







**Universidad  
Zaragoza**



**Aragón**  
Instituto de Investigación  
Sanitaria Aragón



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



**icb**  
INSTITUTO DE  
CARBOQUIMICA



Hospital Universitario  
**Miguel Servet**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Tesis Doctoral

**“Análisis de bis(metiltio)gliotoxina como biomarcador  
para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora. Validez de  
su detección serológica y distribución dentro del género  
*Aspergillus*”**

Memoria presentada por:

**Matxalen Vidal García**

Licenciada en Farmacia para optar al grado de

Doctor en Ciencias por la Universidad de Zaragoza

Septiembre 2017





**Universidad  
Zaragoza**



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Hospital Universitario  
**Miguel Servet**

Dña. **Eva M<sup>a</sup> Gálvez Buerba**, Doctora en Ciencias y Científica Titular en el Instituto de Carboquímica (ICB, CSIC), D. **Julián Pardo Jimeno**, Doctor en Ciencias e Investigador ARAID en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA) de la Universidad de Zaragoza y D. **Antonio Rezusta López**, Doctor en Medicina e Investigador Asociado de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: “**Análisis de bis(metil)gliotoxina como biomarcador para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora. Validez de su detección serológica y distribución dentro del género Aspergillus**”, ha sido realizada por la Licenciada en Farmacia Matxalen Vidal García en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza bajo nuestra dirección y que reúne, a nuestro juicio, las condiciones requeridas para que su autor pueda optar al Grado de Doctor en Ciencias por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, 30 de Junio de 2017

Fdo. Eva M<sup>a</sup> Gálvez

Fdo. Julián Pardo

Fdo. Antonio Rezusta



Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través de un contrato de Investigador Iniciado en la Universidad de Zaragoza (PUI15/168), así como por el Instituto de Salud Carlos III a través de un contrato de formación en investigación Río Hortega (CM16/00236), siendo Matxalen Vidal García la beneficiaria de ambos.



## Agradecimientos

Todas las tesis tienen otra historia que merece ser contada aparte de la inmensurable cantidad de datos, experimentos y citas que normalmente contienen. La historia de esta tesis comienza el último día de residencia de mi residente mayor **Cristina Colmenarejo**. Ella había estado colaborando con **Julián Pardo** y **Eva Gálvez** en la detección de especies de *Aspergillus* productoras de gliotoxina, pero había terminado su periodo de residencia y debía irse, por lo que me pasó el testigo. Cristina es una persona espectacular. Realmente solo coincidimos un año durante la residencia porque como digo ella era R4 cuando yo empecé. Después hicimos un curso juntas y vivió algunos meses en mi piso de alquiler. La verdad es que siempre me ha enriquecido hablar con ella por su manera tan diferente de ver las cosas. Además, no puede parar quieta, siempre está haciendo cosas, siempre sigue formándose y es un modelo a seguir para mí. Solo puedo darle las gracias de todo corazón ya que probablemente sea la persona que más ha tenido que ver con que esta Tesis diese comienzo. Por otra parte, significó mucho para mí que me recomendase para trabajar en Cruces, pero eso es otra historia...volvamos a la Tesis. Como Cristina siempre me había dado muy buenos consejos y yo soy muy bien mandada le hice caso y continué lo que ella había empezado. Así, sin quererlo y de manera un tanto improvisada comenzó a urdirse esta Tesis Doctoral que al principio fue un deseo y hoy es una realidad.

Empezaron las tardes de experimentos después de las mañanas de residencia, que fueron bastante duras, sobre todo cuando empecé el máster y

no había tiempo para nada. Afortunadamente estaban **Elena Andrés** (que colaboraba con Antonio) y **Pilar Soria** (mi residente pequeña) para hacer esos días más amenos. Ambas se han convertido en amigas después de estos años. Con Elena he salido, he viajado, he ido de compras, a tomar algo, he hecho de todo. Admiro la capacidad que ha tenido de forjar su presente, es muy inspirador y le agradezco que haya estado ahí todo este tiempo. Si Elena completaba mi tiempo fuera del trabajo, Pilar lo hacía dentro. Menos mal que estaba ella para los desayunos y las comidas de tupper. Ha sido literalmente mi cómplice en el trabajo, nadie me ha entendido mejor que ella en todo este proceso. Me ha ayudado siempre que lo he necesitado y se lo agradezco profundamente.

