

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



## TESIS DOCTORAL

Valor de los marcadores fúngicos como adjuntos del diagnóstico de enfermedad fúngica invasora en la práctica clínica en pacientes críticos no neutropénicos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Joshi Rosa Magali Acosta Barriga

Directores

Amalia del Palacio Hernanz  
Ángel del Palacio Pérez-Medel

Madrid, 2012

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Medicina**



**VALOR DE LOS MARCADORES FÚNGICOS COMO  
ADJUNTOS DEL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD  
FÚNGICA INVASORA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA EN  
PACIENTES CRÍTICOS NO NEUTROPÉNICOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR  
Joshi Rosa Magali Acosta Barriga**

Bajo la dirección de los doctores:  
Amalia del Palacio Hernanz  
Ángel del Palacio Pérez-Medel

**Madrid, 2012**

**Universidad Complutense de Madrid**  
Facultad de Medicina  
Departamento de Medicina



**VALOR DE LOS MARCADORES FÚNGICOS COMO  
ADJUNTOS DEL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD  
FÚNGICA INVASORA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA EN  
PACIENTES CRÍTICOS NO NEUTROPÉNICOS**

Tesis Doctoral  
**Joshi Rosa Magali Acosta Barriga**

Madrid, Febrero 2012

D. ÁNGEL DEL PALACIO PÉREZ-MEDEL, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

D. AMALIA DEL PALACIO HERNANZ, Jefe de Sección de microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre hasta Octubre del año 2010

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo titulado “Valor de los marcadores fúngicos como adjuntos del diagnóstico de enfermedad fúngica invasora en la práctica clínica en pacientes críticos no neutropénicos.” ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión por Dña. Joshi Rosa Magali Acosta Barriga en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre. Consideramos que reúne las condiciones para optar al grado de Doctora por la Universidad Complutense de Madrid y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a 3 de Enero de 2012.

Fdo:

Profesor Ángel del Palacio  
Pérez-Medel

Doctora Amalia del Palacio  
Hernanz

## **AGRADECIMIENTOS**

A Amalia del Palacio, gracias por guiarme y supervisar este proyecto, por permitirme entrar en su hogar y quitarle horas de su tiempo de “ocio”, merecido tras muchos años dedicada a la microbiología. Gracias por enseñarme el interesante mundo de la micología, por ser un modelo de profesional, y por el apoyo brindado en el desarrollo de mi futuro profesional.

Al Doctor Ángel del Palacio, ejemplo del buen profesional médico, por supervisar el desarrollo de esta tesis, y por estar siempre dispuesto a ayudar y orientarme en todos los aspectos que conlleva el desarrollo de un trabajo como este.

A Mercedes Catalán, ejemplo de entrega y dedicación profesional, por haber facilitado enormemente la realización de este trabajo al ayudarnos a recopilar los datos clínicos de los pacientes de UCI. Igualmente quiero agradecer la colaboración de todo el personal de la UCI polivalente, especialmente al Jefe del Servicio el Dr. Juan Carlos Montejo.

A todas las personas que ayudaron a la elaboración de este trabajo, a Lola Moragues quien se encargó de realizar la detección de  $(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-glucano}$  sérico; a David Lora y Javier de la Cruz por realizar el análisis estadístico; a las técnicas Guadalupe Abellán, Rosa Camacho y Ana Cueli, de la Sección de Micología por ayudar en el procesamiento de las muestras; a las becarias Almudena Alhambra y María Elena Álvarez que iniciaron este trabajo.

Agradezco a todo el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre, el haber posibilitado mi trabajo en él, y a los técnicos del laboratorio, por enseñarme los procedimientos básicos en el laboratorio de microbiología durante estos años, gracias por estar siempre dispuestos a apoyarme.

## **DEDICATORIA**

A mis papas por el apoyo que siempre me brindan, por compartir conmigo el entusiasmo por cada proyecto, escucharme y animarme cada vez que lo necesitaba. A pesar de la distancia siento que siempre los tengo cerca y que puedo contar con ustedes para todo.

A mi abita, a mi familia, simplemente por estar ahí, son mi isla, el sitio seguro al que siempre puedo regresar, porque cada vez que compartía tiempo con ustedes regresaba llena de energía y nuevos proyectos, por estar siempre dispuestos a ayudarme. A pesar de la distancia, siempre los tengo presentes.

A mis hermanas Eva y Patty por aguantarme durante todo este proceso, por la motivación que siempre me dieron para acabar este proyecto y ayudarme en todo lo que pudieron.

A las residentes de microbiología, las mejores compañeras para pasar estos años de residencia, a Carmen, Lula, Almu, Adela, Esther, Laura, Jenny. Gracias por apoyarme durante estos años, por los momentos que hemos compartidos, buenos y malos, por las tardes en el laboratorio, las cenas y los viajes, porque más que compañeras son mis grandes amigas.

## ABREVIATURAS

ABC: Área bajo la curva

AI: Aspergilosis invasora

Anti-TNF: Anti-Tumour Necrosis Factor

APACHE II: Acute physiology and chronic health evaluation II

API: Aspergilosis pulmonar invasora

BG. (1→3)-β-D- glucano

BHI: Brain- heart infusion

CI: Candidiasis invasora

CVC: Catéter venoso central

DE: Desviación estándar

DO: Densidad óptica

EFI: Enfermedad fúngica invasora

EIA: Enzime Inmuno Assay

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EORTC/MSG: European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group

EPOC: Enfermedad pulmonar crónica obstructiva

FDA: Food and Drug Administration

GM: Galactomanano

IDO: Índice de Densidad Óptica

IRC: Insuficiencia renal crónica

LBA: Lavado broncoalveolar

LCR: Líquido cefalorraquídeo

RM: Resonancia magnética

ROC: Receiver Operating Characteristic

RQ: Rango intercuartil

SAPS II: Simplified Acute Physiology Score II

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SNC: Sistema nervioso central

TA: Tomografía axial computarizada

TPP: Tasa de probabilidad positiva

TPN: Tasa de probabilidad positiva

UCI: Unidad de cuidados intensivos

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

## **INDICE**

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCION Y SITUACION ACTUAL DEL PROBLEMA .....</b>	<b>4</b>
1.1.	PACIENTES CRÍTICOS .....	5
1.2.	ENFERMEDAD FÚNGICA INVASORA EN PACIENTES CRÍTICOS: PATOLOGÍAS MÁS PREVALENTES.....	7
1.2.1.	<i>Aspergilosis Invasora en pacientes críticos y espectro clínico de Aspergilosis .....</i>	8
1.2.2.	<i>Enfermedad Fúngica Invasora por hongos levaduriformes: Candidiasis Invasora en pacientes críticos y espectro clínico de Candidiasis .....</i>	10
1.2.3.	<i>Neumonía por Pneumocystis jirovecii en pacientes críticos .....</i>	13
1.3.	FACTORES DE RIESGO DE ENFERMEDAD FÚNGICA INVASORA EN PACIENTES CRÍTICOS .....	14
1.4.	DIFICULTADES DIAGNÓSTICAS DE LA ENFERMEDAD FÚNGICA INVASORA .....	17
1.4.1.	<i>Cuadro Clínico inespecífico .....</i>	18
1.4.2.	<i>Diagnóstico microbiológico tradicional.....</i>	18
1.4.3.	<i>Diagnostico anatomopatológico.....</i>	19
1.4.4.	<i>Diagnostico radiológico.....</i>	20
1.4.5.	<i>Nuevas técnicas microbiológicas .....</i>	21
1.4.5.1.	Galactomanano: .....	22
1.4.5.2.	(1→3)-β-D-Glucano:.....	24
<b>2.</b>	<b>OJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
2.1.	JUSTIFICACIÓN .....	28
2.2.	OBJETIVOS: .....	28
<b>3.</b>	<b>MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1.	AMBITO CLÍNICO EN EL QUE SE REALIZARON LOS ESTUDIOS .....	31
3.2.	PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.....	31
3.3.	SELECCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES. ....	32
3.3.1.	<i>Características de la población nº 1 .....</i>	33
3.3.1.1.	Pacientes en riesgo de Enfermedad Fúngica Invasora causada por hongos filamentosos .....	34
3.3.1.2.	Pacientes en riesgo de Candidiasis Invasora .....	35
3.3.2.	<i>Características de la población nº 2 .....</i>	36
3.4.	MANEJO CLÍNICO Y SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES .....	37
3.5.	DEFINICIONES .....	38
3.5.1.	<i>Definición de Enfermedad Fúngica Invasora .....</i>	38
3.5.2.	<i>Definición de Neumonía por Pneumocystis jirovecii .....</i>	41
3.6.	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS .....	42
3.6.1.	<i>Diagnóstico Broncoscópico con Lavado Broncoalveolar .....</i>	42
3.6.2.	<i>Técnicas microbiológicas tradicionales para el diagnóstico de Enfermedad Fúngica Invasora .....</i>	43
3.6.3.	<i>Estrategias microbiológicas para la utilización de procedimientos diagnósticos independientes del cultivo.....</i>	44
3.6.4.	<i>Determinación de Galactomanano .....</i>	45
3.6.4.1.	Descripción de la prueba.....	45
3.6.4.2.	Descripción de la técnica de galactomanano Platelia™ Aspergillus .....	46
3.6.4.3.	Análisis de los resultados de galactomanano .....	46
3.6.5.	<i>Determinación de (1→3)-β-D-Glucano .....</i>	47
3.6.5.1.	Descripción de la prueba.....	47
3.6.5.2.	Descripción de la técnica de (1→3)-β-D- glucano: Fungitell® .....	48
3.6.5.3.	Análisis de los resultados de de (1→3)-β-D-glucano .....	49
3.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	50
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
4.1.	ESTUDIO PROSPECTIVO DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD FÚNGICA INVASORA MEDIANTE LA DETECCION DE GALACTOMANANO Y (1→3)-β-D-GLUCANO SÉRICOS.....	52
4.1.1.	<i>Características de los pacientes de la población Nº 1: .....</i>	52
4.1.2.	<i>Pacientes en riesgo de Aspergilosis Invasora.....</i>	63
4.1.2.1.	Niveles de galactomanano sérico .....	63
4.1.2.2.	Niveles de (1→3)-β-D-glucano sérico .....	67
4.1.2.3.	Comparación de niveles de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora .....	69
4.1.2.4.	Combinación de niveles de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos.....	69

4.1.2.5.	Comparación de resultados de cultivo y niveles de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos .....	70
4.1.3.	<i>Pacientes en riesgo de Candidiasis Invasora</i> .....	70
4.1.3.1.	Niveles de (1→3)-β-D-glucano sérico .....	70
4.1.3.2.	Comparación de resultados de cultivo y de niveles de (1→3)-β-D-glucano sérico .....	72
4.1.4.	<i>Pacientes en riesgo de Enfermedad Fúngica Invasora en general</i> .....	72
4.1.4.1.	Niveles de (1→3)-β-D-glucano sérico .....	72
4.1.5.	<i>Estudio por muestras para evaluar el rendimiento diagnóstico de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora y Enfermedad Fúngica Invasora.</i> ....	73
4.1.5.1.	Niveles de galactomanano sérico: análisis por muestra.....	73
4.1.5.2.	Niveles de (1→3)-β-D-glucano sérico: análisis por muestra.....	75
4.1.5.3.	Comparación de niveles galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora: análisis por muestras .....	80
4.2.	ESTUDIO DIAGNÓSTICO PROSPECTIVO DE NEUMONIA FÚNGICA MEDIANTE LA DETECCIÓN DE GALACTOMANANO EN LÍQUIDO DE LAVADO BRONCOALVEOLAR COMPARADO CON GALACTOMANANO Y (1→3)-β-D-GLUCANO SÉRICOS .....	80
4.2.1.	<i>Características de los pacientes de la población N° 2:</i> .....	80
4.2.2.	<i>Niveles de galactomanano en líquido de Lavado Broncoalveolar</i> .....	87
4.2.3.	<i>Niveles de galactomanano sérico</i> .....	91
4.2.4.	<i>Niveles de (1→3)-β-D-glucano sérico</i> .....	92
4.2.5.	<i>Cultivo y microscopía de líquido de Lavado Broncoalveolar</i> .....	95
4.2.6.	<i>Análisis de la combinación de niveles séricos de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano</i> .....	95
4.2.7.	<i>Comparación de los niveles de galactomanano en LBA con los niveles de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora</i> .....	96
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>97</b>
5.1.	ESTUDIO PROSPECTIVO DIAGNÓSTICO DE ASPERGILOSIS INVASORA MEDIANTE LA DETECCIÓN DE GALACTOMANANO SÉRICO.....	107
5.2.	ESTUDIO PROSPECTIVO DIAGNÓSTICO DE ASPERGILOSIS INVASORA MEDIANTE LA DETECCIÓN DE (1→3)-β-D-GLUCANO SÉRICO.....	112
5.3.	ESTUDIOS PROSPECTIVO COMPARATIVO UTILIZANDO GALACTOMANANO Y (1→3)-β-D- GLUCANO SÉRICOS EN EL DIAGNÓSTICO DE ASPERGILOSIS INVASORA.....	118
5.4.	ESTUDIOS PROSPECTIVO COMBINADO UTILIZANDO GALACTOMANANO Y (1→3)-β-D- GLUCANO SÉRICOS EN EL DIAGNÓSTICO DE ASPERGILOSIS INVASORA .....	119
5.5.	ESTUDIO PROSPECTIVO UTILIZANDO GALACTOMANANO EN LÍQUIDO DE LAVADO BRONCOALVEOLAR PARA EL DIAGNÓSTICO DE ASPERGILOSIS INVASORA. ....	119
5.6.	ESTUDIO PROSPECTIVO COMPARATIVO DE GALACTOMANANO EN LÍQUIDO DE LAVADO BRONCOALVEOLAR RESPECTO A GALACTOMANANO Y (1→3)-β-D-GLUCANO SÉRICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ASPERGILOSIS INVASORA .....	122
5.7.	ESTUDIO PROSPECTIVO DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD FÚNGICA INVASORA MEDIANTE LA DETECCIÓN DE (1→3)-β-D-GLUCANO SÉRICO .....	123
5.8.	ESTUDIO PROSPECTIVO DIAGNÓSTICO DE CANDIDIASIS INVASORA MEDIANTE LA DETECCIÓN DE (1→3)-β-D-GLUCANO SÉRICO	127
5.9.	ESTUDIO PROSPECTIVO DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD FÚNGICA INVASORA MEDIANTE LA DETECCIÓN DE GALACTOMANANO Y (1→3)-β-D-GLUCANO SÉRICOS: ANÁLISIS POR MUESTRAS.....	130
5.10.	ESTUDIOS PROSPECTIVOS COMPARATIVOS DEL CULTIVO RESPECTO A LA DETECCIÓN DE MARCADORES (GALACTOMANANO Y (1→3)-β-D- GLUCANO) PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD FÚNGICA INVASORA.....	132
5.10.1.	<i>Estudio prospectivo comparativo del cultivo y la detección de marcadores (galactomanano y (1→3)-β-D-glucano) séricos en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora</i> .....	132
5.10.2.	<i>Estudio prospectivo comparativo de cultivo y la detección de (1→3)-β-D-glucano sérico en el diagnóstico de Candidiasis Invasora</i> .....	133
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>134</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>137</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>163</b>

## **1. INTRODUCCION Y SITUACION ACTUAL DEL PROBLEMA**

## **1.1. PACIENTES CRÍTICOS**

La población de las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) ha cambiado en las últimas décadas, observándose mayor supervivencia y estancias más prolongadas como consecuencia de los avances médicos y tecnológicos.<sup>1</sup> Los pacientes de UCI constituyen una población heterogénea, que incluye pacientes con patología médica, quirúrgica o traumatológica. La mayoría de los pacientes críticos son no-neutropénicos, sin embargo un importante grupo de pacientes presentan inmunosupresión, como los pacientes receptores de trasplantes de órganos sólidos o pacientes en tratamiento con corticoides.

En diferentes estudios multicéntricos en UCIs médicas y/o quirúrgicas, se describe que entre 21-48% de pacientes se encuentran en tratamiento con corticoides, 7-22% presentan neutropenia, 4-5% son receptores de trasplante de órgano sólido y 1,5% son pacientes con infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o con trasplante de médula ósea, aunque estos porcentajes son variables dependiendo del tipo de UCIs estudiadas.<sup>2-4</sup>

El cambio en el tipo de pacientes de la UCI ha supuesto un incremento en tratamientos e intervenciones más agresivas, como el uso prolongado de antibióticos o el uso de catéter venoso central (CVC) o ventilación mecánica, que a su vez incrementan el riesgo de desarrollar infecciones.<sup>5</sup> Se ha descrito que en las UCIs, entre 59-89% de los pacientes reciben tratamiento antibiótico, 91-98% son portadores de CVC y 75-91% han requerido ventilación mecánica.<sup>2-4</sup>

La mayor supervivencia conlleva el incremento de pacientes críticos de edad avanzada y con frecuencia con mayor número de patologías de base. En estudios en UCIs médico-quirúrgicas se observa que el 7-26% de los pacientes presentan cáncer de órgano sólido, 21% presentan enfermedad neurológica, 5-17% presentan Insuficiencia Renal Crónica (IRC), 13-15% presentan Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y 11-20% Diabetes Mellitus tipo I.<sup>3,6-8</sup>

Las patologías más prevalentes de UCI varían dependiendo del tipo de UCI estudiada. En un estudio multicéntrico en España el 49% presentaba un diagnóstico inicial por enfermedad médica, 35% quirúrgica y 16% por traumatológica;<sup>3</sup> de estos el 39% presentaba sepsis al ingreso y 16% shock séptico. Es importante destacar que en esta población la incidencia de infecciones nosocomiales es desproporcionadamente alta comparada con los pacientes no críticos, siendo las infecciones más frecuentes la infección del tracto urinario (31%), la neumonía (27%) y las infecciones primarias del torrente sanguíneo (19%).<sup>9</sup>

A pesar del desarrollo tecnológico de las últimas décadas, en muchos pacientes de UCI no se llega a establecer un diagnóstico exacto, ya sea de la causa de ingreso o de las complicaciones desarrolladas durante su estancia.<sup>10</sup> Esto se debe a que los pacientes críticos muchas veces no se pueden someter a pruebas complementarias por su estado clínico grave. Las necropsias, en este contexto, son una importante herramienta en las UCIs terciarias,<sup>10,11</sup> debido a que en general, a pesar del desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas, la tasa de errores diagnósticos no ha disminuido en las últimas décadas.<sup>12</sup>

La reciente revisión de estudios de necropsias en UCI de De Vlieger y cols.<sup>10</sup> muestra que la tasa de errores mayores clase I (diagnósticos post-mortem obviados que podrían haber modificado el tratamiento y la supervivencia de los pacientes de acuerdo a la clasificación de Goldman y cols.<sup>12</sup>), se encuentran entre el 3 y 16%, y son más frecuentes en los pacientes que fallecen a los pocos días de su ingreso en UCI.<sup>13</sup> Por este motivo es importante el desarrollo de herramientas diagnósticas no invasoras, así como determinar subpoblaciones de pacientes críticos en las cuales el riesgo de determinadas patologías se encuentra incrementado, para poder realizar un seguimiento más estrecho.<sup>14</sup>

## **1.2. ENFERMEDAD FÚNGICA INVASORA EN PACIENTES CRÍTICOS: PATOLOGÍAS MÁS PREVALENTES**

En los pacientes de UCI las Enfermedades Fúngicas Invasoras (EFI) tienen un papel importante por diversos motivos: los pacientes críticos presentan enfermedades de base complejas, las EFI, en este tipo de pacientes, son patologías que no presentan signos o síntomas característicos, se presentan de forma insidiosa y presentan una alta tasa de mortalidad.<sup>3,4</sup> La incidencia de EFI en la población hospitalaria se ha incrementado de forma paulatina en las últimas décadas. Estudios basados en necropsias de un hospital terciario de Alemania, describen un incremento en la incidencia, de 2.2% en el periodo de 1978-1982, 3.2% entre los años 1983-1987, 5.1% entre 1988-1992, 6.6% entre 1993-1996 a 10.4% 2001-2005, similar a lo descrito por Schwesinger y cols.<sup>11,15,16</sup>

La prevalencia de EFI por hongos miceliales y, en menor medida, por zigomicetos ha aumentado también en las últimas décadas, a diferencia de la disminución observada en la incidencia de EFI por *Candida* spp., como consecuencia de las estrategias terapéuticas empíricas implementadas en los últimos años, especialmente con el uso de fluconazol.<sup>17</sup> La incidencia real de EFI en pacientes críticos, es difícil de determinar por la baja rentabilidad del diagnóstico tradicional, la baja tasa de estudios post-mortem y por la presentación clínica inespecífica.<sup>8</sup> Diversos estudios realizados en base a necropsias de pacientes de UCI, han demostrado que las infecciones fúngicas se encuentran entre los diagnósticos más frecuentemente obviados o discrepantes (4-5% de todas las necropsias realizadas).<sup>13,18</sup> En un estudio realizado en un hospital terciario a lo largo de 15 años, se determinó que de 272 casos de EFI sólo 22% fueron sospechadas o documentadas pre-mortem.<sup>16</sup>

En la UCI alrededor del 18% de todas las infecciones, comprobadas microbiológicamente, son fúngicas,<sup>19,20</sup> y específicamente, en el 12% de los hemocultivos se aíslan microorganismo fúngicos.<sup>9</sup> En este tipo de pacientes las levaduras del género *Candida* son con amplio margen las

micosis predominantes (17% de todas las infecciones), seguido de *Aspergillus* spp. (1.4%).<sup>20</sup> Debemos tener en cuenta que la incidencia de infecciones por hongo filamentosos, específicamente de *Aspergillus* spp., está aumentando entre los pacientes no-neutropénicos de la UCI, siendo estos patógenos los agentes etiológicos más frecuentemente asociados a Neumonía fúngica.<sup>8,21,22</sup>

Otros hongos *Fusarium*, *Scedosporium*, Zigomicetos o *Pneumocystis jirovecii*, y *Cryptococcus*, particularmente en pacientes receptores de órgano sólido, están emergiendo como nuevos agentes etiológicos en este tipo de pacientes. Esto se debe a la importante inmunosupresión de los pacientes, así como a la selección de estas especies por tratamiento profiláctico o empírico, aunque su incidencia continua siendo baja.<sup>8,23,24</sup>

### **1.2.1. Aspergilosis Invasora en pacientes críticos y espectro clínico de Aspergilosis**

En la UCI los hongos miceliales más frecuentemente aislados pertenecen al género *Aspergillus*.<sup>20</sup> Son organismos ubicuos en el ambiente, que causan un abanico de síndromes clínicos: desde síndromes alérgicos a EFI.<sup>25</sup> El género *Aspergillus* está constituido por aproximadamente 200 especies, de las cuales aproximadamente 40 han sido asociadas a patología humana.<sup>26</sup>

Las infecciones que puede producir *Aspergillus* son diversas, y van desde infecciones superficiales (otitis externas fúngicas, onicomycosis, infecciones de heridas) hasta formas invasoras profundas, la denominada Aspergilosis invasora (AI).<sup>16</sup> *Aspergillus fumigatus* es la especie que con mayor frecuencia se aísla en el entorno humano (suelo, agua o vegetación) y representa, por tanto, el agente causal más frecuentemente asociado a AI, seguido de *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, y *A. nidulans*.<sup>26</sup> Las presentaciones clínicas más frecuente son las asociadas a las vías respiratorias, en más del 90% de los casos, la enfermedad invasora afecta a los pulmones

o senos paranasales.<sup>8</sup> Esto se debe a que los conidios de *Aspergillus* al ser ubicuos en el ambiente, son fácilmente inhalados.

Se han descrito tres diferentes posibles interacciones entre *Aspergillus* y el ser humano: colonización, reacción alérgica e infección.<sup>8</sup> A nivel pulmonar, *Aspergillus* spp. puede asociarse a diversos síndromes que se asocian a determinadas características de la persona que inhala los conidios. En una persona sin antecedentes patológicos generalmente no se produce ninguna enfermedad. El aspergiloma se ha asociado a personas con enfermedad pulmonar cavitaria, la aspergilosis crónica necrotizante se asocia a pacientes levemente inmunocomprometidos o con enfermedad pulmonar crónica, que puede llegar a producir cuadros de fibrosis pulmonar, y la aspergilosis pulmonar invasora (API) se asocia a pacientes inmunosuprimidos. En lo que respecta los cuadros alérgicos, incluye un amplio rango de síndromes que incluyen asma, Aspergilosis broncopulmonar alérgica (que se presenta generalmente en personas con cuadros previos de asma o a pacientes con fibrosis pulmonar) y sinusitis alérgica.<sup>27,28</sup>

API, como se ha mencionado, es más frecuente en pacientes inmunosuprimidos, pero la forma de presentación dependerá de los factores específicos del huésped. En pacientes neutropénicos la forma angioinvasora es más frecuente, a diferencia de los pacientes que reciben corticoides, presentan EPOC, cirrosis o los pacientes receptores de trasplante de órgano sólido, en los cuales es más frecuente que la API se presenta como lesiones cavitarias.<sup>8</sup> Los síntomas clínicos de esta patología son inespecíficos, especialmente en fases tempranas de la enfermedad. API se puede presentar con fiebre, tos seca, disnea, dolor pleurítico o hemoptisis.<sup>29</sup> La API, como era de esperar, es la forma clínica de Aspergilosis más frecuente en los pacientes críticos.

Otras presentaciones menos frecuentes de AI son: endocarditis, infección de herida, mediastinitis posterior a cirugía cardíaca, infección de injertos vasculares u osteomielitis.<sup>30</sup> La infección del sistema nervioso central (SNC) es frecuentemente un signo de mal pronóstico, y se

puede producir por diseminación hematológica (generalmente desde el pulmón), por contigüidad a partir de los senos paranasales o por neurocirugía.<sup>8</sup>

La incidencia de AI en la UCI, es difícil de determinar debido a las dificultades que conlleva su diagnóstico y a la baja tasa de estudios necrópsicos que se realizan, a pesar de que un alto porcentaje de AI se diagnostican gracias al estudio necrópsico.<sup>4</sup> La incidencia descrita se sitúa entre el 3% y 15%, dependiendo del tipo de pacientes y el tipo de estudio.<sup>8,18,21</sup> La incidencia descrita en pacientes críticos con signos de neumonía es mayor (19-23%).<sup>4,31</sup> Debemos señalar que en un estudio de vigilancia en Estados Unidos entre los años 1992-1997, *Aspergillus* spp. fue responsable de solo el 0.6% de todas las neumonías en UCIs médicas.<sup>9</sup> La mortalidad descrita en pacientes de UCI suele ser muy alta entre 60-80%.<sup>4,21</sup>

El diagnóstico de esta etiología, al igual que en el resto de EFI, es complicado debido a la ausencia de signos clínicos típicos, y a la baja especificidad de los cultivos y de los signos radiológicos. La ausencia de diagnóstico y/o el establecimiento del diagnóstico tardíamente, tiene como consecuencia que la tasa de mortalidad sea mayor a 50%, y que por tanto el diagnóstico definitivo se establezca en el estudio necrópsico.<sup>8,21</sup>

### **1.2.2. Enfermedad Fúngica Invasora por hongos levaduriformes: Candidiasis Invasora en pacientes críticos y espectro clínico de Candidiasis**

Las micosis por hongos levaduriformes constituyen las infecciones fúngicas más importantes en el ser humano. Los agentes etiológicos son numerosos, siendo los más importantes *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* spp. y *Saccharomyces* spp.

La Candidiasis Invasora (CI) es la infección levaduriforme más importante, y además constituye el 70-90% de todas las EFI.<sup>32,33</sup> En las últimas décadas el número de personas con riesgo de presentar CI está aumentando en muchos hospitales, y la incidencia global de

candidemias también está en aumento desde la década de 1980.<sup>34</sup> La candidemia es la cuarta infección del torrente sanguíneo más frecuente en EEUU, y a nivel europeo ocupa el octavo lugar.<sup>35</sup> Otras levaduras como *Cryptococcus* han empezado a emerger en los últimos años particularmente en pacientes receptores de trasplante de órgano sólido.<sup>23,24</sup>

*Candida* spp. puede producir infecciones que abarcan desde las formas leves como las patologías mucocutáneas hasta formas severas como la CI que puede comprometer virtualmente cualquier órgano.<sup>36,37</sup> El término Candidiasis invasora, indica invasión de zonas corporales normalmente estériles, y puede ocurrir por diseminación hematógena (que puede o no estar documentada como candidemia) o por contigüidad.<sup>36</sup> La CI incluye formas focales como sistémicas. La infección focal suele ser consecuencia de una diseminación hematógena aunque puede desarrollarse por alteraciones locales de la anatomía o por la presencia de cuerpos extraños (sondas o prótesis).<sup>38</sup> Las formas focales incluyen infección del tracto urinario, peritonitis, neumonía, mediastinitis, infección osteoarticular, candidiasis hepatoesplénica, pericarditis, laringitis o pericarditis y manifestaciones más severas como endocarditis, meningitis o endoftalmitis; las formas sistémicas son la candidemia y la candidiasis diseminada con compromiso de órgano profundo.<sup>39</sup> La candidiasis diseminada se define como la invasión no-contigua de múltiples órganos por *Candida* especies, secundaria a candidemia.<sup>36</sup>

Las levaduras del género *Candida* son patógenos predominantes en los pacientes críticos y constituyen la infección fúngica más frecuente en ellos.<sup>9,36</sup> En pacientes receptores de trasplante de órgano sólido ingresados en la UCI, las infecciones por *Candida* spp. también constituyen la primera causa de infección fúngica.<sup>40</sup> La incidencia de CI en la UCI, se encuentra en torno al 5%.<sup>3,41</sup> La presentaciones más frecuentes de CI en la UCI son candidemia (60-75%), peritonitis (31%) y con menor frecuencia endoftalmitis (6%).<sup>2,41</sup> Se ha descrito un incremento en la incidencia de 2.4 por 10,000 paciente-día a 7.4 en sólo cuatro años.<sup>42</sup> La mitad de las candidemias hospitalarias se concentran en la UCI, y representan el 11% de todos los

aislamientos de hemocultivos en la UCI.<sup>9,43</sup> Aproximadamente 85% de CI son consideradas nosocomiales y entre el 5-10% de los pacientes con CI presentan bacteriemia asociada.<sup>2</sup>

La utilización profiláctica o empírica de antifúngicos azólicos ha producido cambios importantes en la incidencia de las candidiasis,<sup>44</sup> a pesar del incremento de CI la incidencia de candidemia por *Candida albicans* está disminuyendo, en contraposición al incremento de infección por *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*.<sup>34,45</sup> Específicamente en las UCIs de Estados Unidos se observó que en un periodo de 10 años la incidencia de candidemia por *C. albicans* había disminuido significativamente mientras que la incidencia de candidemia por *C. glabrata* se había incrementado.<sup>46</sup> A pesar de que se ha asociado este cambio a la generalización de profilaxis con fluconazol,<sup>44</sup> algunos autores han cuestionado el rol de este fármaco en estos cambios.<sup>47,48</sup> Este cambio, es importante debido a que la candidemia por *Candida no-albicans* presenta una tasa de mortalidad 7 veces mayor que la candidemia por *C. albicans*.<sup>49</sup> A pesar de esto, *C. albicans* continúa siendo la especie más frecuentemente aislada, responsable de más de la mitad de candidemias, así como del 50% de todos los aislamientos fúngicos, además, es el patógeno más frecuentemente aislado en las muestras de orina.<sup>9,46</sup>

Es importante tener en cuenta que *Candida* spp. puede estar colonizando hasta en el 75% de los pacientes de UCI,<sup>3,41</sup> esto probablemente se deba al uso frecuente de antibióticos de amplio espectro y a la inmunoparálisis que pueden presentar estos pacientes (por ejemplo debido a shock séptico o por el uso de inmunosupresores).<sup>50</sup> La dificultad para diferenciar entre colonización e infección, ha llevado a que muchos pacientes no sean tratados a pesar de presentar CI, y con mayor frecuencia, que muchos pacientes sean tratados de forma empírica, de tal manera que se ha producido un incremento en el uso de drogas antifúngicas, en el costo de tratamiento y en el riesgo de emergencia de resistencias.<sup>3,51</sup>

Candidiasis Invasora y específicamente candidemia, esta independientemente asociada a aumento en la morbi-mortalidad y costos, específicamente en pacientes críticos adultos.<sup>52</sup> La CI,

por tanto, es una patología con un importante impacto en la evolución clínica de los pacientes afectados, que se asocia a una estancia hospitalaria más prolongada así como a una alta tasa de mortalidad, mayor al 45%.<sup>41,47,53</sup>

### **1.2.3. Neumonía por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes críticos**

*Pneumocystis jirovecii* se manifiesta de dos formas en el ser humano, como colonizador de las vías aéreas bajas en pacientes inmunocompetentes y produciendo Neumonía en pacientes inmunocomprometidos. La tasa de mortalidad entre pacientes inmunocomprometidos es alta, por lo cual el diagnóstico temprano es de vital importancia.<sup>54</sup>

Hasta hace algunos años la neumonía por *P. jirovecii* estaba prácticamente restringida a pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) pero con el desarrollo del tratamiento antirretroviral esta patología se torno poco frecuente en países desarrollados, persistiendo como un serio problemas en países en vías en desarrollo en los cuales los pacientes VIH positivos tienen dificultad para acceder al tratamiento antirretroviral.<sup>55</sup> En los últimos años, sin embargo, esta infección se ha incrementado en pacientes no VIH por el aumento de pacientes en tratamiento inmunosupresor por neoplasias, trasplante de médula ósea, trasplante de órgano sólido o enfermedades autoinmunes.<sup>55</sup>

La incidencia de neumonía por *P. jirovecii* en pacientes de UCI es baja, aunque se ha observado un leve incremento en los últimos años como consecuencia de los cambios producidos en esta población.<sup>8,20,23,24</sup> Debemos tener en cuenta que, aunque su incidencia ha disminuido, la neumonía por *P. jirovecii* sigue siendo una patología potencialmente presente entre pacientes HIV positivos ingresados en la UCI.<sup>56</sup>

### **1.3. FACTORES DE RIESGO DE ENFERMEDAD FÚNGICA INVASORA EN PACIENTES CRÍTICOS**

Debido a que los síntomas clínicos de EFI son inespecíficos y de aparición tardía, y que en pacientes críticos la opción de realizar procedimientos invasivos o técnicas radiológicas más sensibles como Tomografía Axial Computarizada (TAC) o Resonancia Magnética (RM) es limitada, es importante establecer cuáles son los factores de riesgo para desarrollar EFI. De esta manera se podrá identificar a la subpoblación más susceptible, que podría beneficiarse con el tratamiento profiláctico o empírico antifúngico.<sup>57-60</sup> Además, la estratificación de los pacientes de acuerdo al riesgo de EFI es necesaria cuando se validan pruebas diagnósticas, debido a que en los grupos con alta prevalencia la eficacia de las pruebas mejora.<sup>14,61</sup>

Se han establecido diferentes factores que incrementarían el riesgo de desarrollar EFI, como la inmunosupresión, cirugía previa reciente, diabetes mellitus o malnutrición.<sup>2,6-8</sup> Un factor de riesgo importante, frecuente en la UCI,<sup>3</sup> es el shock séptico en el que a una respuesta inicial hiperinflamatoria seguiría una fase de inmunoparálisis relativa,<sup>62</sup> que incrementarían el riesgo de EFI. El uso de CVC, el uso previo de antibióticos o necesidad de ventilación mecánica, también se han descrito como factores de riesgo y estaría relacionado con el punto previo.<sup>2,5</sup>

En el caso de AI, se han descrito subpoblaciones en la UCI con mayor riesgo de desarrollar esta patología: pacientes con EPOC, pacientes con cirrosis y pacientes en shock séptico en tratamiento con corticoides.<sup>7,8</sup> Algunos estudios pequeños de pacientes con AI y EPOC demuestran que el desenlace fue siempre fatal.<sup>63</sup> En el caso de fallo hepático, se ha descrito que los pacientes con cirrosis presentan una disminución de la fagocitosis,<sup>64</sup> lo cual explicaría los hallazgos de Ascah y cols.<sup>65</sup> quienes en una revisión de la literatura encontraron que en 5 de 14 pacientes aparentemente inmunocompetentes, la AI estuvo asociada a cirrosis.<sup>65</sup> En el caso de los pacientes con shock séptico en tratamiento con corticoides, presentan dos tipos de inmunosupresión que incrementarían el riesgo de EFI: la secundaria al uso de corticoides y la

secundaria al shock séptico.<sup>62</sup> Otros factores de riesgo para AI, además de los mencionados como factores de riesgo comunes para el desarrollo de EFI, serían las infecciones virales, como influenza o citomegalovirus.<sup>66</sup>

En un reciente artículo de revisión, Meersseman y col.<sup>8</sup> proponen estratificar a la población de pacientes críticos en tres categorías de acuerdo a los factores de riesgo para el desarrollo de AI que presenten. Esta propuesta, sin embargo, no está avalada por un estudio prospectivo. A continuación se detalla la estratificación propuesta:

- Categoría de Riesgo Alto
  - Neutropenia (<500 neutrófilos/mm<sup>3</sup>)
  - Neoplasia hematológica
  - Trasplante alogénico de Médula Ósea
- Categoría de Riesgo Intermedio
  - Tratamiento prolongado con corticoesteroides previo a la admisión en UCI
  - Trasplante autólogo de Médula Ósea
  - Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
  - Cirrosis hepática con una estancia en UCI mayor de 7 días
  - Cáncer de órgano sólido
  - Infección por VIH
  - Trasplante pulmonar
  - Enfermedad sistémica que requiere tratamiento inmunosupresor
- Categoría de Riesgo Bajo
  - Quemaduras severas
  - Receptores de trasplante de otro órgano sólido (ej: corazón, riñón o hígado)
  - Tratamiento con corticoesteroides por siete días o menos días
  - Estancia prolongada en UCI (mayor de 21 días)

- Malnutrición
- Paciente operado recientemente de cirugía cardíaca

En lo concerniente a CI, en diversos estudios se han descrito factores de riesgo asociados al desarrollo de CI en la UCI, que incluyen factores del huésped y factores iatrogénicos, estos han sido recopilados recientemente por Glöckner y Karthaus<sup>29</sup> y son los siguientes:

- Factores del huésped: neutropenia (específicamente > 10 días), colonización por *Candida*, pancreatitis necrotizante, perforación gastrointestinal, insuficiencia renal aguda, sepsis de etiología bacteriana, neoplasia hematológica, puntuación alta del Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II), diabetes mellitus, edad alta
- Factores iatrogénicos: tratamiento inmunosupresor (corticoesteroides), tratamiento antibiótico de amplio espectro, nutrición parenteral total, CVC, nutrición parenteral, cirugías mayores, dehiscencia de anastomosis gastrointestinal, quimioterapia antineoplásica, hemodiálisis.

