimentado proporciona información importante para el diagnóstico y para sospechar si se trata de un hongo contaminante o del agente etiológico. Pueden reconocerse estructuras más o menos específicas de un hongo o grupo de hongos (formas levaduriformes de *Histoplasma* o *Sporothrix* en sangre y/o médula ósea, quistes de *Pneumocystis*, hifas anchas y no septadas de mucorales, hifas septadas y cabezas de *Aspergillus*). Esto permite adelantar un tratamiento empírico en espera del cultivo positivo.

Además sugieren al laboratorio la utilización de medios especiales para favorecer la recuperación del hongo.

- *Cultivo e identificación del hongo aislado.* Permiten aislar el hongo para su posterior identificación y estudio de sensibilidad a antifúngicos. En general se usan medios básicos con y sin antibacterianos y varios especiales elegidos según el origen de la muestra y/o la sospecha clínica, con algunas diferencias según se sospeche levadura o filamentosos.

Para los hongos levaduriformes es útil emplear un medio cromogénico que colorea las colonias y sugiere algunas especies, lo que permite sobre todo detectar cultivos mixtos (representan un 30%) y ofrece además una identificación presuntiva rápida. Por ejemplo, en Chrom-agar®, *C. albicans* presenta colonias verdes y *Candida tropicalis*, colonias azules⁴.

Su identificación clásica/convencional se basa en evaluar la capacidad del hongo para asimilar y transformar diferentes

sustratos como hidratos de carbono, fermentación de azúcares, etc. Estas pruebas bioquímicas están al alcance de casi todos los laboratorios asistenciales, ya que existen métodos comerciales, como ID 32C y API 20C AUX (BioMérieux), Auxacolor (BioRad), Fungicrom, etc. La mayoría de ellos están disponibles en formatos automatizados (VITEK2 de BioMérieux, Rapid Yeast Identification Panel MicroScan de Beckman-Coulter, etc.) y son fiables y bastante rápidos.

Siempre deben complementarse con un agar que permita el estudio morfológico (agar harina de maíz o agar arroz) mediante la visualización de las estructuras características, forma y tamaño de las blastoconidias, hifas, pseudohifas, clamidosporas, artroconidias, ascosporas, etc.

Ante la sospecha de *Cryptococcus* se utiliza la tinción con tinta china, que permite visualizar la cápsula (detecta la presencia del polisacárido capsular) y es particularmente útil en el diagnóstico de *Cryptococcus neoformans* en LCR. La presencia de levaduras encapsuladas es indicador de meningitis criptocócica.

Para el cultivo de hongos filamentosos se suele utilizar también agar extracto de malta (MEA), que favorece la esporulación, y agar Czapek Dox (CZP), específico para crecimiento y descripción de *Aspergillus* spp.

Dado que la identificación se realiza sobre la base de la forma y tipo de esporulación, se utilizan medios que la favorecen como agar patata dextrosa (APD), agar agua (AA), agar oat meal (OMA), etc. También es útil el microcultivo, que mejora la visualización de las estructuras características del hongo y su forma de esporulación (hifas, fialides, esporas). Se incuban a 28-30 °C durante un mínimo de 3 semanas, a diferencia de las levaduras, que crecen en 2 o 3 días, incluso para algunos como *Histoplasma*, *Trichophyton tonsurans*, *Exophiala* o *Alternaria* pueden ser necesarias hasta 6 semanas. Una vez obtenido un crecimiento adecuado de las colonias se realiza el examen microscópico, con el fin de observar estructuras características del hongo.

Su identificación clásica/convencional descansa en la observación de las características macroscópicas de la colonia y de las características microscópicas, es decir, la visualización de las estructuras características de reproducción sexual, asexual y morfología especial de las hifas, descritas en múltiples atlas micológicos⁵. Por tanto, la experiencia y formación del observador es fundamental e imprescindible.

Las preparaciones se realizan con lactofucsina, azul de lactofenol o agua destilada estéril. Existen 2 métodos que pueden usarse indistintamente, la toma con aguja de inoculación (para muestras cultivadas en tubos) es rápida y sencilla, pero deteriora las estructuras del hongo y puede dificultar la identificación, o la técnica de papel celofán (método Pelikan Roll Fix o su modificación utilizando Print Roller-adhesivo transparente)⁶.