Entre la residencia y la Tesis, el Servicio de Microbiología del Hospital Miguel Servet se convirtió en mi hogar y las personas que lo conforman, en mi familia. La verdad es que son una pasada: **Silvia, Alicia, Nieves, Nines, Victoria, Mati, Yolanda, Pilar, Rebeca** y otras muchas, siempre con una sonrisa, siempre dispuestas a ayudarme: a guardarme los sueros cuando no estoy, a darme un poco del líquido para limpiar la campana, a dejar que les robe HEPES y glutamina... Gracias, chicas.

Si hablamos de investigación en el Miguel Servet, inevitablemente nos viene a la cabeza el nombre de **Antonio Rezusta**. Él fue mi tutor durante la residencia y también lo ha sido en la presente Tesis. Si hay una palabra que en mi opinión define a Antonio es entusiasta, es un hervidero de ideas, le apasiona lo que hace y eso lo transmite a todos los que hemos trabajado con él. Debo agradecerle la confianza depositada en mí, así como sus opiniones y consejos

siempre críticos y sinceros que me han convertido en la Investigadora que hoy soy.

Siguiendo con el Servicio de Micro, les agradezco mucho el apoyo e interés que siempre han mostrado **Cruz, Gloria, Ana Sapiña, Lourdes**, etc. Me gustaría agradecer a **Pilar Egido** la provisión de libros, la lectura me ha servido para desconectar en más de una ocasión. Con especial cariño quiero agradecer a **Manuel Omeñaca** haberme aguantado. Me ha encantado estar cerca de él todos estos años intentando que se me pegara algo de su inmensa sabiduría. Siempre se ha mostrado dispuesto a ayudarme, muchísimas gracias.

Tanto trabajo, esfuerzo y sacrificio empezaron a dar resultado y seleccionaron uno de mis trabajos para una comunicación oral en un congreso europeo. La verdad es que fue bastante impresionante hablar delante de tanta gente en inglés pero allí estaban mis compañeros Pilar, **Sonia Ruiz** y **Jorge Arribas** para inmortalizar el momento. Jorge ha sido mi compañero de congresos durante estos años: Barcelona, Copenhague, Ámsterdam, Viena ¡y los que nos quedan!

Poco después se unió al grupo de investigación nuestro biotecnólogo y Maestro Cervecerero, **Sergio Redrado** y al año siguiente lo haría **Patricia Marquina**, muchas gracias a los dos por vuestro trabajo con las PCR. Sé que tampoco ha sido fácil para vosotros apostar por la investigación, por eso tiene aún más mérito. Pero nuestra relación no se ha limitado al laboratorio, hemos quedado para comidas y cafés con hielo y más de una cerveza. Muchas gracias por todos esos buenos ratos.

Durante el último año hemos pasado muchas, muchas horas en Carboquímica haciendo PCRs, analizando sueros y filtrados. Allí siempre estaba **Pilar Domingo**. Tan metódica, tan tranquila. La verdad es que inspira mucha seguridad, siempre se interesa por nosotros y nos soluciona todo lo que necesitamos.

Además, hemos formado parte de una forma más activa en el grupo de Julián Pardo en el CIBA. Allí están los compañeros **Maykel, Llipsy, Laura y Pilar**. Como nos llevan ventaja en esto de la Investigación, suelo tener que preguntarles y pedirles bastantes cosas. Se nota que son un gran equipo porque son tremendamente colaboradores, y tienen muy buen ambiente.