En cuanto a las estrategias diseñadas para estratificar a los pacientes de UCI de acuerdo al riesgo de desarrollar CI, Paphitou y cols.<sup>67</sup> diseñaron, a través de un estudio retrospectivo en una cohorte con una incidencia de CI de 11%, un modelo predictivo para definir los pacientes críticos que se beneficiarían de la profilaxis antifúngica. Determinaron que entre pacientes críticos con 4 o más días de estancia en UCI, con alguna combinación de estos factores: Diabetes mellitus, hemodiálisis de novo, nutrición parenteral total o en tratamiento antibiótico de amplio espectro, el riesgo de CI era significativamente alto.<sup>67</sup>

León y cols.<sup>58</sup> en base a un estudio prospectivo, observacional, desarrollaron un modelo denominado “Candida-score” para estratificar el riesgo de los pacientes no-neutropénicos de la UCI de desarrollar CI, y de esta manera definir que pacientes se beneficiarían del inicio precoz

de tratamiento antifúngico. En base a un modelo logístico se determinó que los factores asociados a mayor riesgo de infección por *Candida* eran:

- Cirugía durante su estadía en ICU
- Nutrición parenteral,
- Colonización por *Candida* multifocal
- Sepsis severa

A cada uno de estos factores se le dio un valor de 1 excepto a sepsis severa que se le dio un valor de 2, un “score”  $\geq 2.5$  se asoció a una probabilidad 7.5 veces mayor de tener infección por *Candida*. Se concluyó que los pacientes con un “score” mayor de 2.5 se beneficiarían de iniciar tratamiento antifúngico.

Ostrosky-Zeichner y cols.<sup>68</sup> desarrollaron un modelo clínico predictivo para el diagnóstico temprano de CI en enfermos críticos ingresados en UCI por al menos cuatro días. Los factores que, combinados, conformaban el mejor modelo predictivo fueron: uso de antibióticos sistémicos, presencia de CVC, nutrición parenteral total, cirugía mayor, pancreatitis, uso de corticoesteroides y uso de inmunosupresores. Este modelo presentaba una sensibilidad de 34%, especificidad de 90%, valor predictivo positivo (VPP) de 10% y valor predictivo negativo (VPN) de 97%.<sup>68</sup> Se expondrá en forma más detallada de este modelo en la sección de materiales y métodos.

#### **1.4. DIFICULTADES DIAGNÓSTICAS DE LA ENFERMEDAD FÚNGICA INVASORA**

El diagnóstico de las micosis invasoras se basa en la sospecha clínica y posterior confirmación con métodos microbiológicos tradicionales, estudio anatomopatológico y técnicas de imagen,<sup>69,70</sup> siendo el estudio histológico y el cultivo, las pruebas de oro para el diagnóstico.<sup>71,72</sup> Sin embargo, actualmente estas herramientas diagnósticas resultan poco

efectivas para el diagnóstico precoz de EFI.<sup>18,22,73</sup> A pesar del desarrollo de nuevas técnicas de imagen en las últimas décadas o de nuevos antifúngicos, no se ha podido disminuir la tasa de mortalidad asociada a esta patología,<sup>17</sup> ya que es frecuente que la infección no se diagnostique o se diagnostica tardíamente y no responda al tratamiento antifúngico.

A continuación explicaremos las dificultades asociadas al diagnóstico de EFI en paciente críticos.

#### **1.4.1. Cuadro Clínico inespecífico**

En este tipo de pacientes críticos, la EFI no tiene un cuadro clínico específico.<sup>36,59</sup> Los pacientes con alto riesgo de desarrollar EFI, generalmente tienen una disminución de la respuesta inflamatoria, por lo cual cuando presentan signos o síntomas, la enfermedad se encuentra en etapa avanzada.<sup>14</sup> Se ha evidenciado que los pacientes críticos no-neutropénicos suelen presentar menos síntomas que los pacientes neutropénicos con EFI y es frecuente que presenten neumonía intercurrente por otros microorganismos.<sup>74</sup> Esto, en el caso de AI, asociado a la ventilación mecánica a la que se encuentran sometidos la mayoría de pacientes, dificulta la interpretación de signos clínicos.<sup>8,75</sup> En el caso de CI, se ha descrito casos severos que evolucionan de forma discreta, que el 20% de pacientes con candidemia no presentan signos de respuesta inflamatoria, incluido fiebre, y solo el 50% de los pacientes presentan leucocitosis.<sup>36</sup>

#### **1.4.2. Diagnóstico microbiológico tradicional.**

El estudio microbiológico, radiológico y anatomopatológico, como se ha mencionado, constituyen la piedra angular del diagnóstico de EFI.<sup>69,70</sup> El rendimiento de las técnicas microbiológicas tradicionales (el cultivo y examen directo) depende tanto de la patología clínica,

como del tipo de muestra utilizada para el estudio.<sup>76</sup> Son preferibles las muestras obtenidas por técnicas asépticas, procedentes de zonas anatómicas estériles, mediante biopsia o aspiración con aguja y en casos concretos el líquido de lavado broncoalveolar (LBA).<sup>26</sup> Sin embargo este enfoque diagnóstico, al ser más agresivo, suele evitarse en los pacientes de la UCI debido a su estado clínico crítico, a que presentan alteraciones de la coagulación, hipoxia, o porque se encuentran hemodinámicamente inestables.<sup>7,59,77</sup>

El VPP de los cultivos en el diagnóstico de AI, en pacientes de la UCI, es bajo<sup>7</sup>, además se ha descrito una baja sensibilidad (50-60%) y especificidad (20-70%).<sup>8</sup> Incluso los hemocultivos, en el diagnóstico de Candidemia, también presentan baja sensibilidad (40-60%).<sup>78,79</sup> El rendimiento diagnóstico de los cultivos puede aumentar si enfocamos el diagnóstico en pacientes con riesgo de presentar EFI,<sup>80,81</sup> sin embargo la probabilidad de tener AI con un cultivo positivo, incluso en una población de riesgo intermedio como la de UCI, es baja de 8-28%.<sup>81</sup>

En líneas generales el diagnóstico microbiológico tradicional basado en el cultivo es poco rentable, presenta bajo rendimiento diagnóstico y baja especificidad.<sup>25,82</sup> Además debemos tener en cuenta que los resultados positivos suelen ser tardíos en el curso clínico de la enfermedad.<sup>79,83,84</sup> Por otro lado en muchas ocasiones resultados positivos no implican infección fúngica y pueden representar colonización o contaminación.<sup>7,8,36,75,81</sup>

### **1.4.3. Diagnóstico anatomopatológico.**

El estudio anatomopatológico es, junto con el cultivo, la prueba de oro para el diagnóstico de EFI<sup>14,71</sup>. Sin embargo como hemos mencionado para el caso del diagnóstico microbiológico tradicional, el diagnóstico se basa en el estudio de biopsias profundas.<sup>14,71</sup> Como se ha mencionado, en los pacientes de UCI es difícil realizar estas biopsias debido a que su estado clínico es crítico, presentan alteraciones de la coagulación, hipoxia, o se encuentran

hemodinámicamente inestables, por este motivo el diagnóstico anatomopatológico se limita a casos específicos o al estudio post-mortem.<sup>7,59,77</sup>

#### **1.4.4. Diagnóstico radiológico**

Debido a que el cuadro clínico de EFI es poco específico, en pacientes con riesgo de EFI y con un cuadro clínico compatible, el diagnóstico de EFI debe incluir técnicas de imágenes sensibles. Sin embargo el diagnóstico radiológico también presenta complicaciones. Por un lado los pacientes críticos, en la mayoría de los casos se encuentran conectados a diferentes equipos tanto de monitorización o de tratamiento, como ventilación mecánica, técnicas de filtración renal o hepática.<sup>8,75</sup> Esto impide que en el momento crítico se les pueda realizar técnicas de imágenes más sensibles como TAC, o inclusive radiografías de buena calidad, ya que solo se pueden realizar en el cuarto de UCI.<sup>22,25</sup>

En los casos en que se pueden realizar las pruebas radiológicas, nos enfrentamos a otras dificultades. Para el diagnóstico radiológico se requiere que haya lesiones macroscópicas para ser detectadas,<sup>85</sup> por lo cual los signos suelen aparecer tardíamente en el curso de la enfermedad.<sup>86</sup>

En el caso de AI, los signos radiológicos típicos generalmente no están presentes en los pacientes no-neutropénicos de UCI, y en caso de estar presentes no son específicos,<sup>8</sup> por tanto en pacientes críticos con AI se pueden encontrar diversos patrones radiológicos no característicos.<sup>25</sup> Cornillet y cols.<sup>74</sup> describieron de forma retrospectiva los signos radiológicos más frecuentes de AI en 36 pacientes no-neutropénicos, estos fueron: nódulos (46%), áreas de consolidación (38%), derrame pleural (33%), nódulos cavitados (25%) y radio-opacidad en vidrio deslustrado (21%).<sup>74</sup>

Estas diferencias y dificultades en el diagnóstico se deben a que los pacientes críticos con estancias prolongadas usualmente desarrollan infiltrados pulmonares, atelectasias o síndrome de distrés respiratorio del adulto, y a que en muchas ocasiones presentan patologías pulmonares subyacentes, que producen cavitaciones o patrones de fibrosis.<sup>8</sup>

El signo de halo, a pesar de presentarse fundamentalmente en pacientes onco-hematológicos,<sup>87</sup> y tener, junto con el signo del aire creciente, baja sensibilidad (5-24%) en pacientes no-neutropénicos,<sup>88</sup> se asocia a mejor tasa de respuesta satisfactoria global y mayor tasa de supervivencia.<sup>89</sup> Debido a que es un signo precoz y transitorio, en pacientes con sospecha de AI es importante realizar una TAC de forma temprana.<sup>87,90</sup>

En lo concerniente a las otras formas clínicas de EFI, no pulmonares, los signos observados en TAC también suelen ser inespecíficos o tardíos.<sup>87</sup>

#### **1.4.5. Nuevas técnicas microbiológicas**

Ante las dificultades diagnósticas que presenta el diagnóstico de EFI, en los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas microbiológicas independientes de cultivo. Estas nuevas técnicas, en las que destacan los marcadores fúngicos, cobran importancia respecto a las técnicas tradicionales que son poco sensibles, dan resultados positivos tardíamente y tienen, por tanto, un impacto muy limitado en el diagnóstico y manejo de EFI.<sup>91</sup>

La pared celular de los hongos está compuesta básicamente de polisacáridos y proteínas. Entre los polisacáridos destacan la quitina, el glucano y el manano o galactomananos, estos son componentes inmunogénicos que estimulan un gran número de respuestas celulares y humorales durante la infección.<sup>92</sup> Algunos como los  $\beta$ -glucanos y los mananos, o los anticuerpos dirigidos contra ellos, son de utilidad para el diagnóstico de EFI.<sup>93</sup>

Estos marcadores fúngicos han sido utilizados como herramientas diagnósticas de cribado en poblaciones hematológicas en alto riesgo de EFI.<sup>93-99</sup> En la práctica clínica, otra posibilidad, es usar los marcadores como herramientas diagnósticas complementarias en pacientes con alto riesgo de EFI y con un síndrome clínico compatible,<sup>100-103</sup> o para monitorizar la respuesta al tratamiento antifúngico.<sup>104</sup>

Existen pocos datos sobre el rendimiento de las nuevas técnicas microbiológicas, independientes del cultivo, en pacientes críticos. Aunque la detección de GM en suero sería una prueba poco sensible, la detección de GM en líquido de LBA, como herramienta para establecer el diagnóstico temprano de AI en pacientes críticos en riesgo, es una herramienta prometedora.<sup>4</sup> En el caso de BG, existen pocos datos sobre el rendimiento de la técnica pacientes críticos.<sup>3,102,105</sup>

#### **1.4.5.1. Galactomanano:**

El galactomanano (GM) es un heteropolisacárido resistente al calor presente en la pared celular de *Aspergillus* spp., *Penicillium*, *Paecilomyces* y *Criptococcus*.<sup>106,107</sup> La molécula está formada por un núcleo de manano no inmunogénico y cadenas laterales de unidades de galactofuranosilo inmunoreactivas de longitud variable.<sup>108</sup> Estudios más recientes indican que GM es una familia de moléculas denominadas antígeno-galactofuranosa.<sup>109</sup> En los casos de AI se libera GM, y debido a que es un carbohidrato hidrosoluble, puede detectarse en sangre, líquido de LBA, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido pleural, líquido pericárdico, líquido peritoneal, orina y, además en, biopsias profundas.<sup>104</sup> Hasta el momento no se ha definido el mecanismo de liberación de antígeno por *Aspergillus* durante la infección, que factores intervienen en su liberación, ni en qué forma circula el antígeno en la sangre.<sup>109</sup> Los estudios realizados para determinar el rendimiento diagnóstico de esta prueba, se han centrado en la

detección de GM en sangre y LBA, y actualmente existe escasos estudios sobre la detección de GM en otro tipo de muestra.

En Europa la técnica se introdujo en 1997, y la FDA lo aprobó en Estados Unidos en el 2003. El ensayo está comercializado como Platelia™ *Aspergillus* EIA (BioRad, Marnes-La-Coquette, Francia) y se basa en una técnica de Inmunoenzimática (ELISA en doble- sándwich), que ha demostrado ser una herramienta eficaz en el diagnóstico precoz de AI en pacientes hematológicos.<sup>99,110,111</sup> En pacientes en riesgo de desarrollar AI se recomienda determinaciones seriadas en suero (técnica de cribado) dos veces a la semana.<sup>99,111</sup>

La detección de GM dependerá de su liberación, que a la vez está determinada por la fase de crecimiento, el micro-ambiente de la lesión, el estado inmune y patología de base del huésped.<sup>112</sup> Los niveles de GM están relacionados con la carga fúngica y puede utilizarse como marcador de evolución clínica, ya que en pacientes tratados, los niveles persistentemente altos de GM están relacionados a respuesta clínica mala.<sup>94,97,112-116</sup>

El punto de corte es una variable que debe determinarse en base a la relación de la curva ROC (Receiver Operating Characteristic) o Característica operativa del receptor,<sup>117</sup> que establece una relación entre la especificidad y la sensibilidad, que a la vez está influida por la prevalencia de AI en la población estudiada. El punto de corte aceptado actualmente por la FDA es 0,5 ng/mL,<sup>118</sup> mientras que en Europa se utiliza un valor de 0,7 en una única muestra o un índice mayor 0,5 en dos muestras consecutivas.<sup>25,110,111,118,119</sup>

En las últimas definiciones establecidas por la European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG), un resultado positivo de GM en suero, plasma, fluido de LBA y LCR se considera un criterio microbiológico para el diagnóstico de AI probable o posible.<sup>71</sup>

La detección de GM en suero en pacientes de UCI presenta una sensibilidad de 42%, de acuerdo a un estudio prospectivo.<sup>4,74</sup> En un reciente estudio en pacientes de UCI con EPOC, los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN se sitúan entre 57- 87%, 64-84%, 70-80% y 47-94%, dependiendo del momento en que se realiza la prueba.<sup>120</sup> Debemos considerar que el rendimiento diagnóstico de esta prueba se ve comprometido por diversos factores que influyen en el resultado, produciendo tanto resultados falsos positivos como falsos negativos.

Una limitación de la detección de GM en suero, es el diagnóstico en pacientes con infección por *Aspergillus* restringida por ejemplo a las vías aéreas, como el caso de traqueobronquitis en receptores de trasplante pulmonar o pacientes con SIDA, en los cuales la carga fúngica en suero es limitada<sup>121</sup> o pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, en los cuales es frecuente la formación de abscesos.<sup>107</sup> Para estos casos la determinación de GM en otros fluidos es de gran utilidad, aunque como se ha mencionado sólo se ha incluido la detección en LBA o LCR entre los criterios microbiológicos establecidos por la EORTC/MSG.<sup>71</sup> En el caso de la detección de GM en fluido de LBA, la sensibilidad y especificidad de la prueba en pacientes críticos es alta (>85%).<sup>4</sup>

#### **1.4.5.2. (1→3)-β-D-Glucano:**

(1→3)-β-D-glucano (BG) es el polisacárido estructural más importante de la pared celular de la mayoría de hongos clínicamente importantes, con la excepción de los zigomicetos y representa el 50-60% del peso seco de esta estructura. Además está presente en bacterias, algas y la mayoría de plantas superiores.<sup>59,107,122</sup> La mayoría de los polímeros de glucano de los hongos están compuestos de unidades de glucosa con uniones β-1,3 (65-90%), aunque también hay glucanos con otro tipo de enlaces como: β-1,6 (en *Candida* pero no en *Aspergillus*), β-1,4, α-1,3 y α-1,4. Al BG se unen covalentemente otros glucanos, la quitina o las manoproteínas.<sup>99,122</sup> La

inexistencia de BG en los tejidos de los mamíferos y la ausencia de glucanasas que lo eliminen, permiten que esta molécula sea un buen marcador de infección fúngica.<sup>33</sup> Su presencia en la sangre puede utilizarse como marcador panfúngico para el diagnóstico de EFI, incluyendo CI, EFI producida por otras especies de levaduras, AI, otras enfermedades invasoras por hongos miceliales (excepto zigomicetos) y *P. jirovecii*.

La técnica para detección de BG fue introducida en Japón hace más de 20 años.<sup>101,102</sup> Actualmente existen cuatro pruebas comerciales para la detección de BG: FungiTec G, Seikagaku Kogyo Corp., Tokyo, Japan;  $\beta$ -D-glucan Test Wako, Wako Pure Chemical Industries, Toky, Japan; B-G Star, Maruha Corp., Tokyo, Japan; and Fungitell<sup>®</sup>, Associates of Cape Cod, Falmouth, Mass. Todos ellos utilizan diferentes tipos de  $\beta$ -glucanos y diferentes especies de cangrejo de herradura (*Tachypleus tridentatus* y *Limulus polyphemus*) como fuente de reactivo, con diferentes valores de corte y reactividad diferente a  $\beta$ -glucano.<sup>101</sup> En el año 2004 la U.S. Food and Drug Administration (FDA) aprobó el uso de la prueba comercial Fungitell<sup>®</sup>, que utiliza una técnica de ELISA para el diagnóstico presuntivo de EFI. Esta es la prueba comercial más utilizada para la detección de BG en los últimos años. Un reciente estudio en el que se comparó esta prueba con las otras 3 pruebas comerciales disponibles en Japón, concluyó que Fungitell<sup>®</sup> era la prueba con mayor sensibilidad, sin embargo su especificidad era menor que la de las pruebas Wako y Maruha<sup>123</sup>. Los valores de área bajo la curva (ABC) ROC de las cuatro pruebas comerciales, sin embargo, no era significativamente diferentes.<sup>123</sup>

La prueba se realiza generalmente en suero. Se ha determinado que esta prueba sería adecuada tanto para el diagnóstico de EFI en pacientes con sospecha clínica (realización de la prueba en forma puntual), así como para el cribado de pacientes en riesgo de EFI, en los que se recomiendan determinaciones seriadas 2 veces por semana.<sup>94,102,124</sup> Además, debido a que los títulos de BG durante el tratamiento fúngico se correlacionan con la respuesta clínica, puede utilizarse como marcador de evolución.<sup>93,94</sup> El punto de corte varía de acuerdo a la prueba usada,

para Fungitell® se ha establecido el punto de corte de > 80 pg/mL como resultado positivo.<sup>17</sup> En las últimas definiciones establecidas por la EORTC/MSG, un resultado positivo de BG se considera un criterio microbiológico para el diagnóstico de AI probable o posible.<sup>71</sup>

A pesar de que varios estudios han descrito que BG no sería una herramienta útil para el diagnóstico de zigomicosis y criptococosis,<sup>102,125</sup> en el caso de criptococosis recientemente se ha demostrado que 25% de los pacientes con Criptococosis diseminada tendrán un resultado positivo de BG, esto se debe a pesar de que la pared celular de *Cryptococcus* contiene BG, solo una pequeña cantidad es liberado al torrente sanguíneo.<sup>102</sup>

Al igual que la detección de GM en suero, la detección de BG en suero dependerá de la angioinvasión que pueda producir la infección. En el caso de aspergiloma pulmonar la liberación de BG, se produciría en la fase temprana de la infección: en esta fase es conocido que el hongo no invade el tejido circundante ni el torrente sanguíneo, por lo cual no sería detectable.<sup>126</sup> En los escasos estudios publicados, la sensibilidad y especificidad descrita para el diagnóstico de CI en pacientes críticos se sitúa entre de 78-100% y 20-73%, respectivamente dependiendo del tipo de población estudiada.<sup>3,127,128</sup> Debemos de tener en cuenta que la detección de BG en suero presenta importantes resultados falsos positivos y en mayor medida resultados falsos negativos asociados a diferentes factores. Esto explicaría el bajo VPP de la prueba en contraste con el alto VPN, descrito en diferentes estudios.<sup>94,124,129</sup> No se han realizado estudios sobre el valor diagnóstico de la detección de BG en otro tipo de muestras.

## **2. OJETIVOS**

## **2.1. JUSTIFICACIÓN**

El diagnóstico precoz de EFI en pacientes ingresados en la UCI, es primordial para la buena evolución del paciente. Sin embargo la poca especificidad de la clínica, la dificultad de realizar e interpretar técnicas radiológicas, así como el poco rendimiento diagnóstico de las técnicas microbiológicas convencionales, conlleva al retraso del diagnóstico.

En este contexto, el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas no invasoras independientes del cultivo, como la detección de GM y BG, constituyen una opción para el diagnóstico precoz de EFI. La validación de estas técnicas en los enfermos críticos sería la base para establecer un tratamiento adelantado o precoz, y de esta manera disminuir la morbimortalidad asociada.<sup>14,130</sup> Estas técnicas han mejorado el diagnóstico de EFI en pacientes adultos neutropénicos y pacientes receptores de trasplante de células hematopoyéticas.<sup>77,94,102,124,129</sup> Sin embargo existen pocos datos sobre su eficacia en pacientes de Unidades de Cuidados Intensivos.<sup>3,4,102,105,127</sup>

Por este motivo desarrollamos un estudio prospectivo para valorar clínicamente el rendimiento diagnóstico de las técnicas de determinación de GM en líquido de LBA, y GM y BG en suero, en una cohorte de pacientes críticos de la UCI con alto riesgo de desarrollar EFI.

## **2.2. OBJETIVOS:**

- I. Determinar el rendimiento diagnóstico de la determinación de Galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora en pacientes críticos no neutropénicos con alto riesgo de Aspergilosis Invasora.
- II. Determinar el rendimiento diagnóstico de Galactomanano en líquido de LBA para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora en pacientes críticos no neutropénicos con alto riesgo de Aspergilosis Invasora.

- III. Comparar el rendimiento diagnóstico de Galactomanano en líquido de LBA respecto a Galactomanano y (1→3)-β-D-glucano en suero para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora en pacientes críticos no neutropénicos con alto riesgo de Aspergilosis Invasora.
- IV. Comparar el rendimiento diagnóstico de los marcadores fúngicos (Galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos, y Galactomanano en líquidos de lavado broncoalveolar), respecto al cultivo de *Aspergillus spp.* en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora en pacientes críticos no neutropénicos con alto riesgo de Aspergilosis Invasora.
- V. Determinar el rendimiento diagnóstico de (1→3)-β-D-glucano para el diagnóstico de Enfermedad Fúngica Invasora en pacientes críticos no neutropénicos con alto riesgo de Enfermedad Fúngica Invasora.
- VI. Determinar el rendimiento diagnóstico de (1→3)-β-D-glucano para el diagnóstico de Candidiasis Invasora en pacientes críticos no neutropénicos con alto riesgo de Candidiasis Invasora.
- VII. Comparar el rendimiento diagnóstico de (1→3)-β-D-glucano respecto al cultivo de *Candida spp.* para el diagnóstico de Candidiasis Invasora en pacientes críticos no neutropénicos con alto riesgo de Enfermedad Fúngica Invasora.

### **3. MATERIAL Y METODOS**

### **3.1. AMBITO CLÍNICO EN EL QUE SE REALIZARON LOS ESTUDIOS**

Los estudios se realizaron en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, perteneciente al área sanitaria 11 de la Comunidad de Madrid. Es un hospital terciario con 1.300 camas, que atiende a una población de aproximadamente 600.000 habitantes. Dispone de cuatro Unidades de Cuidados Intensivos de adultos: la UCI polivalente (médico-quirúrgica) con 14 camas, la Unidad de Atención Coronaria con 19 camas, la UCI de Traumatología y la UCI de Cirugía Cardíaca, cada una de estas con 8 camas. El número de admisiones anuales es de aproximadamente 42.000 en el hospital y de 2.350 en el total de las cuatro Unidades de Cuidados intensivos.

### **3.2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO**

Se plantearon dos estudios prospectivos, ambos en pacientes admitidos en la UCI del Hospital Universitario 12 de Octubre entre los años 2008 y 2010. Sin embargo los criterios de inclusión en cada estudio eran excluyentes entre sí, es decir los pacientes solo podían estar incluidos en uno de los estudios. Denominaremos en este trabajo a cada una de las poblaciones como nº 1 o nº 2 tal como a continuación se detalla.

- **Población nº 1: Estudio prospectivo diagnóstico de Enfermedad Fúngica Invasora mediante la detección de galactomanano y (1→3)- $\beta$ -D-glucano séricos**

Se realizó un estudio en un único centro hospitalario, prospectivo, observacional, para evaluar y comparar la eficacia diagnóstica de GM y BG en suero como herramientas diagnósticas de EFI probada y probable en una cohorte de pacientes críticos no- neutropénicos con alto riesgo de EFI.

- **Población nº 2: Estudio prospectivo diagnóstico de Neumonía Fúngica mediante la detección de galactomanano en líquido de lavado broncoalveolar comparado con galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos**

Se realizó un estudio en un único centro hospitalario, prospectivo, observacional, para evaluar y comparar la eficacia diagnóstica de GM en líquido de lavado broncoalveolar respecto a GM y BG en suero en el diagnóstico de Neumonía Fúngica, en una cohorte de pacientes críticos de la UCI con neumonía y con alto riesgo de EFI.

Los dos estudios fueron aprobados por el Comité ético del Hospital Universitario 12 de Octubre.

### ***3.3. SELECCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.***

Se establecieron criterios de inclusión y exclusión para cada población estudiada, los cuales se detallarán más adelante. Se recolectaron los datos demográficos de los pacientes a medida que ingresaban en los estudios, y posteriormente se recolectaron los datos de antecedentes patológicos, cuadro clínico actual y evolución clínica. Se incluyeron los datos pertinentes en una base de datos desarrollada con el programa informático SPSS 15.0. Para la recolección de los datos clínicos, se contó con el apoyo del personal médico del Departamento de UCI, y de Medicina Interna en el caso de que los pacientes fueran trasladados a este servicio después de su estancia en UCI. Los pacientes incluidos en los estudios pertenecían a la UCI polivalente y la UCI de Traumatología.

Con el fin de analizar los resultados clínico-microbiológicos, dividimos a los pacientes en dos grupos, tal como se mencionó anteriormente:

- Población nº 1: Enfermos críticos con alto riesgo de EFI con muestra de sangre obtenida para la detección de marcadores fúngicos (GM y BG) y muestras clínicas para el estudio microbiológico tradicional, sin estudio de LBA (por no estar indicado o por la imposibilidad de realizarlo).
- Población nº 2: Enfermos críticos con alto riesgo de EFI con lavado broncoalveolar y muestra de sangre obtenida sincrónicamente (en el mismo día), para poder comparar los resultados del LBA (examen directo, cultivo y detección de GM) con los resultados de detección de marcadores fúngicos en sangre (GM y BG).

### **3.3.1. Características de la población nº 1**

El personal médico de UCI solicitó estudio microbiológico y realización de marcadores fúngicos según criterios clínicos de sospecha de EFI y/o por situación de riesgo, a los pacientes ingresados entre los meses de junio del 2008 a Mayo del 2010, inclusive. Básicamente la inclusión en este estudio descriptivo y prospectivo se hizo a demanda de los intensivistas. Se incluyeron los pacientes con muestra de sangre solicitada para la determinación de marcadores fúngicos (GM y BG).

Básicamente se evidenciaron dos entidades infecciosas principales: Aspergilosis Invasora y otras infecciones profundas por hongos filamentosos, y Candidiasis Invasora. Los criterios utilizados para determinar que pacientes presentaban factores de riesgo y un síndrome clínico compatible con estas entidades se detallan a continuación.

### **3.3.1.1. Pacientes en riesgo de Enfermedad Fúngica Invasora causada por hongos filamentosos**

Los intensivistas consideraron riesgo de EFI causada por *Aspergillus* spp. u otros hongos filamentosos (*Fusarium*, *Scedosporium* y Zigomicetos) si los pacientes presentaban un síndrome clínico compatible con neumonía, enfermedad naso-sinusal, infección del SNC y/o infección de tejido subcutáneo secundario a traumatismo. Asimismo los pacientes debían de presentar al menos uno de estos factores de riesgo:

- Neutropenia ( $< 500$  neutrófilos/mm<sup>3</sup>)
- Enfermedad Pulmonar Crónica Obstructiva
- Cirrosis
- VIH
- Cáncer de órgano sólido en tratamiento con quimioterapia
- Neoplasia hematológica
- Receptor de trasplante de órgano sólido
- Tratamiento con corticoesteroides o inmunosupresores de células T
- Estancia prolongada en la UCI ( $>21$  días)
- Malnutrición
- Insuficiencia Renal con requerimiento de diálisis

Se definió neumonía como la presencia de al menos dos de los siguientes criterios:

- Fiebre
- Alteraciones del intercambio gaseoso
- Infiltrados pulmonares
- Disnea

La enfermedad naso-sinusal se definió como la presencia de sinusitis de acuerdo a técnicas radiológicas (Radiografía o TAC) y al menos uno de los siguientes tres signos:

- Dolor localizado
- Ulceración nasal necrosada (escara negra)
- Extensión de la lesión a través de las barreras óseas

La enfermedad del SNC se definió como la presencia de al menos uno de los siguientes signos en técnicas de imagen radiológicas:

- Lesión focalizada
- Realce radiológico meníngeo

### **3.3.1.2. Pacientes en riesgo de Candidiasis Invasora**

Para determinar que pacientes estaban en riesgo de desarrollar CI, los intensivistas se basaron en un modelo predictivo de riesgo descrito por Ostrosky-Zeichner y cols.<sup>68</sup> Este modelo permite la identificación de pacientes en riesgo de CI a partir de su cuarto día de estancia en la misma. Los criterios que debían cumplir los pacientes para determinar que estaban en riesgo de desarrollar CI se detallan a continuación. Entre paréntesis se especifica el periodo de exposición a dichos factores de riesgo, teniendo en cuenta el día de ingreso en UCI.

- Al menos uno de los siguientes:
  - o Antibióticos sistémicos (días 1 a 3) ó
  - o Presencia de catéter venoso central (días 1 a 3)
- Y al menos dos de los siguientes:
  - o Nutrición parenteral total (días 1 a 3)
  - o Diálisis (días 1 a 3)
  - o Pancreatitis (días -7 a 0)

- Uso de esteroides (días -7 a 3)
- Uso de agentes inmunosupresores (días -7 a 0)
- Cirugía mayor (días -7 a 0)

Los pacientes en riesgo de CI además requerían presentar un síndrome clínico compatible, es decir: la presencia de signos y síntomas compatibles con sepsis y/o anomalías radiológicas compatibles con absceso peritoneal.

Se definió sepsis como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) asociado a infección. Para establecer el diagnóstico de SRIS, los pacientes debían presentar dos o más de las siguientes alteraciones:

- Temperatura corporal mayor de 38°C ó menor de 36°C.
- Frecuencia cardíaca mayor de 90 latidos por minuto.
- Frecuencia respiratoria superior a 20 por minuto ó PaCO<sub>2</sub> menor de 32 mmHg.
- Recuento de leucocitos mayor de 12.000 por mm<sup>3</sup> ó menor a 4.000 por mm<sup>3</sup> ó más de 10% de formas inmaduras.

### **3.3.2. Características de la población nº 2**

El personal médico de UCI solicitó estudio microbiológico y realización de marcadores fúngicos según criterios clínicos de sospecha de EFI y/o por situación de riesgo, en los pacientes ingresados entre los meses de junio del 2008 a Febrero del 2010, inclusive. Básicamente la inclusión en este estudio descriptivo y prospectivo se hizo a demanda de los intensivistas. Se incluyeron los pacientes críticos con un síndrome clínico compatible con neumonía, que tuvieran líquido de LBA (para realización de examen directo, cultivo y GM) y muestra de sangre (para determinación de GM y BG), obtenidos sincrónicamente (el mismo día). Los criterios

utilizados para determinar que pacientes presentaban factores de riesgo y un síndrome clínico compatible se detallan a continuación.

El síndrome clínico compatible con neumonía se definió como la presencia de al menos dos de los siguientes criterios:

- Fiebre
- Empeoramiento del intercambio gaseoso
- Infiltrados pulmonares
- Disnea

Se consideró que un paciente presentaba factores de riesgo para EFI si presentaba al menos uno de los siguientes factores:

- Cirrosis
- VIH
- Cáncer de órgano sólido en tratamiento con quimioterapia
- Neoplasia hematológica
- Tratamiento con esteroides o inmunosupresores de células T
- Receptor de trasplante de órgano sólido

### **3.4. MANEJO CLINICO Y SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES**

El manejo clínico de los pacientes así como, el inicio del tratamiento antifúngico y antibiótico se realizó de acuerdo a los criterios clínicos de los intensivistas y a las recomendaciones de los protocolos clínicos actuales. De la misma manera la decisión de repetir pruebas para la detección de marcadores séricos (GM y BG) se realizó a demanda de los intensivistas, y no se basó en ningún protocolo.

### **3.5. DEFINICIONES**

#### **3.5.1. Definición de Enfermedad Fúngica Invasora**

El diagnóstico de Enfermedad Fúngica Invasora se realizó en base a las definiciones establecidas por la EORTC/MSG.<sup>71</sup> A pesar de que estas definiciones han sido descritas para pacientes inmunosuprimidos con cáncer y pacientes receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos, en la actualidad son las más ampliamente aceptadas, incluso para pacientes no neutropénicos.<sup>71</sup>

Estas definiciones asignan 3 niveles de probabilidad de diagnóstico de EFI: posible, probable y probada. La clasificación se realiza de acuerdo ha: factores del huésped, criterios micológicos y criterios clínicos. En el análisis de nuestros resultados solo consideramos como EFI los casos definidos como probada y probable.

La definición de EFI probada no requiere cumplir criterios de factores del huésped o criterios clínicos.<sup>71</sup> A continuación se detallan los criterios específicos para definir EFI probada.

Se define EFI probada por hongos miceliales como la presencia de uno de los siguientes criterios:

- Presencia histo/citopatológica o por examen directo de hifas tabicadas en una muestra procedente de aspiración con aguja o biopsia, con evidencia de daño tisular asociado.
- Cultivo positivo de hongo micelial procedente de una muestra (obtenida por procedimiento estéril) de una localización habitualmente estéril con datos clínicos o radiológicos compatibles con un proceso infeccioso (excluyendo el lavado broncoalveolar, muestras de senos paranasales y orina).
- Hemocultivo positivo para hongo micelial (el crecimiento de *Aspergillus* spp. invariablemente representa contaminación).

Se define EFI probada por levaduras como la presencia de uno de los siguientes criterios:

- Presencia histo/citopatológica o por examen directo de levaduras en una muestra procedente de aspiración con aguja o biopsia de una localización habitualmente estéril (excluyendo membranas mucosas).
- Cultivo positivo de levaduras procedente de una muestra obtenida por procedimiento estéril (incluyendo drenajes colocados recientemente: < 24horas) de una localización habitualmente estéril con datos clínicos o radiológicos compatibles con un proceso infeccioso.
- Hemocultivo positivo con levaduras u hongos levaduriformes.

Se define EFI probable (tanto para hongos miceliales como levaduras) como la presencia de al menos un criterio de la categoría de factores del huésped, un criterio micológico y un criterio clínico; en relación temporal con el episodio y compatible con los hallazgos micológicos, excluyendo etiologías alternativas.<sup>71</sup> A continuación se especifican los criterios utilizados en esta definición:

- Factores del huésped:
  - Historia reciente de neutropenia en relación temporal con el comienzo de la enfermedad fúngica (<500 neutrófilos/mm<sup>3</sup> durante más de 10 días).
  - Receptor de trasplante alogénico.
  - Uso prolongado de corticoesteroides (excluyendo pacientes con aspergilosis broncopulmonar alérgica) con una dosis mínima de 0.3 mg/kg/día de prednisona (o equivalente) durante más de tres semanas.
  - Tratamiento con otros inmunosupresores de células T, como ciclosporina, anti-TNF, anticuerpos específicos monoclonales, como alentuzumab, o análogos de nucleósidos en los 90 días previos.

- Inmunodeficiencia hereditaria grave (como enfermedad granulomatosa crónica o inmunodeficiencia grave asociada).
- Criterios micológicos:
- Pruebas directas: citología, examen directo o cultivo:
    - Presencia de hongos miceliales en esputo, lavado broncoalveolar, cepillado bronquial o aspirado de senos paranasales, puesto de manifiesto por uno de los siguientes hechos:
      - Observación de elementos fúngicos compatibles con hongo filamentoso.
      - Cultivo positivo de hongo micelial.
  - Pruebas indirectas (detección de antígeno o constituyente de la pared celular):
    - Aspergilosis:
      - Detección de GM en plasma, suero, lavado broncoalveolar o líquido cefalorraquídeo.
    - EFI (excluyendo zigomicosis y criptocosis)
      - Detección de BG en suero.
- Criterios clínicos:
- Infección fúngica de vías respiratorias inferiores: definido como la presencia de, al menos, uno de los siguientes signos en TAC:
    - Lesiones densas, bien circunscritas, con o sin signo del halo.
    - Signo del aire creciente (o signo de la media luna).
    - Cavidades.
  - Traqueobronquitis: visualización por broncoscopio de ulceración traqueobronquial, nódulo, pseudomembrana, placa o cicatriz.

- Infección rinosinusal: evidencia radiológica de sinusitis con, al menos, uno de los siguientes signos:
  - Dolor localizado agudo (incluyendo dolor irradiado al ojo).
  - Ulceración nasal necrosada (escara negra).
  - Extensión ósea por contigüidad (incluyendo afectación orbitaria) desde los senos paranasales.
- Infección del SNC: presencia de, al menos, uno de los siguientes signos:
  - Lesiones focales con técnicas de imagen.
  - Evidencia radiológica de realce meníngeo (por TAC o RM).

En el caso de los pacientes con AI, se consideraron imágenes radiológicas compatibles con esta patología, las descritas previamente por Greene y cols. y Cornillet y cols.<sup>74,89</sup>. En el caso de los pacientes con CI, se requirió para el diagnóstico que los hemocultivos positivos para *Candida* spp. obtenidos a través de CVC tuviera muestras positivas simultáneas de hemocultivos tomados ya fuera a través de catéter arterial o por venopunción periférica.<sup>131</sup>

Para el análisis de ambos estudios, se excluyeron los criterios diagnósticos microbiológicos basados en los marcadores: GM en líquido de LBA, y GM y BG en suero.

### **3.5.2. Definición de Neumonía por *Pneumocystis jirovecii***

Para establecer el diagnóstico de neumonía por *P. jirovecii*, los pacientes debían tener una tinción microscópica positiva con anticuerpos monoclonales (Monofluo<sup>TM</sup>; BioRad Laboratories, Marnes La Coquette, Francia) en muestras de LBA. Además debían presentar al menos cuatro de los siguientes criterios:

- Infiltrado Intersticial bilateral

- Hipoxia
- Fiebre
- Disnea
- Tos
- Lactato Deshidrogenasa > 230 U/L
- CD4+  $\leq$  200 células/mm<sup>3</sup>
- Respuesta apropiada a tratamiento específico de neumonía por *P. jirovecii*

### **3.6. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS**

#### **3.6.1. Diagnóstico Broncoscópico con Lavado Broncoalveolar**

Los intensivistas solicitaron fibrobroncoscopia diagnóstica cuando los determinaron clínicamente necesario y fue posible su realización. Durante este procedimiento se realizó el LBA eligiendo el área de muestra de acuerdo a la localización del infiltrado o consolidación pulmonar, evaluado previamente mediante TAC torácico o radiografía de tórax. Se instiló 100 a 150 mL de suero salino al 0.9%. Se obtuvo biopsias siempre que fue posible.