Se puede asociar una serie de pruebas complementarias, con utilidad no claramente definida, que, basándose en la utilización de diversos compuestos, agar para dermatofitos (DTM), perforación de pelo, desdoblamiento de urea, utilización de agares *trichophyton*, crecimiento en medio de arroz, etc., ayudan a la identificación, fundamentalmente de los dermatofitos. Todas estas pruebas requieren lecturas entre 5 días y 2 semanas, lo que dificulta la identificación rápida del hongo.

Identificación molecular de la cepa aislada

La identificación clásica o convencional de levaduras y hongos filamentosos no permite una identificación precisa ni con la suficiente rapidez para el tratamiento adecuado en algunas especies (diferente sensibilidad a los antifúngicos de las distintas especies dentro de un mismo género). El importante avance que han experimentado las técnicas de biología molecular en los últimos años ha condicionado el desarrollo de nuevas técnicas con sensibilidad y especificidad ele-

vadas, que permiten una identificación más precisa de los hongos patógenos. Además, basándose en estas técnicas moleculares se han realizado estudios taxonómicos que han ocasionado cambios en la clasificación de los hongos patógenos humanos con una continua reclasificación de especies, algunas de las cuales son indistinguibles por métodos clásicos, pero presentan diferentes patrones de sensibilidad a los antifúngicos.

Estas técnicas se basan en la amplificación (mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR) y secuenciación de diversos fragmentos de ADN, que corresponden a genes adecuados para la identificación de género y especie de los hongos. Preferentemente se amplifican fragmentos localizados en la región del ADN ribosomal (genes 5.8S, 18S y 28S). Estas secuencias tienen la particularidad de encontrarse repetidas n veces en el genoma fúngico (genes multicopia), lo que permite obtener buenos niveles de sensibilidad, así como mostrar gran variabilidad intraespecie, lo que favorece su especificidad.

Los métodos moleculares son de aplicación universal y contribuyen a la caracterización de especies fúngicas de forma exacta y rápida.

La técnica admite la posibilidad de realizar una reacción de PCR directa a partir de una colonia de la levadura problema aislada en medio de cultivo apropiado (habitualmente Sabouraud) y preparando una suspensión densa en agua estéril, de la que se añade la cantidad adecuada en el tubo de PCR. El mismo protocolo de PCR, con una fase inicial de desnaturalización a elevada temperatura, es suficiente para la ruptura de la pared de la célula levaduriforme y la liberación del material genético para su posterior amplificación de forma casi inmediata. Este "método directo" de amplificación de ADN no es, sin embargo, un método universal, y existen algunas especies de levaduras que requieren métodos alternativos con procesos de extracción de ADN más laboriosos, que necesitan varios pasos sucesivos para favorecer la ruptura de la pared y optimizar la recuperación del material genético de forma específica⁷.

Para las levaduras se amplifica la región del ADNr con la combinación de iniciadores ITS-1 + ITS-4, y si no hay amplificación se procede a la amplificación con las combinaciones: ITS-1 + ITS-2, ITS-3 + ITS-4, ITS-5 + ITS-4 y/o D1/D2.

En algunos casos particulares es muy útil amplificar además el fragmento IGS1, que proporciona información adicional sobre los genotipos circulantes y permite clasificar mejor algunas especies como *Trichosporon* y *Cryptococcus*⁸.

Para los hongos filamentosos, aunque se puede emplear este método rápido de extracción de ADN, habitualmente se utiliza el método clásico, en el que, a partir de una siembra de esporas en un medio apropiado, se incuba hasta que el micelio se desarrolle y forme un césped, al que se somete a un proceso de ruptura mecánica de la pared celular para la liberación del material genético y amplificación mediante PCR.

Además de la diana general, ITS, se utilizan otras dianas específicas de género:

- β -tubulina para *Aspergillus* y *Neosartoria*.
- Tubulina para *Scedosporium* spp.
- Factor de elongación EF1 α para *Fusarium*.
- Microsatélites para *Trichophyton* y *Microsporium*.
- D1-D2, citocromo B, etc.

Tras la amplificación, se purifica el producto de PCR, se secuencian y se analiza la secuencia comparándola con bases de datos de referencia (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Identificación mediante espectrometría de masas

Se trata de una técnica rápida y fiable para la identificación de microorganismos, basada en el perfil de proteínas (específico de cada especie) o en el análisis de ácidos nucleicos.