Supongo que algo habrá tenido que ver en hacer equipo el estar a las órdenes de **Julián y Eva**. En todo este tiempo he podido conocerles mejor y solo puedo decir que son aún mejores personas que científicos. Han demostrado su calidad como personas. Se involucran y comprometen con todos y cada uno de los miembros de su grupo y nos apoyan en todo, pero sobre todo, intentan entender la situación de cada uno de nosotros. Muchas, muchas gracias.

Con la incorporación al contrato Río Hortega, he conocido a la gente de la UIT. Mis compañeros de despacho **Blanca, Lorena, Javier y Andrea** me han estado animando y apoyando estos últimos meses de la Tesis, que han sido realmente duros. Os lo agradezco de veras.

Si todas estas personas han sido imprescindibles para poder elaborar la tesis, hay otras personas imprescindibles para ser quien soy: mi familia y mis amigas. Son simplemente lo mejor que tengo. De **aita** he aprendido su

capacidad de trabajo, de esfuerzo, de superación y de sacrificio. Sé que todo lo que haces lo haces por nosotros. Gracias. Y qué voy a decir de **Ama**, ¿qué se puede decir de una madre, acaso no son las personas más excepcionales del mundo mundial? Os quiero. También a **Lander**. Gracias por hacerme millones de favores. Importantísimos también los **abuelos** y los **tíos Ana y Teo**. Gracias por coserme vestidos, hacerme tortillas, darme verduras de la huerta y un millón de cosas más. Gracias **Argiñe** por ayudarme a pintar el piso a 40 °C en Zaragoza sin saber que tenía aire acondicionado...

Para el final pero no menos importante dejo a mis **amigas Carmen, Izaskun Iratxe, Amaia, Rubén, Xandra...** las personas que mejor me conocen, las personas con las que puedo ser yo misma y que me dicen hasta lo que no me gusta oír. Sois las mejores, el motivo de que yo sea así. Espero que el tiempo no nos separe y si así fuera recordemos: "*Friends are like stars; you don't have to see them to know they are there*".

A **Dan** sólo puedo agradecerle tantos buenos consejos para la vida como para las presentaciones. Has hecho que el diseño de mis trabajos mejore notablemente. Me alegro de que hayas encontrado a alguien que merezca la pena.

Si ha habido una persona que ha estado a mi lado día a día estos días es sin duda **Julio**, gracias por hacer el café todas las mañanas y por cerrar la puerta de casa todas las noches, los pequeños gestos son a veces los más importantes. Gracias por aguantar todas mis rarezas, que no son precisamente pocas.

Aunque esta historia se acabe aquí, otras vendrán y sé que tod@s estaréis en mi vida y yo estaré en las aventuras que vosotr@s emprendáis, al fin y al cabo somos compañer@s de este viaje.

...y me siento mejor

si sé que tengo una estrellita pequeñita pero firme

Sucedde (Extremoduro)

**“Que tus decisiones reflejen tus esperanzas, no tus temores”**

Nelson Mandela

**A aita y ama**



## Abreviaturas

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AI	Aspergilosis Invasora
BAS	Broncoaspirado selectivo
BG	(1→3)β-D-glucano
BmGT	Bis(metiltio)gliotoxina
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COR	Característica Operativa del Receptor
CYP	Citocromo P
DCM	Diclorometano
DO	Densidad Óptica
DE	Desviación Estándar
EAPCRI	del inglés: European <i>Aspergillus</i> PCR Initiative (Iniciativa Europea <i>Aspergillus</i> -PCR)
EICH	Enfermedad Injerto Contra Huésped
EORTC	del inglés: European Organization for Research and Treatment of Cancer (Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer)
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ETP	Epipolítiodioxopiperazina