Las muestras de líquido de LBA fueron procesadas en el laboratorio de microbiología, previa centrifugación de la muestra. El sedimento se procesó para:

- Examen directo con hidróxido de potasio 20% y dimetil sulfóxido al 40%
- Tinción de Gram
- Tinción de Ziehl
- Tinción con anticuerpos monoclonales para *P. jirovecii*
- Cultivo para bacterias, hongos, micobacterias y virus

El sobrenadante del líquido de LBA se utilizó para determinar los niveles de GM. Se almacenó el sobrenadante a 4°C hasta la determinación de GM, realizada dos veces por semana en el laboratorio de microbiología.

### **3.6.2. Técnicas microbiológicas tradicionales para el diagnóstico de Enfermedad Fúngica Invasora**

Todas las muestras provenientes de zonas anatómicamente estériles (excepto LCR) y las muestras de secreciones respiratorias, fueron sembradas en dos placas de Sabouraud-cloranfenicol y en dos placas de BHI (Brain- heart infusión), las cuales fueron incubadas a 30° C y 37° C. Las muestras de LCR se sembraron en dos tubos de Sabouraud-cloranfenicol y se incubaron a 37°C. Las muestras superficiales para evaluar colonización por *Candida* se sembraron en una placa de Sabouraud-cloranfenicol y se incubaron a 37°C. El tiempo de incubación se determinó en base al tipo de muestra. Las muestras de exudado faríngeo, orina o muestras superficiales de piel se incubaron 2 días, las secreciones respiratorias 3 días, las puntas de catéter, las muestras corneales u exudados 5 días, las muestras provenientes de drenajes 7 días, las muestras de líquidos orgánicos 10 días, excepto las muestras de LCR que se incubaron 15 días y las muestras de médula ósea o biopsias 20 días. El crecimiento fúngico fue identificado según los procedimientos habituales.<sup>132,133</sup> Todos los aislamientos de *Candida* fueron identificados a nivel de especie usando el API ID 32C (bioMérieux, Marcy, I'Etoile, Francia) y posteriormente se determinó su sensibilidad a antifúngicos con el sistema colorimétrico Sensititre YeastOne® (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, Ohio).

En caso de obtenerse hemocultivos, estos fueron incubados durante cinco días en el sistema automático BacT/ALERT 3D (bioMérieux, Marcy, I'Etoile, Francia). El crecimiento fúngico fue identificado tal como se ha descrito previamente.

### **3.6.3. Estrategias microbiológicas para la utilización de procedimientos diagnósticos independientes del cultivo**

La determinación de GM en suero y GM en LBA, se realizó dos veces por semana (martes y viernes), en la sección de Micología del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre. En todas las muestras de suero en las que se realizó la determinación de GM, se realizó además la determinación de BG en el laboratorio del Profesor Pontón en el Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina y Odontología, de la Universidad del País Vasco (Lejona, Vizcaya, España), dos veces por semana (martes y viernes).

Para la realización de este estudio, todas las muestras de sangre de los pacientes que cumplían los criterios de inclusión, fueron centrifugadas y el suero obtenido fue dividido en 3 alícuotas en tubos estériles. La primera alícuota de suero fue almacenada a 4°C, hasta su procesamiento para detección de GM. La segunda alícuota de suero fue almacenada a 4°C y enviada diariamente al laboratorio del Profesor Pontón para la determinación de los niveles de BG. La tercera alícuota fue congelada a -70°C en nuestro laboratorio, y se guardó para utilizarla en caso de tener algún problema con las primeras dos alícuotas. Entre la recepción de las muestras en el servicio de Microbiología y la determinación de los marcadores fúngicos transcurrían entre cero y un máximo de cuatro días.

Las muestras de líquido de LBA fueron procesadas tal como se ha mencionado anteriormente y, al igual que las muestras de suero, fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento.

- Población nº 1: en caso de que los pacientes tuvieran más de una determinación de GM o BG en suero, solo se analizaron los resultados de la primera muestra enviada. Posteriormente se decidió realizar el análisis por muestras teniendo en cuenta todas las determinaciones disponibles de los pacientes de la cohorte. Las muestras en todos los casos fueron solicitadas por intensivistas de acuerdo a su criterio clínico.

- Población nº 2: se requería que la determinación de GM y BG en suero y la determinación de GM en líquido de LBA se hubieran realizado el mismo día. Para esto a los pacientes a los que se le realizaba LBA, con un síndrome clínico de neumonía y factores de riesgo para EFI, se les solicitaban una muestra de suero el mismo día del LBA para determinar niveles de GM y BG.

### **3.6.4. Determinación de Galactomanano**

#### **3.6.4.1. Descripción de la prueba**

Para la detección de GM, tanto en suero como en LBA, se utilizó la prueba comercial Platelia™ *Aspergillus* EIA (BioRad Laboratories, Marnes La Coquette, Francia). Es una prueba basada en una determinación inmunoenzimática en doble sándwich en microplaca, que utiliza el anticuerpo monoclonal EB-A2 como captor y detector de GM. EB-A2 es un anticuerpo monoclonal proveniente de ratas, que reconoce las cadenas laterales de  $\beta$ -1-5-D-galactofuranósido de las moléculas de GM. Los residuos galactofuranósidos se encuentran presentes también en glicoproteínas fúngicas como fosfolipasa C y fitasa.<sup>109</sup>

Los anticuerpos monoclonales se utilizan para, en primer lugar, recubrir los pocillos de la microplaca y unirse al antígeno GM de la muestra, y en segundo lugar, para detectar el antígeno unido a la microplaca sensibilizada. Para el enlace de los anticuerpos se requieren cuatro o más antígenos, por tanto en la prueba de EIA el anticuerpo se une a múltiples antígenos inmunoreactivos de una única molécula de GM.<sup>118</sup> Este es un punto determinante en la rentabilidad de esta prueba, ya que moléculas de GM con menor número de antígenos no podrán ser detectadas.

Otro punto importante en esta técnica, es el pre-tratamiento al que se somete la muestra para disociar los complejos inmunes y precipitar las proteínas de la muestra que podrían bloquear el

enlace de GM a EB-A2. Sin embargo en este paso, los residuos galactofuranósidos pueden ser degradados por el ácido edético utilizado para este pre-tratamiento, lo que disminuiría la sensibilidad de la prueba.<sup>112</sup> El límite de detección de esta prueba es de 0,5 – 1 ng/mL.<sup>134</sup>

#### **3.6.4.2. Descripción de la técnica de galactomanano Platelia™ Aspergillus**

La técnica de detección de GM se realizó con el analizador semiautomático Behring ELISA processor III (Dade Behring, Marburg, Alemania) con el cual se realizó además la medición de la densidad óptica (DO). El primer paso de la prueba consiste en someter a las muestras a calor en presencia de EDTA. Una vez tratadas se añaden, junto con el conjugado (anticuerpos monoclonales asociados a peroxidasa) a los pocillos de la microplaca recubiertos con anticuerpos monoclonales y posteriormente se incuba. En presencia de antígeno GM se forma el complejo anticuerpo monoclonal-antígeno- anticuerpo monoclonal/peroxidasa.

Posteriormente se realiza el lavado de los pocillos y se añade la solución sustrato, que reaccionará con la peroxidasa de los complejos antígeno/anticuerpo formados para dar un color azul. Se añade luego un ácido que detiene la reacción enzimática y cambia el color azul por amarillo. La absorbancia de las muestras y controles se determina con un espectrofotómetro configurado para leer la longitud de onda a 450 nm. (Filtro de referencia 620 nm.).

#### **3.6.4.3. Análisis de los resultados de galactomanano**

La prueba utiliza un control negativo, uno positivo y dos controles de valor de corte. Los resultados se determinaron en base al promedio de la densidad óptica de los pocillos de control del valor de corte. Se calculó un valor índice para cada suero examinado (IDO= Índice de

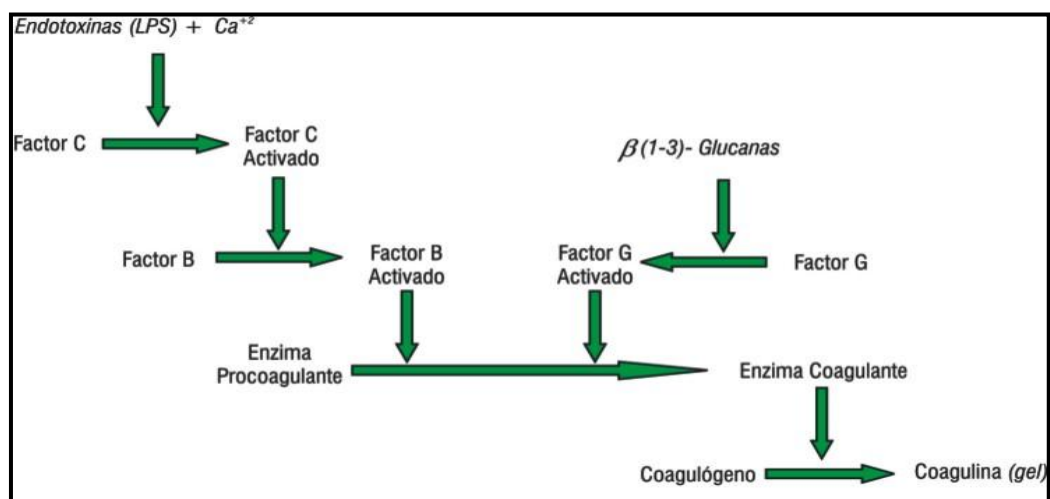
Densidad Óptica), dividiendo la DO de cada muestra entre el promedio de la DO de los controles de valor de corte. Se considero un resultado positivo en las pruebas de GM en suero si el valor del índice fue  $\geq 0.5$ , en el caso de GM en líquido de LBA se consideró un resultado positivo si el valor del índice fue  $\geq 1.0$ . La prueba se realizó dos veces a la semana. Los resultados de la prueba fueron informados a los intensivistas.

### **3.6.5. Determinación de (1→3)-β-D-Glucano**

#### **3.6.5.1. Descripción de la prueba**

Para la determinación de BG se utilizó la prueba comercial Fungitell<sup>®</sup> antes denominada GlucateLL<sup>®</sup> (Associates of Cape Cod Inc, Falmouth, MA, USA). Esta prueba se basa en la capacidad del (1→3)-β-D-glucano de activar la cascada de coagulación de los amebocitos derivados de la hemolinfa del cangrejo herradura americano (*Limulus polyphemus*). Tal como se puede observar en la figura 1 (página 48), las endotoxinas inducen la formación del coágulo a través del Factor C (la pro-enzima proteasa de serina), esta pro-enzima convierte la enzima pro-coagulante inactiva en enzima coagulante activa de la cascada de coagulación del cangrejo de herradura. De igual manera el BG induce la formación de coagulo de manera independiente al factor C a través de otra vía con una segunda pro-enzima proteasa de serina denominada factor G. La base de esta prueba es la detección de la actividad de la enzima pro-coagulante con un ensayo turbidimétrico o cromogénico como en el caso de Fungitell, donde la enzima coagulante escinde el sustrato cromogénico Boc-Leu-Gly-Arg-p-nitroanilido, creando un cromóforo que se absorbe a 405 nm.<sup>25,107</sup>

**Figura 1:**



La prueba presenta un límite de detección de 1 pg/mL. Este valor está determinado en parte por dos cuestiones técnicas. En primer lugar debemos considerar que el plasma humano contiene una serie de proteasas de serina e inhibidores de proteasas de serina que deben eliminarse con un pre-tratamiento, en la prueba de Fungitell esto se realiza con un método reactivo alcalino.<sup>135</sup> Este paso además convierte glucanos de triple-hélice en glucanos de hebra simple, que presentan mayor reactividad con el factor G. Otro paso clave en la prueba, que se realiza en el pre-tratamiento, es la eliminación de endotoxinas del lisado de *Limulus* que pudieran activar la cascada de coagulación. Esto se realiza en la prueba Fungitell, añadiendo factor C. Este paso además aumenta la especificidad del ensayo, al remover activadores de proteasas de serina no específicos presentes en el suero humano.<sup>25</sup>

### 3.6.5.2. Descripción de la técnica de (1→3)-β-D- glucano: Fungitell®

La prueba se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La prueba de Fungitell® incluye la realización de una curva de calibración con controles estándar a concentraciones conocidas de un BG derivado de un glucano de *Basidiomycetes* spp. Las

muestras de suero se descongelaron a temperatura ambiente, y se procesaron por duplicado. Las muestras fueron pre-tratadas con un reactivo alcalino compuesto por KOH 0,125M y KCl 0,6 M e incubadas a 37°. A continuación se dispensaron las muestras control, el control negativo, y los sueros a analizar en una microplaca, se añadió a todos los pocillos el reactivo derivado del lisado de amebocitos del *L. polyphemus* y el buffer de reconstitución pyrosol. La microplaca se colocó en la cámara precalentada a 37°C, de un lector de microplacas (modelo ELx808, BIO-TEK Instruments, Inc.; Winooski, VT, USA), registrándose el incremento en absorbancia a 405 nm (filtro de referencia 490 nm) a intervalos de 30 segundos durante 40 minutos. Se calculó la tasa media del cambio de la densidad óptica (unidades de mili-absorbancia por minuto) para cada uno de los pocillos, con ayuda del programa de software KC4 (BIO-TEK Instruments, Inc.). Se calculó la concentración de BG en suero por comparación con la recta de calibración.

### **3.6.5.3. Análisis de los resultados de de (1→3)-β-D-glucano**

La concentración de BG se determinó comparando la tasa media del cambio de la densidad óptica (unidades de mili-absorbancia por minuto) para cada uno de los pocillos, con ayuda del programa de software KC4 (BIO-TEK Instruments, Inc.). Se calculó la concentración de BG en suero por comparación con la recta de calibración de los controles con concentraciones estándar.

La prueba se realizó por duplicado en todas las muestras. Los datos de los pocillos duplicados con más de un 20% de desviación respecto a la media no se tuvieron en cuenta, y posteriormente se repitió el ensayo de aquellos sueros con datos no homogéneos. Los resultados no se mostraron a los médicos adjuntos de la UCI. Se considero un resultado positivo en las pruebas de BG en suero si el valor fue  $\geq 80.0$  pg/mL.

### **3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para la descripción de las variables cuantificables se utilizó la media, mediana, desviación estándar (DE), rango y rango intercuartil (RQ); y en el caso de las variables categóricas se utilizó la frecuencia de distribución.

Las variables continuas se compararon con la prueba de Mann-Whitney U-test. Se calcularon los parámetros diagnósticos más relevantes de las pruebas diagnósticas evaluadas: la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, el cociente de probabilidad positiva (CPP), el cociente de probabilidad negativa (CPN) y la eficiencia.

Los puntos de corte óptimos para GM y BG fueron determinados de acuerdo a curvas ROC, consecuentemente los puntos de corte elegidos fueron aquellos que presentaban los mejores parámetros diagnósticos para nuestra población. Se analizó el ABC para determinar el poder discriminatorio de las pruebas diagnósticas evaluadas. La comparación de las ABC se realizó utilizando el método de Hanley y McNeil.<sup>136</sup>

Se consideró que una prueba presentaba un rendimiento diagnóstico superior a otra, si existía una diferencia estadísticamente significativa en el valor del ABC.

Todas las estimaciones se realizaron utilizando un intervalo de confianza (IC) de 95%.

## **4. RESULTADOS**

#### **4.1. ESTUDIO PROSPECTIVO DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD FÚNGICA INVASORA MEDIANTE LA DETECCIÓN DE GALACTOMANANO Y (1→3)-β-D-GLUCANO SÉRICOS**

##### **4.1.1. Características de los pacientes de la población N° 1:**

Durante el periodo de estudio correspondiente a 24 meses (entre Junio del 2008 y Mayo del 2010) 965 pacientes fueron admitidos en la UCI. De estos 149 (15.4%) presentaron un síndrome clínico compatible y factores de riesgo para EFI, y 98 (10.2%) cumplían los criterios de inclusión (23 pacientes con EFI y 75 pacientes control sin evidencia de EFI). Se excluyeron 51 pacientes a los que se les realizó estudio de fibrobroncoscopia y lavado broncoalveolar.

Los casos de EFI correspondían a:

- Aspergilosis Invasora Probada: 4 pacientes
- Aspergilosis Invasora Probable: 7 pacientes
- Candidiasis Invasora Probada: 9 pacientes
- Infección mixta de Candidiasis Invasora Probada y Aspergilosis Invasora Probable: 1 paciente
- Zigomicosis Probada: 1 paciente
- Enfermedad mixta por hongos miceliales (*Scedosporium apiospermum*, *Rhizopus arrhizus*, *Fusarium solani*): 1 paciente

La prevalencia global de EFI en esta cohorte de pacientes fue de 23.4% (10.2% de EFI causada por hongos miceliales y 13.2% de EFI causada por *Candida* spp.).

En las tablas 1 y 2 (páginas 53 y 54) podemos observar las características demográficas y clínicas de estos pacientes, agrupados de acuerdo al Síndrome de ingreso, así como la

distribución de diagnósticos de EFI en cada grupo. Los síndromes de ingreso más prevalentes fueron neumonía severa con shock séptico (52.0%) y shock séptico de origen abdominal o urológico (34.6%).

**Tabla 1:** Características de 98 pacientes críticos en riesgo de Enfermedad Fúngica Invasora

Síndrome al ingreso en UCI Nº (%)	Edad Promedio años (rango)	Sexo (masculino/ femenino)	APACHE II promedio (± DE)	SAPS II Promedio (± DE)	RTOS	Estancia en UCI, mediana días (rango)	SFMO N (%)	Mortalidad en pacientes con SFMO N (%)	Mortalidad total en UCI (%)	Estancia hospitalaria posterior a UCI, promedio días (rango)	Mortalidad hospitalaria posterior a estancia en UCI, N (%)
<b>Grupo 1<sup>a</sup> 51 (52.0)</b>	60.9 (21-83)	31/20	24.7 (7.2)	52.6 (13.2)	5 <sup>c</sup>	11 (1-79)	18 (35.2)	14 (77.7)	26 (50.9)	11 (0-59)	1 (1.96)
<b>Grupo 2<sup>b</sup> 34 (34.6)</b>	64.4 (22-89)	22/12	49.7 (20.7)	26.9 (12.3)	5 <sup>f</sup>	17.25 (1-61)	14 (41.2)	12 (85.7)	15 (44.1)	13 (0-176)	5 (14.7)
<b>Grupo 3<sup>c</sup> 3 (3.1)</b>	44.3 (32-61)	3/0	58.66 (11.05)	29.33 (8.96)	0	37 (36-58)	1 (33.3)	1 (100)	2 (66.6)	0	0
<b>Grupo 4<sup>d</sup> 10 (10.2)</b>	56.5 (39-78)	6/4	17.8 (2.0)	38.8 (9.5)	1 <sup>g</sup>	19 (5-42)	1 (10)	1 (100)	2 (20)	7 (0-236)	1 (10)

UCI= Unidad de Cuidados Intensivos, APACHE II= Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II, SAPS II = Simplified Acute Physiology Score II, RTOS= Receptores de Trasplante de Órgano Sólido, SFMO = Síndrome de Fallo Multi-Orgánico

<sup>a</sup> Neumonía grave con shock séptico; <sup>b</sup> Shock séptico Abdominal/ Urológico y meningoencefalitis (n=1), fascitis (n=1), flebitis (n=1) y celulitis (n=1) con shock séptico; <sup>c</sup> Politraumatismo grave; <sup>d</sup> Este grupo incluía pacientes con patologías diversas: 4 pacientes presentaban patología del Sistema Nervioso Central: Epilepsia (n=3), Hemorragia Subaracnoidea (n=1); 2 pacientes con crisis miasténica; 2 pacientes con cirugía vascular mayor; 1 paciente con infarto agudo de miocardio, 1 paciente con Angina de Ludwig; <sup>e</sup>Trasplante renal (n=5); <sup>f</sup>Trasplante renal (n= 3), trasplante hepático (n=2); <sup>g</sup>Trasplante hepático (n= 1)

**Tabla 2:** Enfermedad Fúngica Invasora en 98 pacientes críticos con riesgo

<b>Grupo</b>	<b>AI Probada N (%)</b>	<b>AI Probable N (%)</b>	<b>CI Probada N (%)</b>	<b>CI Probada y AI Probable N (%)</b>	<b>Zigomicosis Probada N (%)</b>	<b>Enfermedad Probada mixta por hongos filamentosos,<sup>e</sup> N (%)</b>	<b>No EFI N (%)</b>	<b>TOTAL N</b>
<b>Grupo 1<sup>a</sup></b>	0 (0.0)	4 (7.8)	2 (3.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	45 (88.2)	51
<b>Grupo 2<sup>b</sup></b>	3 (8.8)	3 (8.8)	6 (17.6)	1 (2.94)	0 (0.0)	0 (0.0)	21 (61.8)	34
<b>Grupo 3<sup>c</sup></b>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	3
<b>Grupo 4<sup>d</sup></b>	1 (10.0)	0 (0.0)	1 (10.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (80.0)	10
<b>Número total</b>	4	7	9	1	1	1	75	98

AI=Aspergilosis Invasora, CI= Candidiasis Invasora, EFI= Enfermedad Fúngica Invasora

<sup>a</sup> Neumonía grave con shock séptico

<sup>b</sup> Shock séptico abdominal/ urológico y meningoencefalitis (n=1), fascitis (n=1), flebitis (n=1) y celulitis (n=1) con shock séptico

<sup>c</sup> Politraumatismo grave

<sup>d</sup> Pacientes con otra patología clínica: 4 pacientes con enfermedad del Sistema Nervioso Central; epilepsia (n=3), hemorragia subaracnoidea (n=1); 2 pacientes con crisis miasténica; 2 pacientes con cirugía mayor vascular; 1 paciente con infarto agudo de miocardio, 1 paciente con angina de Ludwig

<sup>e</sup> *S. apiospermum*, *R. arrhizus*, *F. solani*

En la tabla 3 (página 56) se detallan las características demográficas, clínicas y microbiológicas y los factores de riesgo de EFI, de los pacientes incluidos en el estudio, agrupados de acuerdo al diagnóstico de EFI. El índice promedio de severidad de enfermedad al ingreso a la UCI medido con el sistema SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II) y con el sistema APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) de los 23 pacientes con EFI fue de 53.8 (rango 15-93) y 27.1 (rango 12-57) respectivamente, y para el grupo control fue de 49.9 (rango 12-83) y 24.4 (rango 8-42), respectivamente.

El 80.61% (79) de los pacientes incluidos presentaban al menos un factor de riesgo de EFI, de estos 26 pacientes (26.53%) presentaban dos factores de riesgo definidos, 16 (16.32%) presentaban tres y 8 (8.1%) presentaban cuatro o más. En la tabla 3 (página 56) se puede observar que 21 pacientes (21.42%) de los pacientes fueron tratados con corticoesteroides, 18 (18.36%) con agentes inmunosupresores, 4 pacientes (4.08%) presentaban neutropenia y cinco (5.1%) pacientes eran VIH positivo. La mortalidad en la UCI en el grupo con EFI fue significativamente mayor al compararla con el grupo control: 19/23 (82.6%) y 33/75 (44%), respectivamente ( $p=0.0012$ ).

La tasa de necropsias entre la población estudiada fue de 9/52 (17.3%). Se obtuvieron biopsias profundas en 29 de 98 pacientes (29.59%).

Las características de los 23 pacientes con EFI están detalladas en la tabla 4 (página 58).

**Tabla 3:** Características de pacientes críticos con riesgo de Enfermedad Fúngica Invasora

Pacientes	AI Probada (n=4)	AI Probable <sup>a</sup> (n=8)	CI Probada <sup>a</sup> (n=10)	Zigo Probada (n=1)	Enfermedad filamentosa mixta (n=1)	No EFI (n=75)	TOTAL (n=98)
<b>Ventilación mecánica promedio de días</b>	12.5	16.37	14.4	0	59	13.87	16.92
<b>Antibióticos sistémicos/CVC</b>	4/2	8/1	10/2	1/0	1/1	74/11	97/17
<b>Insuficiencia Renal Aguda con TPER (%)</b>	2 (50)	3 (37.5)	4 (40)	1(100)	1(100)	12 (16)	23 (23.46)
<b>Corticoesteroides<sup>b</sup> (%)</b>	2 (50)	6 (75.0)	3 (30)	0	0	11 (14.6)	21 (21.42)
<b>Neutropenia (%)</b>	0	2 (25.0)	1 (10)	0	0	2 (2.6)	4 (4.08)
<b>Agentes inmunosupresores (%)</b>	0	3 (37.5)	4 (40)	0	0	12 (16)	18 (18.36)
<b>NPT (%)</b>	2 (50)	1 (12.5)	4 (40)	0	0	9 (12)	15 (15.30)
<b>Cirugía mayor (%)</b>	2 (50)	2 (25)	7 (70)	1 (100)	1 (100)	18 (24)	31 (31.63)
<b>Enfermedad Onco- hematológica (%)</b>	0	1 (12.5)	1 (10)	0	0	4 (5.3)	6 (6.12)
<b>TCM autólogo (%)</b>	0	0	0	0	0	1 (1.33)	1 (1.02)
<b>No hematológica</b>							
<b>EPOC (%)</b>	1 (25)	4 (50)	1 (10)	0	0	13 (17.3)	19 (19.38)
<b>TOS (%)</b>	0	1 (12.5)	2 (20)	0	0	9 (12)	11 (11.22)
<b>VIH (%)</b>	0	0	0	0	0	5 (6.66)	5 (5.10)
<b>Cirrosis (%)</b>	1 (25)	0	1 (10)	0	0	9 (12)	11 (11.22)
<b>Enfermedad Sistémica (%)</b>	1 (25)	0	0	0	0	7 (9.3)	8 (8.16)
<b>Cáncer de órgano sólido (%)</b>	1 (25)	2 (25)	4 (40)	0	0	12 (16)	19 (19.38)
<b>Insuficiencia Renal Crónica (%)</b>	1 (25)	2 (25)	2 (20)	0	0	12 (16)	16 (16.32)
<b>Pancreatitis (%)</b>	0	0	1 (10)	0	0	5 (6.6)	6 (6.12)
<b>Criterios Clínicos</b>							
<b>Nódulos pulmonares</b>	3 <sup>c</sup>	6	0	0	0	3	12

<b>Pacientes</b>	<b>AI Probada (n=4)</b>	<b>AI Probable<sup>a</sup> (n=8)</b>	<b>CI Probada<sup>a</sup> (n=10)</b>	<b>Zigo Probada (n=1)</b>	<b>Enfermedad filamentosa mixta (n=1)</b>	<b>No EFI (n=75)</b>	<b>TOTAL (n=98)</b>
<b>Consolidación</b>	1	2	1	0	0	20	23
<b>Abscesos abdominales</b>	0	0	3	0	0	2	5
<b>Cultivo positivo <i>Aspergillus</i> / <i>Candida</i> (zona estéril)</b>	4/0	8/1	1/10	0/0	0/0	6/0	18/10
<b>Estructuras fúngicas en biopsias o necropsias</b>	4	0	0	1	1	0	6
<b>GM en suero, promedio (rango)</b>	2.50 (0.155- 4.39)	1.32 (0.122- 4.56)	0.40 (0.059- 2.5)	0.1	0.115	0.25 (0.032- 7.06)	0.423 (0.032- 7.06)
<b>BG en suero pg/mL, promedio (rango)</b>	1513 (639- 1747)	2399.7 (24.34- 8009)	1655.8 (18.36- 7836)	29	535	178.09 (16- 2625)	501.82 (16- 7836)

AI= Aspergilosis Invasora; CI= Candidiasis Invasora; Zigo= Zigomicosis; EFI= Enfermedad Fúngica Invasora; CVC= Catéter venosos central; TPER=Técnicas de purificación Extra-Renal; NPT= Nutrición Parenteral Total; TCM= Trasplante de células madre; EPOC= Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; TOS= Trasplante de órgano sólido; VIH= Virus de Inmunodeficiencia Humana; GM= galactomanano; BG= (1→3) β-D-glucano

<sup>a</sup>Incluye un paciente con CI probada y AI probable; <sup>b</sup>Dosis mínima de 0.3 mg/kg/día de prednisona o equivalente por > 3 semanas; <sup>c</sup>Un paciente con signo del halo

**Tabla 4:** Resumen de las características de los pacientes con Enfermedad Fúngica Invasora probada y probable (n=23)

Paciente número	Edad/ Sexo	SAPS II	Factores del huésped <sup>a</sup>	Órgano afectado	EFI	Imagen Radiológica	Sitio de aislamiento de la especie fúngica	Microscopía/ Cultivo	Total muestra de suero	Nº de muestras positivas BG/GM	Nivel más alto de BG (pg/mL) /GM en suero	Tratamiento	Evolución	DI UCI/ Hospital
1	78/ F	69	Corticoides, IRA, CIR, TPER	Pulmón	AI Probable	Nódulo pulmonar	AT	Negativo / <i>A. terreus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i>	2	2/1	155.5/0.624	Anfotericina Liposomal	Fallecio en UCI	35/35
5	59/M	58	IRA, CVC TPER	Pulmón	AI Probable	Nódulo pulmonar	AT	Negativo / <i>A. fumigatus</i>	2	2/2	3525/4.56	Voriconazol	Fallecio en UCI	6/17
10	39/ F	47	Cirrosis, Corticoides, CVC, Enfermedad Sistémica	Pulmón, Cerebro	AI Probada	Nódulo pulmonar cavitado; Lesiones cerebrales hipodensas	AT, Biopsia pulmonar	Positivo/ <i>A. fumigatus</i>	2	2/2	2218/ 5.029	Voriconazol	Fallecio en UCI	6/18
11	75/ F	82	IRA, EPOC, NPT, TPER, Corticoides	Pulmón	AI Probada	Nódulo pulmonar cavitado	AT, Necropsia: AI	Positivo/ <i>A. fumigatus</i>	2	2/2	639/ 3.709	Anfotericina Liposomal	Fallecio en UCI	11/15
12	70/ M	85	EPOC, IRC, Neutropenia, LLC, Corticoides, TIS, TPER,	Pulmón	AI Probable	Nódulo pulmonar	AT	Negativo/ <i>A. fumigatus</i>	2	2/2	226/ 0.855	Voriconazol, Caspofungina	Fallecio en UCI	8/8
37	78/M	51	EPOC, COS, IRA, TPER, Corticoides	Pulmón	AI Probable	Nódulo pulmonar	AT	Negativo/ <i>A. fumigatus</i>	2	2/1	8009/1.196	Anfotericina Liposomal	Fallecio en UCI	8/30

Paciente número	Edad/Sexo	SAPS II	Factores del huésped <sup>a</sup>	Órgano afectado	EFI	Imagen Radiológica	Sitio de aislamiento de la especie fúngica	Microscopía/cultivo	Total muestra de suero	Nº de muestras positivas BG/GM	Nivel más alto de BG (pg/mL) /GM en suero	Tratamiento	Evolución	DI UCI/Hospital
51	81/F	50	Corticoides, CIR, IRA	Pulmón	AI Probable	Nódulo pulmonar	AT	Negativo/ <i>A. fumigatus</i>	1	1/0	372/0.122	Voriconazol	Fallecio en UCI	61/63
52	71/F	53	IRA, COS, CIR, NPT, TPER	Pulmón	AI Probada	Consolidación	AT, Necropsia: AI	Positivo/ <i>A. fumigatus</i>	1	1/1	1448/2.093	Caspofungina, Anfotericina Liposomal	Fallecio en UCI	13/28
55	59/M	55	IRC, RTxR, Corticoides, TIS, NPT, TPER, Neutropenia	Pulmón, Seno Esfenoidal	AI Probable CI Probada	Consolidación, Ocupación parcial de seno esfenoidal	AT; Sangre	Negativo/ <i>A. fumigatus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i> (AT); <i>C. glabrata</i> (sangre)	3	3/3	6550/9.501	Voriconazol, Anfotericina Liposomal	Fallecio en UCI	10/37
56	89/F	60	IRC, CIR, CVC	Pulmón	AI Probada	Nódulo pulmonar, signo del halo	AT, Necropsia: AI	Positivo/ <i>A. fumigatus</i>	1	1/0	1747/ 0.155	Anfotericina Liposomal	Fallecio en UCI	21/21
63	64/M	52	EPOC, COS, TIS	Pulmón	AI Probable	Nódulo pulmonar	AT	Positivo/ <i>A. fumigatus</i>	2	1/0	14349/0.465	Anfotericina Liposomal	Fallecio en UCI	2/10
66	40/M	58	CIR, IRA, CVC, TPER, Politrauma	Cuero cabelludo	EFI Probada	-	Biopsia de cuero cabelludo	Positivo/ <i>S. apiospermum</i> , <i>R. arrhizus</i> , <i>F. solani</i>	5	5/0	535/ 0.115	Anfotericina Liposomal, Voriconazol	Fallecio en UCI	58/58

Paciente número	Edad/ Sexo	SAPS II	Factores del huésped <sup>a</sup>	Órgano afectado	EFI	Imagen Radiológica	Sitio de aislamiento de la especie fúngica	Microscopía/cultivo	Total muestra de suero	Nº de muestras positivas BG/GM	Nivel más alto de BG (pg/mL) /GM en suero	Tratamiento	Evolución	DI UCI/Hospital
67	68/M	34	EPOC, Corticoides	Pulmón	AI Probable	Consolidación	AT	Negativo/ <i>A. fumigatus</i> , <i>A. lentulus</i>	2	2/0	1274.5/ 0.166	Voriconazol	Fallecio en UCI	17/32
93	61/M	70	CIR, IRA, Politrauma, TPER	Pierna	Zigomycosis Probada	-	Biopsia de herida de pierna	Positivo/ <i>Mucor</i> spp.	1	1/0	291/0.1	Anfotericina Liposomal	Fallecio en UCI	37/37
94	68/F	38	COS, CIR, NPT, IRA, TPER	Sangre, Abdomen	CI Probada	Absceso intra-abdominal	Pus abdominal, Sangre	Positivo/ <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> (sangre, pus)	2	0/0	75.88/0.133	Anidulafungina	Sobrevivió	5/70
96	71/M	52	COS, CIR, IRA, TPER	Sangre, Abdomen	CI Probada	Absceso intra-abdominal	Sangre	Negativo/ <i>C. albicans</i>	3	3/1	1363.9/0.766	Anidulafungina	Fallecio en UCI	21/25
129	59/M	52	COS, TIS	Pleura	CI Probada	-	Líquido pleural	Positivo/ <i>C. albicans</i>	1	1/0	86/ 0.207	Fluconazol	Fallecio en UCI	9/10
132	47/M	48	IRC, RTxR, Corticoides, TIS, Pancreatitis, CIR, TPER	Abdomen	CI Probada	Hemoperitoneo	Pus abdominal	Positivo/ <i>C. albicans</i>	2	2/0	12474/0.142	Caspofungina, Anidulafungina	Sobrevivió	17/89
149	73/M	93	EPOC, CIR, Linfoma B, IRA, Corticoides, NPT, TPER	Sangre	CI Probada	-	Sangre, catéter	Negativo/ <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> (Sangre, catéter)	2	2/0	293.66/ 0.571	Caspofungina, Anfotericina Liposomal	Fallecio fuera de UCI	7/46

Paciente número	Edad/ Sexo	SAPS II	Factores del huésped <sup>a</sup>	Órgano afectado	EFI	Imagen Radiológica	Sitio de aislamiento de la especie fúngica	Microscopía/cultivo	Total muestra de suero	Nº de muestras positivas BG/GM	Nivel más alto de BG (pg/mL) /GM en suero	Tratamiento	Evolución	DI UCI/Hospital
160	65/M	55	Cirrosis, COS, CIR, IRA, CVC, TPER	Abdomen, Sangre	CI Probada	Absceso intra-abdominal	Pus Abdominal, Sangre	Negativo/ <i>C. albicans</i> (sangre, pus)	1	1/0	1565/0.487	Anidulafungina, Fluconazol	Falleció en UCI	28/28
166	32/F	13	NPT, CIR	Sangre	CI Probada	Absceso peritoneal y absceso perirectal	Sangre	Negativo/ <i>C. glabrata</i>	1	0/0	69.81/0.059	Anfotericina Liposomal	Sobrevivió	15/38
168	78/M	57	NPT, CIR	Sangre	CI Probada	-	Sangre	Negativo/ <i>C. albicans</i>	1	1/0	120.16/0.102	Fluconazol	Falleció en UCI	37/37
171	65/F	46	CVC	Sangre	CI Probada	-	Sangre	Negativo/ <i>C. albicans</i>	1	0/0	22.41/0.075	Casposfungina	Sobrevivió	14/65

SAPS II= Simplified Acute Physiology Score II; EFI= Enfermedad Fúngica Invasora; BG= (1→3)-β-D-glucano; GM= galactomanano; DI= días de ingreso; UCI= Unidad de Cuidados Intensivos; IRA=Insuficiencia renal aguda; CIR=Cirugía; TPER= Técnicas de purificación extra-renal; AI= Aspergilosis Invasora; AT= Aspirado traqueal; CVC= Catéter venoso central; EPOC= Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; NPT=Nutrición Parenteral Total; IRC=Insuficiencia Renal Crónica; LLC= Leucemia Linfocítica Crónica; TIS= Tratamiento Inmunosupresor; COS= Cáncer de órgano solido; RTxR=Receptor de Trasplante Renal; CI= Candidiasis Invasora <sup>a</sup>Todos los pacientes fueron tratados con antibióticos sistémicos

Se incluyeron en este estudio descriptivo 98 pacientes, con un total de 130 muestras serológicas. La distribución de muestras de acuerdo al diagnóstico micológico es como se muestra a continuación:

- Pacientes del grupo control: 88 muestras
- Pacientes con Aspergilosis Invasora Probada: 6 muestras
- Pacientes con Aspergilosis Invasora Probable: 13 muestras
- Pacientes con Candidiasis Invasora Probada: 14 muestras
- Pacientes con Infección mixta de Candidiasis Invasora Probada y Aspergilosis Invasora Probable: 3 muestras
- Paciente con Zigomicosis Probada: 1 muestra
- Paciente con Enfermedad mixta por hongos miceliales (*Scedosporium apiospermum*, *Rhizopus arrhizus*, *Fusarium solani*): 5 muestras

#### **4.1.2. Pacientes en riesgo de Aspergilosis Invasora**

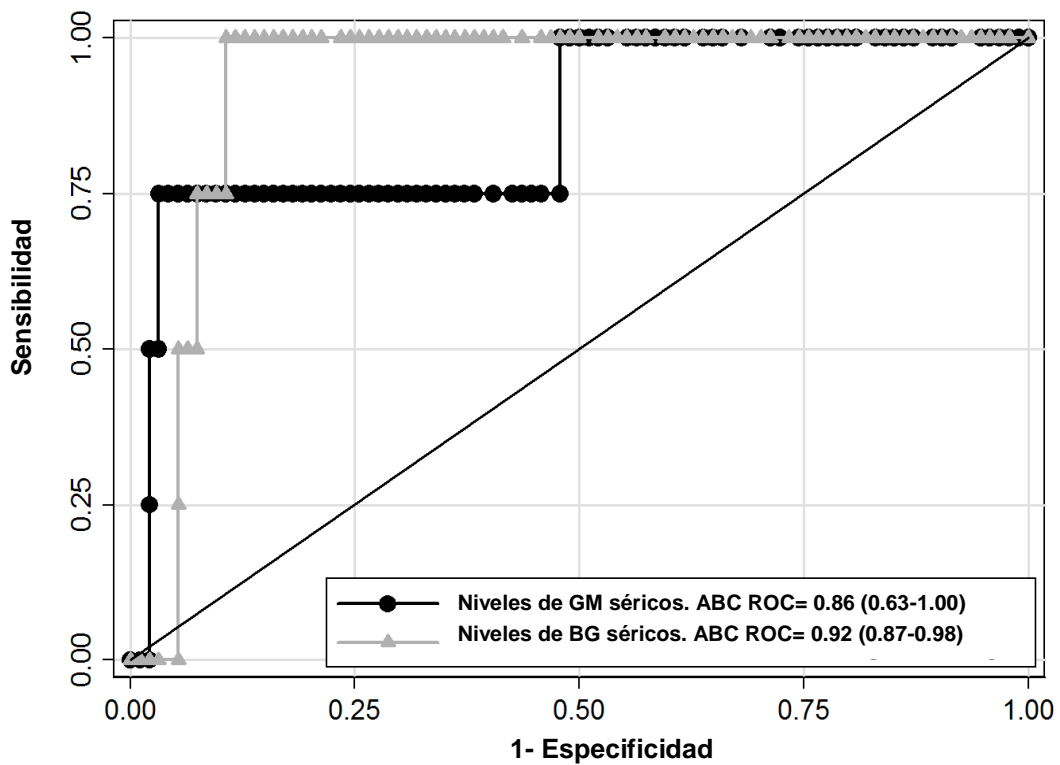
##### **4.1.2.1. Niveles de galactomanano sérico**

El rendimiento diagnóstico dado por el ABC de GM en suero en todos los casos de AI fue 0.873 (IC 95%: 0.75-0.99) y en los casos de AI probada fue de 0.862 (IC 95%: 0.63-1.00) tal como se muestra en las figuras 2 y 3 (páginas 64 y 65).