Es una técnica de ionización suave de la muestra, MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*; desorción/ionización por láser asistida por matriz) que permite el análisis de proteínas mediante un sistema TOF (*time of flight*; tiempo de vuelo). Los iones generados se separan en función de su relación masa/carga, y según esto se genera un espectro. Este espectro es específico de especie, por lo que cada microorganismo presenta siempre un espectro característico. Los espectros se incluyen en una base de datos, con la que se compara el espectro obtenido para identificar el microorganismo con un rango de concordancia⁹.

Se utilizan fundamentalmente 2 sistemas disponibles comercialmente, MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Alemania) y Axima[®] MALDI-TOF/MS, actualmente VITEK-MS (Shimadzu-Biomerieux).

La técnica puede realizarse a partir de un cultivo puro del hongo o a partir de una muestra clínica. La duración del proceso varía según el método y el equipo utilizado, reduciendo el tiempo de identificación en 5-7 días dependiendo del hongo.

Los rangos de identificación también son diferentes según el sistema utilizado, el sistema Bruker utiliza valores entre 0 y 3 (≥ 2 fiable a nivel de especie, entre 1,7-2 fiable a nivel de género y $< 1,7$ no fiable), mientras que el sistema Shimadzu-Biomerieux utiliza porcentajes ($\geq 70\%$ fiable a nivel de especie, entre 70-40% fiable a nivel de género y $< 40\%$ no fiable).

Diversos trabajos demuestran que esta técnica presenta una correlación con los métodos clásicos $> 95\%$ para las levaduras más habituales y $> 80\%$ para las infrecuentes. Además, permite diferenciar especies indistinguibles por métodos convencionales, como las incluidas en los complejos *Candida glabrata/bracarensis* o *Candida parapsilosis/orthopsilosis/metapsilosis*^{10,11}.

En cuanto a hongos filamentosos, la correlación también es buena, consiguiéndose una identificación correcta a nivel de especie $> 90\%$ para especies como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y mucorales^{12,13}.

La correlación está claramente influenciada por los espectros incluidos en la base de datos del sistema pero, dado que los sistemas disponibles permiten incorporar nuevos espectros, es de esperar que mejore en un futuro próximo¹⁴.

Esta metodología también puede utilizarse para estudios de tipificación de brotes y de resistencia a antifúngicos¹⁵. Cada vez son más numerosos los laboratorios clínicos dotados de esta metodología, a pesar del elevado coste.

Métodos independientes del cultivo

Los métodos independientes del cultivo se basan en detectar antígenos (Ag), metabolitos y componentes fúngicos, anticuerpos (Ac) producidos frente al hongo o ADN directamente en la muestra clínica. Con ellos se intenta realizar un diagnóstico rápido para la instauración precoz del tratamiento antifúngico más efectivo, pero no permiten diferenciar entre colonización e infección.

Hay que tener en cuenta que las técnicas de detección de Ac están muy influenciadas por la patología del paciente y en enfermos inmunocomprometidos su producción está afectada, lo que dificulta su detección y origina falsos negativos. A pesar de esto, se dispone de varias técnicas de utilidad¹⁶.

Detección de antígeno capsular de *Cryptococcus*

Se dispone de una técnica de EIA (enzimoinmunoanálisis) y una técnica de aglutinación con partículas de látex, que es la más utilizada. En ella los Ac mono- o policlonales frente al polisacárido capsular (glucuroxilomanano) se fijan a las partículas de látex, las cuales reaccionan con la muestra y originan una precipitación. Es una técnica fácilmente utilizable en cualquier laboratorio, muy rápida (15-20 min) y su sensibilidad es del 99% en LCR para meningitis criptocócicas en paciente positivos al virus de la inmunodeficiencia humana.

La sensibilidad disminuye a un 75-80% en otros grupos de pacientes y en infecciones pulmonares¹⁷.

Además de en LCR, puede realizarse en otros líquidos orgánicos y en suero. Permite la titulación del Ag mediante diluciones seriadas para facilitar el seguimiento de la infección y evaluar la efectividad del tratamiento (semicuantitativa).

Es una de las técnicas independientes del cultivo más útiles y rápidas para diagnosticar criptocosis, pero puede dar falsos positivos en presencia de factor reumatoide, infección por *Trichosporon* y algunas neoplasias.