FDA	del inglés: Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
GM	Galactomanano
GSH	Glutación
GT	Gliotoxina
HEPES	Ácido hidroxietil-piperazinetanosulfónico
HPLC	del inglés: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia)
HPTLC	del inglés: High Performance Thin Layer Chromatography (Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficacia)
HUMS	Hospital Universitario Miguel Servet
IC	Intervalo de Confianza
IFI	Infección Fúngica Invasora
IFN- $\gamma$	Interferón $\gamma$
IL	Interleukina
ISHAM	del inglés: International Society for Human and Animal Mycoses (Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal)
LBA	Lavado broncoalveolar
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
MSG	del inglés: Mycoses Study Group (Grupo de Estudio de las Micosis)
PCR	del inglés: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

PMN	Polimorfonucleares
ROS	del inglés: Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas de Oxígeno)
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SAM	S-adenosil-metionina
EEM	Error Estándar de la Media
SH <sub>2</sub> -GT	Ditiol gliotoxina (gliotoxina reducida)
TAA	Terapia Antifúngica Anticipada
TAE	Terapia Antifúngica Empírica
TC	Tomografía Computerizada
Th	Linfocito T colaborador
TLR	del inglés: Toll Like Receptor (Receptor de tipo Toll)
TNF- $\alpha$	del inglés: Tumor Necrosis Factor (Factor de Necrosis Tumoral) $\alpha$
TOS	Trasplante de Órgano Sólido
TPH	Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Positivo
$\lambda$	Longitud de onda



## Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	31
1.1. El género <i>Aspergillus</i> .....	33
1.2. Presentaciones clínicas .....	37
1.2.1. Aspergilosis cutánea .....	39
1.2.2. Aspergilosis pulmonar.....	39
1.2.2.1. Aspergilosis broncopulmonar alérgica .....	39
1.2.2.2. Aspergiloma .....	40
1.2.2.3. Aspergilosis necrotizante crónica .....	40
1.2.2.4. Traqueobronquitis .....	41
1.2.2.5. Aspergilosis pulmonar invasora .....	42
1.2.3. Aspergilosis diseminada .....	42
1.2.4. Rinosinusitis .....	43
1.2.5. Infección del sistema nervioso central.....	44
1.2.6. Endocarditis .....	44
1.2.7. Queratitis y endoftalmitis.....	45
1.2.8. Aspergilosis gastrointestinal.....	45
1.3. Patogénesis de la aspergilosis invasora .....	46
1.4. Factores y pacientes de riesgo.....	49
1.4.1. Pacientes de riesgo.....	53
1.5. Epidemiología .....	55

1.5.1. Pacientes hematológicos .....	56
1.5.2. Receptores de órgano sólido.....	57
1.5.2.1. Pulmón.....	57
1.5.2.2. Hígado .....	57
1.5.2.3. Corazón.....	58
1.5.2.4. Riñón .....	58
1.5.3. Pacientes en Unidades de Cuidados Intensivos.....	58
1.5.4. Pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica .....	59
1.6. Diagnóstico de la aspergilosis invasora.....	59
1.6.1. Técnicas de imagen.....	60
1.6.2. Fibrobroncoscopía .....	61
1.6.3. Histología .....	62
1.6.4. Microbiología.....	63
1.6.4.1. Microscopía .....	63
1.6.4.2. Cultivo .....	64
1.6.4.3. Detección de antígenos circulantes .....	64
1.7. Clasificación de la aspergilosis invasora .....	65
1.7.1. Aspergilosis invasora posible .....	66
1.7.2. Aspergilosis invasora probable .....	67
1.7.3. Aspergilosis invasora probada.....	67
1.8. Biomarcadores en el diagnóstico de aspergilosis invasora.....	68
1.8.1. Biomarcadores empleados en la práctica clínica .....	68