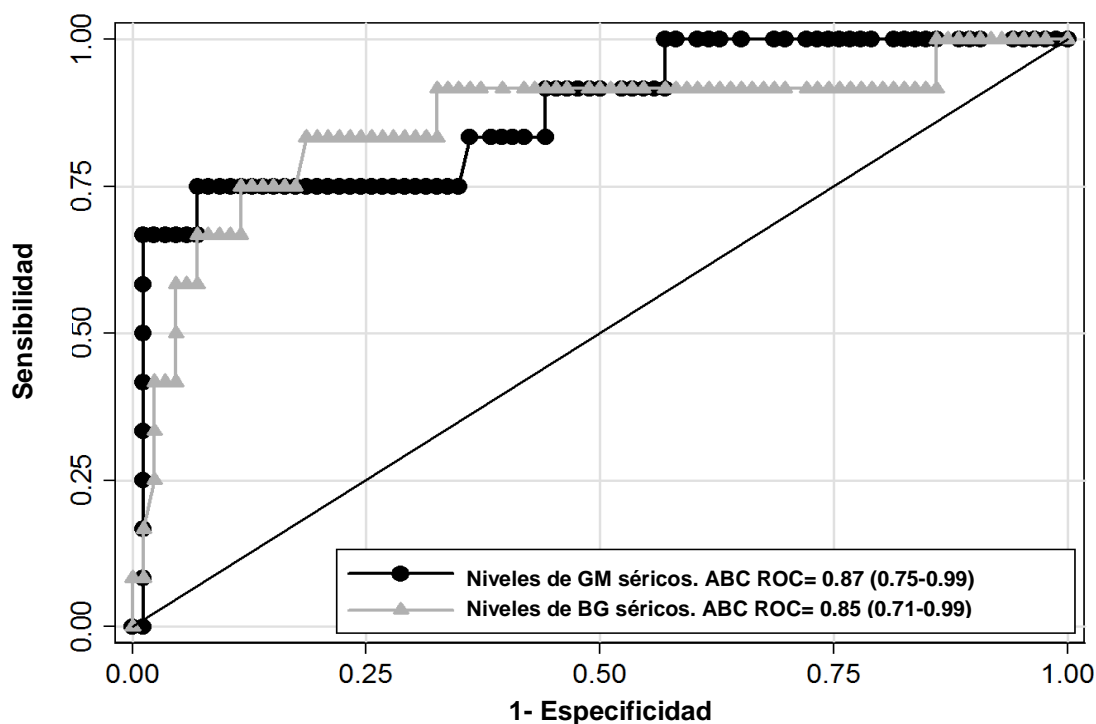
Las características clínicas y microbiológicas de los pacientes con Aspergilosis (probada y probable) se muestran en la tabla 3 (página 56). En esta tabla se muestran los valores de media y rango de GM tanto de los casos (agrupados de acuerdo al diagnóstico de EFI), como de los controles. La mediana de GM entre los pacientes con AI probada fue de 2.901 (RQ: 1.799-4.225) y entre los pacientes con AI probable fue de 0.687 (RQ: 0.332-1.525). En el grupo control (en el cual incluimos para este análisis los pacientes con CI y los pacientes con zigomicosis y

enfermedad por hongo miceliales: *Scedosporium apiospermum*, *Rhizopus arrhizus*, *Fusarium solani*) la mediana fue de 0.136 (RQ: 0.099-0.196; media: 0.246; rango: 0.032-7.066). La media de los niveles GM de los dos pacientes control neutropénicos no fue estadísticamente diferente que la media para los 84 pacientes control no neutropénicos: 0.288 (DE: 0.27, RQ: 0.09-0.48) y 0.245 (DE: 0.76, RQ: 0.10-0.19), respectivamente (p= 0.937).

**Figura 2:** Área bajo la curva ROC de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano en suero en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora Probada: análisis por paciente



**Figura 3:** Área bajo la curva ROC de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano en suero en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora Probada y Probable: análisis por paciente



La tabla 5 (página 65) muestra el rendimiento de GM en el diagnóstico de todos los casos de AI (probada y probable) y AI probada utilizando diferentes puntos de corte. En nuestra población el mejor rendimiento diagnóstico para todos los casos de AI (probada y probable), se obtuvo utilizando un punto de corte  $\geq 0.5$ . Cuatro pacientes con AI (nº 51, 56, 63 y 67, tabla 4, página 58) presentaron valores de GM en suero  $< 0.5$ . Tres de ellos habían sido tratados previamente de forma empírica: uno de ellos con Caspofungina y Anfotericina B liposomal y los otros dos con Voriconazol. Por otro lado, tres pacientes (nº 4,8 y 101) del grupo control, presentaron valores de GM  $\geq 0.5$ : uno había sido tratado con piperacilina/tazobactam, y en los otros dos pacientes no se identificaron posibles causas de falsa reactividad para GM.

**Tabla 5** Rendimiento diagnóstico de la determinación de galactomanano sérico en pacientes con Aspergilosis Invasora

<b>Punto de corte</b>	<b>Sensibilidad % (IC 95%)</b>	<b>Especificidad % (IC 95%)</b>	<b>VPP % (IC 95%)</b>	<b>VPN % (IC 95%)</b>	<b>CPP (IC 95%)</b>	<b>CPN (IC 95%)</b>	<b>Eficiencia (%)</b>
<b>AI Probada</b>							
≥ 0.4	75.00 ( 20.06- 100.0)	86.17 (78.66-93.68)	18.75 (0.00-41.00)	98.78 (95.80- 100.00)	5.42 (2.54- 11.57)	0.29 (0.05-1.59)	85.71
≥ 0.5	75.00 (20.06- 100.0)	91.49 (85.32-97.66)	27.27 (0.00- 58.14)	98.85 (96.04-100.00)	8.81 (3.69-21.07)	0.27 (0.05-1.49)	90.82
≥ 0.8	75.00 (20.06-100.00)	95.74 (91.13-100.00)	42.86 (0.00-86.66)	98.90 (96.21-100.00)	17.63 (5.79-53.66)	0.26 (0.05-1.43)	94.90
≥ 2.0	75.00 (20.06-100.00)	96.81 (92.72-100.00)	50.00 (1.66-98.34)	98.91 (96.25-100.00)	23.50 (6.74-81.93)	0.26 (0.05-1.41)	95.92
≥ 3.5	50.00 (0.00-100.00)	97.87 (94.42-100.00)	50.00 (0.00-100.00)	97.87 (94.42-100.00)	23.50 (4.36-126.76)	0.51 (0.19-1.36)	95.92
<b>AI Probada + AI Probable</b>							
≥ 0.4	75.00 (46.33-100.00)	91.86 (85.50-98.22)	56.25 (28.82-83.68)	96.34 ( 91.67-100.0)	9.21 (4.22-20.13)	0.27 (0.10-0.73)	89.80
≥ 0.5	66.67 (35.83-97.51)	97.67 (93.91-100.0)	80.00 (50.21-100.0)	95.45 ( 90.53-100.0)	28.67 (6.88-119.43)	0.34 (0.15-0.76)	93.88
≥ 0.6	58.33 (26.27-90.39)	98.84 (95.99-100.0)	87.50 (58.33-100.0)	94.44 (89.16-99.73)	50.17 (6.75-373.06)	0.42 (0.22-0.82)	93.88
≥ 2.0	41.67 (9.61-73.73)	98.84 (95.99-100.00)	83.33 (45.18-100.0)	92.39 (86.43-98.35)	35.83 (4.57-281.25)	0.59 (0.37-0.95)	91.84

IC= Intervalo de Confianza; VPP= Valor predictivo positivo; VPN= Valor predictivo negativo; CPP= Cociente de probabilidad positiva; CPN= Cociente de probabilidad negativa; AI= Aspergilosis Invasora

#### 4.1.2.2. Niveles de (1→3)-β-D-glucano sérico

El rendimiento diagnóstico dado por el ABC de BG en suero en todos los casos de AI (probada y probable) fue de 0.856 (IC 95%: 0.714-0.998), y en los casos de AI probada fue de 0.928 (IC 95%: 0.874-0.982), tal como se muestra en las figuras 2 y 3 (páginas 63 y 64). En la tabla 3 (página 56) se muestran los valores de media y rango de BG tanto de los casos (agrupados de acuerdo al diagnóstico de EFI), como de los controles. La mediana de BG entre los pacientes con AI probada fue de 1588 pg/mL (RQ: 841.25-1724.36 pg/mL) y entre los pacientes con AI probable fue de 1662.2 pg/mL (RQ: 146.03-4873.50 pg/mL). La mediana de los valores de BG en el grupo control (grupo de pacientes sin EFI, en el cual incluimos para este análisis el paciente con zigomicosis) fue 61.26 pg /mL (RQ: 40.52-132.98 pg/mL; media: 179.6 pg /mL; rango: 16-2625 pg/mL). La media de los valores de BG de los dos pacientes control neutropénicos no fue estadísticamente diferente del valor medio de BG de los 74 pacientes control no neutropénicos: 630.2 pg /mL (DE: 846.34; RQ: 31.69-1128.6 pg/mL) y 167.4 pg /mL (DE: 369.04; RQ: 40.52-132.98 pg/mL), respectivamente (p=0.719).

La tabla 6 (página 67) muestra el rendimiento de BG para el diagnóstico de AI probada y AI (probada y probable) utilizando diferentes valores de punto de corte. En nuestra población el mejor rendimiento diagnóstico de esta prueba para todos los casos de AI (probada y probable) se obtuvo utilizando un punto de corte  $\geq 80$  pg/mL.

**Tabla 6:** Rendimiento diagnóstico de la determinación de (1→3)-β-D-glucano sérico

Punto de corte	Sensibilidad % (IC 95%)	Especificidad % (IC 95%)	VPP % (IC 95%)	VPN % (IC 95%)	CPP (IC 95%)	CPN (IC 95%)	Eficiencia (%)
<b>AI Probada</b>							
≥ 70	100.0 (87.50-100.00)	50.00 (39.36- 60.64)	7.84 (0.00-16.20)	100.0 (98.94-100.00)	2.00 (1.63-2.45)	-	52.04
≥ 80	100.0 (87.50-100.00)	58.51 (48.02-69.00)	9.30 (0.00-19.15)	100.0 ( 99.09-100.0)	2.41 (1.90-3.06)	-	60.20
≥ 120	100.0 (87.50-100.0)	64.89 (54.71-75.07)	10.81 (0.00-22.17)	100.0 ( 99.18-100.0)	2.85 (2.16-3.75)	-	66.33
≥ 150	100.0 ( 87.50-100.0)	71.28 (61.60-80.96)	12.90 (0.00-26.32)	100.0 (99.25-100.0)	3.48 (2.53-4.79)	-	72.45
<b>AI Probada + AI Probable</b>							
≥ 70	91.67 (71.86-100.00)	53.49 (42.37-64.61)	21.57 (9.30-33.84)	97.87 (92.68-100.00)	1.97 (1.48-2.62)	0.16 (0.02-1.03)	58.16
≥ 80	91.67 (71.86-100.00)	62.79 (51.99-73.59)	25.58 (11.38-39.79)	98.18 (93.74-100.00)	2.46 (1.78-3.40)	0.13 (0.02-0.87)	66.33
≥ 120	83.33 (58.08-100.00)	68.60 (58.21-78.99)	27.03 (11.37-42.69)	96.72 (91.43-100.00)	2.65 (1.78-3.97)	0.24 (0.07-0.87)	70.41
≥ 150	83.33 (58.08-100.00)	75.58 (65.92-85.24)	32.26 (14.19-50.33)	97.01 (92.19-100.00)	3.41 (2.18-5.35)	0.22 (0.06-0.79)	76.53
<b>CI Probada</b>							
≥ 70	70.00 (36.60-100.00)	50.00 (38.98-61.02)	13.73 (3.30-24.15)	93.62 (85.56-100.00)	1.40 (0.89-2.21)	0.60 (0.23-1.58)	52.04
≥ 80	70.00 (36.60-100.00)	59.09 (48.25-69.93)	16.28 (4.08-28.48)	94.55 (87.63-100.00)	1.71 (1.06-2.76)	0.51 (0.19-1.33)	60.20
≥ 120	60.00 (24.64-95.36)	64.77 (54.22-75.32)	16.22 (2.99-29.44)	93.44 (86.41-100.00)	1.70 (0.95-3.04)	0.62 (0.28-1.34)	64.29
≥ 150	40.00 (4.64-75.36)	69.32 (59.11-79.52)	12.90 (0.00-26.32)	91.04 (83.46-98.63)	1.30 (0.57-2.96)	0.87 (0.51-1.46)	66.33
<b>Todas las EFI</b>							
≥ 70	81.82 (63.43-100.00)	56.58 (44.78-68.38)	35.29 (21.20-49.39)	91.49 (82.45-100.00)	1.88 (1.36-2.60)	0.32 (0.13-0.80)	62.24
≥ 80	81.82 (63.43-100.00)	67.11 (55.88-78.33)	41.86 (25.95-57.77)	92.73 (84.95-100.00)	2.49 (1.71-3.63)	0.27 (0.11-0.67)	70.41
≥ 120	72.73 (51.84-93.61)	72.37 (61.66-83.08)	43.24 (25.93-60.56)	90.16 (81.87-98.46)	2.63 (1.69-4.11)	0.38 (0.19-0.76)	72.45
≥ 150	63.64 (41.26-86.01)	77.63 (67.60-87.66)	45.16 (26.03-64.29)	88.06 (79.55-96.57)	2.84 (1.68-4.81)	0.47 (0.27-0.82)	74.49

IC= Intervalo de Confianza; VPP= Valor predictivo positivo; VPN= Valor predictivo negativo; CPP= Cociente de probabilidad positiva; CPN= Cociente de probabilidad negativa; AI= Aspergilosis Invasora; CI= Candidiasis Invasora; EFI=Enfermedad Fúngica Invasora

Un paciente con AI (n°63, tabla 4, página 58) presentaba en la muestra inicial valores de BG < 80 pg/mL, aunque posteriormente presento valores muy elevados de BG. Este paciente había recibido previamente tratamiento con voriconazol de forma empírica. Veinticuatro pacientes del grupo control presentaron valores de BG  $\geq$  80 pg/mL. Catorce de estos pacientes tuvieron bacteriemias co-sincrónicas por *Klebsiella pneumoniae* (n=3), *Streptococcus pneumoniae* (n=3), *Pseudomonas aeruginosa* (n=2), *Enterococcus faecium* (n=2), *Escherichia coli* (n=2) y *Staphylococcus simulans* (n=2). Otros dos pacientes habían sido tratados con Amoxicilina/Ácido clavulánico y otros tres pacientes habían sido sometidos a una cirugía mayor dos días (n=1) y seis días (n=2) antes de realizarse la prueba de BG en suero. No se identificaron posibles causas de falsa reactividad de BG en otros cinco pacientes. En estos 24 pacientes se pudo excluir el diagnóstico de EFI luego de una cuidadosa evaluación de la historia clínica, los hallazgos microbiológicos y la evolución de los pacientes.

#### **4.1.2.3. Comparación de niveles de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora**

Se comparó el rendimiento diagnóstico determinado por el ABC de GM y BG en suero tanto para el diagnóstico de todas las AI (probadas y probables) como para el de AI probada. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los casos (p=0.9719 y p=0.588, respectivamente).

#### **4.1.2.4. Combinación de niveles de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos**

Un paciente con AI probada (n° 56, tabla 4, página 58) y dos pacientes con AI probable (n° 51 y n°67, tabla 4, página 58) con valores de GM  $\leq$  0.5, presentaban valores  $\geq$  80 pg/mL de BG

en la misma muestra de suero. Por tanto la combinación de la determinación de ambos marcadores (GM y BG en suero) presenta un mejor rendimiento diagnóstico, en todos los casos de AI (probada y probable) que cada prueba por separado: ABC de la combinación de GM y BG en suero: 0.943 (IC 95%: 0.89-0.98). Esta diferencia, sin embargo no fue estadísticamente significativa ( $p=0.1934$  al compararla con el ABC de GM en suero y  $p=0.1709$  al compararla con el ABC de BG en suero). La sensibilidad y el VPN de la combinación de ambas pruebas para el diagnóstico de AI (probadas y probables) fue: 83.33 (IC 95%: 58.08-100.0) y 97.5 (IC 95%: 93.45-100.0), respectivamente, resultando superiores a la sensibilidad y el VPN de GM en suero, pero no de BG en suero. Los valores de especificidad, VPP, CPP, CPN y eficiencia de la combinación de GM y BG fueron: 90.70 (IC 95%: 83.98-97.42), 55.56 (IC 95%: 29.82-81.29), 8.96 (IC 95%: 4.42-18.16), 0.18 (IC 95%: 0.05-0.65) y 89.80, respectivamente.

#### **4.1.2.5. Comparación de resultados de cultivo y niveles de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos**

Los resultados positivos de GM (41.6%) y BG (50%) en los pacientes con AI, antecedieron un promedio de 6.5 días (rango 4-11) al cultivo de *Aspergillus* spp.

#### **4.1.3. Pacientes en riesgo de Candidiasis Invasora**

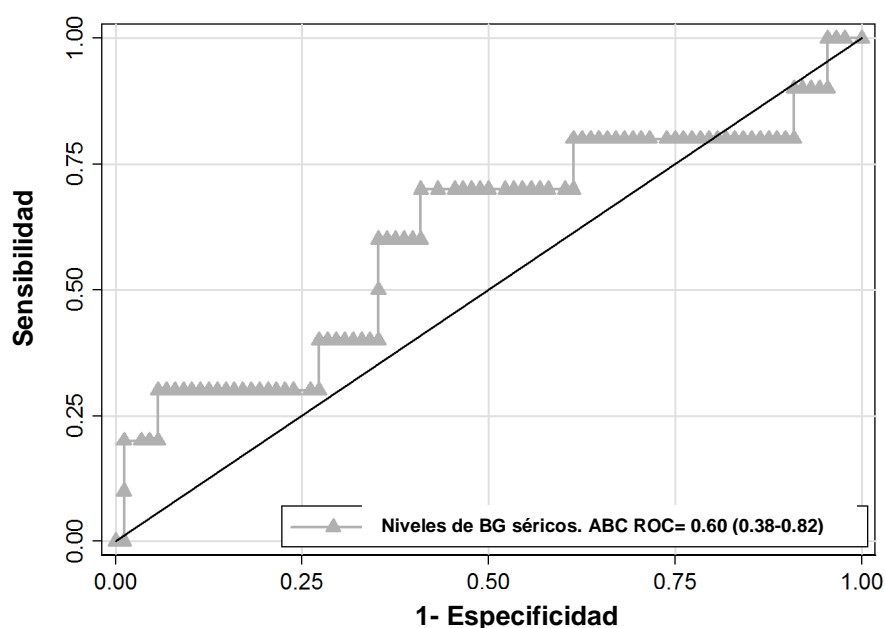
##### **4.1.3.1. Niveles de (1→3)-β-D-glucano sérico**

El rendimiento diagnóstico dado por el ABC en el diagnóstico de CI fue de 0.605 (IC 95%: 0.387-0.823) tal como se muestra en la figura 4 (página 70). La mediana de los niveles de BG de todos los casos de CI fue de 122.18 pg/ mL (RQ: 61.99-1219.6 pg/mL), las características

clínicas y microbiológicas (incluida la media de BG) de este grupo de paciente se detallan en la tabla 3 (página 56).

Como se mencionó anteriormente la mediana de los valores de BG en el grupo control (incluido el paciente con zigomicosis), fue 61.26 pg/mL (RQ: 40.52-132.98 pg/mL; media: 179.6 pg /mL; rango: 16-2625 pg/mL).

**Figura 4:** Área bajo la curva ROC de (1→3)-β-D-glucano en suero en el diagnóstico de Candidiasis Invasora: análisis por paciente



En la tabla 6 (página 67) se muestra el rendimiento de BG en suero en el diagnóstico de CI utilizando diferentes puntos de corte. El mejor rendimiento diagnóstico se obtuvo con un punto de corte de  $\geq 80$  pg/mL. Tres pacientes (nº 94, nº 166 y nº 171, tabla 4, página 58) presentaron valores de BG  $< 80$  pg/mL, uno de ellos había sido tratado de forma empírica con anidulafungina previo al diagnóstico. Como se mencionó anteriormente, 24 pacientes control presentaron valores de BG  $\geq 80$  pg/mL, las posibles causas de estos resultados se han comentado previamente.

#### **4.1.3.2. Comparación de resultados de cultivo y de niveles de (1→3)-β-D-glucano sérico**

Los resultados positivos de BG en los pacientes con CI, antecedieron un promedio de 3.25 días (rango 2-5 días) al cultivo de *Candida* spp. en el 40% de los casos, y una media de 4.8 días (rango 2-7 días) a la identificación a nivel de especie de *Candida* spp. en el 50% de los casos.

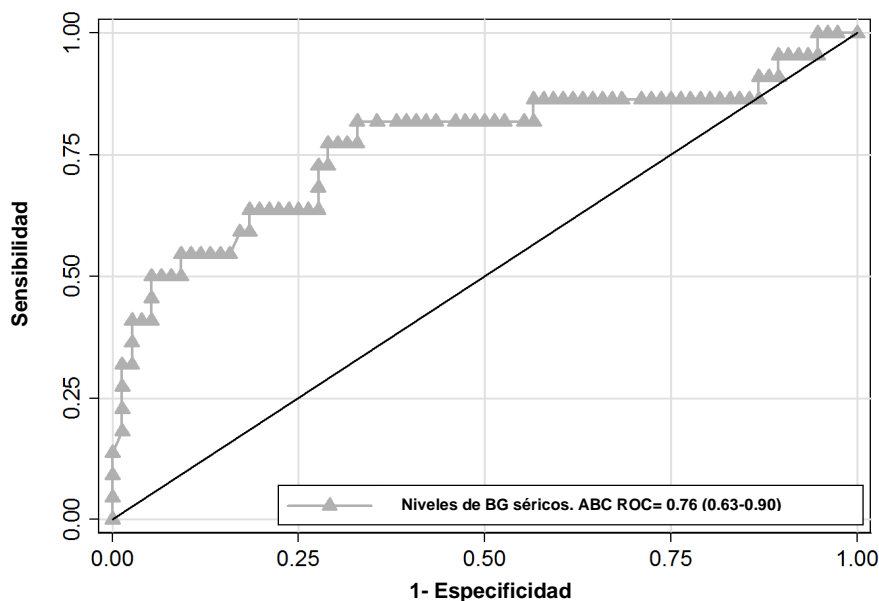
#### **4.1.4. Pacientes en riesgo de Enfermedad Fúngica Invasora en general**

##### **4.1.4.1. Niveles de (1→3)-β-D-glucano sérico**

El rendimiento diagnóstico dado por el ABC de BG en suero en el diagnóstico de EFI (todos los casos de AI, CI y el paciente con enfermedad por hongo micelial mixta) fue de 0.768 (IC95%: 0.633-0.903) tal como se muestra en la figura 5 (página 72). La mediana de los niveles de BG de todos los pacientes con EFI (excluyendo el paciente con zigomicosis) fue 453.5 pg/mL (RQ: 117.34-1701.78 pg/mL; media: 1626.94 pg/mL; rango: 18.36-8009 pg/mL). El mejor rendimiento diagnóstico de BG en suero para el diagnóstico de EFI (exceptuando el caso de Zigomicosis) se obtuvo utilizando como punto de corte  $\geq 80$  pg. /mL, tal como se muestra en la tabla 6 (página 67).

El paciente con Zigomicosis (°93, tabla 4, página 58) presentó valores de BG < 80 pg. /mL.

**Figura 5:** Área bajo la curva ROC de (1→3)-β-D-glucano en suero en el diagnóstico de Enfermedad Fúngica Invasora que incluye Aspergilosis Invasora, Candidiasis Invasora e Infección mixta por hongos miceliales: análisis por paciente

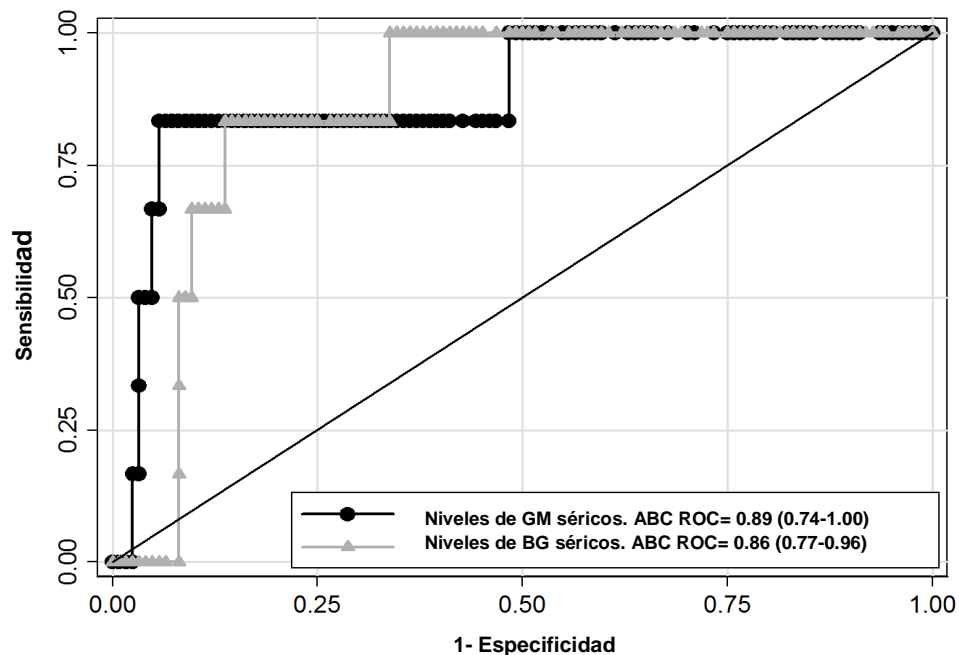


#### **4.1.5. Estudio por muestras para evaluar el rendimiento diagnóstico de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora y Enfermedad Fúngica Invasora.**

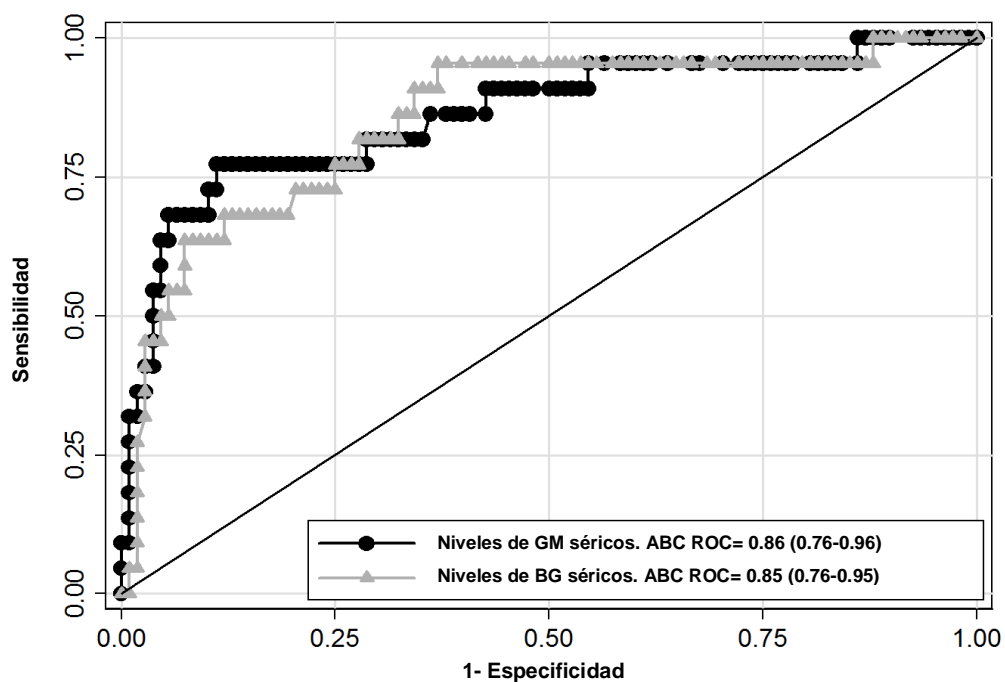
##### **4.1.5.1. Niveles de galactomanano sérico: análisis por muestra**

Analizando todas las muestras de suero disponibles de los pacientes incluidos en el estudio, determinamos que el rendimiento diagnóstico dado por el ABC de GM en suero en todos los casos de AI fue 0.8617 (IC 95%: 0.76-0.96) y en los casos de AI probada fue de 0.8871 (IC 95%: 0.73-1.00) tal como se muestra en las figuras 6 y 7 (página 73). La mediana de niveles de GM en suero de las muestras correspondientes al grupo de pacientes con AI probada fue de 2.901 (RQ: 1.799-4.226; media: 2.847; rango: 0.155-5.029), y del grupo con AI probable fue 0.687 (RQ: 0.332-1.525; media: 1.982; rango: 0.061-9.501). La mediana en el grupo control (en el cual incluimos para este análisis los pacientes con CI y los pacientes con enfermedad por hongos miceliales y zigomicosis) fue de 0.134 (RQ: 0.096-0.207; media: 0.281; rango: 0.021-7.06).

**Figura 6:** Área bajo la curva ROC de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano en suero en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora Probada: análisis por muestra



**Figura 7:** Área bajo la curva ROC de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano en suero en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora Probada y Probable: análisis por muestra



La tabla 7 (página 75) muestra el rendimiento de GM en suero en el diagnóstico de todos los casos de AI (probada y probable) y AI probada utilizando diferentes puntos de corte. El mejor rendimiento diagnóstico para AI probada se obtuvo utilizando un punto de corte de  $\geq 1.7$  y para AI (probada y probable), se obtuvo utilizando un punto de corte de  $\geq 0.6$ .

#### **4.1.5.2. Niveles de (1→3)-β-D-glucano sérico: análisis por muestra**

Analizando todas las muestras de suero disponibles de los pacientes incluidos en el estudio, determinamos que el rendimiento diagnóstico dado por el ABC de BG en suero en todos los casos de AI (probada y probable) fue 0.8535 (IC 95%: 0.76-0.94) y en los casos de AI probada fue de 0.8642 (IC 95%: 0.77-0.96) tal como se muestra en las figuras 6 y 7 (páginas 73).

La mediana de niveles de BG para el grupo de pacientes con AI probada fue de 1588.0 pg/mL (RQ: 841.25-1742.36 pg/mL; media: 1318.57 pg/mL; rango: 131.3-2218.0 pg/mL) y en el grupo de pacientes con AI probable 11.62.2 pg/mL (RQ: 146.62-4873.5 pg/MI; media: 2526.78 pg/mL; rango: 14.34-8009.0 pg/mL). En el grupo control (en el cual incluimos para este análisis al paciente con zigomicosis) fue de 59.5 pg /mL (RQ: 36.08-117.56 pg/mL; media: 145.65 pg/mL; rango: 1.26-1503.55 pg/mL).

La tabla 8 (página 76) muestra el rendimiento de BG en el diagnóstico de todos los casos de AI (probada y probable) utilizando diferentes puntos de corte, el mejor rendimiento diagnóstico se obtuvo utilizando un punto de corte de  $\geq 80$  pg/mL. En el caso de AI probada, el mejor rendimiento diagnóstico se obtuvo con un punto de corte de  $\geq 120$  pg/mL.

**Tabla 7:** Rendimiento diagnóstico de galactomanano sérico en pacientes con Aspergilosis Invasora: análisis por muestra

<b>Punto de corte</b>	<b>Sensibilidad % (IC 95%)</b>	<b>Especificidad % (IC 95%)</b>	<b>VPP % (IC 95%)</b>	<b>VPN % (IC 95%)</b>	<b>CPP (95% CI)</b>	<b>CPN (95% CI)</b>	<b>Eficiencia %</b>
<b>AI Probada</b>							
≥ 0.4	83.33 (45.18-100.0)	81.45 (74.21-88.70)	17.86 (1.89-33.83)	99.02 (96.62-100.00)	4.49 (2.69-7.51)	0.20 (0.03-1.23)	81.54
≥ 0.5	83.33 (45.18-100.0)	85.48 (78.88-92.09)	21.74 (2.71-40.77)	99.07 (96.77-100.00)	5.74 (3.29-10.02)	0.19 (0.03-1.17)	85.38
≥ 0.8	83.33 (45.18-100.00)	91.13 (85.72-96.54)	31.25 (5.41-57.09)	99.12 (96.97-100.00)	9.39 (4.82-18.32)	0.18 (0.03-1.10)	90.77
≥ 1.0	83.33 (45.18-100.00)	92.74 (87.77-97.71)	35.71 (7.04-64.39)	99.14 (97.02-100.00)	11.48 (5.57-23.68)	0.18 (0.03-1.08)	92.31
≥ 1.7	83.33 (45.18-100.00)	94.35 (89.89-98.82)	41.67 (9.61-73.73)	99.15 (94.42-100.00)	14.76 (6.61-32.97)	0.18 (0.03-1.06)	93.85
<b>AI Probada + Probable</b>							
≥ 0.4	72.73 (51.84-93.61)	88.89 (82.50-95.28)	57.14 (37.03-77.26)	94.12 (89.06-99.17)	6.55 (3.62-11.83)	0.31 (0.15-0.61)	86.15
≥ 0.5	68.18 (46.45-89.92)	92.59 (87.19-97.99)	65.22 (43.58-86.86)	93.46 (88.31-98.61)	9.20 (4.46-19.01)	0.34 (0.19-0.63)	88.46
≥ 0.6	63.64 (41.26-86.01)	95.37 (90.94-99.80)	73.68 (51.25-96.12)	92.79 (87.53-98.05)	13.75 (5.52-34.23)	0.38 (0.22-0.66)	90.00
≥ 0.7	59.09 (36.27-81.91)	98.84 (95.99-100.00)	83.33 (45.18-100.0)	92.39 (86.43-98.35)	35.83 (4.57-281.25)	0.59 (0.37-0.95)	91.84
≥ 1.1	45.45 (22.37-68.53)	96.30 (92.27-100.00)	71.43 (44.19-98.66)	89.66 (83.68-95.63)	12.27 (4.23-35.60)	0.57 (0.39-0.83)	87.69

IC= Intervalo de Confianza; VPP= Valor predictivo positivo; VPN= Valor predictivo negativo; CPP= Cociente de probabilidad positiva; CPN= Cociente de probabilidad negativa; AI= Aspergilosis Invasora

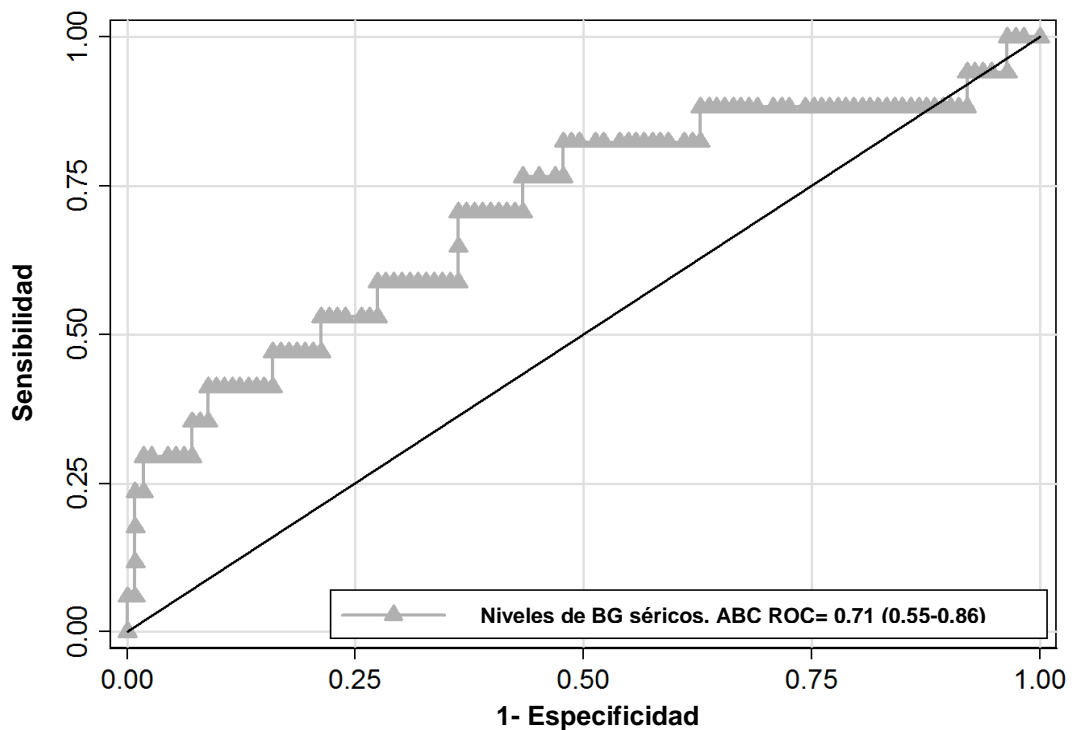
**Tabla 8:** Rendimiento diagnóstico de (1→3)-β-D-glucano sérico en pacientes con Enfermedad Fúngica Invasora: análisis por muestra