Una técnica recientemente desarrollada es el dispositivo de flujo lateral (LFD, *lateral flow device*), que ofrece fácil manejo, gran versatilidad y proporciona un diagnóstico rápido. Es una inmunocromatografía que utiliza una combinación de 2 Ac monoclonales, uno de ellos reacciona con Ag de los serotipos A, B y C, y el otro con Ag de los serotipos A y D, lo que permite identificar todos los serotipos y supone una ventaja en comparación con la aglutinación con látex o EIA, presentando una concordancia con dichas técnicas superior al 90%.

Puede realizarse en suero, plasma y LCR, con una sensibilidad y especificidad $> 99\%$ ^{18,19}.

Detección de antígenos y anticuerpos de *Candida*

Son técnicas útiles para el diagnóstico de candidiasis invasivas, ya que en ellas el hemocultivo solo aparece positivo en un 50% casos.

Para la detección de Ag se dispone de técnicas de aglutinación con partículas de látex y de detección de manano mediante ELISA (Platelia *Candida* Ag[®], BioRad), esta última bastante más sensible y específica. Detecta la presencia de manano en suero utilizando un Ac monoclonal, EBCA1, que reconoce residuos β -1-5 manano de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *Candida guilliermondii*.

Respecto los Ac, las técnicas disponibles detectan Ac antimanano y antimicelio de *C. albicans*.

La detección de Ac antimanano se realiza en suero mediante una técnica de ELISA (Platelia *Candida* Ab/Ac/Ak[®], BioRad). La técnica puede ser cuantitativa realizando diluciones seriadas, lo que permite titular la cantidad de Ac y relacionarlos con la evolución clínica y/o microbiológica del paciente²⁰⁻²².

La sensibilidad de estas técnicas mejora realizando la detección simultánea de Ag y Ac, para lo que disponemos de una técnica combinada (Platelia Ag Plus y Ab Plus[®], BioRad) que presenta una sensibilidad del 80% y una especificidad del 85%.

Se recomienda realizar determinaciones en muestras seriadas 2 veces por semana en pacientes de riesgo.

La técnica antimicelio o antitubos germinales de *C. albicans* es una técnica de inmunofluorescencia indirecta (Invasive Candidiasis [CAGTA] IFA IgG[®] Vircell S.L.), que detecta Ac específicos de tipo IgG frente a Ag de la fase micelial.

Aunque la utilidad de la detección de Ac frente al CAGTA para el diagnóstico y monitorización terapéutica de la candidiasis invasiva es clara, y un título $\geq 1/160$ es sugestivo de infección por *C. albicans*, es más útil su detección seriada en pacientes de riesgo²³.

Se realiza en suero y se evalúa la fluorescencia mediante microscopía según su localización en distintas zonas de los tubos germinales, siguiendo las indicaciones del fabricante. En general, las levaduras (blastoconidias) no presentan fluorescencia. La sensibilidad y la especificidad se estiman en el 84 y el 94%, respectivamente. Permite discriminar entre infección y colonización, ya que estos Ac únicamente se producen frente a los Ag de la pared celular de *Candida* cuando la levadura está infectando.

Detección de antígenos y anticuerpos de *Aspergillus*

El principal Ag utilizado para el diagnóstico de AI es el galactomanano (GM); es un polisacárido presente en la pared de la mayoría de especies de hifomicetos hialinos, fundamentalmente de *Aspergillus*,

el cual se libera durante la infección al producirse el crecimiento de las hifas y la invasión del tejido.

Su detección se realiza mediante técnica de ELISA en suero utilizando el Ac monoclonal EBA-2, que reconoce fundamentalmente *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* (Platelia Aspergillus EIA®, BioRad). Se recomienda realizar mediciones seriadas 2 veces por semana^{24,25}.

Pruebas positivas permitirían iniciar el tratamiento cuando la infección es aún subclínica y evaluar la respuesta al tratamiento, ya que la detección de un incremento significativo debe hacer pensar en fallo terapéutico²⁶.

Puede determinarse en otras muestras como LBA, LCR para diagnóstico de AI cerebral, orina o plasma, pero en general la sensibilidad es menor que en el suero^{25,27,28}.