---

1.8.1.1. Galactomanano .....	68
1.8.1.2. (1→3)β-D-glucano .....	71
1.8.1.3. Detección de ácidos nucleicos.....	72
1.8.2. Biomarcadores en investigación .....	75
1.8.2.1. Dispositivo de flujo lateral.....	76
1.8.2.2. Compuestos orgánicos volátiles .....	77
1.8.2.3. Gliotoxina.....	77
1.8.2.4. Bis(metiltio)gliotoxina .....	84
1.9. Antifúngicos.....	86
1.9.1. Triazoles.....	87
1.9.1.1. Itraconazol.....	88
1.9.1.2. Voriconazol .....	90
1.9.1.3. Posaconazol .....	93
1.9.1.4. Isavuconazol .....	95
1.9.2. Polienos.....	96
1.9.3. Equinocandinas .....	100
1.9.4. Terapia combinada.....	102
1.10. Utilidad de los biomarcadores en diferentes estrategias terapéuticas .....	103
1.10.1. Profilaxis antifúngica en pacientes en riesgo de aspergilosis invasora ...	104
1.10.2. Estrategias de terapia antifúngica anticipada .....	106
1.10.3. Tratamiento empírico .....	107
1.10.4. Tratamiento dirigido.....	108

1.10.5. Combinación de biomarcadores .....	110
<b>2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS .....</b>	<b>113</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>119</b>
3.1. Análisis de la producción de GT y bmGT <i>de novo</i> .....	119
3.1.1. Procedencia de los aislados .....	119
3.1.2. Pase de archivo.....	119
3.1.3. Cultivo en medio líquido .....	120
3.1.4. Extracción química de GT y bmGT .....	121
3.1.5. Detección y cuantificación de GT y bmGT mediante HPTLC .....	122
3.2. Análisis de la producción de bmGT tras la adición de GT exógena.....	127
3.2.1. Procedencia de los aislados y pase de archivo .....	127
3.2.2. Cultivo en medio líquido .....	127
3.2.3. Adición de GT.....	128
3.2.4. Extracción química, detección y cuantificación de GT y bmGT mediante HPTLC.....	128
3.3. Análisis de la producción de GT y bmGT en presencia de voriconazol.....	128
3.3.1. Procedencia de los aislados y pase de archivo .....	129
3.3.2. Cultivo en medio líquido .....	129
3.3.3. Adición de voriconazol.....	129
3.3.4. Extracción química de voriconazol .....	130
3.3.5. Detección y cuantificación de voriconazol mediante HPTLC.....	130
3.3.6. Ensayo de viabilidad fúngica.....	131

---

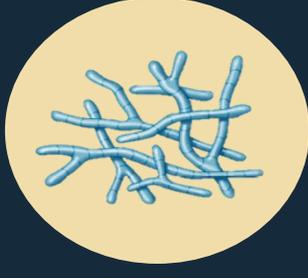
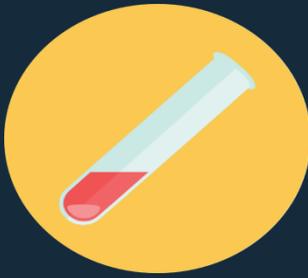
3.4. Utilidad de la bmGT en el diagnóstico y manejo de pacientes en riesgo de aspergilosis invasora.....	133
3.4.1. Validación clínica de la detección de bmGT en el diagnóstico de aspergilosis invasora.....	133
3.4.1.1. Pacientes .....	135
3.4.1.2. Sueros .....	135
3.4.1.3. Detección de GM .....	136
3.4.1.4. Extracción química de GT, bmGT y voriconazol.....	137
3.4.1.5. Detección y cuantificación de GT, bmGT y voriconazol mediante HPTLC .....	137
3.4.1.6. Recogida de datos.....	137
3.4.2. Correlación entre la detección de bmGT y la gravedad clínica .....	138
3.4.2.1. Pacientes y sueros.....	138
3.4.2.2. Detección de GM, GT y bmGT .....	138
3.4.2.3. Recogida de datos.....	138
3.4.3. Efecto del voriconazol en la detección de bmGT .....	139
3.4.3.1. Pacientes y sueros.....	139
3.4.3.2. Detección de bmGT y voriconazol .....	139
3.4.3.3. Recogida de datos.....	139
3.4.4. Reactividad cruzada .....	140
3.4.4.1. Pacientes .....	140
3.4.4.2. Sueros .....	140