Punto de corte	Sensibilidad % (IC 95%)	Especificidad % (IC 95%)	VPP % (IC 95%)	VPN % (IC 95%)	CPP (95% CI)	CPN (95% CI)	Eficiencia %
<b>AI Probada</b>							
≥ 70	100.0 (91.67-100.00)	45.97 (36.79- 55.14)	8.22 (1.23-15.20)	100.0 (99.12-100.00)	1.85 (1.57-2.18)	-	48.46
≥ 80	100.0 (91.67-100.00)	54.84 (45.68-64.00)	9.68 (1.51-17.84)	100.0 (99.26-100.0)	2.21 (1.82-2.69)	-	56.92
≥ 120	100.0 (91.67-100.00)	61.29 (52.31-70.27)	11.11 (1.80-20.42)	100.0 (99.34-100.00)	2.58 (2.07-3.22)	-	63.08
≥ 150	83.33 (45.18-100.00)	67.74 (59.11-76.37)	11.11 (0.82-21.40)	98.82 (95.94-100.00)	2.58 (1.66-4.01)	0.25 (0.04-1.48)	68.46
<b>AI Probada + Probable</b>							
≥ 70	95.45 (84.48-100.00)	51.85 (41.97-61.74)	28.77 (17.70-39.84)	98.25 (93.96-100.00)	1.98 (1.60-2.46)	0.09 (0.01-0.60)	59.23
≥ 80	95.45 (84.48-100.00)	62.04 (52.42-71.65)	33.87 (21.28-46.46)	98.53 (94.93-100.00)	2.51 (1.94-3.25)	0.07 (0.01-0.50)	67.69
≥ 120	86.36 (69.75-100.00)	67.59 (58.30-76.88)	35.19 (21.52-48.85)	96.05 (91.02-100.00)	2.66 (1.94-3.67)	0.20 (0.07-0.58)	70.77
≥ 150	77.27 (57.49-97.06)	74.07 (65.35-82.80)	37.78 (22.50-53.05)	94.12 (88.53-99.71)	2.98 (2.02-4.41)	0.31 (0.14-0.67)	74.62
<b>CI Probada</b>							
≥ 70	82.35 (61.29-100.0)	47.79 (38.14-57.44)	19.18 (9.46-28.89)	94.74 (88.06-100.00)	1.58 (1.19-2.09)	0.37 (0.13-1.05)	52.31
≥ 80	76.47 (53.37-99.58)	56.64 (47.06-66.22)	20.97 (10.03-31.91)	94.12 (87.79-100.00)	1.76 (1.26-2.47)	0.42 (0.17-0.99)	59.23
≥ 120	70.59 (45.99-95.19)	62.83 (53.48-72.18)	22.22 (10.21-34.24)	93.42 (87.19-99.65)	1.90 (1.29-2.80)	0.47 (0.22-0.99)	63.85
≥ 150	58.82 (32.49-85.16)	69.03 (60.06-77.99)	22.22 (8.96-35.48)	91.76 (85.33-98.20)	1.90 (1.17-3.08)	0.60 (0.33-1.07)	67.69
<b>Todas las IFI</b>							
≥ 70	90.24 (79.94-100.00)	59.55 (48.79-70.31)	50.68 (38.53-62.84)	92.98 (85.47-100.00)	2.23 (1.70-2.93)	0.16 (0.06-0.42)	69.23
≥ 80	87.80 (76.57-99.04)	70.79 (60.78-80.80)	58.06 (44.98-71.15)	92.65 (85.71-99.59)	3.01 (2.13-4.24)	0.17 (0.07-0.40)	76.15
≥ 120	80.49 (67.14-93.84)	76.40 (67.02-85.79)	61.11 (47.18-75.04)	89.47 (81.92-97.03)	3.41 (2.28-5.10)	0.26 (0.14-0.48)	77.69
≥ 150	68.29 (52.83-83.76)	80.90 (72.17-89.63)	62.22 (46.95-77.50)	84.71 (76.47-92.95)	3.58 (2.22-5.75)	0.39 (0.25-0.62)	76.92

IC= Intervalo de Confianza; VPP= Valor predictivo positivo; VPN= Valor predictivo negativo; CPP= Cociente de probabilidad positiva; CPN= Cociente de probabilidad negativa; AI= Aspergilosis Invasora; CI= Candidiasis Invasora; EFI=Enfermedad Fúngica Invasora

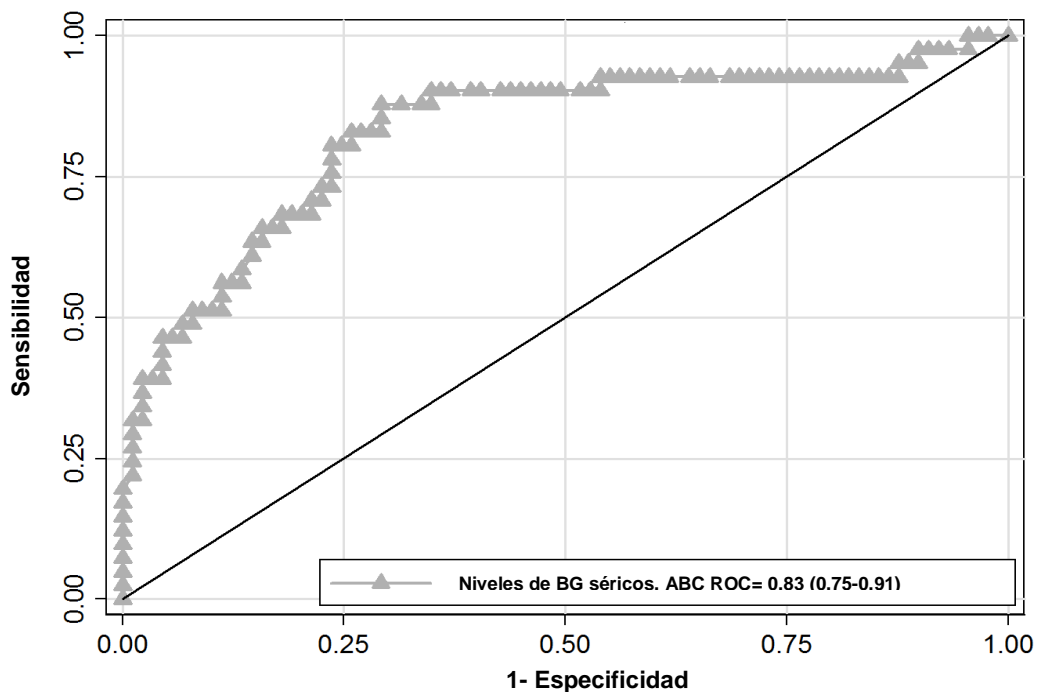
El rendimiento diagnóstico dado por el ABC en el diagnóstico de CI probada fue de 0.706 (IC 95%: 0.553-0.858) tal como se muestra en la figura 8 (página 77). La mediana de los niveles de BG en los pacientes con CI fue de 181.66 pg /mL (RQ: 75.88-4549.0 pg/mL; media: 2358.08 pg/mL; rango: 1.56-12474.0 pg/mL). La mediana del grupo control (incluido el paciente con zigomicosis) fue 59.5 pg/mL (RQ: 36.08-117.56 pg/mL), tal como se ha mencionado anteriormente. El mejor rendimiento diagnóstico de BG en suero para el diagnóstico de CI se obtuvo utilizando como punto de corte  $\geq 120$  pg /mL (tabla 8, página76).

**Figura 8:** Área bajo la curva ROC de (1→3)- $\beta$ -D-glucano en suero en el diagnóstico de Candidiasis Invasora: análisis por muestra



El rendimiento diagnóstico dado por el ABC de BG en suero en el diagnóstico de EFI (todos los casos de AI, CI y el paciente con enfermedad por hongos miceliales mixta) fue de 0.8295 (IC 95%: 0.746-0.913) tal como se muestra en la figura 9 (página 78). La mediana de los niveles de BG de todos los pacientes con EFI fue 297.0 pg/mL (RQ: 120.16 -1747.15 pg/mL; media: 1777.22 pg/mL; rango: 1.56-12474.0 pg/mL). El mejor rendimiento diagnóstico de BG en suero en el diagnóstico de EFI (exceptuando el caso de Zigomicosis) se obtuvo utilizando como punto de corte  $\geq 80$  pg/mL, tal como se muestra en la tabla 8 (página 76).

**Figura 9:** Área bajo la curva ROC de (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucano en suero en el diagnóstico de Enfermedad Fúngica Invasora (incluye Aspergilosis Invasora, Candidiasis Invasora y Enfermedad Probada mixta por hongos filamentosos): análisis por muestra



#### **4.1.5.3. Comparación de niveles galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora: análisis por muestras**

Se comparó el rendimiento diagnóstico determinado por el ABC de GM y BG en suero tanto para el diagnóstico de todas las AI (probadas y probables) como para el de AI probada. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los casos ( $p=0.9048$  y  $p=0.8111$ , respectivamente).

#### **4.2. ESTUDIO DIAGNÓSTICO PROSPECTIVO DE NEUMONIA FÚNGICA MEDIANTE LA DETECCIÓN DE GALACTOMANANO EN LÍQUIDO DE LAVADO BRONCOALVEOLAR COMPARADO CON GALACTOMANANO Y (1→3)-β-D-GLUCANO SÉRICOS**

##### **4.2.1. Características de los pacientes de la población N° 2:**

En el periodo de estudio, correspondiente a 21 meses entre Junio del 2008 y Febrero del 2010, 847 pacientes fueron admitidos en la UCI. De estos 191, el 22.5%, tenían neumonía, de los cuales 93 (48.6%) pacientes presentaban factores de riesgo de EFI, y 51 (26.7%) cumplían los criterios de inclusión del estudio. Es decir, se les realizó estudio de fibrobroncoscopia diagnóstica con LBA y se extrajo una muestra de suero para la determinación de GM y BG, el mismo día a demanda de los intensivistas.

Entre los 51 pacientes incluidos en el estudio, 13 pacientes fueron incluidos en el grupo de casos con EFI y 38 en el grupo control.

Los casos de EFI correspondían a:

- Aspergilosis Invasora Probada: 4 casos
- Aspergilosis Invasora Probable: 5 casos

- Neumonía por *P. jirovecii* Probada: 3 casos
- Infección mixta: Aspergilosis Invasora Probable y Neumonía por *P. jirovecii* Probada: 1 caso

La prevalencia global de EFI fue de 25.5%, (69.2% causadas por *Aspergillus* spp., 23.1% causada por *P. jirovecii* y 7.7% infección mixta: *P. jirovecii* y AI probable).

Todos los pacientes incluidos presentaban factores de riesgo para EFI tal como se muestra en la tabla 9 (página 82). En esta tabla podemos observar que el 70% de los pacientes fueron tratados con corticoesteroides (50% de ellos con al menos 4mg de metilprednisolona por al menos 7 días antes del ingreso en UCI y 20% de los pacientes, durante su estancia en UCI). Seis pacientes (11.8%) presentaban neutropenia como factor de riesgo y ocho pacientes eran VIH positivo con menos de 200 CD4/mm<sup>3</sup>. En esta cohorte, 31 pacientes (76.4%) presentaban al menos dos factores de riesgo para adquisición de EFI y de estos 19 (37.25%) presentaban al menos 3 factores de riesgo.

Los diagnósticos de ingreso a UCI fueron:

- Insuficiencia Respiratoria Aguda en 48 pacientes, de los cuales 31 presentaban neumonía con shock séptico
- Shock séptico asociado a pancreatitis en un paciente.
- Shock séptico asociado a peritonitis fecaloidea en un paciente.
- Shock séptico asociado a pielonefritis en un paciente.

Fallecieron 23 pacientes, 9 (69.23%) en el grupo de pacientes con EFI y 14 (36.84%) en el grupo control, esta diferencia no alcanzó niveles de significación estadística (p=0.0571).

Solo se realizó necropsia en 5 casos, siendo la tasa de necropsias de 21.73%.

Las características de los pacientes se describen en la tabla 9 (página 82). El LBA y la obtención de suero para estudio de GM y BG fue sincrónica (en el mismo día), y se realizó un promedio 9.16 días después del ingreso en UCI (rango de 1 a 66 días). Específicamente 50% de las muestras se obtuvieron entre los días 1 a 3 después del ingreso a UCI, y el 80% entre los días 1 a 10.

Seis pacientes en el grupo control presentaban neutropenia al momento de realizarles el LBA. Tres pacientes con EFI recibieron tratamiento con voriconazol 1, 3 y 7 días antes de la realización de la fibrobroncospia para el LBA.

Las características de los pacientes con EFI se muestran en la tabla 10 (página 83).

**Tabla 9:** Características de pacientes críticos con riesgo de Enfermedad Fúngica Invasora

Pacientes	Aspergilosis Invasora Probada (n=4)	Aspergilosis Invasora Probable <sup>a</sup> (n=6)	Neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i> Probada <sup>a</sup> (n=4)	No EFI (n=38)	TOTAL (n=51)
Edad Promedio, años (DE)	63.3 (±13.7)	65.6 (±8.0)	59.5 (±15.5)	55.5 (±15.66)	57.5 (±15,1)
Mujeres/Hombre	3/1	3/3	1/3	11/27	17/34
Nº muertes (%)	3 (75)	4 (66.6)	3 (75)	14 (36.8)	23 (45.1)
Promedio APACHE II/SAPS II	18.3/47.6	31.4/61.4	24.3/61	23.3/49.4	23.8/51.26
Ventilación mecánica, promedio de días	17	12	13	18.1	17
Estancia en UCI, promedio de días (rango)	12.25 (6-15)	11.6 (2-28)	10 (6-20)	18.5 (1-66)	16.8 (1-66)
Estancia hospitalaria, promedio de días (rango)	19.8 (15-28)	35 (7-76)	33.5 (8-56)	40.9 (4-136)	38.1 (4-136)
Fallo Renal Agudo con TPER	2	3	1	10	16
Corticoesteroides (%)	3 (75)	6 (100)	4 (100)	24 (63.2)	36 (70.6)
Neutropenia (%)	0	0	0	6 (15.8)	6 (11.8)
Patología Hematológica (%)	0	0	0	3 (7.9)	3 (5.9)
TCM autólogo	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0
Patología No-hematológica (%)	4	6	4		
EPOC	1	2	1	5	8
Trasplante Renal	1	0	0	3	4
VIH	1	1	3	4	8
Cirrosis	0	1	0	1	2
Enfermedades sistémicas	1	2	1	2	6
Cáncer de Órgano Sólido	1	1	1	5	8
Insuficiencia Renal Crónica	2	3	1	14	20
LBA/Cultivo de <i>Aspergillus</i> en Biopsia o Necropsia	4/4	3/0	0	0	7/4
Índice GM en LBA, promedio (rango)	12.4 (4.3-30)	6.9 (0.44-30.2)	0.20 (0.02-0.46)	0.21 (0.04-1.56)	1.96 (0.02-30.19)
Índice GM sérico, promedio (rango)	1.2 (0.19-2.17)	0.56 (0.13-1.15)	0.37 (0.08-0.9)	0.22 (0.06-1.1)	0.35 (0.05-2.17)
Índice BG sérico, promedio (rango)	1076.4 (84.3-2294.6)	990.94 (32-3071)	1023.2 (423-2229)	133.27 (1.4-2625)	336.8 (1.4-3071)

EFI= Enfermedad Fúngica Invasora; DE= Desviación Estándar; APACHE II= Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; SAPS II= Simplified Acute Physiology Score II; UCI= Unidad de Cuidados Intensivos; TPER= Técnicas de purificación extra-renal; TCM= Trasplante de Células Madre; EPOC= Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; VIH=Virus de inmunodeficiencia humana; LBA=Lavado Broncoalveolar; GM= galactomanano; BG= (1→3)-β-D-glucano; <sup>a</sup> Un paciente VIH presentaba neumonía probada por *P. jirovecii* y Aspergilosis Invasora Probable

**Tabla 10:** Características de pacientes con Enfermedad Fúngica Invasora probada y probable (n=13)

N°	Edad/ Sexo	SAPS II	Factores del Huésped	Órgano afectado	Síndrome Clínico / Diagnóstico de ingreso	EFI	TAC/ Lugar del asilamiento de la especie fúngica	LBA		SUERO		Tratamiento	Evolu- ción	DI UCI/ Hospi- tal
								Microscopía/ cultivo	GM	GM	BG (pg/mL)			
9	55/ F	57	Corticoides, Síndrome de Evans, Insuficiencia Renal Crónica	Pulmón	Insuficiencia Respiratoria Aguda, Insuficiencia hepática aguda	AI Probable	Nódulo pulmonar/ LBA	Negativa / <i>A. fumigatus</i>	30,2	1,2	385	Fluconazol	Falleció en UCI	3 / 13
38	76/ F	50	Corticoides, Lupus Eritematoso Sistémico	Pulmón	Pancreatitis Aguda, Insuficiencia Renal Aguda	AI Probada	Nódulo pulmonar / LBA, biopsia pulmonar	Positiva / <i>A. fumigatus</i>	4,27	2,2	478,7	Anfotericina Liposomal	Falleció en UCI	15 / 15
52	71/ F	56	Cáncer de órgano sólido, Insuficiencia Renal Crónica	Pulmón	Insuficiencia Respiratoria Aguda, Absceso Abdominal	AI Probada	Nódulo pulmonar, Infiltrado Alveolar Bilateral/ Necropsia	Positiva / <i>A. fumigatus</i>	30	2,1	1448	Caspofungina, Anfotericina Liposomal	Falleció en UCI	13 / 28
64	61/ F	45	Corticoides, Síndrome de Cushing	Pulmón	Insuficiencia Respiratoria Aguda	AI Probada	Nódulo pulmonar / LBA, biopsia pulmonar	Positiva / <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i>	8,8	0,2	84,3	Voriconazol, Caspofungina	Falleció en UCI	15 / 18
65	65/ M	57	Corticoides, Insuficiencia Renal Crónica	Pulmón	Insuficiencia Respiratoria Aguda, Shock Séptico	AI Probable	Nódulo pulmonar, Infiltrado Intersticial Bilateral / LBA	Negativo / <i>A. fumigatus</i>	2,5	0,3	32	Voriconazol <sup>a</sup>	Sobrevivió	11 / 45
69	76/ M	71	Corticoides, Insuficiencia Renal Crónica	Pulmón	Rabdomiolisis, Insuficiencia Renal Aguda, Insuficiencia Respiratoria Aguda	AI Probable	Nódulo pulmonar / LBA	Negativo / <i>A. fumigatus</i>	1,2	0,7	178,5	Voriconazol <sup>a</sup> Caspofungina	Falleció en UCI	28 / 33

Nº	Edad/ Sexo	SAPS II	Factores del Huésped	Órgano afectado	Síndrome Clínico / Diagnóstico de ingreso	EFI	TAC/ Lugar del asilamiento de la especie fúngica	LBA		SUERO		Tratamiento	Evolu- ción	DI UCI/ Hospita- l
								Microscopía/ cultivo	GM	GM	BG (pg/mL)			
79	60/ F	68	Infección avanzada por VIH, Insufi- ciencia Hepá- tica Aguda sobre proceso crónico, Corti- coides, EPOC	Pulmón, lesiones focales en SNC	Insuficiencia Respiratoria Aguda	AI Probable / NPJ Probada	Nódulo pulmonar con signo del halo e Infiltrado Intersticial Bilateral, lesiones focales en SNC / LBA	<i>P. jirovecii</i> / <i>A.</i> <i>fumigatus</i>	0,5	0,4	2229,1	Fluconazol, Voriconazol <sup>a</sup> , Trimetoprim – sulfametoxazol	Falleció en UCI	6 / 34
91	64/ M	51	Corticoides, Cáncer de órgano sólido, EPOC	Traqueo- bronquitis	Politrauma- tismo	AI Probable	Traqueobron- quitis <sup>b</sup> , Nódulo pulmonar / LBA	Negativa / <i>A. fumigatus</i>	0,4	0,1	50,1	Voriconazol	Sobre- vivió	20 / 47
95	78/ M	60	Corticoides, Insuficiencia Renal Crónica, Cáncer de órgano sólido	Pulmón	Insuficiencia Respiratoria Aguda, Shock Séptico	NPJ Probada	Infiltrado Intersticial Bilateral / LBA	<i>P. jirovecii</i> / Negativa	0,02	0,9	734,3	Fluconazol, Trimetoprim – sulfametoxazol	Falleció en UCI	7 / 8
98	60/ M	55	Infección avanzada por VIH, Insuficiencia Renal Crónica	Pulmón	Diarrea, Insuficiencia Respiratoria Aguda, Insuficiencia Renal Aguda	NPJ Probada	Infiltrado Intersticial Bilateral / LBA	<i>P. jirovecii</i> / Negativa	0,2	0,1	423	Trimetoprim – sulfametoxazol, Anidulafungina, Anfotericina Liposomal	Falleció en UCI	20 / 36
113	74/ F	54	Corticoides, Cirrosis	Pulmón	Shock Séptico, Insuficiencia Respiratoria Aguda	AI Probable	Nódulo pulmonar, Infiltrado Alveolar / LBA	Positiva / <i>A. fumigatus</i>	7	0,7	3071	Voriconazol	Falleció en UCI	2 / 7

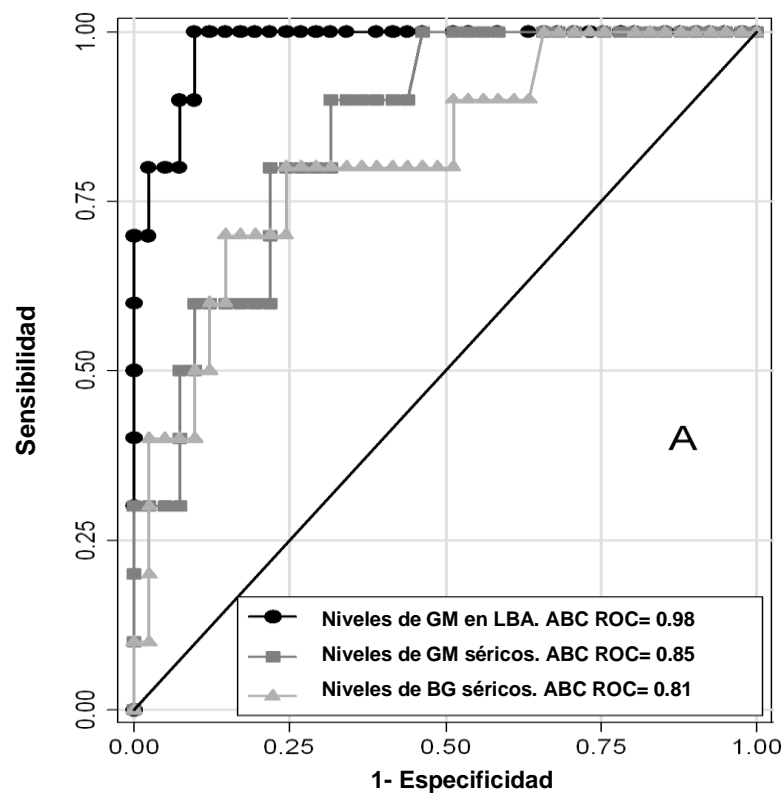
N°	Edad/ Sexo	SAPS II	Factores del Huésped	Órgano afectado	Síndrome Clínico / Diagnóstico de ingreso	EFI	TAC/ Lugar del asilamiento de la especie fúngica	LBA		SUERO		Tratamiento	Evolu- ción	DI UCI/ Hospita- l
								Microscopía/ cultivo	GM	GM	BG (pg/mL)			
120	45/ M	48	VIH, Trasplante Renal, Corticoides	Pulmón	Insuficiencia Respiratoria Aguda	AI Probada	Nódulo pulmonar, Infiltrado Alveolar / LBA, biopsia pulmonar	Positiva / <i>A. fumigatus</i>	6,4	0,3	2294,6	Caspofungina	Sobre- vivió	67/ 79
140	40/ M	52	Infección avanzada por VIH, Corticoides	Pulmón	Insuficiencia Respiratoria Aguda	NPJ Probada	Infiltrado Intersticial Bilateral / LBA	<i>P. jirovecii</i> / Negativa	0,1	0,1	708	Trimetoprim – sulfametoxazol, Anidulafungina	Sobre- vivió	7 / 56

SAPS II= Simplified Acute Physiology Score II; EFI= Enfermedad Fúngica Invasora; TAC= Tomografía Axial Computarizada; LBA Lavado Broncoalveolar; GM= galactomanano; BG= (1,3)- $\beta$ -D-glucano; DI= Días de ingreso; UCI= Unidad de Cuidados Intensivos; AI= Aspergilosis Invasora; VIH=Virus de Inmunodeficiencia Humana; EPOC= Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; SNC= Sistema Nervioso Central; NPJ= Neumonía por *Pneumocystis jirovecii*; <sup>a</sup>Profilaxis previa con Voriconazol, <sup>b</sup>Visualizado por fibrobroncoscopia

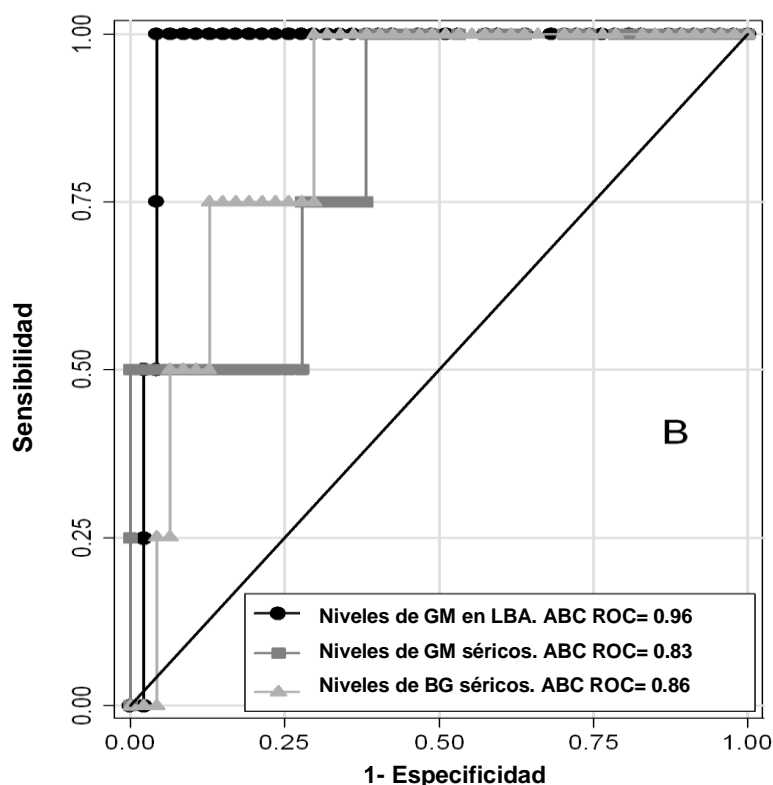
#### 4.2.2. Niveles de galactomanano en líquido de Lavado Broncoalveolar

El rendimiento diagnóstico dado por el ABC en todos los casos de AI (probadas y probables) fue de 0.981 (IC 95%: 0.94-1.0) y el rendimiento diagnóstico en los casos de AI Probada fue de 0.968 (IC 95%: 0.92-1.0), tal como se muestra en las figuras 10 y 11 (páginas 86 y87).

**Figura 10:** Área bajo la curva ROC de galactomanano en LBA, galactomanano en suero y (1→3)-β-D-glucano en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora (probadas y probables)



**Figura 11:** Área bajo la curva ROC de galactomanano en LBA, galactomanano en suero y (1→3)-β-D-glucano en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora Probada



Las características clínicas y microbiológicas (incluyendo la media de los valores de GM en suero y en LBA) de los pacientes con Aspergilosis probada y probable, se muestran en la tabla 9 (página 82).

La mediana de GM en LBA de los pacientes con AI probada fue de 7.596 (RQ: 5.895-14.068) y en los pacientes con AI probable 1.824 (RQ: 0.641-5.906). En el grupo control (en el cual incluimos para este análisis los tres pacientes con neumonía por *P. jirovecii*) fue 0.13 (RQ: 0.095-0.16; media: 0.232; rango: 0.058-1.103). El valor promedio de GM para los 6 pacientes neutropénicos, pertenecientes al grupo control, fue similar al promedio de GM de los 35 pacientes control, 0.146 (DE: 0.08, RQ: 0.11-0.15) y 0.231 (DE: 0.06, RQ: 0.09-0.17), respectivamente (p=0.377).

La tabla 11 (página 89) muestra el rendimiento diagnóstico de GM en líquido de LBA en el diagnóstico de AI probada, y en todos los casos de AI (probada y probable), con el uso de diferentes valores de GM como punto de corte. El mejor rendimiento diagnóstico, tanto para AI probada, como para AI global (probada y probable), se obtuvo utilizando un punto de corte de GM de  $\geq 1$ . Dos pacientes con AI probable (20%), presentaban niveles de GM  $< 1$ . En la tabla 10 (página 83) se muestran las características de estos pacientes (n° 79 y 91). Uno de estos pacientes había recibido tratamiento con voriconazol desde 3 días antes de la realización de la fibrobroncoscopia diagnóstica.

Un paciente en el grupo control presento un valor de GM de 1.516, aunque no pudimos determinar el motivo de este caso falso positivo, luego de una valoración clínica y de la evolución posterior.

**Tabla 11:** Rendimiento diagnóstico de galactomanano en líquido de lavado broncoalveolar y galactomanano sérico

Punto de corte	Sensibilidad % (IC 95%)	Especificidad % (IC 95%)	VPP % (IC 95%)	VPN % (IC 95%)	CPP (IC 95%)	CPN (IC 95%)	Eficiencia (%)
<b>GM LBA</b>							
<b>AI Probada</b>							
≥ 0.5	100 (87.5-100.0)	85.11 (73.86-96.35)	36.36 (3.39-69.34)	100 (98.75-100.0)	6.71 (3.39-13.30)	-	86.27
≥ 1	100 (87.5-100.0)	89.36 (79.48-99.24)	44.44 (6.42-82.46)	100 (98.81-100.0)	9.40 (4.10-21.53)	-	90.20
≥ 4	100 (87.5-100.0)	95.74 (88.91-100.0)	66.67 (20.61-100)	100 (98.89-100.0)	23.50 (6.05-91.21)	-	96.08
≥ 8	50.0 (0.0-100.0)	97.87 (92.68-100.0)	66.67 (0.0-100.0)	95.83 (89.14-100)	23.5 (2.68-206.36)	0.51 (0.19-1.36)	92.16
<b>AI Probada y AI Probable</b>							
≥ 0.5	80.0 (50.2-100)	92.68 (83.40-100.0)	72.7 (41.80-100.0)	95.00 (87.0-100.0)	10.93 (3.5-33.90)	0.21 (0.06-0.70)	90.2
≥ 1	80.0 (50.2-100)	97.56 (91.60-100.0)	88.8 (62.80-100.0)	95.20 (87.6-100.0)	32.80 (4.6-232.9)	0.20 (0.06-0.70)	94.1
≥ 1.5	70.0 (36.6-100)	97.56 (91.60-100.0)	87.5 (58.30-100.0)	93.00 (84.2-100.0)	28.70 (3.9-207.4)	0.30 (0.10-0.70)	92.1
≥ 2	70.0 (36.6-100)	100.0 (98.70-100.0)	100 (92.80-100.0)	93.10 (84.6-100.0)	-	0.30 (0.10-0.70)	94.1
<b>GM en suero</b>							
<b>AI Probada</b>							
≥ 0.2	75.0 (20.06-100)	61.70 (46.74-76.66)	14.29 (0.0-31.63)	96.67 (88.58-100)	1.96 (1.00-3.84)	0.41 (0.07-2.25)	62.75
≥ 0.4	50.0 (0.0-100.0)	82.98 (71.17-94.79)	20.00 (0.0-49.79)	95.12 (87.31-100)	2.94 (0.92-9.42)	0.60 (0.22-1.62)	80.39
≥ 0.5	50.0 (0.0-100.0)	85.11 (73.86-96.35)	22.22 (0.0-54.94)	95.24 (87.61-100)	3.36 (1.02-11.09)	0.59 (0.22-1.58)	82.35
≥ 1	50.0 (0.0-100.0)	95.74 (88.91-100.0)	50.0 (0.0-100.0)	95.74 (88.91-100)	11.75 (2.20-62.62)	0.52 (0.20-1.39)	92.16
≥ 2	50.0 (0.0-100.0)	100.0 (98.94-100.0)	100.0 (75.0-100)	95.92 (89.36-100)	--	0.50 (0.19-1.33)	96.08
<b>AI Probada y AI Probable</b>							
≥ 0.3	60.0 (24.6-95.3)	80.49 (67.1-93.80)	42.8 (13.3-72.3)	89.1 (77.8-100)	3.08 (1.3-6.80)	0.50 (0.2-1.0)	76.4
≥ 0.4	60.0 (24.6-95.3)	90.24 (79.9-100.0)	60.0 (24.6-95.3)	90.2 (79.9-100)	6.15 (2.1-17.70)	0.44 (0.2-0.9)	84.3
≥ 0.5	50.0 (14.0-85.9)	90.24 (79.9-100.0)	55.5 (17.5-93.5)	88.1 (77.1-99.0)	5.13 (1.6-15.60)	0.55 (0.3-1.0)	82.3
≥ 0.7	40.0 (4.6-75.30)	92.68 (83.4-100.0)	57.1 (13.3-100.0)	86.3 (75.0-97.6)	5.47 (1.4-20.60)	0.65 (0.3-1.1)	82.3
≥ 1	30.0 (0.0-63.40)	97.56 (91.6-100.0)	75.0 (20.0-100.0)	85.1 (73.8-96.3)	12.3 (1.4-106.1)	0.70 (0.4-1.1)	84.3

IC= Intervalo de Confianza; VPP= Valor predictivo positivo; VPN= Valor predictivo negativo; CPP= Cociente de probabilidad positiva; CPN= Cociente de probabilidad negativa; GM= galactomanano; LBA= lavado broncoalveolar; AI= Aspergilosis Invasora

### 4.2.3. Niveles de galactomanano sérico

El rendimiento diagnóstico de GM en suero determinado por el ABC en todos los pacientes con AI (probable y probada) fue de 0.854 (IC 95%: 0.74-0.96) y en el caso de los pacientes con AI probada el ABC fue 0.835 (IC 95%: 0.65-1.00), tal como se muestra en las figuras 10 y 11 (páginas 86 y 87).

La mediana de los niveles de GM en suero en el grupo de pacientes con AI probada fue 1.187 (RQ: 0.261- 2.114) y en el grupo de AI probable fue 0.537 (RQ: 0.309-0.717). La mediana de los niveles de GM en el grupo control (en el cual incluimos para este análisis los 3 pacientes con Neumonía por *P. jirovecii*) fue 0.13 (RQ: 0.11-0.26). El promedio de niveles de GM en suero para los seis pacientes-control con neutropenia no fue diferente del valor promedio de los 35 pacientes-control no neutropénicos: 0.32 (DE, 0.39; RQ, 0.12-0.27) y 0.203 (DE, 0.21; RQ, 0.10-0.26), respectivamente (p=0.484).

La tabla 11 (página 89) muestra el rendimiento diagnóstico de GM en suero en el diagnóstico de AI probada, y de AI (probada y probable) con el uso de diferentes puntos de corte de GM. En nuestra población el mejor rendimiento diagnóstico de GM en suero en el diagnóstico de AI (probada y probable) se obtuvo utilizando un punto de corte de  $\geq 4.0$ , un valor similar al recomendado por los fabricantes de la prueba comercial. En el caso de AI probada el mejor rendimiento diagnóstico se obtuvo con un punto de corte de  $\geq 0.2$ : con este punto la eficiencia era de 62.75%, y se mantuvo un alto VPN (96.67%), con una sensibilidad de 75%.

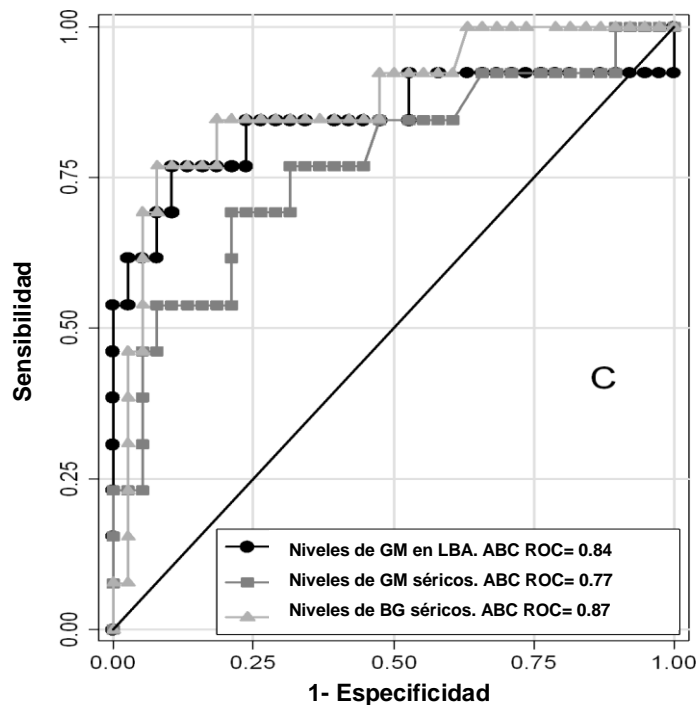
Cuatro pacientes con AI presentaron valores de GM  $< 0.4$ . Se muestran las características de los mismos en la tabla 10 (nº 64, 65, 91 y 120, página 83). Uno de estos pacientes había sido tratado previamente con voriconazol (nº 65) y el otro paciente presentaba traqueobronquitis (nº 91). Sin embargo, en tres de estos cuatro pacientes los niveles de GM en líquido LBA fueron positivos (dos pacientes con AI probada y uno con AI probable).

Tres pacientes en el grupo control presentaron valores de GM  $\geq 0.4$ : dos de ellos presentaban bacteriemia por *Acinetobacter baumannii* y por *Enterococcus faecalis* cuando se obtuvieron las muestras de suero y líquido de LBA. El tercer paciente presentaba neumonía por *P. jirovecii* e insuficiencia renal crónica.

#### 4.2.4. Niveles de (1→3)- $\beta$ -D-glucano sérico

El rendimiento diagnóstico de BG en suero determinado por el ABC fue 0.815 (IC 95%: 0.67-0.96) en el diagnóstico de AI (probada y probable) y 0.867 (IC 95%: 0.74-0.99) en el diagnóstico de AI probada, tal como se puede observar en las figuras 10 y 11 (páginas 86 y 87). En el diagnóstico de EFI en general (pacientes con AI y/o neumonía por *P. jirovecii*) el ABC fue 0.873 (IC 95%: 0.76-0.99) tal como se muestra en la figura 12 (página 91).

**Figura 12:** Área bajo la curva ROC de galactomanano en LBA, galactomanano en suero y (1→3)- $\beta$ -D-glucano en el diagnóstico de Enfermedad Fúngica Invasora (Aspergilosis Invasora probada y probable y de neumonía por *P. jirovecii*)



En la tabla 9 (página 82) se muestran los valores de media y rango de BG tanto de los casos con EFI, como de los controles. La mediana de BG entre los pacientes del grupo con AI probada fue: 963.36 pg/mL (RQ: 380.13-1659.65 pg/mL), en el caso de AI probable fue: 281.75 pg/mL (RQ: 82.19-1768.08 pg/mL), y para los pacientes con Neumonía por *P. jirovecii* fue 721.15 pg/mL (RQ: 636.75-1108.0 pg/mL). La mediana de niveles de BG de todos los pacientes con EFI (AI y neumonía por *P. jirovecii*) fue 478.72 pg/mL (RQ, 178.5-1448.0 pg/mL; media: 932.05 pg/mL; rango: 32.0-3071.0 pg/mL). El promedio de niveles de BG de los seis pacientes del grupo control neutropénicos no fue diferente del promedio de los 32 pacientes del grupo control no neutropénicos: 64.31 pg/mL (DE, 56.53; RQ, 33.72-61.6 pg/mL) y 146.2 (DE, 462.15; RQ, 22.0-79.0 pg/mL), respectivamente (p=0.378).