En términos generales, la sensibilidad y la especificidad son buenas, > 85 y 90%, respectivamente, con un valor límite de positividad $\geq 0,7$ ng/ml en suero, pero se elevan al 96 y 98% si se considera un punto de corte dinámico de 2 muestras positivas separadas 3-4 días con cifras > 0,5 ng/ml. En AI puede aparecer positivo antes de que se observen signos clínicos y radiológicos, lo que permite el tratamiento precoz.

Las determinaciones seriadas 2 por semana son útiles para evaluar la respuesta al tratamiento y la evolución de la infección, ya que la cantidad de GM está relacionada con la carga fúngica y su elevación sugiere fallo terapéutico.

Se debe tener en cuenta que la sensibilidad y, en menor proporción, la especificidad están influenciadas por otros factores como: tipo de aspergilosis (posible, probable o probada), especie de *Aspergillus* (infecciones por *A. fumigatus* en pacientes oncohematológicos presentan concentraciones menores que las causadas por otras especies)²⁹, inmunidad del paciente, tratamientos antifúngicos previos (azoles), edad del paciente (la sensibilidad en niños es menor), trasplantes de órgano sólido y hemodiálisis (pueden aparecer valores elevados por acumulación al no filtrarse). Dependiendo de estos factores, la sensibilidad puede oscilar entre el 30 y el 99%.

Otro dato a tener en cuenta son las posibles reacciones cruzadas con otros hongos como *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Acremonium* y *Cryptococcus*. Destaca también el bajo valor predictivo positivo en algunos grupos de pacientes. Recientes estudios muestran evidencias de la falta de utilidad en pacientes en profilaxis³⁰⁻³².

Recientemente se ha desarrollado un nuevo LDF, LFD-Asp, útil, fácil de manejar y que proporciona un diagnóstico rápido de la AI. Se trata de una técnica inmunocromatográfica, que mediante un Ac monoclonal detecta una glucoproteína antigénica segregada por *Aspergillus* durante su crecimiento. Su unión sobre una membrana de nitrocelulosa origina una banda de precipitación visible (Aspergillus-Lateral-Flow Device, OLM diagnostics®). El Ac es muy específico para *Aspergillus* spp. y no se han descrito reacciones cruzadas con *Candida*, mucorales y *Fusarium*. Es una técnica rápida (15 min), con escasa necesidad de equipamiento y de manipulación de la muestra. Esto permitiría utilizarla como ensayo *point-of-care*. Puede realizarse tanto en suero como en LBA, en ambos presenta una elevada especificidad y sensibilidad^{33,34}.

Ha mostrado resultados alentadores en pacientes inmunocomprometidos con riesgo de desarrollar AI. Un metaanálisis incluyó 7 estudios entre 2008 y 2014 que mostraron alta sensibilidad (el 86 frente al 68%) y especificidad (el 93 frente al 87%) cuando se realizaron en muestras de LBA y suero. Otros estudios que la comparan con PCR-TR mostraron una especificidad similar, > 96%, y una sensibilidad menor, el 81 frente al 95%³⁵.

Referente a la detección de Ac en suero para el diagnóstico de aspergilosis, hay varias técnicas comercializadas; la más utilizada es la inmunodifusión doble o de Ouchterlony, con la que se visualizan bandas de precipitación formadas en la reacción Ag-Ac. La técnica puede acelerarse mediante la aplicación de un campo eléctrico, inmunoelectroforesis o contraelectroforesis. Son de gran utili-

dad en el diagnóstico de aspergiloma y de aspergilosis broncopulmonar alérgica.

Detección de metabolitos y otros componentes fúngicos

Existen otros componentes que se liberan durante la infección y son útiles para el diagnóstico, aunque algunos se encuentran en fase de desarrollo.

Detección de 1-3 β -D-glucano

El 1-3 β -D-glucano (BG) es un componente polisacárido de la pared de casi todos los hongos excepto de zigomicetos y muy escaso en criptococo. Se libera durante la infección y aparece en sangre y líquidos biológicos, y puede utilizarse como marcador de infección fúngica invasiva. Se trata de una técnica colorimétrica basada en la capacidad del BG de estimular el factor G de la vía de la coagulación en los amebocitos de cangrejo *Limulus polyphemus*, y que se pone de manifiesto mediante un sustrato cromogénico y una reacción diazo originando un compuesto coloreado medible (Fungitell® Associated of Cape Cod Incorporate).