3.4.4.3. Detección de GT y bmGT.....	140
3.4.4.4. Recogida de datos.....	141
3.5. Comité de ética .....	141
3.6. Análisis estadísticos .....	141
3.6.1. Estadística descriptiva .....	142
3.6.2. Estadística analítica.....	143
3.6.3. Programas informáticos .....	144
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>147</b>
4.1. Producción de GT y bmGT <i>de novo</i> .....	147
4.2. Producción de bmGT tras la adición de GT exógena.....	152
4.3. Producción de GT y bmGT en presencia de voriconazol.....	155
4.4. Utilidad de la bmGT en el diagnóstico y manejo de aspergilosis invasora.....	159
4.4.1. Validación clínica de la detección de bmGT en el diagnóstico de aspergilosis invasora .....	159
4.4.1.1. Rendimiento de la bmGT y del GM en el diagnóstico de aspergilosis invasora según la clasificación EORTC/MSG .....	164
4.4.1.2. Rendimiento de la bmGT y del GM en el diagnóstico de aspergilosis invasora excluyendo el GM de los criterios micológicos de la clasificación EORTC/MSG.....	165
4.4.1.3. Rendimiento de la bmGT y del GM en el diagnóstico de aspergilosis invasora incluyendo la bmGT en los criterios micológicos de la clasificación EORTC/MSG.....	166

---

4.4.2. Correlación entre la detección de bmGT y la gravedad clínica .....	167
4.4.2.1. Correlación con la mortalidad .....	168
4.4.2.2. Correlación con el tratamiento antifúngico .....	168
4.4.3. Efecto del voriconazol en la detección de bmGT .....	169
4.4.4. Reactividad cruzada .....	171
4.4.5. Comportamiento de la bmGT en casos de infección fúngica invasora probada.....	172
4.4.5.1. Infección fúngica invasora diseminada por probable <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	173
4.4.5.2. Infección fúngica invasora de senos paranasales por <i>Fusarium verticillioides</i> y <i>Aspergillus flavus</i> .....	175
4.4.5.3. Aspergilosis diseminada por <i>Aspergillus fumigatus</i> en paciente inmunocompetente .....	178
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	185
5.1. Estudios de producción de GT y bmGT <i>in vitro</i> .....	185
5.2. Utilidad de la bmGT en el diagnóstico y manejo de la aspergilosis invasora ..	194
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	207
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	211





## Introducción



## 1. INTRODUCCIÓN

Las terapias inmunosupresoras así como los fármacos citotóxicos, aunque han supuesto un gran avance médico al permitir técnicas y tratamientos antes impensables (como el trasplante de órgano sólido (TOS) o el tratamiento de enfermedades autoinmunes) han ocasionado un aumento del número de pacientes con un estado inmune debilitado en riesgo de infecciones oportunistas [1].

La infección fúngica invasora (IFI) ha aumentado su incidencia en los últimos años, no sólo por un mayor número de pacientes de riesgo, sino por los avances en las técnicas diagnósticas [2]. La principal IFI continúa siendo la candidiasis y entre los hongos filamentosos, las infecciones por *Aspergillus* spp son las más prevalentes, con una incidencia global del 12,3 % que aumenta hasta el 33,8 % en pacientes de riesgo como la población hematológica [1].

El género *Aspergillus* comprende más de 300 especies de hongos filamentosos. Es ubicuo y está distribuido por todo el mundo; en el suelo, el agua, los alimentos y otros nichos medio ambientales. Algunas especies de *Aspergillus* producen micotoxinas, dañinas para el ser humano y los animales cuando son ingeridas. Sin embargo, la forma de infección habitual para el hombre es a través de la inhalación de sus esporas. La infección producida por estos hongos se denomina aspergilosis [3].