La tabla 12 (página 93) muestra el rendimiento diagnóstico de BG en suero en el diagnóstico de AI y todos los casos de EFI, utilizando diferentes puntos de corte de BG. El mejor rendimiento diagnóstico de BG en el diagnóstico de todas las EFI y AI (probada y probable) se obtuvo utilizando un punto de corte de  $\geq 80$  pg/mL. Dos pacientes presentaron valores de BG  $< 80$  pg/mL, uno de ellos había sido tratado con voriconazol previo al diagnóstico (nº 65 y 91, tabla 10, página 83). Ocho pacientes en el grupo control presentaron valores de BG  $\geq 80$  pg/mL, tres de ellos habían presentado de forma simultánea (sincrónica) al proceso respiratorio, bacteriemia por *Staphylococcus epidermidis*, y uno de ellos por *Enterococcus faecalis*. Un quinto paciente de este grupo tenía peritonitis fecal y por tanto fue sometido a cirugía la semana previa a la toma de muestras para marcadores. No se pudo identificar otras posibles causas de falsa reactividad de BG en los otros tres pacientes.

**Tabla 12:** Rendimiento diagnóstico de (1→3)-β-D-glucano sérico

Punto de corte	Sensibilidad % (IC 95%)	Especificidad % (IC 95%)	VPP % (IC 95%)	VPN % (IC 95%)	CPP (IC 95%)	CPN (IC 95%)	Eficiencia (%)
<b>AI Probada</b>							
≥ 70	100 (87.50-100.0)	65.96 (51.35-80.57)	20.0 (0.00-40.03)	100.0 (98.33-100.0)	2.94 (1.97- 4.37)	-	68.63
≥ 80	100 (87.50-100.0)	70.21 (56.07-84.35)	22.22 (0.24-44.21)	100.0 (98.48-100.0)	3.36 (2.16-5.21)	.	72.55
≥ 120	75.0 (20.06-100.0)	72.34 (58.49-86.19)	18.75 (0.00-41.00)	97.14 (90.19-100.0)	2.71 (1.31-5.63)	0.35 (0.06-1.90)	72.55
≥ 150	75.0 (20.06-100.0)	74.47 (60.94-88.00)	20.00 (0.00-43.58)	97.22 (90.47-100.0)	2.94 (1.39-6.20)	0.34 (0.06-1.85)	74.51
≥ 450	75.0 (20.06-100.0)	87.23 (76.63-97.84)	33.33 (0.00-69.69)	97.62 (91.82-100.0)	5.88 (2.30-15.0)	0.29 (0.05-1.57)	86.27
<b>AI Probada + Neumonía por <i>P. jirovecii</i> Probada</b>							
≥ 70	100 (93.75-100.0)	72.09 (57.52-86.66)	40.00 (16.03-63.97)	100.0 (98.39-100.0)	3.58 (2.22-5.79)	-	76.47
≥ 80	100 (93.75-100.0)	76.74 (62.95-90.53)	44.44 (18.71-70.18)	100.0 (98.48-100.0)	4.30 (2.50-7.40)	-	80.39
≥ 120	87.5 (58.33-100.0)	79.07 (65.75-92.39)	43.75 (16.32-71.18)	97.14 (90.19-100.0)	4.18 (2.21-7.91)	0.16 (0.03-1.00)	80.39
≥ 400	87.5 (58.33-100.0)	93.02 (84.25-100.0)	70.00 (36.60-100.0)	97.56 (91.62-100.0)	12.54 (4.08-38.53)	0.13 (0.02-0.84)	92.16
<b>AI Probada y AI Probable</b>							
≥ 50	90.0 (66.41-100.0)	48.78 (32.26-65.30)	30.00 (11.93-48.07)	95.24 (83.75-100.0)	1.76 (1.22-2.53)	0.21 (0.03-1.35)	56.86
≥ 60	80.0 (50.21-100.0)	60.98 (44.82-77.13)	33.33 (12.39-54.28)	92.59 (80.86-100.0)	2.05 (1.25-3.35)	0.33 (0.09-1.16)	64.71
≥ 80	80.0 (50.21-100.0)	75.61 (61.25-89.97)	44.44 (18.71-70.18)	93.94 (84.28-100.0)	3.28 (1.76-6.11)	0.26 (0.08-0.92)	76.47
≥ 175	70.0 (36.60-100.0)	85.37 (73.33-97.40)	53.85 (22.90-84.79)	92.11 (82.22-100.0)	4.78 (2.06-11.12)	0.35 (0.14-0.91)	82.35
≥ 385	60.0 (24.64-95.36)	87.80 (76.57-99.04)	54.55 (20.57-88.52)	90.00 (79.45-100.0)	4.92 (1.87-12.91)	0.46 (0.21-0.98)	82.35
<b>EFI: AI Probada + AI Probable + Neumonía por <i>P. jirovecii</i> Probada</b>							
≥ 60	84.62 (61.16-100)	65.79 (49.39-82.19)	45.83 (23.82-67.85)	92.59 (80.86-100.0)	2.47 (1.50-4.07)	0.23 (0.06-0.85)	70.59
≥ 80	84.62 (61.16-100)	81.58 (67.94-95.22)	61.11 (35.81-86.41)	93.94 (84.28-100.0)	4.59 (2.26-0.33)	0.19 (0.05-0.68)	82.35
≥ 120	76.92 (50.17-100)	84.21 (71.30-97.12)	62.50 (35.65-89.35)	91.43 (80.73-100.0)	4.87 (2.21-10.76)	0.27 (0.10-0.75)	82.35
≥ 170	76.92 (50.17-100)	89.47 (78.40-100.0)	71.43 (44.19-98.66)	91.89 (81.75-100.0)	7.31 (2.76-19.35)	0.26 (0.10-0.70)	86.27

IC= Intervalo de Confianza; VPP= Valor predictivo positivo; VPN= Valor predictivo negativo; CPP= Cociente de probabilidad positiva; CPN= Cociente de probabilidad negativa; AI= Aspergilosis Invasora; EFI: Enfermedad Fúngica Invasora

#### 4.2.5. Cultivo y microscopía de líquido de Lavado Broncoalveolar

Todas las muestras de líquido de LBA, correspondientes a 13 pacientes con AI y 38 pacientes del grupo control, fueron procesadas para cultivo y microscopia. En 10 (100%), de las muestras de los casos con AI, el cultivo fue positivo para *Aspergillus* spp. (*A. fumigatus* [n=9], y *A. fumigatus* y *A. niger* [n=1]). Ninguno de los cultivos de las muestras de los controles fue positivo.

Los resultados positivos de GM (90%) y BG (80%) en suero en los pacientes con AI, antecedieron un promedio de 4.3 días (rango 1-10 días) al cultivo de *Aspergillus* spp.

Cinco (50%) muestras de líquido de LBA de los pacientes con IA, presentaron un examen positivo en el examen directo microscópico (se observó hifas septadas). Los cuatro pacientes con neumonía por *P. jirovecii* presentaron la prueba de fluorescencia con anticuerpos monoclonales positiva.

#### 4.2.6. Análisis de la combinación de niveles séricos de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano

Dos pacientes con AI probada con niveles de GM  $\leq 0.4$  (n° 64 y 120, tabla 10, página 83) presentaron valores positivos de BG en muestras de suero. Esto determinó que en el análisis del rendimiento diagnóstico de GM en suero combinado con BG en el diagnóstico de AI (probada y probable), el ABC fuera superior al ABC de GM en suero, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0.8751$ ).

Los valores del ABC (0.861; IC 95%: 0.72-0.99), especificidad (95,12%; IC 95%: 87.31-100), VPP (75.0%; IC 95%: 38.74-100.0), CPP (12.3; IC 95%: 2.9-52.1) y eficiencia 88.24%, de la combinación de GM y BG en suero, fueron superiores a los de GM en suero.

Los valores de sensibilidad, VPN y CPN de la combinación de GM y BG en suero fueron: 60% (IC 95%: 24.64-95.36), 90.70% (IC 95%: 80.85-100) y 0.42 (IC 95%: 0.20-0.90), respectivamente.

#### **4.2.7. Comparación de los niveles de galactomanano en LBA con los niveles de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora**

Se comparó el rendimiento diagnóstico, determinado por el ABC, de GM en LBA comparado con GM en suero y BG en suero para el diagnóstico de AI (probadas y probables). En ambos casos el ABC de GM en LBA fue significativamente mayor ( $p=0.0258$  y  $p=0.0322$ , respectivamente) (figuras 10 y 11, páginas 86 y 87). Se comparó además el rendimiento diagnóstico, determinado por el ABC, de GM en LBA con la combinación de GM y BG en suero para el diagnóstico de AI, siendo la detección de GM en LBA superior a la combinación de ambas pruebas en suero, aunque la diferencia no fue significativa ( $p=0.765$ ).

Se realizó el mismo análisis para el diagnóstico de AI probada, sin embargo en este caso no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el ABC de GM en LBA y GM en suero ( $p=0.203$ ) ni entre el ABC de GM en LBA y BG en suero ( $p=0.159$ ).

Para concluir queremos resaltar que en el diagnóstico de AI la detección de GM en LBA es significativamente superior a la detección de marcadores (GM y BG) en suero. Aunque en algunos enfermos críticos no se puede realizar el LBA por la extremada gravedad de los pacientes.

## **5. DISCUSIÓN**

En este trabajo se presentan dos estudios prospectivo-observacionales en pacientes críticos no-neutropénicos, que evalúan el rendimiento diagnóstico de los marcadores fúngicos (GM en suero, GM en LBA y BG en suero) en el diagnóstico de EFI en un medio clínico real. Los estudios se llevaron a cabo en una cohorte de pacientes críticos de UCI, de un único hospital de nivel terciario, con alto riesgo de adquisición de EFI y con un síndrome clínico compatible con esta patología. Ambos se desarrollaron sin un protocolo preestablecido que guiara la toma de decisiones clínicas, ni la solicitud de las pruebas que estudiamos. Todas las peticiones se realizaron de acuerdo al criterio clínico de los intensivistas.

En las últimas décadas se ha observado un incremento en las infecciones por EFI en los pacientes críticos de UCI, especialmente asociado a un incremento de infecciones por hongos miceliales, siendo *Aspergillus* spp. la especie más prevalente.<sup>8,137</sup> Es de destacar, sin embargo, que las infecciones debidas a *Candida* spp. siguen siendo las infecciones fúngicas predominantes.<sup>137</sup> En un reciente estudio multicéntrico llevado a cabo en 38 UCIs de Italia, la tasa de API era 6.31 por 1000 ingresos, mientras que la tasa de candidemia fue de 10.08 por 1000 ingresos.<sup>138</sup>

En nuestros dos estudios existe una marcada diferencia en la tasa de mortalidad entre los grupos de pacientes con EFI respecto a los grupos control, en la población nº1, 82.6% y 44%, respectivamente ( $p=0.0012$ ) y en la población nº 2, 69.2% y 36.8%, respectivamente ( $p=0.0571$ ). Estos datos, avalados por estudios previos donde se describe la alta mortalidad atribuible a EFI en pacientes críticos no neutropénicos, subrayan la necesidad de mejorar el diagnóstico de esta patología.<sup>3,4,53,139</sup>

En este sentido, en los últimos años han cobrado importancia en la práctica clínica, los métodos diagnósticos basados en la detección de marcadores fúngicos circulantes, debido a que las herramientas diagnósticas tradicionales presentan bajo rendimiento diagnóstico.<sup>8,18</sup> Estas nuevas técnicas diagnósticas, son procedimientos no-invasores, independientes del cultivo, que

permitirían un diagnóstico precoz de EFI en los pacientes críticos, y por tanto incrementaría la tasa de supervivencia de estos pacientes al instaurar un tratamiento adelantado.<sup>140</sup>

La detección de GM en suero ha mejorado el diagnóstico de AI en pacientes adultos neutropénicos y receptores de trasplante autólogo de células madre.<sup>77,96,97,99</sup> Recientemente, la pruebas de detección de marcadores fúngicos (GM y BG), han sido incluidas como criterios microbiológico para el diagnóstico de EFI probable en las definiciones de la EORTC/MSG.<sup>71</sup> Estas definiciones, sin embargo, no incluyen a pacientes de UCI, salvo aquellos con EFI probada.<sup>8,71</sup> Esto se debe a que actualmente, a pesar del aumento de incidencia de EFI y las dificultades diagnósticas que presentan las herramientas tradicionales, hay publicados escasos trabajos sobre el rendimiento diagnóstico de estas nuevas técnicas diagnósticas en los pacientes críticos de UCI.<sup>3,4,21,102,105,127,128,141-143</sup>

Nuestros dos estudios presentan limitaciones importantes. Primero, los estudios se realizaron, como se mencionó previamente, sin un protocolo de actuación, por tanto los intensivistas solicitaron las pruebas diagnósticas (marcadores) de acuerdo a su criterio clínico. Debido a esto el tiempo desde el ingreso en la UCI hasta la fecha de ingreso en el estudio y el tiempo entre el inicio de los síntomas hasta la toma de las muestras fue variable. Una segunda limitación es el escaso número de pacientes incluidos en los estudios, 98 pacientes en la población n°1 y de 51 pacientes en la población n°2.

Asimismo, la tercera limitación es la baja tasa de necropsias, 17.3% en la población n°1 y 21.8% en la población n°2. En la población n°1 se tomaron biopsias profundas diagnósticas en 29 pacientes (29.6%).

La tasa de necropsias realizadas a disminuido en todo el mundo en las últimas décadas, hasta tasas menores al 20% en muchos centros.<sup>10,13,144</sup> Este descenso en la tasa de necropsias también se observa en los servicios de medicina intensiva, a pesar de que diversos estudios han demostrado la importancia de las necropsias en este tipo de pacientes para un diagnóstico

certero<sup>11,13,15,16,18,19</sup> (tabla 13, página 99). En los pacientes críticos, en los cuales las técnicas diagnósticas invasoras son difíciles de realizar y la exposición a tratamiento inmunosupresor es cada vez más frecuente, los estudios necrópsicos permiten establecer un diagnóstico certero, y además permiten evaluar el rendimiento de nuevas herramientas diagnósticas.<sup>10,13,18,145,146</sup>

**Tabla 13:** Estudios necrópsicos de Enfermedad Fúngica Invasora

Nº Referencia	Autores	Tipo de población	Necropsias (%)	Pacientes (n)	Pacientes críticos (%)	Duración de estudio	Incidencia de AI (%)	Incidencia de CI (%)	Incidencia de AI+ CI/EFI (%)	Observaciones
16	Groll A.H., y cols.	Hospitalaria heterogénea	-	8124	-	1978-2002	-	-	-/3.4	Incremento de AI
147	Sarode V. R., y cols.	Hospitalaria heterogénea	23-27%	1000	-	1983-1988	-	-	-	89 % de EFI no se diagnosticaron premortem
15	Lehrnbecher, T. y cols.	Hospitalaria heterogénea	29%	2707	-	1993-2005	-	-	-/8.1	Incremento de CI
11	Schwesinger, G. y cols.	Hospitalaria heterogénea	-	2027	-	1994-2003	1.3	6.6	8.1/-	
18	Roosen J., y cols.	Pacientes críticos	93%	100	100%	1996	-	-	-/16	5 de los 16 casos no se diagnosticaron premortem
13	Dimopoulos G., y cols.	Pacientes críticos	45.4 %	222	100%	1999	-	-	-/4	7 de los 9 casos no se diagnosticaron premortem
148	Magret Iglesias m., y cols.	Pacientes críticos	16.3 %	80	100%	46 meses	2.5	-	-	Los 2 casos no se diagnosticaron premortem
149	Tejerina E., y cols	Pacientes críticos	30.3 %	866	100%	1982-2007	0.9	-	-	Los 8 casos no se diagnosticaron premortem

AI= Aspergilosis Invasora; CI= Candidiasis Invasora; EFI= Enfermedad Fúngica Invasora

-: No datos

Se ha descrito que hasta un 30% de las enfermedades infecciosas son detectadas post-mortem<sup>150</sup>, y en el caso de EFI la tasa aumenta hasta el 75% -89%<sup>144,147</sup> (tabla 13, página). En el caso de los pacientes de UCI, varios estudios han demostrado que las infecciones y específicamente las infecciones fúngicas, son los diagnósticos más frecuentemente obviados o discrepantes (4-5% de todas las necropsias realizadas).<sup>13,18</sup> Roosen y cols.<sup>18</sup>, realizaron un estudio en una UCI médica con una tasa de necropsias de 93%, y determinaron que en el 30% de los pacientes con EFI no se considero este diagnóstico pre-mortem<sup>18</sup> (tabla 13, página 99).

La baja tasa de necropsias, se ha visto reflejada en diversos estudios que evalúan el rendimiento diagnóstico de las nuevas técnicas microbiológicas, GM y BG. Una revisión de la literatura, que incluye 40 estudios relevantes publicados en los últimos 11 años sobre la utilidad diagnóstica de GM y BG, revela que solo en 11 estudios, los autores reportaron la tasa de necropsias (tabla14, página 101):

**Tabla 14:** 40 estudios relevantes en los últimos 11 años que estudian el rendimiento diagnóstico de galactomanano y (1→3)-β-D-glucano

Nº	Autores	Tipo de Estudio	Nº de pacientes	Población Estudiada	Herramienta Diagnóstica	EFI probada (n)	EFI probable (n)	EFI probada y probable mixtas (n)	Tasa de Necropsias (Nº de pacientes fallecidos)
96	Maertens, J. y cols.	Prospectivo	186	Pacientes hematológicos	GM en suero	27	6	-	100% (77)
151	Siemann, M. y cols.	Prospectivo	39	Pacientes ingresados con signos clínicos de AI	GM en suero	5	7	-	No se muestran datos
152	Williamson, E.C., y cols.	Retrospectivo	104	Pacientes hematológicos	GM en suero	7	9	-	No se muestran datos
153	Salonen, J. y cols.	Prospectivo	105	Pacientes hematológicos	GM en suero	6	7	-	No se muestran datos
97	Maertens, J. y cols.	Prospectivo	191/362*	Pacientes hematológicos	GM en suero	30*	9*	-	92.6% (82)
154	Chan, C.M. y cols.	Retrospectivo	143	Pacientes ingresados	GM en suero	24	-	-	No se muestran datos
98	Maertens, J. y cols.	Prospectivo	100	Pacientes hematológicos	GM en suero	5	8	-	95% (59)
114	Becker, M. J. y cols.	Prospectivo	160	Pacientes hematológicos	<b>GM en LBA</b>	2	11	-	No se muestran datos
155	Pinel, C. y cols.	Prospectivo	807	Pacientes hematológicos	GM en suero	3	31	-	
105	Digby, J. y cols.	Prospectivo	No se muestran datos	<b>Pacientes Críticos</b>	BG en suero	-	-	-	No se muestran datos
124	Odabasi, Z. y cols.	Prospectivo	283	Pacientes hematológicos	BG en suero	16	4	-	No se muestran datos
156	Kawazu, M. y cols.	Prospectivo	96/149*	Pacientes hematológicos	GM y BG en suero	9*	2*	-	No se muestran datos
157	Husain, S. y cols.	Prospectivo	70	Receptores de Trasplante de pulmón	GM en suero	9	3	-	100% (10)
158	Maertens, J. y cols.	Prospectivo	104/124*	Pacientes hematológicos	GM en suero	16*	13*	-	No se muestran datos

Nº	Autores	Tipo de Estudio	Nº de pacientes	Población Estudiada	Herramienta Diagnóstica	EFI probada (n)	EFI probable (n)	EFI probada y probable mixtas (n)	Tasa de Necropsias (Nº de pacientes fallecidos)
99	Maertens, J. y cols.	Prospectivo	88	Pacientes hematológicos	GM en suero	7*	12*	-	100% (16)
102	Ostrosky-Zeichner, L. y cols.	Prospectivo	333	Pacientes ingresados	BG en suero	-	-	163	No se muestran datos
159	Weisser, M. y cols.	Prospectivo	107	Pacientes hematológicos	GM en suero	-	-	20	34.37% (32)
94	Pazos, C. y cols.	Prospectivo	40	Pacientes hematológicos	GM y BG en suero	5	3	-	No se muestran datos
129	Pickering, J.W. y cols.	Retrospectivo	156	Pacientes ingresados	<b>GM en LBA</b>	-	-	-	No se muestran datos
160	Mar, K.A. y cols.	Retrospectivo	315	Pacientes hematológicos	GM en suero	20	26	-	No se muestran datos
74	Cornillet, A. y cols.	Retrospectivo	88	Pacientes con AI: Neutropénicos vs. No-neutropénicos	GM en suero	12	52	-	No se muestran datos
161	Upton, A. y cols.	Prospectivo	405	Pacientes hematológicos	GM en suero	235	170	-	No se muestran datos
162	Clancy, C.J. y cols.	Retrospectivo	81	Receptores de trasplante de órgano sólido	GM en suero	2	3	-	1/12 de paciente no EFI
164	Husain, S. y cols.	Prospectivo	116	Receptores de Trasplante de pulmón	GM en suero	2	4	-	No se muestran datos
103	Persat, F. y cols.	Retrospectivo	279	Pacientes con riesgo de EFI	BG en suero	-	-	117	No se muestran datos
165	Senn, L. y cols.	Prospectivo	95	Pacientes hematológicos	BG en suero	9*	21*	-	No se muestran datos
4	Meersseman, W. y cols.	Prospectivo	110	<b>Pacientes Críticos</b>	<b>GM en LBA</b>	26	8	-	95% (73)
166	Ellis, M. y cols.	Prospectivo	95	Pacientes hematológicos	BG en suero	5	21	-	No se muestran datos
101	Obayashi, T. y cols.	Retrospectivo	456	Patients with Cancer or autoimmune disease	BG en suero	-	-	54	100%: estudio en base a necropsias

Nº	Autores	Tipo de Estudio	Nº de pacientes	Población Estudiada	Herramienta Diagnóstica	EFI probada (n)	EFI probable (n)	EFI probada y probable mixtas (n)	Tasa de Necropsias (Nº de pacientes fallecidos)
167	Lunel, F.M. y cols.	Retrospectivo	51	Pacientes hematológicos	BG en suero	21	-	-	No se muestran datos
116	Maertens, J. y cols.	Prospectivo	70	Pacientes hematológicos	BG en suero	27	43	-	79.4% (39)
119	Maertens, J. y cols.	Retrospectivo	128	Pacientes hematológicos	<b>GM en LBA</b>	31	27	-	60%
95	Hachem, R. y cols.	Prospectivo	82	Pacientes hematológicos	GM y BG en suero	-	-	62	No se muestran datos
100	Koo, S. y cols.	Retrospectivo	871	Pacientes con Cáncer	BG en suero	80	36	-	No se muestran datos
142	Presterl, E. y cols.	Prospectivo	197	Pacientes Críticos	BG en suero	-	-	24	No se muestran datos
168	Alexander, B.D. y cols.	Prospectivo	73	Receptores de Trasplante de pulmón	BG en suero	-	-	14	No se muestran datos
169	Pasqualotto, A.C. y cols.	Prospectivo	60	Receptores de Trasplante de pulmón	<b>GM en LBA</b>	4	4	-	50%
128	Mohr, J.F. y cols.	Prospectivo	57	<b>Pacientes críticos quirúrgicos</b>	BG en suero	3	6	-	No se muestran datos
170	Posteraro, B. y cols.	Prospectivo	95	<b>Pacientes críticos</b>	BG en suero	16	-	-	No se muestran datos
120	He, H. y cols.	Prospectivo	90	<b>Paciente críticos con EPOC</b>	GM en suero	1	18	-	No se muestran datos

EFI=Enfermedad Fúngica Invasora; GM= Galactomanano; AI= Aspergilosis Invasora; LBA= Lavado Broncoalveolar; BG= (1→3)-β-D-glucano; EPOC= Enfermedad Pulmonar Crónica Obstructiva

\*: Corresponde a episodios; -: No datos

En la tabla 14 (página 101), se observa que un grupo de investigadores belgas publicaron 5 estudios en pacientes onco-hematológicos con tasas de necropsias entre 79.9 a 100%<sup>96-99,116,158</sup>. Este grupo publicó otros dos estudios donde comparan GM en LBA con GM en suero. El primero, es un estudio prospectivo en 110 pacientes críticos (una población mixta de 24 neutropénicos y 86 pacientes no neutropénicos) con una tasa de necropsia de 95%.<sup>4</sup> El segundo estudio, es un análisis retrospectivo de 99 pacientes hematológicos de alto riesgo (que incluía 58 caso de AI probada y probable) en los cuales GM en LBA es comparado con GM en suero, con una tasa de necropsia de 60%.<sup>119</sup> Por último, un reciente estudio de este grupo evalúa de forma retrospectiva el rendimiento diagnóstico de BG en suero en 47 pacientes críticos inmunocomprometidos (20 pacientes hematológicos y 27 no hematológicos), con una tasa de necropsias de 100%.<sup>141</sup>

Otros investigadores de Norte-América llevaron a cabo un estudio en 70 pacientes receptores de trasplante de pulmón, ellos reportaron una tasa de necropsia de 100% (murieron 10 pacientes).<sup>157</sup>

Asimismo investigadores suizos realizaron un estudio prospectivo en 107 pacientes onco-hematológicos y reportaron una tasa de necropsias de 34.37%.<sup>159</sup>

Finalmente, un grupo de investigadores Brasil realizó un estudio prospectivo en 60 pacientes receptores de trasplante de pulmón y reportaron una tasa de necropsia de 50%.<sup>169</sup>

Como podemos deducir de esta tabla general (tabla 14, página 101), en la mayoría de estudios diagnósticos no se indica la tasa de necropsias (probablemente por disponer de un pequeño número de necropsias).

En nuestros dos estudios, los resultados representan las condiciones reales en las que se trabaja en una UCI de un hospital terciario, aunque ambos tienen la limitación ya mencionada de la baja proporción de necropsias y/o biopsias profundas.

El desarrollo de las nuevas herramientas diagnósticas microbiológicas de EFI, independiente de las técnicas tradicionales de cultivo, representa un importante avance en el diagnóstico y el manejo de pacientes con EFI. Sin embargo, debemos tener en cuenta que siempre debemos interpretar los resultados de estas pruebas en el contexto conjunto de los factores de riesgo para EFI, los signos y síntomas, y las imágenes radiológicas del paciente.<sup>71,107,171</sup>

Para la evaluación y posterior introducción de los nuevos marcadores (GM y BG), es importante clasificar a los pacientes, sujetos de estudio, de acuerdo al riesgo que presentan de desarrollar EFI. Esto es sumamente importante debido a que los valores predictivos positivos o negativos que se obtengan de la evaluación de estas técnicas están influenciados por la prevalencia de la enfermedad en el grupo estudiado.<sup>172</sup>

En este sentido, se han propuesto diferentes estrategias para identificar los pacientes ingresados en UCI en riesgo de desarrollar EFI. En el caso de CI, la EFI más prevalente en pacientes de la UCI, Ostrosky-Zeichner y cols. diseñaron un modelo predictivo, a través de un estudio multicéntrico retrospectivo, para identificar de forma temprana (a partir del cuarto día de estancia en UCI) los pacientes con alto riesgo de CI.<sup>68</sup> Siguiendo el modelo predictivo propuesto en este estudio, la tasa de CI entre los pacientes que cumplían la regla fue de 9.9% respecto a 2.3% entre los pacientes que no cumplían la regla, y se capturaron 34% de los casos de CI.<sup>68</sup> Los valores de riesgo relativo, sensibilidad, especificidad, VPP y VPN eran: 4.36, 34%, 90%, 1% y 97%, respectivamente.<sup>68</sup> Por otro lado, Meersseman y cols.<sup>8</sup> propusieron un esquema de estratificación de riesgo, para identificar los pacientes en riesgo de AI. Agruparon los factores de riesgo, asociados con el desarrollo de AI en la UCI, en tres categorías: alta, intermedia y alta. Actualmente no hay datos publicados sobre la validación prospectiva de estas propuestas.

En el presente trabajo hemos utilizado ambas estrategias para definir y categorizar a la población de estudio.

Las cohortes estudiadas por nosotros estaban constituidas por pacientes con alto riesgo de EFI, en la población n° 1 casi 50%, y en la población n° 2 más del 75% de los pacientes, presentaban 2 o más factores de riesgo. Esto explicaría la alta incidencia de EFI detectada en nuestras poblaciones, 23.4% en la población n°1 y 25.5% en la población n°2, aunque debemos recordar que no se puede determinar la verdadera incidencia de EFI sin exámenes necrópsicos y/o estudios de biopsias profundas.<sup>96,97,99,144,173</sup> La prevalencia descrita en nuestros estudios, determinada en base a los criterios de la EORTC/MSG<sup>71</sup>, podría por tanto estar infra-estimada. Sin embargo de acuerdo a la evolución clínica de los pacientes y en base a una evaluación clínica y microbiológica, se podría afirmar que la prevalencia real sería similar a la estimada en base a los criterios de la EORTC/MSG<sup>71</sup>.

A continuación se discutirán los resultados obtenidos en el estudio de acuerdo a los objetivos planteados.

### ***5.1. Estudio prospectivo diagnóstico de Aspergilosis Invasora mediante la detección de galactomanano sérico***

Los estudios que evalúan el rendimiento diagnóstico de GM en suero en pacientes críticos son escasos. En un estudio de Meersseman y cols.<sup>4</sup>, basado en un alto porcentaje de necropsias en pacientes de UCI, se determinó que la sensibilidad de GM en suero para el diagnóstico de AI probada era baja (42%),<sup>4</sup> comparada con la sensibilidad descrita en pacientes neutropénicos onco-hematológicos (88%).<sup>97</sup> Para explicar esta diferencia debemos tener en cuenta que la gran mayoría de pacientes de la UCI son no-neutropénicos, en el estudio de Meersseman y cols.<sup>4</sup> 78% de los pacientes (96.9% de los pacientes en la población n°1 de nuestro trabajo y 88.2% en la población n° 2), a diferencia de los pacientes onco-hematológicos donde la mayoría son pacientes neutropénicos (100% en el estudio de Maertens y cols.<sup>97</sup>).

La diferencia en la sensibilidad de esta prueba en estas dos poblaciones, pacientes críticos (no-neutropénicos) y pacientes onco-hematológicos (neutropénicos), se puede entender a través de la descripción de un modelo animal experimental en ratones con AI.<sup>174</sup> En él los ratones fueron tratados con corticoesteroides o quimioterapia. En los individuos tratados con corticoesteroides (críticos no neutropénicos), la inflamación en los pulmones es más pronunciada y la carga fúngica y angio-invasión es mínima comparada con los individuos neutropénicos (equivalentes a los pacientes onco-hematológicos). En estos la carga fúngica y la angio-invasión es pronunciada, y sin embargo no se observa signos de inflamación.

Además se ha descrito que los neutrófilos pueden disminuir los niveles de GM en la sangre a través de receptores de unión a la manosa por lo cual la sensibilidad de GM en suero en pacientes sin neutropenia sería menor.<sup>112</sup> Este patrón histopatológico ha sido confirmado en autopsias de pacientes con AI probada.<sup>4,144</sup>

En nuestro primer estudio la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de GM para los casos de AI (probada y probable) fue 66.6%, 97.6%, 80.0% y 95.4% respectivamente, utilizando  $\geq 0.5$  como punto de corte. La especificidad en nuestro estudio y en el estudio de Meersseman y cols.<sup>4</sup> fueron concordantes y altas (97.6% y 96%, respectivamente), sin embargo la sensibilidad fue marcadamente superior en nuestra cohorte (66.6% y 42%, respectivamente) (tabla 15, página 108). Esto puede explicarse por el bajo porcentaje de pacientes tratados con corticoesteroides en nuestra población (aproximadamente 20%) comparado con el 48% en su estudio. En la población n°2 el mejor rendimiento diagnóstico se obtuvo con un punto de corte  $\geq 0.4$ , similar al indicado por la casa comercial, con una sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de: 60%, 90.2%, 60% y 90.2% (tabla 15, página 110). Utilizando un punto de corte de  $\geq 0.5$  los parámetros diagnósticos no mejoraban. En ambos estudios la prueba presenta altos valores de especificidad y VPN, por lo cual resulta una prueba útil para descartar con seguridad la posibilidad de AI en pacientes críticos con alto riesgo de EFI.

**Tabla 15:** Rendimiento diagnóstico de galactomanano sérico para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora en pacientes críticos

Nº Referencia	Autores	Tipo de Estudio	Población	AI probada (n)	AI probada+ probable (n)	Incidencia AI	Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Falsos Positivos (n)	Falsos Negativos (n)
4	Meerssema n, W. y cols. <sup>a</sup>	Prospectivo	110	26 (125 muestras) <sup>b</sup>	34	31%	≥0.5	42.0	-	-	-	6 <sup>c</sup>	14
120	He, H. y cols.	Prospectivo <sup>d</sup>	90 <sup>e</sup>	1	19 <sup>b</sup>	-	≥0.5	55.0	57.9	54.5	72.7	-	-
Población nº1	Acosta, J. y cols.	Prospectivo	98	4	11 <sup>b</sup>	11.2%	≥0.5	66.7	97.7	80.0	95.5	3	4
Población nº2	Acosta, J. y cols.	Prospectivo	51	4	10 <sup>b</sup>	19.6%	≥0.4	60.0	90.2	60.0	90.2	3	4

AI=Aspergilosis Invasora; VPP= valor predictivo positivo; VPN=valor predictivo negativo

a: Análisis por muestras

b: Rendimiento diagnóstico de la prueba evaluado para estos casos

c: Pacientes control con pruebas positivas (galactomanano sérico y/o galactomanano en líquido de LBA)

d:Estudio de cribado con muestras en día 1 y 4 de ingreso en UCI, análisis con al menos una prueba positiva

e: Pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

-: No datos

Un reciente estudio de He y cols.<sup>170</sup>, evalúa el rendimiento diagnóstico de GM en el diagnóstico de AI, en pacientes críticos con EPOC. Determinaron los valores de GM en suero los días 1 y 4 de estancia en UCI. Este grupo describe valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de 57-87%, 64-84%, 70-80% y 47-94%, respectivamente, dependiendo del día en que se realizó la prueba. Además determinaron el rendimiento diagnóstico de GM en suero mediante un análisis por muestras (tabla 15, página 108). Estos resultados, al haberse determinado en una sub-población específica de pacientes críticos, no se pueden extrapolar a todos los pacientes de UCI.

Uno de los problemas observados en la prueba de detección de GM en suero, es la existencia de resultados falsos positivos que disminuyen la especificidad de la misma. En la primera población estudiada, tres pacientes del grupo control presentaron valores de  $GM \geq 0.5$ , uno de ellos había recibido tratamiento con piperacilina/tazobactam, una causa conocida de falsa reactividad.<sup>175</sup> En los otros dos casos no se identificaron causas de falsa positividad.

Es ampliamente conocido, que el uso de antibióticos beta-lactámicos, piperacilina/tazobactam y amoxicilina/ácido clavulánico, puede producir resultados falsos positivos de GM en suero.<sup>175-181</sup> Otros beta-lactámicos, como ampicilina o amoxicilina, también se han asociado a resultados falsos positivos de GM.<sup>177</sup> Por este motivo en pacientes con riesgo de EFI se debería evitar el uso de esta clase de antibióticos, que pudieran confundir la interpretación de los resultados de GM en suero. Los días necesarios para eliminar el antígeno del torrente sanguíneo después de discontinuar el tratamiento varían entre 1 y 5.5 días, con una media de 2.4 días.<sup>177</sup> Por este motivo se debería esperar al menos 5 días desde el último día de tratamiento antibiótico, para repetir la prueba y descartar un resultado falso positivo. Debemos señalar que en pacientes con insuficiencia renal la excreción de GM es menor, por lo cual este periodo puede ser más prolongado. En pacientes con hemodiálisis, el tiempo puede ser mayor debido a que las moléculas de GM no son filtradas en los sistemas de hemodiálisis.<sup>182</sup>

En el caso de la segunda población, tres pacientes en el grupo control presentaron valores positivos de GM en suero, dos de ellos presentaron bacteriemia sincrónica por *E. faecalis* y *A. baumannii*. La bacteriemia sincrónica a la toma de muestra, ha sido asociada a resultados falsos positivos de GM en suero.<sup>59</sup> En el caso del tercer paciente (quien presentaba neumonía por *P. jirovecii* e insuficiencia renal crónica), no se pudo identificar la causa de la falsa reactividad. El paciente falleció durante el ingreso pero no se le realizó necropsia.

Además de estas posibilidades, se han descrito resultados falsos positivos por otros motivos que incluyen: contaminación con conidios de *Aspergillus* en la extracción o manipulación de la muestra, colonización por *Bifidobacterium* en niños,<sup>183</sup> alimentación parenteral con Racol (que contiene proteínas de soja),<sup>184</sup> inclusive algunas comidas como los cereales, la pasta, leche maternizadas y productos ricos en galactofuranosa.<sup>59,86</sup> Además se han descrito resultados falso positivos debido a infección por *Cryptococcus neoformans*,<sup>106</sup> por alteración de la barrera intestinal, como casos de mucositis secundaria a quimioterapia,<sup>59,86</sup> radioterapia<sup>86</sup> o enfermedad injerto contra huésped.<sup>86,184</sup> En general, la tasa de pacientes con resultados falsos positivos es más alta en pacientes con menor edad: en neonatos se ha descrito una tasa de falsos positivos de 83%<sup>185</sup>, en la población pediátrica del 10%<sup>186</sup> y en adultos del 2,5%.<sup>96</sup>

Otros hongos como *Penicillium*, *Alternaria* y *Paecilomyces*, presentan reactividad cruzada con los anticuerpos monoclonales utilizados en la prueba comercial Platelia *Aspergillus*, y podrían producir resultados positivos, aunque estas especies no se asocian con frecuencia a EFI.<sup>59</sup>

La detección de GM en suero también se ha asociado a resultados falso negativos, lo cual está relacionado a la baja sensibilidad de la prueba. En la población n°1 (tabla 4, página 58), tres de cuatro pacientes con AI con resultados de GM en suero  $\leq 0.5$ , habían recibido tratamiento antifúngico sistémico con actividad frente a *Aspergillus*. Uno de ellos había sido tratado con Caspofungina y Anfotericina B liposomal, y los otros dos con voriconazol. En el caso de la

población n°2 (tabla 10, página 83), cuatro pacientes con AI presentaban niveles de GM en suero  $\leq 0.4$ , uno de ellos había recibido tratamiento con voriconazol y otro presentaba traqueobronquitis (aunque este último posteriormente presentó compromiso pulmonar).