La sensibilidad y especificidad son buenas, > 70 y 85%, respectivamente, aunque pueden existir falsos positivos en infecciones bacterianas concomitantes, tratamientos con inmunoglobulinas, sulfamidas, albúmina, cirrosis y hemodiálisis con membrana de acetato de celulosa. También se dan falsos positivos con la ingestión de algunos cereales como avena o cebada y sueros hemolizados.

Los límites de detección de la técnica oscilan entre 30 y 500 pg/ml. Se considera positivo un *cutt off* de 80 pg/ml, si se realizan determinaciones seriadas se recomienda un *cutt off* de 60 pg/ml.

Es útil en AI, candidiasis invasiva y neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, donde se detecta antes de la aparición de síntomas clínicos, lo que permite iniciar precozmente el tratamiento.

Como ocurre con otras técnicas similares, las determinaciones seriadas elevan su sensibilidad a más de 80% y adelantan la detección mediante hemocultivo en varios días^{36,37}.

Es una prueba útil para monitorizar y evaluar la efectividad del tratamiento, ya que sus valores disminuyen en respuesta al antifúngico³⁸.

Detección de ácidos nucleicos

La detección de ácido nucleico procedente del hongo directamente en la muestra clínica mediante diferentes técnicas (hibridación o amplificación) ha supuesto un importante avance en el diagnóstico micológico.

Hoy en día, gracias al desarrollo a gran escala de las técnicas genómicas, ya disponemos de una amplia variedad de procedimientos basados en la amplificación, mediante la PCR, para la detección de ácido nucleico de origen fúngico. La versatilidad de esta técnica, con diferentes formatos de detección en tiempo real (monoplex, dúplex, tríplex), permite la cuantificación e identificación de la presencia del hongo directamente en las muestras clínicas sin necesidad de cultivo, de forma rápida, sensible y específica, convirtiéndose en una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico de micosis.

A pesar de sus grandes ventajas, uno de los principales problemas asociados a la utilización de la PCR en el diagnóstico micológico es la falta de estandarización de los procedimientos de extracción del ácido nucleico desde la muestra clínica, el tipo de dianas (específicas o universales) a amplificar y el formato de detección. La variedad de diseños ha reportado en ocasiones resultados contradictorios y, por tanto, de difícil aplicación.

Considerando estas dificultades existe una iniciativa europea (European *Aspergillus* PCR Initiative, EAPCRI) potenciada por diferentes expertos para establecer guías y recomendaciones a seguir por todos los laboratorios y aumentar la reproducibilidad de estas técnicas, que inicialmente se ha dirigido a la técnica de PCR para *Aspergillus* y, de

esta manera, favorecer su utilización en el diagnóstico de la AI³⁹. En el futuro, estas recomendaciones se harán extensivas a otras especies fúngicas y contribuirán a estandarizar estos procedimientos de modo que sea una técnica más incluida en los criterios de la EORTC/MSG para el diagnóstico de micosis.

Es importante destacar que ya se dispone de algunas técnicas comerciales de qPCR para el diagnóstico de *Aspergillus* y *Candida* con buenos resultados: SeptiFast (Roche), MagicPlex Sepsis (Izasa), FilmArray (BioFireDx), MycAssay *Aspergillus* (Mycosnostica). Los ensayos comerciales de PCR tienen la ventaja de proporcionar una metodología estandarizada y un aseguramiento de la calidad (procedimientos establecidos por el fabricante). La mayoría de las pruebas de PCR comerciales utilizan tecnología en tiempo real, proporcionando resultados rápidos, aunque en algunos casos la necesidad de incluir diferentes dianas en el formato multiplex (bacterias, hongos) limita la sensibilidad del ensayo y, en definitiva, su utilidad.

En el año 2014, la Food and Drug Administration americana aprobó el uso de una nueva metodología basada en la amplificación de ácidos nucleicos y su posterior detección mediante resonancia magnética (T2Candida), que permite el diagnóstico de candidemia en un tiempo estimado de 6 h a partir de una única muestra de sangre⁴⁰.

Otros formatos de detección basados en PCR también están dando resultados interesantes, como la detección de producto amplificado mediante espectrometría de masas^{41,42}.