Se han sido descritos resultados falsos negativos de GM en suero en pacientes que recibían profilaxis o tratamiento antifúngico.<sup>113,114,160</sup> Marr y cols.<sup>160</sup>, determinaron que la sensibilidad de GM en suero se redujo a 52% en pacientes que estaban recibiendo tratamiento antifúngico de amplio espectro, respecto a 89% en pacientes controles. En el caso del paciente con traqueobronquitis, podemos asumir que debido a que en el momento del diagnóstico serológico el paciente presentaba una infección limitada a las vías aéreas, la liberación de GM al torrente sanguíneo era escasa, tal como se ha descrito previamente.<sup>121</sup>

## **5.2. Estudio prospectivo diagnóstico de Aspergilosis Invasora mediante la detección de (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucano sérico**

La información sobre la eficacia de la detección de BG en suero para el diagnóstico de EFI en pacientes críticos es escasa e imprecisa.<sup>3,102,105,127,128,141</sup> En el caso específico del diagnóstico de AI, recientemente se ha publicado un estudio basado en necropsias, que evalúa el rendimiento de diagnóstico de BG en pacientes críticos con AI.<sup>141</sup>

En este, De Vlieger y cols.<sup>141</sup> describen que la sensibilidad y especificidad de BG en el diagnóstico de AI, utilizando un punto de corte  $\geq 80$  pg/m, fue 85.7% y 36.4%, respectivamente. Sin embargo utilizando un punto de corte de  $\geq 140$  pg/mL logran incrementar la especificidad a 69.7% sin alterar la sensibilidad. Este estudio incluía un alto porcentaje de pacientes hematológicos (42.65%), al estratificar a los pacientes los autores encontraron que la especificidad de BG en suero para el diagnóstico de AI era mayor en los pacientes hematológicos que en los no hematológicos, 77.8% y 69.6%, respectivamente.<sup>141</sup> (tabla 16, página 112)

**Tabla 16:** Rendimiento diagnóstico de (1→3)-β-D-glucano sérico para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora en pacientes críticos

N° Referencia	Autores	Tipo de Estudio	Población	AI probada (n)	AI probada+ probable (n)	Incidencia AI	Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Falsos Positivos (n)	Falsos Negativos (n)
141	De Vlieger, G. y cols.	Retrospectivo	47	14 <sup>a</sup>	-	29.8%	≥140	85.7	69.7	54.5	92.0	9	2
Población n°1	Acosta, J. y cols.	Prospectivo	98	4	11 <sup>a</sup>	11.2%	≥80	91.67	62.79	25.58	98.18	24	1
Población n°2	Acosta, J. y cols.	Prospectivo	51	4	10 <sup>a</sup>	19.6%	≥80	80.0	75.61	44.44	93.94	8	2

AI= Aspergilosis Invasora; VPP= valor predictivo positivo; VPN= valor predictivo negativo

a: Rendimiento diagnóstico de la prueba evaluado para estos casos

-: No datos

En nuestro trabajo, el mejor rendimiento diagnóstico de BG en el diagnóstico de AI (probada y probable), tanto en la población n°1 como en la población n°2, se obtuvo utilizando un punto de corte de  $\geq 80$  pg/mL. Utilizando este punto de corte, en la población n°1 obtuvimos una sensibilidad y especificidad de 91.7% y 62.8%, respectivamente; mientras que en la población n°2 los valores fueron de 80% y 75.6%, respectivamente. Los valores de sensibilidad son similares a los descritos por De Vlieger y cols.<sup>141</sup>, aunque en nuestro trabajo encontramos una especificidad más alta en ambas poblaciones (tabla 16, página 112). Estos valores discrepantes, se pueden explicar por las diferentes características de las poblaciones, así como por la diferencia en la prevalencia de AI. En la población n°1 el 52.2% de las EFI eran AI respecto al 76.9% en la población n°2, mientras que en el estudio de Vlieger y cols.<sup>141</sup> el 100% de las EFI eran AI, aunque como hemos mencionado en ese estudio había un alto porcentaje de pacientes hematológicos.

Es importante recalcar que en nuestros estudios obtuvimos un alto VPN, mayor de 90% en ambas poblaciones (98.2% en la población n°1 y 92.6% en la población n°2). (tabla 16, página 112) Esto permitiría descartar el diagnóstico de AI en pacientes con valores negativos de BG.

Una importante limitación de la detección de BG en suero es la alta frecuencia de resultados falsos positivos, lo cual disminuye la especificidad de la prueba.<sup>59,156</sup> En la población n° 1, veinticuatro pacientes del grupo control (24.4%) presentaban valores de BG  $\geq 80$  pg/mL sin presentar EFI. Catorce de estos pacientes presentaban bacteriemia de forma sincrónica a la toma de la muestra de suero, 7 de ellos por bacterias gram positivas y otros siete pacientes por bacilos gram negativos. Otros dos pacientes habían sido tratados con Amoxicilina-Ácido clavulánico y tres pacientes habían sido sometidos a una cirugía mayor la semana previa a la prueba de BG. En la población 2, ocho de los 38 pacientes del grupo control presentaron valores de BG  $\geq 80$  pg/mL sin presentar EFI. Cuatro de estos pacientes presentaron bacteriemias sincrónicas a la realización del LBA, por bacterias gram positivas y otro paciente presentó peritonitis fecaloidea y cirugía

reciente. Todos estos factores son conocidos como factores de falsa reactividad de BG.<sup>93,105,129,187-192</sup>

Se ha descrito resultados falsos positivos de BG en pacientes con bacteriemia, tanto por bacterias gram positivas como bacterias gram negativas.<sup>93,129,187</sup> En un reciente estudio en pacientes sin EFI, Albert y cols.<sup>187</sup> determinaron que bacteriemias tanto por bacilos gram negativos, como bacteriemias por cocos gram positivos, producían resultados falsos positivos. Los valores de BG en el grupo de pacientes con bacteriemia por bacilos gram negativos, eran significativamente más altos que en los pacientes con bacteriemia por cocos gram positivos.<sup>187</sup> Un estudio previo, sin embargo, determinó que los pacientes con infecciones del torrente sanguíneo (ya sea bacterianas o fúngicas) no presentaban niveles más altos de BG comparado a los pacientes sin este tipo de infección<sup>105</sup>, aunque en este estudio se utilizó un punto de corte de  $\geq 20$ pg/ml.

El uso concomitante de antibióticos betalactámicos, como amoxicilina-clavulánico, también se ha descrito como causa de falsa reactividad de BG,<sup>189</sup> lo cual explicaría el resultado falso positivo en dos de los pacientes controles. Antibióticos como colistina, ertapenem, cefazolina, trimetoprim/sulfametoxazol, cefotaxima, cefepima y ampicilina/sulbactam, han presentado reactividad en las pruebas de BG, pero solo cuando fueron evaluados directamente del vial.<sup>188</sup> A una menor concentración, similar a la máxima concentración posible en plasma, no presentaron reactividad.<sup>188</sup>

Por otro lado, en los pacientes sometidos a cirugía los días previos a la determinación de BG también se han descrito resultados falsos positivos, asociados al uso de gasas o esponjas que contengan glucano.<sup>191,192</sup> En el caso de pacientes con infecciones bacterianas o fúngicas, diferentes a las infecciones del torrente sanguíneo, también se ha descrito falsa reactividad de BG.<sup>105,190</sup> Aunque en el caso de pacientes con cultivos positivos de secreciones respiratorias, Digby y cols.<sup>105</sup> no encontraron que presentaran niveles más altos de BG comparados con

aquellos pacientes sin este tipo de infecciones.<sup>105</sup> En el paciente control con peritonitis, tanto el procedimiento quirúrgico, con posible traslocación bacteriana y de *Candida* spp., así como los implementos usados en la cirugía, podrían explicar el resultado falso positivo.

En cinco pacientes control de la población nº1 y en 3 pacientes control de la población nº 2, no se pudo identificar ninguna causa de falsa reactividad de BG. Después de un análisis clínico y microbiológico, y de acuerdo a la evolución clínica, se pudo excluir la presencia de EFI en todos los pacientes control con resultados falsos positivos.

Además de los factores mencionados, se han descrito diversas causas de falsa reactividad de BG. Entre estas tenemos: la hemodiálisis con membranas de celulosa,<sup>193,194</sup> tratamiento con inmunoglobulinas humanas intravenosas<sup>195,196</sup>, polisacáridos antitumorales<sup>197</sup>, albúmina, factores de coagulación o proteínas plasmáticas.<sup>46,195,198</sup> También se han descrito resultados falsos positivos por sobrecrecimiento intestinal por *Candida* y posterior traslocación,<sup>59,199</sup> por contaminación iatrogénica en el material de laboratorio (debido a que la molécula de BG es ubicua en el entorno)<sup>129,198</sup>, y por utilizar suero hemolizado para la prueba.

Por otro lado, se han descrito algunos fármacos que contienen BG: lentinan, crestin, scleroglucan, schizophyllan, que podrían ser causa de falsa reactividad.<sup>102</sup>

Existe controversia sobre algunas causas descritas como factores de falsa positividad de BG. Alexander y cols.<sup>168</sup> investigaron si la colonización por hongos miceliales podría ser otra causa de falsa positividad, sin embargo encontraron que los pacientes colonizados presentaban valores de BG más bajos que los no colonizados, planteándose, que la causa de los bajos valores de BG en los pacientes colonizados fuera el tratamiento antifúngico administrado, sin embargo no se pudo comprobar esta afirmación.<sup>168</sup>

Otro punto controvertido, es que, a pesar de que se han descrito infecciones bacterianas como causa de falsa reactividad al BG, las únicas bacterias conocidas que producen glucanos o polímeros similares a glucanos son *Alcaligenes faecalis* y *Streptococcus pneumoniae*.<sup>122,200</sup>

Recientemente se ha planteado que, probablemente *Pseudomonas aeruginosa* presente (1→3)-β-D-glucano, debido a que pacientes con bacteriemias por este microorganismo presentan resultados positivos de BG, además el sobrenadante de cultivos de esta bacteria también presentan reactividad frente a BG.<sup>190</sup> Otras bacterias presentan enlaces β-glucano, pero no enlaces (1→3)-β-D-glucano.<sup>107</sup>

En el caso de colonización por *Candida*, aunque se han descrito resultados falsos positivos, se ha descrito que pacientes con intensa colonización presentaban resultados negativos de BG.<sup>61,94</sup>

Recientemente Mohr y cols.<sup>128</sup> han propuesto, de acuerdo a los resultados de un estudio en una UCI quirúrgica, que debido al alto número de casos falsos positivos en los primeros tres primeros días de ingreso, los resultados positivos de BG en ese periodo deberían interpretarse con cautela.<sup>128</sup>

La prueba de BG, además puede presentar resultados falsos negativos, aunque con menor frecuencia. En este trabajo, en la población n°1 (tabla 4, página 58), encontramos un paciente con AI probable con valores de BG ≤80pg/mL que había sido tratado previamente con voriconazol. En la población n°2 (tabla 10, página 83), dos pacientes con AI probable presentaban valores de BG ≤80pg/mL (uno de estos pacientes también había recibido tratamiento previo con voriconazol). Aunque en el caso de la determinación de GM en suero, el tratamiento previo con antifúngicos podría explicar un resultado falso negativo<sup>160</sup>, en el caso de BG no sucede lo mismo. Koo y cols.<sup>100</sup> evaluaron si la sensibilidad de la prueba de BG disminuía con la administración de tratamiento antifúngico sistémico, pero no encontraron que el tratamiento antifúngico recibido por más de 7 días influyera en el resultado de la prueba. Esto se debería al lento aclaramiento de BG en algunas infecciones fúngicas.<sup>93,94,201,202</sup>

Se han descrito resultados falsos negativos de BG, con el método Fungitell<sup>®</sup>, en sueros con altos niveles de bilirrubina y triglicéridos.<sup>129</sup>

### **5.3. Estudios prospectivo comparativo utilizando galactomanano y (1→3)-β-D- glucano séricos en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora**

En la población nº1 se comparó el rendimiento diagnóstico de GM en suero y BG en suero en el diagnóstico tanto de AI probada y de AI global (probada y probable). En el diagnóstico de AI probada el ABC de BG en suero fue mayor que el ABC de GM en suero, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0.5888$ ). En el diagnóstico de AI (probada y probable), el ABC de GM en suero fue superior al ABC de BG, esto se refleja en una especificidad y VPP de GM en suero superior. Sin embargo esta diferencia no fue significativa ( $p=0.871$ ). Es importante indicar que, en la población nº 1, la tasa de falsos positivos de BG fue significativamente mayor ( $p\leq 0.0001$ ) cuando se comparó con los resultados falsos positivos de GM en suero. Esto explicaría los bajos valores de especificidad y VPP de BG.

Se han realizado escasos estudios que comparen el rendimiento diagnóstico de BG y GM en suero para el diagnóstico de AI, todos ellos en pacientes hematológicos y utilizando las pruebas como herramientas de cribado. En ellos se describe resultados similares a los nuestros, mayor valor de ABC, especificidad y VPP para GM en suero, respecto a BG en suero en el diagnóstico de AI, pero mayor sensibilidad y VPN de BG.<sup>95,156,203</sup>

Después de una exhaustiva revisión de la literatura, podemos afirmar que este es el primer estudio que compara el rendimiento diagnóstico de GM y BG en suero para el diagnóstico de AI (probada y probable) en pacientes críticos. Aunque el ABC de GM en suero fue superior al ABC de BG en suero, esta diferencia no fue significativa. Sin embargo es probable que en estudios con un mayor número de pacientes esta diferencia sea mayor, debido a que GM es un antígeno específico de *Aspergillus* spp. a diferencia de BG que es un marcador panfúngico. Además la prueba de BG en suero presenta un alto número de resultados falsos positivos, significativamente mayor que la tasa de resultados falsos positivos de GM en suero, de acuerdo a nuestros datos.

Debemos mencionar que en el trabajo de Pazos y cols.<sup>94</sup>, en pacientes onco-hematológicos, se estudio el rendimiento diagnóstico de GM y BG a través de un estudio de cribado con dos muestras de suero semanales: la positividad de BG era significativamente más temprana que la de GM en relación a la aparición de síntomas o signos clínicos o radiológicos.<sup>94</sup> Esta estrategia para el diagnóstico de AI, no ha sido evaluada en pacientes críticos de UCI.

#### **5.4. Estudios prospectivo combinado utilizando galactomanano y (1 → 3)-β-D- glucano séricos en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora**

Debido a que las pruebas con marcadores fúngicos, GM y BG en suero, presentan limitaciones, es posible que podamos superarlas con el uso combinado de GM y BG en el diagnóstico de AI. Esta estrategia, descrita previamente,<sup>93,94</sup> incrementaría el rendimiento diagnóstico de cada prueba por separado. En ambas poblaciones estudiadas, el ABC de la combinación de ambas pruebas fue superior al ABC de cada prueba por separado, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En la población n° 1, con la combinación de ambas pruebas se mejoró la sensibilidad y el VPN, respecto a la detección de GM en suero. Mientras que en la población n° 2 se incremento la especificidad, VPP y eficiencia.

#### **5.5. Estudio prospectivo utilizando galactomanano en líquido de lavado broncoalveolar para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora.**

La mayoría de estudios previos en los que se evalúa el rendimiento diagnóstico de GM en LBA, han sido realizados en pacientes hematológicos,<sup>114,119,204,205</sup> receptores de trasplante de órgano sólido<sup>162</sup> y pacientes no inmunocomprometidos.<sup>163</sup> En ellos se describe sensibilidades y especificidades que varían en entre 85% y 100%, utilizando diferentes puntos de corte con

valores entre  $\geq 0.5$  a  $\geq 1.0$ . Por otro lado, se ha reportado que la sensibilidad de GM en LBA en pacientes receptores de trasplante de pulmón, es significativamente más baja que en otras subpoblaciones (61%).<sup>164</sup>

Todos estos estudios reportaron alto VPN que se relaciona con los resultados obtenidos en nuestro estudio en la población n°2. A pesar de existir un número importante de estudios enfocados en evaluar el rendimiento diagnóstico de GM en LBA, la comparación de ellos es difícil debido a que las definiciones utilizadas son variables. Así por ejemplo, no se define el momento de la toma de muestra ni el impacto del tratamiento antifúngico, además la cantidad de solución salina instilada durante el LBA, varía en los diferentes estudios.<sup>4,114,119,162-164,204</sup> Pese a estos inconvenientes, en una reciente revisión sobre el tema se concluyó que la detección de GM en LBA sería recomendable en el caso de que se realizara una fibrobroncoscopia para el estudio de infiltrados pulmonares en pacientes en riesgo de EFI.<sup>206</sup>

En el caso de pacientes críticos, Meersseman y cols.<sup>4</sup> realizaron un estudio en base a necropsias, donde evaluaron el rendimiento diagnóstico de GM en líquido de LBA, además de GM en suero, para el diagnóstico de AI. La sensibilidad y especificidad reportada de GM en LBA (para un punto de corte de  $\geq 0.5$ ) fueron de 88% y 87% (tabla 17, página 120). Con este punto de corte en nuestro estudio, la sensibilidad y especificidad para todos los casos de AI sería 80% y 92.6%, respectivamente, pero utilizando un punto de corte de  $\geq 1.0$ , mantenemos la misma sensibilidad pero se incrementa la especificidad a 97.5% y además mejoran todos los parámetros diagnósticos (VPP, VPN, CPP, CPN). En estudios previos, ya se había determinado que incrementado el punto de corte de GM en LBA de  $\leq 0.5$  a  $\leq 1.0$ , mejoraba el rendimiento diagnóstico de esta prueba.<sup>4,163</sup>

**Tabla 17:** Rendimiento diagnóstico de galactomanano en líquido de LBA para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora en pacientes críticos

Nº Referencia	Autores	Tipo de Estudio	Población	AI probada (n)	AI probada+ probable (n)	Incidencia AI	Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Falsos Positivos (n)	Falsos Negativos (n)
4	Meerssema n, W. y cols. <sup>a</sup>	Prospectivo	110	26 (34 muestras) <sup>b</sup>	34	31%	≥0.5	88.0	87.0-	-	-	6	3 <sup>c</sup>
Población nº2	Acosta, J. y cols.	Prospectivo	51	4	10 <sup>b</sup>	19.6%	≥1.0	80.0	97.5	88.8	95.2	1	2

LBA= Lavado broncoalveolar; AI= Aspergilosis Invasora; VPP= valor predictivo positivo; VPN= valor predictivo negativo

a: Análisis por muestras

b: Rendimiento diagnóstico de la prueba evaluado para estos casos

c: Pacientes con AI con resultado negativo en la primera muestra

-: No datos

En lo concerniente a los resultados discordantes, se observó altos niveles de GM en líquido de LBA en uno de los pacientes del grupo control. Este paciente presentaba examen de visión directa y cultivo de líquido de LBA negativos. El paciente se recuperó sin tratamiento antifúngico y por tanto podemos descartar de forma razonable que presentara EFI.

Se han reportado altos niveles de GM en LBA en pacientes colonizados por *Aspergillus* spp.<sup>164</sup> y *Penicillium* spp.<sup>162</sup>. La prueba de detección de GM también puede presentar reactividad por *Alternaria* spp, *Paecilomyces* spp., *Lichtheimia ramosa* o *Histoplasma*.<sup>59,207,208</sup> Además recientemente Persat y cols.<sup>209</sup> han reportado que pacientes colonizados con grandes cantidades de *Candida albicans*, determinado a través de cultivo de líquido del LBA, presentaban niveles altos de GM en líquido de LBA.<sup>209</sup> Se ha descrito, que el tratamiento con piperacilina/tazobactam o ampicilina/sulbactam se asocia también a resultados falsos positivos.<sup>210</sup> Nuestro paciente del grupo control con resultado falso positivo, no había recibido tratamiento con ninguno de estos antibióticos.

Dos pacientes con AI presentaron valores de GM en LBA <1.0, uno de ellos había recibido tratamiento con voriconazol durante 3 días antes de la toma de muestra. Se ha relacionado el tratamiento antifúngico con itraconazol y voriconazol, con resultados falsos negativos en pacientes receptores de órgano sólido.<sup>211</sup> Sin embargo en un estudio reciente en pacientes oncohematológicos, se determinó que el tratamiento antifúngico (menos de 3 días), no alteraba el resultado de GM en LBA.<sup>205</sup>

### **5.6. Estudio prospectivo comparativo de galactomanano en líquido de Lavado Broncoalveolar respecto a galactomanano y (1 →3)-β-D-glucano séricos para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora**

Es importante señalar que en la mayoría de estudios diseñados para evaluar el rendimiento diagnóstico de GM en LBA, no se muestran datos sobre el valor diagnóstico de GM en líquido

de LBA comparado con GM en suero. Una excepción es el estudio de Maertens y cols.<sup>212</sup>, en el cual se estudiaron 10 pacientes neutropénicos y 19 no-neutropénicos con AI probada, donde posteriormente describieron, que en forma global la determinación de GM en líquido de LBA tiene mayor sensibilidad que la determinación de GM en suero.<sup>119,212</sup>

En pacientes críticos de UCI, Meersseman y cols.<sup>4</sup>, tal como se ha mencionado previamente, realizaron un estudio que evalúa y compara el rendimiento diagnóstico de GM en líquido de LBA y GM en suero con muestras tomadas de forma simultánea. En este estudio la sensibilidad de GM en LBA (utilizando un punto de corte  $\geq 0.5$ ) en casos de AI probada fue 88%, superior a la sensibilidad de GM en suero, que fue sólo 42%.<sup>4</sup> En este estudio sin embargo no se reportó el VPN ni el VPP de las pruebas. Los resultados obtenidos en nuestro estudio son similares a los reportados en este estudio, ya que en la población n<sup>o</sup>2, todos los parámetros diagnósticos de GM en líquido de LBA fueron significativamente mejores cuando se comparó con GM en suero, incluido el ABC ( $p=0.0258$ ).

En el caso de BG en suero, los parámetros diagnósticos de GM en líquido de LBA también fueron significativamente superiores a los de BG, utilizando un punto de corte de  $\geq 80\text{pg/mL}$  ( $p=0.0322$ ). En este sentido no hemos encontrado literatura que compare estas dos pruebas diagnósticas, aunque confirma la importancia de realizar broncoscopia a los pacientes con sospecha de AI.

### **5.7. Estudio prospectivo diagnóstico de Enfermedad Fúngica Invasora mediante la detección de (1 →3)- $\beta$ -D-glucano sérico**

La información sobre la eficacia de la detección de BG en suero para el diagnóstico de EFI en pacientes críticos es escasa e imprecisa.<sup>102</sup> Digby y cols.<sup>105</sup> han cuestionado la utilidad de BG en los pacientes de UCI. Estos autores sostienen que los niveles de BG en suero no mantienen correlación con la presencia de EFI, y que resultados positivos no serían específicos de esta

patología.<sup>105</sup> Sin embargo utilizaron en su estudio la prueba FungiTec G con un punto de corte de  $\geq 20$  pg. /mL.<sup>105</sup> Dado que en este estudio se utilizó un punto de corte inapropiado, por debajo del sugerido de  $\geq 80$  pg. /mL, se podía esperar que obtuvieran una alta tasa de falsos positivos.

A diferencia de este estudio, la especificidad de BG reportada por otros autores es alta ( $>90\%$ ),<sup>102,124</sup> aunque estos estudios se realizaron en pacientes de áreas hospitalarias diferentes a la UCI. En nuestros estudios la especificidad fue de 67,11% en la población n°1, y 81.6% en la población n°2, una especificidad similar a la reportada por Presterl y cols.<sup>142</sup> en pacientes críticos (75.9%), aunque en este estudio se utilizó un punto de corte de  $\geq 40$ pg/mL (tabla 18, página 127). Posteraro y cols.<sup>170</sup>, en un estudio reciente realizado en pacientes críticos con sepsis, describen una especificidad similar a la reportada en pacientes críticos (93.6%). En este estudio, en el que sólo se incluyó pacientes con sepsis, la tasa de resultados falsos positivos fue baja 5/79, lo que explicaría la alta especificidad reportada.<sup>170</sup>

Nuestros resultados muestran que, tanto en la población n°1 como en la n°2, el VPN de BG en el diagnóstico de EFI (excepto el caso de Zigomicosis) fue mayor a 90%. Estos resultados coinciden con los valores reportados en estudios previos, realizados en pacientes hematológicos,<sup>94,102,156,165</sup> con los resultados del estudio de Ostrosky-Zeichner y cols.<sup>102</sup> realizado en una población heterogénea de pacientes hospitalizados y con los resultados de Posteraro y cols.<sup>170</sup> en pacientes críticos con sepsis (tabla 18, página124). Presterl y cols.<sup>142</sup> reportan un VPN menor en pacientes críticos (80%), sin embargo como hemos mencionado, utilizan un punto de corte de  $\geq 40$  pg/mL. El alto VPN de BG permite excluir de forma razonable el diagnóstico de EFI. Este punto es muy importante, debido a que el tratamiento antifúngico puede presentar efectos adversos o interacciones con otros fármacos. Al contar con pruebas diagnósticas con alto VPN con las que podamos descartar la presencia de EFI, se evitaría un tratamiento antifúngico potencialmente tóxico<sup>25</sup> (tabla 18, página124).

**Tabla 18:** Rendimiento diagnóstico de de (1→3)-β-D-glucano sérico para el diagnóstico de Enfermedad Fúngica Invasora en pacientes críticos

Nº Referencia	Autores	Tipo de Estudio	Población	EFI probada (n)	EFI probada+ probable (n)	Incidencia EFI	Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Falsos Positivos (n)	Falsos Negativos (n)
105	Digby, J. y cols.	Prospectivo	46	37 <sup>a</sup>	-	No hay datos	≥20	-	-	-	-	2	4
142	Presterl, E. y cols.	Prospectivo	82	24	-	12.18%	≥40	52.2	75.9	46.2	80.0	14	12
170	Posterano, B. y cols.	Prospectivo	95	16	-	16.8%	≥80	93.7	93.6	75.0	98.6	5	1
Población nº1	Acosta, J. y cols.	Prospectivo	98	16	23	23.4%	≥80	81.82	67.11	41.86	92.73	24	4
Población nº2	Acosta, J. y cols.	Prospectivo	51	8	13 <sup>b</sup>	25.5%	≥80	84.62	81.58	61.11	93.94	8	2

EFI= Enfermedad Fúngica Invasora; VPP= valor predictivo positivo; VPN= valor predictivo negativo

a: Pacientes de UCI con infección bacteriana y/o fúngica

b: Rendimiento diagnóstico de la prueba evaluado para estos casos

-: No datos

En el estudio de Digby y cols.<sup>105</sup>, se describe un VPP, para el diagnóstico de infecciones en general, de 89%, pero no encontraron diferencias en la tasa de resultados positivos de BG en las infecciones fúngicas respecto a las infecciones bacterianas. Esto se debería a que el punto de corte utilizado por ellos que fue de  $\geq 20$  pg. /mL.<sup>105</sup> Aunque Ostrosky-Zeichner y cols. (en una población hospitalaria heterogénea) y Posteraro y cols. (en pacientes críticos con sepsis), han descrito que el VPP de esta prueba es alto para el diagnóstico de EFI (89% y 75%, respectivamente),<sup>102,170</sup> en nuestro estudio el VPP era bajo, tanto en la población n°1(41.86%) como en la población n°2 (61.1%). Nuestros valores son similares a los descritos por Presterl y cols.<sup>142</sup> en pacientes críticos (46.2%). (tabla 18, página 124)

En el caso de un resultado positivo, debido a que BG es un marcador panfúngico, debe realizarse estudios diagnósticos complementarios al paciente teniendo en cuenta las distintas micosis productoras de EFI.<sup>94</sup> Debemos resaltar que de los cuatro pacientes sobrevivientes con EFI probada o probable, tres presentaron niveles de BG negativos, lo cual sugeriría el potencial rol de esta prueba como marcador pronóstico de la evolución del paciente.

Como se ha mencionado anteriormente la tasa de resultados falsos positivos de la prueba de BG es alta, sin embargo de acuerdo a un análisis clínico y microbiológico se pudo excluir razonablemente la presencia de EFI en todos los pacientes del grupo control con resultados falsos positivos en ambas poblaciones. En cinco pacientes de estos paciente de la población n°1 y en 3 pacientes de la población n° 2, no encontramos un motivo que explicará el resultados falsos positivo. Sin embargo existen algunos factores descritos, difíciles de identificar que podrían explicar estos resultados como: el sobre-crecimiento intestinal y traslocación por *Candida* spp.<sup>199</sup>, infección pulmonar oculta por *P. jirovecii*,<sup>214</sup> producción de BG por infecciones bacterianas concomitantes<sup>190</sup> y contaminación iatrogénica.<sup>189,192</sup> En estos pacientes fue improbable que una probable colonización por *Candida*, fuera el motivo de la falsa positividad

de BG, ya que otros pacientes con una importante colonización por *Candida*, determinada por estudios de vigilancia no protocolizados, presentaban resultados de BG negativos.<sup>93,94</sup>

En la población nº1, como era de esperar, el paciente con zigomicosis, presentaba resultados negativos de BG, debido a que los zigomicetos producen ninguna o escasa cantidad de BG y por tanto esta infección invasora no puede ser detectada con este marcador.

En la población nº2, en el caso de pacientes con neumonía por *P. jirovecii*, el examen directo de las muestras de LBA proporcionó un diagnóstico precoz en estos pacientes, pero en todos estos pacientes los niveles de BG fueron elevados, tal como previamente se ha reportado.<sup>202,213,214</sup> Un estudio realizado en pacientes hematológicos y pacientes con VIH, donde se evalúa el rendimiento de BG para el diagnóstico de Neumonía por *P. jirovecii*, describe una sensibilidad y especificidad de 100% y 96.4%, respectivamente, utilizando un punto de corte de 100pg/mL.<sup>213</sup> Después de una búsqueda bibliográfica, podemos afirmar que no se han publicado estudios que evalúen el rendimiento diagnóstico de BG en el diagnóstico de Neumonía por *P. jirovecii* en pacientes críticos. Debido al escaso número de pacientes, no se analizó el poder diagnóstico de BG en el diagnóstico de Neumonía por *P. jirovecii*, en la población nº2.

### **5.8. Estudio prospectivo diagnóstico de Candidiasis Invasora mediante la detección de (1 →3)-β-D-glucano sérico**

Los estudios que evalúan el rendimiento de BG para el diagnóstico de CI en pacientes de UCI son escasos y no son concluyentes. En el estudio retrospectivo antes mencionado, de Ostrosky-Zeichner y cols.<sup>102</sup> realizado en una población heterogénea de pacientes hospitalizados, se evaluó la prueba Fungitell para el diagnóstico de CI probada, la sensibilidad de BG fue 78% utilizando un punto de corte de  $\geq 80$  pg. /mL.<sup>102</sup>

En lo concerniente a estudios realizados en pacientes críticos, León y cols.<sup>3</sup> desarrollaron un estudio prospectivo que incluía 240 pacientes no-neutropénicos de UCI; en este evaluaron y

compararon la utilidad de la prueba de BG en suero para diferenciar pacientes colonizados por *Candida* spp. frente a pacientes con CI. Utilizando un punto de corte de 75 pg. /mL, reportaron una sensibilidad y una especificidad de 77.8% y 52.7%, respectivamente. (tabla 19, página 128)

Debido al bajo rendimiento diagnóstico encontrado, se han desarrollado otras estrategias diagnósticas para incrementar los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba. Un reciente estudio en 57 pacientes quirúrgicos de UCI,<sup>128</sup> determinó que el rendimiento diagnóstico de BG mejoraba, si se consideraba como resultado positivo la presencia de dos pruebas consecutivas con valores  $\geq 80$  pg/mL, obteniéndose una sensibilidad y especificidad de 90% y 80%, respectivamente, en el diagnóstico de CI probada y probable, y de 100% y 72%, respectivamente en el diagnóstico de CI probada.<sup>128</sup> (tabla 19, página 128)

Otra estrategia ha sido incrementar el punto de corte de la prueba. En este sentido, Tissot y cols.<sup>127</sup>, evaluaron 106 pacientes quirúrgicos de alto riesgo ingresados en UCI, y encontraron que el mejor rendimiento diagnóstico de BG en el diagnóstico de CI se consigue definiendo un resultado positivo de BG, como dos pruebas consecutivas con valores de BG  $\geq 150$  pg/mL.<sup>127</sup> Utilizando esta estrategia consiguieron mejores valores de sensibilidad y especificidad, 73% y 78%, respectivamente.<sup>127</sup> (tabla 19, página 128)

La razón por lo cual el rendimiento diagnóstico de BG en candidiasis mejora al considerar un resultado positivo como la presencia de dos pruebas consecutivas por encima del punto de corte o al incrementar el punto de corte, esta probablemente relacionada con la alta tasa de resultados falsos positivos obtenidos utilizando el punto de corte sugerido por los fabricantes ( $\geq 80$  pg/mL) en una sola muestra.

**Tabla 19:** Rendimiento diagnóstico de (1→3)-β-D-glucano sérico en el diagnóstico de Candidiasis Invasora probada en pacientes críticos

Nº Referencia	Autores	Tipo de Estudio	Población	CI probada (n)	EFI probada+ probable (n)	Incidencia CI	Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Falsos Positivos (n)	Falsos Negativos (n)
3	León, C. y cols.	Prospectivo	240	18	-	7.5%	≥75	77.8	52.7	-	-	-	4
127	Tissot, F. y cols.	Prospectivo	106	37 (1251 muestras)	-	34.9%	≥150 <sup>a</sup>	73	78	-	-	-	-
170	Posterano, B. y cols. <sup>b</sup>	Prospectivo	95	14	16	14.73%	≥80	92.9	93.7	72.2	98.7	5	1
128	Mohr, J.F. y cols.	Prospectivo <sup>c</sup>	57 (239 muestras)	2	15 <sup>d</sup>	26%	≥80 <sup>b</sup>	90	80	-	-	9	-
Población nº1	Acosta, J. y cols.	Prospectivo	98	10	23	10.2%	≥80	70	59.09	16.28	94.55	24	3

EFI= Enfermedad Fúngica Invasora; CI= Candidiasis Invasora; VPP= valor predictivo positivo; VPN= valor predictivo negativo

a: En dos muestras consecutivas

b: Estudio realizado en pacientes críticos con sepsis

c: Análisis para el diagnóstico de CI probada y probable

d: CI probadas, probables y posibles

-: No datos

Al comparar nuestros resultados con el estudio de León y cols.<sup>3</sup>, observamos que, utilizando un punto de corte de  $\geq 80\text{pg/mL}$ , la sensibilidad que obtuvimos fue menor (70%) en los casos de CI y la especificidad fue mayor (59.09%). Con este punto de corte, a pesar de obtener un muy bajo VPP (16.3%), el VPN fue muy alto (94.6%). Esto indicaría que esta prueba, podría utilizarse como una herramienta complementaria para descartar el diagnóstico de CI, en pacientes con alto riesgo y síndrome compatible con esta patología pero con una prueba de BG negativa. Nuestros resultados concuerdan con los datos de un reciente estudio en pacientes con sepsis de UCI.<sup>170</sup> En este estudio el VPP de BG en el diagnóstico de CI fue de 72.2%, mientras que el VPN fue 98.7%.<sup>170</sup> (tabla 19, página 128)

### **5.9. Estudio prospectivo diagnóstico de Enfermedad Fúngica Invasora mediante la detección de galactomanano y (1 →3)-β-D-glucano séricos: análisis por muestras**

La detección de GM, y recientemente de BG, son pruebas utilizadas como herramienta de cribado para el diagnóstico precoz de EFI en pacientes onco-hematológicos, y se ha establecido que se debería realizar 2 veces por semana.<sup>91,94,102,111</sup> La estrategia de cribado para el diagnóstico de EFI no se ha estudiado en otras poblaciones, y tampoco en pacientes de la UCI, a excepción del estudio de He y cols.<sup>120</sup>, aunque este estudio se realizó en una subpoblación específica de pacientes críticos con EPOC. Esto se debe en parte a las características de los pacientes de UCI, una población heterogénea, donde la mayoría de pacientes son no neutropénicos, y en la que la mayoría de pacientes están ingresados por periodos cortos de tiempos. Son estas características las que hacen a esta población diferente a la de pacientes onco-hematológicos.

En nuestro estudio no se implementó esta estrategia de cribado, y la decisión de solicitar las pruebas de GM y BG dependió del criterio clínico de los intensivistas. Es por este motivo que, a pesar de haber realizado el análisis por muestras en la población n°1, no podemos sacar una

conclusión definitiva sobre el rendimiento diagnóstico de esta estrategia en nuestra población. Los motivos por que se solicitaron en más de una ocasión la detección de marcadores en algunos pacientes, fueron variados, como evaluar la evolución del paciente una vez establecido el diagnóstico, o intentar establecer un diagnóstico en el caso de pacientes del grupo control con cultivos microbiológicos negativos. En todo caso, como se ha mencionado, dependieron del criterio clínico de los intensivistas.

En nuestros resultados observamos que en el caso de GM, utilizando un punto de corte de  $\geq 0.5$  en el diagnóstico de AI probada, solo la sensibilidad y el VPN fueron mayores que en el análisis por paciente, el mejor rendimiento diagnóstico se obtuvo utilizando un punto de corte de  $\geq 1.7$ , muy por encima del punto de corte sugerido. En el caso de AI probada y probable para un punto de corte de  $\geq 0.5$  solo la sensibilidad fue mayor que en el análisis por pacientes, y el mejor rendimiento diagnóstico se obtuvo utilizando un punto de corte de  $\geq 0.6$ .

En el caso de BG utilizando un punto de corte de  $\geq 80$  pg/mL en el diagnóstico de AI probada, solo la el VPP fue ligeramente mayor que en el análisis por paciente. El mejor rendimiento diagnóstico se obtuvo utilizando un punto de corte de  $\geq 120$  pg/mL, a pesar de que la especificidad y el VPP fueran muy bajos. En el caso de AI probada y probable para un punto de corte de  $\geq 80$  pg/mL, todos los parámetros diagnósticos fueron mejores que en el análisis por pacientes excepto la especificidad y el CPN. Tanto en el caso de AI probada y probable, como en el caso de AI probada, el rendimiento diagnóstico determinado por ABC de GM fue superior al de BG, sin embargo esta diferencia no fue significativa.

El mejor rendimiento diagnóstico de BG en suero en el diagnóstico de CI se obtuvo utilizando como punto de corte  $\geq 120$  pg/mL, los valores del sensibilidad, especificidad, VPP y VPN fueron similares a los obtenidos en el estudio por paciente, con un punto de corte  $\geq 80$  pg/mL. El mejor rendimiento diagnóstico de BG en suero en el diagnóstico de EFI (exceptuando el caso de Zigomicosis) se obtuvo utilizando como punto de corte  $\geq 80$  pg. /mL,

con valores de sensibilidad, especificidad, VPP, CPP y eficiencia superiores al análisis por paciente.

A pesar de estos resultados y debido a la falta de protocolo, no podemos afirmar que modificar el punto de corte de GM o BG en una estrategia diagnóstica de cribado, mejore el diagnóstico de AI, IC o EFI. En el caso de los pacientes de UCI, se ha estudiado el rendimiento diagnóstico de los marcadores (GM y BG) como técnicas diagnósticas complementarias puntuales en casos de sospecha de EFI. Sin embargo no hay estudios publicados en los que se evalúe, de forma prospectiva, la eficacia del uso de estos marcadores como herramientas diagnósticas de cribado en pacientes críticos con alto riesgo de EFI.