Estas técnicas, aún en desarrollo y solo disponibles en unidades de investigación y centros de referencia, ofrecen prometedoras perspectivas en cuanto a que permitirán establecer un diagnóstico rápido y específico de las micosis.

Conclusión

Los nuevos retos asociados con el diagnóstico rápido y confiable de las micosis han permitido que técnicas moleculares como la PCR desempeñen un papel fundamental, junto con las técnicas clásicas de cultivo e identificación, en el diagnóstico y la monitorización de la respuesta a la terapia. Otros enfoques como la inmunocromatografía, la espectrometría de masas y la resonancia magnética han surgido recientemente como herramientas prometedoras para el diagnóstico de micosis invasivas, pero aún requieren estandarización y validación antes de que su uso pueda extenderse en la práctica clínica.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Walsh TJ, Gamaletsou MN, McGinnis MR, Hayden RT, Kontoyiannis DP. Early clinical and laboratory diagnosis of invasive pulmonary, extrapulmonary, and disseminated mucormycosis (zygomycosis). *Clin Infect Dis.* 2012;54 Suppl 1:S55-60.
- Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:609-22.
- Kwon-Chung KJ. *Medical Mycology*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998.
- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. *Yeasts: Characteristics and identification*. 3rd ed. Cambridge University Press; 2000.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*. 2011. Disponible en: <http://www.clinicalfungi.org/>
- Rodríguez-Tudela JL, Aviles P. Improved adhesive method for microscopic examination of fungi in culture. *J Clin Microbiol.* 1991;29:2604-5.
- White TJ, Burns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rDNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols. A guide for Methods and applications*. Academic Press; 1990.
- Rodríguez-Tudela JL, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cano V, Tapia C, Perkins A, et al. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:4026-34.
- Mery A, Sendid B, Francois N, Cornu M, Poissy J, Guerardel Y, et al. Application of mass spectrometry technology to early diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol.* 2016;54:2786-97.
- Quiles-Melero I, García-Rodríguez J, Gomez-Lopez A, Mingorance J. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass

- spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:67-71.
- Bader O, Weig M, Taverner-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1359-65.
 - Becker PT, De Bel A, Martiny D, Ranque S, Piarroux R, Cassagne C, et al. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Med Mycol.* 2014;52:826-34.
 - De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:475-84.
 - Panda A, Ghosh AK, Mirdha BR, Xess I, Paul S, Samantaray JC, et al. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. *J Microbiol Methods.* 2015;109:93-105.
 - Quiles MI, Pelaez T, Rezusta LA, García-Rodríguez J. [Application of mass spectrometry in mycology]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34 Suppl 2:26-30.
 - Peman J, Zaragoza R. Combined use of nonculture-based lab techniques in the diagnosis and management of critically ill patients with invasive fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10:1321-30.
 - Saha DC, Xess I, Biswas A, Bhowmik DM, Padma MV. Detection of *Cryptococcus* by conventional, serological and molecular methods. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 8):1098-105.
 - Rivet-Danon D, Guitard J, Grenouillet F, Gay F, Ait-Ammar N, Angoulvant A, et al. Rapid diagnosis of cryptococcosis using an antigen detection immunochromatographic test. *J Infect.* 2015;70:499-503.
 - Vidal JE, Boulware DR. Lateral flow assay for cryptococcal antigen: an important advance to improve the continuum of HIV care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57 Suppl 19:38-45.
 - Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care.* 2010;14:R222.
 - Ahmad S, Khan Z. Invasive candidiasis: a review of nonculture-based laboratory diagnostic methods. *Indian J Med Microbiol.* 2012;30:264-9.
 - Chumpitazi BF, Lebeau B, Faure-Cognet O, Hamidfar-Roy R, Timsit JF, Pavese P, et al. Characteristic and clinical relevance of *Candida* mannan test in the diagnosis of probable invasive candidiasis. *Med Mycol.* 2014;52:462-71.
 - Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Castro C, Loza A, Zakariya I, et al. Contribution of *Candida* biomarkers and DNA detection for the diagnosis of invasive candidiasis in ICU patients with severe abdominal conditions. *Crit Care.* 2016;20:149.
 - Swoboda-Kopec E, Sikora M, Piskorska K, Golas M, Netsvaytayaeva I, Przybylowska D, et al. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Adv Exp Med Biol.* 2017;944:27-33.
 - Fortun J, Martín-Davila P, Gomez Garcia de la Pedrosa E, Silva JT, Garcia-Rodríguez J, Benito D, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive aspergillosis in non-hematological patients. *J Infect.* 2016;72:738-44.
 - Boluk G, Kazak E, Ozkalemkas F, Ener B, Akalin H, Agca H, et al. Comparison of galactomannan, beta-D-glucan, and *Aspergillus* DNA in sera of high-risk adult patients with hematological malignancies for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Turk J Med Sci.* 2016;46:335-42.
 - Eigl S, Hoenigl M, Spiess B, Heldt S, Prattes J, Neumeister P, et al. Galactomannan testing and *Aspergillus* PCR in same-day bronchoalveolar lavage and blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol.* 2017;55:528-34.
 - Lahmer T, Neuenhahn M, Held J, Rasch S, Schmid RM, Huber W. Comparison of 1,3-beta-D-glucan with galactomannan in serum and bronchoalveolar fluid for the detection of *Aspergillus* species in immunosuppressed mechanically ventilated critically ill patients. *J Crit Care.* 2016;36:259-64.
 - Canton Lacasa E, García-Rodríguez J, Guinea Ortega JV, Martín-Mazuelos E, Peman García J. Métodos microbiológicos para el diagnóstico, manejo y estudio de la infección fúngica invasora. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. SEIMC; 2012.
 - Eigl S, Prattes J, Reinwald M, Thornton CR, Reischies F, Spiess B, et al. Influence of mould-active antifungal treatment on the performance of the *Aspergillus*-specific bronchoalveolar lavage fluid lateral-flow device test. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46:401-5.
 - Heng SC, Morrissey O, Chen SC, Thursky K, Manser RL, Nation RL, et al. Utility of bronchoalveolar lavage fluid galactomannan alone or in combination with PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in adult hematology patients: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Microbiol.* 2015;41:124-34.
 - Loeffler J, Hafner J, Mengoli C, Wirth C, Heussel CP, Loeffler C, et al. Prospective biomarker screening for the diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk paediatric patients. *J Clin Microbiol.* 2017;55:101-9.
 - Alvarez E. [Utility of *Aspergillus*-LFD: first experience in Chile]. *Rev Chilena Infectol.* 2015;32:117-9.
 - Pan Z, Fu M, Zhang J, Zhou H, Fu Y, Zhou J. Diagnostic accuracy of a novel lateral-flow device in invasive aspergillosis: a meta-analysis. *J Med Microbiol.* 2015;64:702-7.
 - White PL, Parr C, Thornton C, Barnes RA. Evaluation of real-time PCR, galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and a novel lateral-flow device for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1510-6.
 - He S, Hang JP, Zhang L, Wang F, Zhang DC, Gong FH. A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3-beta-D-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels. *J Microbiol Immunol Infect.* 2015;48:351-61.

37. Martin-Mazuelos E, Loza A, Castro C, Macias D, Zakariya I, Saavedra P, et al. beta-D-Glucan and *Candida albicans* germ tube antibody in ICU patients with invasive candidiasis. *Intensive Care Med.* 2015;41:1424-32.
38. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, et al. beta-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis.* 2012;54:633-43.
39. White PL, Barnes RA, Springer J, Klingspor L, Cuenca-Estrella M, Morton CO, et al. Clinical Performance of *Aspergillus* PCR for Testing Serum and Plasma: a Study by the European *Aspergillus* PCR Initiative. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2832-7.
40. Mylonakis E, Clancy CJ, Ostrosky-Zeichner L, Garey KW, Alangaden GJ, Vazquez JA, et al. T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: a clinical trial. *Clin Infect Dis.* 2015;60:892-9.
41. Alanio A, Garcia-Hermoso D, Mercier-Delarue S, Lanternier F, Gits-Muselli M, Menotti J, et al. Molecular identification of Mucorales in human tissues: contribution of PCR electro-spray-ionization mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:594-5.
42. Kaleta EJ, Clark AE, Cherkaoui A, Wysocki VH, Ingram EL, Schrenzel J, et al. Comparative analysis of PCR-electrospray ionization/mass spectrometry (MS) and MALDI-TOF/MS for the identification of bacteria and yeast from positive blood culture bottles. *Clin Chem.* 2011;57:1057-67.