### **5.10. Estudios prospectivos comparativos del cultivo respecto a la detección de marcadores (galactomanano y (1→3)-β-D- glucano) para el diagnóstico de Enfermedad Fúngica Invasora**

#### **5.10.1. Estudio prospectivo comparativo del cultivo y la detección de marcadores (galactomanano y (1→3)-β-D-glucano) séricos en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora**

En nuestro estudio los resultados positivos de los marcadores fúngicos en pacientes con AI tanto de GM como de BG en suero, antecedieron al cultivo *Aspergillus* spp, tal como se ha mencionado en estudios previos. En la población n°1, en un promedio de 6.5 días y en la población n° 2 un promedio de 4.3 días, aunque el rango fue variable (entre 1 a 11 días). Esto es muy importante para el manejo de los pacientes, debido a que un diagnóstico temprano de AI implica la posibilidad de iniciar rápidamente la terapia antifúngica, lo cual ha demostrado ser crucial para disminuir la mortalidad en estos pacientes.<sup>14,130,140</sup>

Sin embargo, debemos mencionar que las técnicas tradicionales (específicamente la visión directa) continúa teniendo un papel importante en el diagnóstico de EFI. En cinco (50%) pacientes con AI de la población n°2, la visión directa fue positiva en la muestra de líquido de

LBA. Además, es una prueba de diagnóstico rápido y actualmente es, asociada a la inmunofluorescencia, la prueba de oro para el diagnóstico de neumonía por *P. jirovecii*.

### **5.10.2. Estudio prospectivo comparativo de cultivo y la detección de (1→3)-β-D-glucano sérico en el diagnóstico de Candidiasis Invasora**

En nuestro estudio, los resultados positivos de BG, en el 40% de los pacientes con CI, antecedieron al cultivo positivo de *Candida* spp., (específicamente a 3 hemocultivos y 1 cultivo de pus abdominal), un promedio de 3.25 días (rango 2-5). Esto como se ha mencionado previamente, es importante tanto en el diagnóstico de EFI como en el de CI en particular, debido a que los resultados microbiológicos tempranos permiten el inicio precoz tratamiento antifúngico, con lo cual disminuye la morbi-mortalidad asociada.<sup>215,216</sup>

La precocidad de los resultados positivo de BG respecto al diagnóstico microbiológico tradicional, ha sido descrito previamente.<sup>127,128</sup> Tissot y cols.<sup>127</sup> encontraron que en el 73% de los casos con BG positivo, los resultados precedieron el inicio de tratamiento antifúngico.<sup>127</sup> Además Mohr y cols.<sup>128</sup> refieren que en los casos de CI probada, el primer resultado positivo de BG antecedió al cultivo positivo de *Candida* spp. un promedio de 4 días.<sup>128</sup>

En centros hospitalarios con población de alto riesgo debería implementarse la detección diaria de estos marcadores séricos (GM y BG), para que la disminución en el tiempo de diagnóstico de EFI, conseguido con estas pruebas, tuviera un valor clínico real. Además se debería implementar la realización de GM en todas las muestras de LBA de poblaciones con factores de riesgo. Sin embargo como se ha mencionado, no se debe dejar de lado las técnicas tradicionales debido a que presentan un rol importante en el diagnóstico de EFI en general.

## **6. CONCLUSIONES**

En nuestra población de enfermos críticos no neutropénicos hemos llegados a las siguientes conclusiones:

- I. La detección de Galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos son herramientas diagnósticas eficaces en pacientes con Aspergilosis Invasora. El GM sérico es una técnica diagnóstica con alta especificidad y alto VPN. El (1→3)-β-D-glucano sérico es una técnica diagnóstica con alta sensibilidad, alto VPN y baja especificidad.
- II. La detección de Galactomanano en líquido de LBA en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora, es una herramienta diagnóstica adecuada con valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN superiores a 80%.
- III. En el diagnóstico de Aspergilosis Invasora, la determinación de Galactomanano en líquido de LBA, ha demostrado ser una herramienta diagnóstica con un rendimiento significativamente superior a la determinación de Galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos.
- IV. La determinación de marcadores fúngicos (Galactomanano y (1→3)-β-D-glucano séricos, y Galactomanano en líquido de LBA), son técnicas que permiten un diagnóstico precoz respecto al cultivo de *Aspergillus spp.* Esto permitiría la instauración de un tratamiento antifúngico anticipado.
- V. La detección de (1→3)-β-D-glucano sérico en el diagnóstico de Enfermedad Fúngica Invasora es una técnica diagnóstica con alto VPN y una sensibilidad superior a 80%, pero baja especificidad. Resulta eficaz para descartar Enfermedad Fúngica Invasora, pero en el caso de un resultado positivo, se debe realizar estudios diagnósticos complementarios teniendo en cuenta los diferentes agentes etiológicos productores de Enfermedad Fúngica Invasora.
- VI. La detección de (1→3)-β-D-glucano sérico en el diagnóstico de Candidiasis Invasora es una técnica diagnóstica con alto VPN, una sensibilidad de 70% y muy bajo

VPP, resultando por tanto eficaz para descartar Candidiasis Invasora.

- VII. La determinación de (1→3)-β-D-glucano es una técnica que permite un diagnóstico precoz, respecto al cultivo de *Candida spp.* Esto permitiría la instauración de un tratamiento antifúngico anticipado.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Ostrosky-Zeichner L. New approaches to the risk of *Candida* in the intensive care unit. *Curr Opin Infect Dis.* 2003;16:533-537.
2. Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med.* 2009;37:1612-1618.
3. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Galván B, Blanco A, Castro C, et al. Usefulness of the "Candida score" for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: a prospective multicenter study. *Crit Care Med.* 2009;37:1624-1633.
4. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:27-34.
5. Polderman KH, Girbes AR. Central venous catheter use. Part 2: infectious complications. *Intensive Care Med.* 2002;28:18-28.
6. Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, et al. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis.* 2001;33:177-186.
7. Vandewoude K, Vogelaers D, Blot SI. Aspergillosis in the ICU the new 21st century problem? *Med Mycol.* 2006;44:S71-S76.
8. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clin Infect Dis.* 2007;45:205-216.

9. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit Care Med.* 1999;27:887-892.
10. De Vlieger GY, Mahieu EM, Meersseman W. Clinical review: What is the role for autopsy in the ICU? *Crit Care.* 2010;14:221.
11. Schwesinger G, Junghans D, Schroder G, Bernhardt H, Knoke M. Candidosis and aspergillosis as autopsy findings from 1994 to 2003. *Mycoses.* 2005;48:176-180.
12. Goldman L, Sayson R, Robbins S, Cohn LH, Bettmann M, Weisberg M. The value of the autopsy in three medical eras. *N Engl J Med.* 1983;308:1000-1005.
13. Dimopoulos G, Piagnerelli M, Berre J, Salmon I, Vincent JL. Post mortem examination in the intensive care unit: still useful? *Intensive Care Med.* 2004;30:2080-2085.
14. Alexander BD. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. *Transpl Infect Dis.* 2002;4 Supl 3:32-37.
15. Lehrnbecher T, Frank C, Engels K, Kriener S, Groll AH, Schwabe D. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect.* 2010;61:259-265.
16. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect.* 1996;33:23-32.
17. Gurgui M, Cuenca-Estrella M. Current status of invasive fungal infections. New diagnostic techniques and antifungal agents. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26 Supl 14:1-6.
18. Roosen J, Frans E, Wilmer A, Knockaert DC, Bobbaers H. Comparison of premortem clinical diagnoses in critically ill patients and subsequent autopsy findings. *Mayo Clin Proc.* 2000;75:562-567.

19. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med.* 2007;33:606-618.
20. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA.* 2009;302:2323-2329.
21. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:621-625.
22. Meersseman W, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in the ICU: an emerging disease. *Intensive Care Med.* 2007;33:1679-1681.
23. Nucci M. Emerging moulds: *Fusarium*, *Scedosporium* and *Zygomycetes* in transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis.* 2003;16:607-612.
24. Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis.* 2005;41:634-653.
25. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:609-622.
26. Peman J. Diagnosis of nosocomial aspergillosis. *Rev Iberoam Micol.* 2000;17:S90-S92.
27. Soubani AO, Chandrasekar PH. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Chest.* 2002;121:1988-1999.
28. Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20:545-61.
29. Glockner A, Karthaus M. Current aspects of invasive candidiasis and aspergillosis in adult intensive care patients. *Mycoses.* 2011;54:420-433.

30. Pasqualotto AC, Denning DW. Post-operative aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:1060-1076.
31. Valles J, Mesalles E, Mariscal D, del Mar Fernández M, Pena R, Jiménez JL, et al. A 7-year study of severe hospital-acquired pneumonia requiring ICU admission. *Intensive Care Med.* 2003;29:1981-1988.
32. Lamagni TL, Evans BG, Shigematsu M, Johnson EM. Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales (1990-9). *Epidemiol Infect.* 2001;126:397-414.
33. Pontón J, del Palacio A. Advances and limitations in the early diagnosis of invasive yeast infections. *Rev Iberoam Micol.* 2007;24:181-186.
34. Ruhnke M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. *Curr Drug Targets.* 2006;7:495-504.
35. Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. *Clin Infect Dis.* 2000;30:454-460.
36. Blot S, Vandewoude K. Management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Drugs.* 2004;64:2159-2175.
37. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr., Calandra TF, Edwards JE Jr., et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48:503-535.
38. Sánchez García M. Clinical spectrum of invasive candidiasis in critically ill non-neutropenic patients. *Rev Iberoam Micol.* 2006;23:8-11.
39. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20:485-506.
40. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin Infect Dis.* 2010;50:1101-1111.

41. León C, Álvarez-Lerma F, Ruiz-Santana S, León MA, Nolla J, Jorda R, et al. Fungal colonization and/or infection in non-neutropenic critically ill patients: results of the EPCAN observational study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28:233-242.
42. Voss A, le Noble JL, Verduyn Lunel FM, Foudraine NA, Meis JF. Candidemia in intensive care unit patients: risk factors for mortality. *Infection*. 1997;25:8-11.
43. Garey KW, Neuhauser MM, Bearden DT, Cannon JP, Lewis RE, Gentry LO, et al. Evaluation of antifungals in the surgical intensive care unit: a multi-institutional study. *Mycoses*. 2006;49:226-231.
44. Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis*. 2006;6:21.
45. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:133-163.
46. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP, National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis*. 2002;35:627-630.
47. Blot S, Janssens R, Claeys G, Hoste E, Buyle F, De Waele JJ, et al. Effect of fluconazole consumption on long-term trends in candidal ecology. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58:474-477.
48. Magill SS, Swoboda SM, Shields CE, Colantuoni EA, Fothergill AW, Merz WG, et al. The epidemiology of *Candida* colonization and invasive candidiasis in a surgical intensive care unit where fluconazole prophylaxis is utilized: follow-up to a randomized clinical trial. *Ann Surg*. 2009;249:657-665.

49. Dimopoulos G, Ntziora F, Rachiotis G, Armaganidis A, Falagas ME. *Candida albicans* versus non-*albicans* intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome. *Anesth Analg*. 2008;106:523-529.
50. Boktour MR, Kontoyiannis DP, Hanna HA, Hachem RY, Girgawy E, Bodey GP, et al. Multiple-species candidemia in patients with cancer. *Cancer*. 2004;101:1860-1865.
51. Olaechea PM, Palomar M, León-Gil C, Álvarez-Lerma F, Jordá R, Nolla-Salas J, et al. Economic impact of *Candida* colonization and *Candida* infection in the critically ill patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23:323-330.
52. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004;39(3):309-317.
53. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis*. 2003;37:1172-1177.
54. Held J, Koch MS, Reischl U, Danner T, Serr A. Serum (1 → 3)-beta-D-glucan measurement as an early indicator of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and evaluation of its prognostic value. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:595-602.
55. 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.
56. Akgun KM, Pisani M, Crothers K. The changing epidemiology of HIV-infected patients in the intensive care unit. *J Intensive Care Med*. 2011;26:151-164.
57. Sobel JD, Rex JH. Invasive candidiasis: turning risk into a practical prevention policy? *Clin Infect Dis*. 2001;33:187-190.
58. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Álvarez-Lerma F, et al. A bedside scoring system ("Candida score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Crit Care Med*. 2006;34:730-737.

59. Del Palacio A, Alhambra A, Cuétara MS, Pontón J. Early diagnosis of invasive fungal infections caused by *Aspergillus* and other emerging mycelial fungi]. Rev Iberoam Micol. 2007;24:187-197.
60. Álvarez-Lerma F, Palomar M, León C, Olaechea P, Cerda E, Bermejo B, et al. Fungal colonization and/or infection in intensive care units. Multicenter study of 1,562 patients. Med Clin (Barc). 2003;121:161-166.
61. Pontón J, del Palacio A. Influence of *Candida* colonization on the (1→3) beta-D-glucan assay. Clin Infect Dis. 2006;43:263-264.
62. Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD. Immunomodulatory therapies in sepsis. Intensive Care Med. 2000;26 Supl 1:S124-8.
63. Bulpa PA, Dive AM, Garrino MG, Delos MA, González MR, Evrard PA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease patients with invasive pulmonary aspergillosis: benefits of intensive care? Intensive Care Med. 2001;27:59-67.
64. Bailey RJ, Woolf IL, Cullens H, Williams R. Metabolic inhibition of polymorphonuclear leucocytes in fulminant hepatic failure. Lancet. 1976;1:1162-1163.
65. Ascah KJ, Hyland RH, Hutcheon MA, Urbanski SJ, Pruzanski W, St Louis EL, et al. Invasive aspergillosis in a "healthy" patient. Can Med Assoc J. 1984;131:332-335.
66. Bulpa P, Dive A, Sibille Y. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J. 2007;30:782-800.
67. Paphitou NI, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH. Rules for identifying patients at increased risk for candidal infections in the surgical intensive care unit: approach to developing practical criteria for systematic use in antifungal prophylaxis trials. Med Mycol. 2005;43:235-243.
68. Ostrosky-Zeichner L, Sable C, Sobel J, Alexander BD, Donowitz G, Kan V, et al. Multicenter retrospective development and validation of a clinical prediction rule for

- nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26:271-276.
69. Del Palacio A, Cuétara MS, Pontón J. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis]. *Rev Iberoam Micol*. 2003;20:90-98.
70. O'Shaughnessy EM, Shea YM, Witebsky FG. Laboratory diagnosis of invasive mycoses. *Infect Dis Clin North Am*. 2003;17:135-158.
71. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008;46:1813-1821.
72. Alexander BD, Pfaller MA. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. *Clin Infect Dis*. 2006;43:S15-27.
73. Reiss E, Obayashi T, Orle K, Yoshida M, Zancope-Oliveira RM. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Med Mycol*. 2000;38 Supl 1:147-159.
74. Cornillet A, Camus C, Nimubona S, Gandemer V, Tattevin P, Belleguic C, et al. Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin Infect Dis*. 2006;43:577-584.
75. Del Palacio A, Cuétara MS, Montejo JC. La aspergilosis invasora en el paciente crítico no neutropénico. En: Pontón J, editor. Segunda ed. Bilbao, España: Revista Iberoamericana de Micología; 2008. p. 31-39.
76. Cuétara MS, Alhambra A, Del Palacio A. Traditional microbiological diagnosis for invasive candidiasis in critical non-neutropenic patients. *Rev Iberoam Micol*. 2006;23:4-7.
77. Maertens J, Meersseman W, Van Bleyenbergh P. New therapies for fungal pneumonia. *Curr Opin Infect Dis*. 2009;22:183-190.

78. Berenguer J, Buck M, Witebsky F, Stock F, Pizzo PA, Walsh TJ. Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive candidiasis. Disseminated versus single-organ infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1993;17:103-109.
79. Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Med*. 1996;100:171-178.
80. Bouza E, Guinea J, Peláez T, Pérez-Molina J, Alcalá L, Muñoz P. Workload due to *Aspergillus fumigatus* and significance of the organism in the microbiology laboratory of a general hospital. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2075-2079.
81. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L, Chapman SW, et al. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2001;33:1824-1833.
82. Gadea I, Cuenca-Estrella M, Martín E, Pemán J, Pontón J, Rodríguez-Tudela JL. Microbiological procedures for diagnosing mycoses and for antifungal susceptibility testing. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25:336-340.
83. Yu VL, Muder RR, Poorsattar A. Significance of isolation of *Aspergillus* from the respiratory tract in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Results from a three-year prospective study. *Am J Med*. 1986;81:249-254.
84. Kontoyiannis DP, Sumoza D, Tarrand J, Bodey GP, Storey R, Raad II. Significance of aspergillemia in patients with cancer: a 10-year study. *Clin Infect Dis*. 2000;31:188-189.
85. Gavalda J, Len O, San Juan R, Aguado JM, Fortún J, Lumbreras C, et al. Risk factors for invasive aspergillosis in solid-organ transplant recipients: a case-control study. *Clin Infect Dis*. 2005;41:52-59.
86. Denning DW. Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet*. 2000;355:423-424.
87. Del Palacio A, Cuétara MS, García-Ruiz JC. ¿Qué se puede esperar del diagnóstico por imagen (radiológico) de la aspergilosis invasora? En: Pontón J, editor. *Aspergilosis Invasora*,

- guía de bolsillo. Segunda ed. Bilbao, España: Revista Iberoamericana de Micología; 2008. p. 59-68.
88. Trof RJ, Beishuizen A, Debets-Ossenkopp YJ, Girbes AR, Groeneveld AB. Management of invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2007;33:1694-1703.
89. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW, Stark P, Durand C, Lortholary O, et al. Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. *Clin Infect Dis.* 2007;44:373-379.
90. Caillot D, Couaillier JF, Bernard A, Casasnovas O, Denning DW, Mannone L, et al. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J Clin Oncol.* 2001;19:253-259.
91. Maertens J, Theunissen K, Lodewyck T, Lagrou K, Van Eldere J. Advances in the serological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections in patients with haematological disorders. *Mycoses.* 2007;50 Supl 1:2-17.
92. Pontón J. The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25:78-82.
93. Pazos C, Moragues MD, Quindós G, Pontón J, del Palacio A. Diagnostic potential of (1,3)-beta-D-glucan and anti-*Candida albicans* germ tube antibodies for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients. *Rev Iberoam Micol.* 2006;23:209-215.
94. Pazos C, Pontón J, Del Palacio A. Contribution of (1→3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol.* 2005;43:299-305.

95. Hachem RY, Kontoyiannis DP, Chemaly RF, Jiang Y, Reitzel R, Raad I. Utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1,3) beta-D-glucan in diagnosis of invasive fungal infections: low sensitivity for *Aspergillus fumigatus* infection in hematologic malignancy patients. *J Clin Microbiol.* 2009;47:129-133.
96. Maertens J, Verhaegen J, Demuyne H, Brock P, Verhoef G, Vandenberghe P, et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3223-3228.
97. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, Van Eldere J, Boogaerts M. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood.* 2001;97:1604-1610.
98. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis.* 2002;186:1297-1306.
99. Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, Verschakelen J, Lagrou K, Verbeken E, et al. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis.* 2005;41:1242-1250.
100. Koo S, Bryar JM, Page JH, Baden LR, Marty FM. Diagnostic performance of the (1→3)-beta-D-glucan assay for invasive fungal disease. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1650-1659.
101. Obayashi T, Negishi K, Suzuki T, Funata N. Reappraisal of the serum (1→3)-beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections--a study based on autopsy cases from 6 years. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1864-1870.

102. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1→3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis*. 2005;41:654-659.
103. Persat F, Ranque S, Derouin F, Michel-Nguyen A, Picot S, Sulahian A. Contribution of the (1→3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1009-1013.
104. Klont RR, Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Utility of *Aspergillus* antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis*. 2004;39:1467-1474.
105. Digby J, Kalbfleisch J, Glenn A, Larsen A, Browder W, Williams D. Serum glucan levels are not specific for presence of fungal infections in intensive care unit patients. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10:882-885.
106. Dalle F, Charles PE, Blanc K, Caillot D, Chavanet P, Dromer F, et al. *Cryptococcus neoformans* Galactoxylomannan contains an epitope(s) that is cross-reactive with *Aspergillus* Galactomannan. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2929-2931.
107. Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Non-culture-based diagnostics for opportunistic fungi. *Infect Dis Clin North Am*. 2006;20:711-27.
108. Latgé JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP, Diaquin M, Sarfati J, Wieruszeski JM, et al. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*. 1994;62:5424-5433.
109. Morelle W, Bernard M, Debeaupuis JP, Buitrago M, Tabouret M, Latgé JP. Galactomannoproteins of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*. 2005;4:1308-1316.
110. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2006;42:1417-1427.

111. Maertens JA, Klont R, Masson C, Theunissen K, Meersseman W, Lagrou K, et al. Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay. Clin Infect Dis. 2007 ;44:1329-1336.
112. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. Lancet Infect Dis. 2004;4:349-357.
113. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. J Infect Dis. 2004;190:641-649.
114. Becker MJ, Lugtenburg EJ, Cornelissen JJ, Van Der Schee C, Hoogsteden HC, De Marie S. Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage fluid and serum in haematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. Br J Haematol. 2003;121:448-457.
115. Boutboul F, Alberti C, Leblanc T, Sulahian A, Gluckman E, Derouin F, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease. Clin Infect Dis. 2002;34:939-943.
116. Maertens J, Buve K, Theunissen K, Meersseman W, Verbeken E, Verhoef G, et al. Galactomannan serves as a surrogate endpoint for outcome of pulmonary invasive aspergillosis in neutropenic hematology patients. Cancer. 2009;115:355-362.
117. Bennett JE, Kauffman C, Walsh T, de Pauw B, Dismukes W, Galgiani J, et al. Forum report: issues in the evaluation of diagnostic tests, use of historical controls, and merits of the current multicenter collaborative groups. Clin Infect Dis. 2003;36(Supl 3):S123-7.
118. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol. 1995;33:497-500.

119. Maertens J, Maertens V, Theunissen K, Meersseman W, Meersseman P, Meers S, et al. Bronchoalveolar lavage fluid galactomannan for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases. *Clin Infect Dis*. 2009;49:1688-1693.
120. He H, Ding L, Chang S, Li F, Zhan Q. Value of consecutive galactomannan determinations for the diagnosis and prognosis of invasive pulmonary aspergillosis in critically ill chronic obstructive pulmonary disease. *Med Mycol*. 2011;49:345-351.
121. Marr KA, Leisenring W. Design issues in studies evaluating diagnostic tests for aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2005;41 Supl 6:S381-386.
122. Stone BA, Clarke AE. Chemistry and biology of (1→3)beta-d-Glucan. Melbourne, Australia: La Trobe University Press; 1992.
123. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis*. 2004;39:199-205.
124. Yoshida K, Shoji H, Takuma T, Niki Y. Clinical viability of fungitell, a new (1,3)-B-D-glucan measurement kit, for diagnosis of invasive fungal infection, and comparison with other kits available in Japan. *J Infect Chemother*. 2011;17:473-7.
125. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, Tanaka K, Ishikawa N, et al. Plasma (1→3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *J Clin Microbiol* 1995;33:3115-3118.
126. Yuasa K, Goto H. (1→3)-beta-D-glucan in patients with pulmonary aspergilloma. *Mediators Inflamm*. 1997;6:285-287.
127. Tissot F, Lamoth F, Eggiman P, Bille J, Hauser P, Fluckiger U, et al. Monitoring of 1,3-beta-D-glucan in high-risk surgical ICU patients for early diagnosis of invasive candidiasis: a prospective study of the Swiss Fungal Infection Network (FUNGINOS). Poster presented

- en: 50th International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC); 2010 Sept 12-15; Boston, MA.
128. Mohr JF, Sims C, Paetznick V, Rodríguez J, Finkelman MA, Rex JH, et al. Prospective survey of (1→3)-beta-D-glucan and its relationship to invasive candidiasis in the surgical intensive care unit setting. *J Clin Microbiol.* 2011;49:58-61.
  129. Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1→3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5957-5962.
  130. Jones BL, McLintock LA. Impact of diagnostic markers on early antifungal therapy. *Curr Opin Infect Dis.* 2003;16:521-526.
  131. McMullan R, Metwally L, Coyle PV, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, et al. A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults. *Clin Infect Dis.* 2008;46:890-896.
  132. Versalovic J, Carrol KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. *Manual of Clinical Microbiology.* 10th ed. Washington DC: ASM Press; 2011.
  133. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of clinical fungi.* Second ed. Utrecht/Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2000.
  134. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:310-350.
  135. Tamura H, Tanaka S, Obayashi T, Yoshida M, Kawai T. A new sensitive microplate assay of plasma endotoxin. *J Clin Lab Anal.* 1992;6:232-238.
  136. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology.* 1982;143:29-36.
  137. Morace G, Borghi E. Fungal infections in ICU patients: epidemiology and the role of diagnostics. *Minerva Anestesiol.* 2010;76:950-956.

138. Tortorano AM, Dho G, Prigitano A, Breda G, Grancini A, Emmi V, et al. Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006-2008). *Mycoses*. 2011;55:73-79.
139. Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med*. 1988;148:2642-2645.
140. von Eiff M, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zuhlsdorf M, van de Loo J. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration*. 1995;62:341-347.
141. De Vlieger G, Lagrou K, Maertens J, Verbeken E, Meersseman W, Van Wijngaerden E. Beta-D-glucan detection as a diagnostic test for invasive aspergillosis in immunocompromised critically ill patients with symptoms of respiratory infection: an autopsy-based study. *J Clin Microbiol*. 2011;49:3783-3787
142. Presterl E, Parschalk B, Bauer E, Lassnigg A, Hajdu S, Graninger W. Invasive fungal infections and (1,3)-beta-D-glucan serum concentrations in long-term intensive care patients. *Int J Infect Dis*. 2009;13:707-712.
143. Heyland D, Jiang X, Day AG, Laverdiere M. Serum beta-d-glucan of critically ill patients with suspected ventilator-associated pneumonia: preliminary observations. *J Crit Care*. 2011;26:536.e1-536.e9.
144. Chamilos G, Luna M, Lewis RE, Bodey GP, Chemaly R, Tarrand JJ, et al. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). *Haematologica*. 2006;91:986-989.
145. Pastores SM, Dulu A, Voigt L, Raouf N, Alicea M, Halpern NA. Premortem clinical diagnoses and postmortem autopsy findings: discrepancies in critically ill cancer patients. *Crit Care*. 2007;11:R48.
146. Nadrous HF, Afessa B, Pfeifer EA, Peters SG. The role of autopsy in the intensive care unit. *Mayo Clin Proc*. 2003;78:947-950.

147. Sarode VR, Datta BN, Banerjee AK, Banerjee CK, Joshi K, Bhusnurmath B, et al. Autopsy findings and clinical diagnoses: a review of 1,000 cases. *Hum Pathol.* 1993;24:194-198.
148. Magret Iglesias M, Vidaur Tello L, Fernández Olsina S, García Fontgivell JF, Blázquez Vilàs S, Alonso Rubio S, et al. Discrepancies between clinical and pathological diagnosis in a polyvalent intensive care service. *Med Intensiva.* 2006;30:95-100.
149. Tejerina E, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Maria Rodríguez-Barbero J, Gordo F, Frutos-Vivar F, et al. Clinical diagnoses and autopsy findings: Discrepancies in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2011; [Epub ahead of print].
150. Wilson ML. Infectious diseases and the autopsy. *Clin Infect Dis.* 2006;43:602-603.
151. Siemann M, Koch-Dorfler M. The Platelia *Aspergillus* ELISA in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis (IPA). *Mycoses.* 2001;44:266-272.
152. Williamson EC, Oliver DA, Johnson EM, Foot AB, Marks DI, Warnock DW. *Aspergillus* antigen testing in bone marrow transplant recipients. *J Clin Pathol.* 2000;53:362-366.
153. Salonen J, Lehtonen OP, Terasjarvi MR, Nikoskelainen J. *Aspergillus* antigen in serum, urine and bronchoalveolar lavage specimens of neutropenic patients in relation to clinical outcome. *Scand J Infect Dis.* 2000;32:485-490.
154. Chan CM, Woo PC, Leung AS, Lau SK, Che XY, Cao L, et al. Detection of antibodies specific to an antigenic cell wall galactomannoprotein for serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus* aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2041-2045.
155. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Garban F, Hamidfar R, Ambroise-Thomas P, et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2003;4:2184-2186.
156. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, et al. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked

- immunosorbent assay for galactomannan, and a (1→3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2733-2741.
157. Husain S, Kwak EJ, Obman A, Wagener MM, Kusne S, Stout JE, et al. Prospective assessment of Platelia *Aspergillus* galactomannan antigen for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Am J Transplant.* 2004;4:796-802.
158. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E, Lagrou K, Verhaegen J, Boogaerts M, et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol.* 2004;126:852-860.
159. Weisser M, Rausch C, Droll A, Simcock M, Sendi P, Steffen I, et al. Galactomannan does not precede major signs on a pulmonary computerized tomographic scan suggestive of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis.* 2005;41:1143-1149.
160. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis.* 2005;40:1762-1769.
161. Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis.* 2007;44:531-540.
162. Clancy CJ, Jaber RA, Leather HL, Wingard JR, Staley B, Wheat LJ, et al. Bronchoalveolar lavage galactomannan in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis among solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1759-1765.

163. Nguyen MH, Jaber R, Leather HL, Wingard JR, Staley B, Wheat LJ, et al. Use of bronchoalveolar lavage to detect galactomannan for diagnosis of pulmonary aspergillosis among nonimmunocompromised hosts. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2787-2792.
164. Husain S, Paterson DL, Studer SM, Crespo M, Pilewski J, Durkin M, et al. *Aspergillus* galactomannan antigen in the bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Transplantation.* 2007;83:1330-1336.
165. Senn L, Robinson JO, Schmidt S, Knaup M, Asahi N, Satomura S, et al. 1,3-Beta-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. *Clin Infect Dis.* 2008;46:878-885.
166. Ellis M, Al-Ramadi B, Finkelman M, Hedstrom U, Kristensen J, Ali-Zadeh H, et al. Assessment of the clinical utility of serial beta-D-glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. *J Med Microbiol.* 2008;57:287-295.
167. Lunel FM, Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, van der Lee HA, Donnelly JP, Blijlevens NM, et al. Value of *Candida* serum markers in patients with invasive candidiasis after myeloablative chemotherapy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;64:408-415.
168. Alexander BD, Smith PB, Davis RD, Perfect JR, Reller LB. The (1,3){beta}-D-glucan test as an aid to early diagnosis of invasive fungal infections following lung transplantation. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4083-4088.
169. Pasqualotto AC, Xavier MO, Sanchez LB, de Oliveira Costa CD, Schio SM, Camargo SM, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients by detection of galactomannan in the bronchoalveolar lavage fluid. *Transplantation.* 2010;90:306-311.
170. Posteraro B, De Pascale G, Tumbarello M, Torelli R, Pennisi MA, Bello G, et al. Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1→3)-beta-D-glucan assay, *Candida* score, and colonization index. *Crit Care.* 2011;15:R249.

171. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, 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.
172. Klont RR, Meis JF, Verweij PE. Critical assessment of issues in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7( Supl 2):32-37.
173. Meersseman W, Lagrou K, Spriet I, Maertens J, Verbeken E, Peetermans WE, et al. Significance of the isolation of *Candida* species from airway samples in critically ill patients: a prospective, autopsy study. *Intensive Care Med.* 2009;35:1526-1531.
174. Balloy V, Huerre M, Latge JP, Chignard M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun.* 2005;73:494-503.
175. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, Bucci B, Bruzzi P, Van Lint MT, et al. False-positive galactomannan platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis.* 2004;38:913-916.
176. Aubry A, Porcher R, Bottero J, Touratier S, Leblanc T, Brethon B, et al. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol.* 2006;44:389-394.
177. Bart-Delabesse E, Basile M, Al Jijakli A, Souville D, Gay F, Philippe B, et al. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigenemia to determine biological and clinical implications of beta-lactam treatments. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5214-5220.
178. Metan G, Agkus C, Buldu H, Koc AN. The interaction between piperacillin/tazobactam and assays for *Aspergillus* galactomannan and 1,3-beta-D-glucan in patients without risk factors for invasive fungal infections. *Infection.* 2010;38:217-221.

179. Adam O, Auperin A, Wilquin F, Bourhis JH, Gachot B, Chachaty E. Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive *Aspergillus* galactomannan antigen test results for patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis*. 2004;38:917-920.
180. Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, Van Eldere J. False-positive *Aspergillus* galactomannan antigen test results. *Clin Infect Dis*. 2004;39:289-290.
181. Sulahian A, Touratier S, Ribaud P. False positive test for *Aspergillus* antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam. *N Engl J Med*. 2003;349:2366-2367.
182. El Saleeby CM, Allison KJ, Knapp KM, Walsh TJ, Hayden RT. Discordant rise in galactomannan antigenemia in a patient with resolving Aspergillosis, renal failure, and ongoing hemodialysis. *J Clin Microbiol*. 2005;43:3560-3563.
183. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Klont RR, Warris A, Gavini F, Op den Camp HJ, et al. Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. *J Clin Microbiol*. 2005;43:3925-3931.
184. Murashige N, Kami M, Kishi Y, Fujisaki G, Tanosaki R. False-positive results of *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assays for a patient with gastrointestinal graft-versus-host disease taking a nutrient containing soybean protein. *Clin Infect Dis*. 2005;40:333-334.
185. Rohrllich P, Sarfati J, Mariani P, Duval M, Carol A, Saint-Martin C, et al. Prospective sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for serum galactomannan: early predictive value and clinical use in invasive aspergillosis. *Pediatr Infect Dis J*. 1996;15:232-237.
186. Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P, Leblanc T, Lacroix C, Derouin F. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer*. 2001;91:311-318.

187. Albert O, Toubas D, Strady C, Cousson J, Delmas C, Vernet V, et al. Reactivity of (1→3)-beta-d-glucan assay in bacterial bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30:1453-60.
188. Marty FM, Lowry CM, Lempitski SJ, Kubiak DW, Finkelman MA, Baden LR. Reactivity of (1→3)-beta-d-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3450-3453.
189. Mennink-Kersten MA, Warris A, Verweij PE. 1,3-beta-D-glucan in patients receiving intravenous amoxicillin-clavulanic acid. *N Engl J Med.* 2006;354:2834-2835.
190. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Verweij PE. *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of 1,3-beta-D-glucan assay reactivity. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1930-1931.
191. Nakao A, Yasui M, Kawagoe T, Tamura H, Tanaka S, Takagi H. False-positive endotoxemia derives from gauze glucan after hepatectomy for hepatocellular carcinoma with cirrhosis. *Hepatogastroenterology.* 1997;44:1413-1418.
192. Kanamori H, Kanemitsu K, Miyasaka T, Ameku K, Endo S, Aoyagi T, et al. Measurement of (1-3)-beta-D-glucan derived from different gauze types. *Tohoku J Exp Med.* 2009;217:117-121.
193. Kato A, Takita T, Furuhashi M, Takahashi T, Maruyama Y, Hishida A. Elevation of blood (1→3)-beta-D-glucan concentrations in hemodialysis patients. *Nephron.* 2001;89:15-19.
194. Kanda H, Kubo K, Hamasaki K, Kanda Y, Nakao A, Kitamura T, et al. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)-beta-D-glucan level. *Kidney Int.* 2001 Jul;60:319-323.
195. Ikemura K, Ikegami K, Shimazu T, Yoshioka T, Sugimoto T. False-positive result in Limulus test caused by Limulus amebocyte lysate-reactive material in immunoglobulin products. *J Clin Microbiol.* 1989;27:1965-1968.

196. Ogawa M, Hori H, Niiguchi S, Azuma E, Komada Y. False-positive plasma (1→3)-beta-D-glucan test following immunoglobulin product replacement in an adult bone marrow recipient. *Int J Hematol.* 2004;80:97-98.
197. Kakinuma A, Asano T, Torii H, Sugino Y. Gelation of *Limulus* amoebocyte lysate by an antitumor (1 leads to 3)-beta-D-glucan. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981;101:434-439.
198. Usami M, Ohata A, Horiuchi T, Nagasawa K, Wakabayashi T, Tanaka S. Positive (1-->3)-beta-D-glucan in blood components and release of (1→3)-beta-D-glucan from depth-type membrane filters for blood processing. *Transfusion.* 2002;42:1189-1195.
199. Samonis G, Kofteridis DP, Maraki S, Alegakis D, Mantadakis E, Papadakis JA, et al. Levofloxacin and moxifloxacin increase human gut colonization by *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:5189.
200. Honda S, Sugino H, Asano T, Kakinuma A. Activation of the alternative pathway of complement by an antitumor (1→3)-beta-D-glucan from *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* IFO 13140, and its lower molecular weight and carboxymethylated derivatives. *Immunopharmacology.* 1986;11:29-37.
201. Marty FM, Koo S, Bryar J, Baden LR. (1→3)beta-D-glucan assay positivity in patients with *Pneumocystis (carinii) jiroveci* pneumonia. *Ann Intern Med.* 2007;147:70-72.
202. Cuetara MS, Alhambra A, Chaves F, Moragues MD, Pontón J, del Palacio A. Use of a serum (1→3)-beta-D-glucan assay for diagnosis and follow-up of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2008;47:1364-1366.
203. Kami M, Tanaka Y, Kanda Y, Ogawa S, Masumoto T, Ohtomo K, et al. Computed tomographic scan of the chest, latex agglutination test and plasma (1AE3)-beta-D-glucan assay in early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a prospective study of 215 patients. *Haematologica.* 2000;85:745-752.

204. Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, Pagliari G, Fianchi L, Mele L, et al. Comparison of real-time PCR, conventional PCR, and galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3922-3925.
205. Nguyen MH, Leather H, Clancy CJ, Cline C, Jantz MA, Kulkarni V, et al. Galactomannan testing in bronchoalveolar lavage fluid facilitates the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies and stem cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17:1043-1050.
206. Hage CA, Knox KS, Davis TE, Wheat LJ. Antigen detection in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of fungal pneumonia. *Curr Opin Pulm Med.* 2011;17:167-171.
207. Borrás R, Rosello P, Chilet M, Bravo D, de Lomas JG, Navarro D. Positive result of the *Aspergillus* galactomannan antigen assay using bronchoalveolar lavage fluid from a patient with an invasive infection due to *Lichtheimia ramosa*. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3035-3036.
208. Wheat LJ, Hackett E, Durkin M, Connolly P, Petraitiene R, Walsh TJ, et al. Histoplasmosis-associated cross-reactivity in the BioRad Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14:638-640.
209. Persat F, Vanon P, Ranque S, Picot S. *Candida albicans* interferes with galactomannan antigenaemia in human bronchoalveolar lavage fluids. Poster presentado en: 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2010 Abril 10-13; Viena, Austria.
210. Park SY, Lee SO, Choi SH, Sung H, Kim MN, Choi CM, et al. *Aspergillus* galactomannan antigen assay in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect.* 2010;61:492-498.

211. Husain S, Clancy CJ, Nguyen MH, Swartzentruber S, Leather H, LeMonte AM, et al. Performance characteristics of the Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay for detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in bronchoalveolar lavage fluid. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15:1760-1763.
212. Maertens J, Theunissen K, Lagrou K. Reply to Rijnders and Slobbe and to Donnelly and Leeflang. *Clin Infect Dis.* 2010;50:1071-1073.
213. Saito T, Shime N, Itoh K, Fujita N, Saito Y, Shinozaki M, et al. Disseminated aspergillosis following resolution of *Pneumocystis* pneumonia with sustained elevation of beta-glucan in an Intensive Care Unit: a case report. *Infection.* 2009;37:547-550.
214. Desmet S, Van Wijngaerden E, Maertens J, Verhaegen J, Verbeken E, De Munter P, et al. Serum (1-3)-beta-D-glucan as a tool for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection or hematological malignancy. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3871-3874.
215. Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis.* 2006;43:25-31.
216. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:3640-3645.

## **8. ANEXOS**