En función del estado inmunitario del paciente y de los factores de riesgo que éste presente, la diversidad de procesos que el hongo puede producir varían en su gravedad. Estos síndromes incluyen (i) la colonización por el

microorganismo, como las masas de hongos debidas a *Aspergillus* spp (también denominadas aspergilomas), (ii) las respuestas alérgicas frente al hongo, incluida la aspergilosis broncopulmonar alérgica y (iii) las infecciones semiinvasivas o invasivas, que abarcan desde la neumonía necrotizante crónica hasta la aspergilosis invasora (AI). La localización más habitual es la pulmonar, tras la inhalación de esporas, aunque la afectación ocular, cerebral, ósea o cutánea, entre otras, también son posibles [4].

La forma más grave de aspergilosis es la AI, la cual presenta una elevada morbimortalidad, que puede superar el 50 % [5]. El diagnóstico microbiológico mediante cultivo convencional tiene serias limitaciones ya que requiere un elevado tiempo de incubación y su sensibilidad en el hemocultivo es extremadamente baja, en torno al 0,5 - 2 % [6]. Además, en muestras respiratorias, la sensibilidad se ve disminuida por el tratamiento antifúngico previo y el aislamiento del hongo no significa necesariamente infección, sino que puede deberse a la colonización de las vías aéreas [7,8]. Por estos motivos, en las últimas décadas se han hecho importantes esfuerzos y se han desarrollado biomarcadores como el galactomanano (GM) o técnicas de biología molecular que permiten un diagnóstico precoz [9].

A continuación se describen con mayor detalle la patogénesis, la epidemiología, el diagnóstico y el tratamiento de la AI.

## 1.1. El género *Aspergillus*

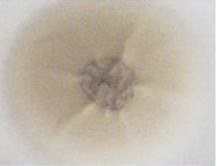
El género *Aspergillus* pertenece a la familia *Trichomaceae* de la división Ascomycota del reino Fungi [3]. Está constituido por más de 300 especies que están comprendidas en 16 secciones o complejos de especies (sección *Aspergillus*, *Candidi*, *Cervini*, *Clavati*, *Circumdati*, *Cremeri*, *Flavi*, *Flavipedes*, *Fumigati*, *Nidulantes*, *Nigri*, *Restricti*, *Sparsi*, *Terrei*, *Usti* y *Versicolores*), agrupadas a su vez en 5 subgéneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati*, *Nidulantes* y *Ornati*) [10].

La identificación de las especies se ha basado clásicamente en las características fenotípicas del hongo, principalmente su morfología y en algunos casos sus propiedades bioquímicas. En la **Tabla 1** se recogen las características macroscópicas y microscópicas de las especies más frecuentemente aisladas en el ser humano [11]. Dichas características sirven para su identificación a nivel de sección o complejo de especies, pero no para la identificación a nivel de especie. El patrón de referencia para la identificación de especies fúngicas es el análisis del espaciador interno transcrito del ácido desoxirribonucleico (ADN) ribosomal [12]. Sin embargo, en el caso del género *Aspergillus*, esta técnica sólo permite la identificación a nivel de complejo o sección [13]. Para la identificación de especies, es necesaria la secuenciación de los genes de la  $\beta$ -tubulina, calmodulina o rodlet A [14]. En el presente trabajo se ha utilizado el nombre de la especie como sinónimo de complejo de especies, a no ser que se especifique lo contrario.

Los estudios taxonómicos han dado lugar al descubrimiento de especies “crípticas” que hasta este momento eran clasificadas erróneamente al ser

identificadas como complejos de especies morfológicamente similares [15]. La importancia de la correcta identificación de estas especies en clínica radica en que presentan una sensibilidad disminuida a antifúngicos [16]. *A. lentulus*, *A. fumigatiaffin*, *A. calidoustus*, *A. niveus*, y *A. carneus* presentan sensibilidad disminuida a anfotericina B, los tres primeros también son resistentes a azoles junto con *A. viridinutans*, *Neosartorya pseudofischeri* y *A. tubingensis* [13].

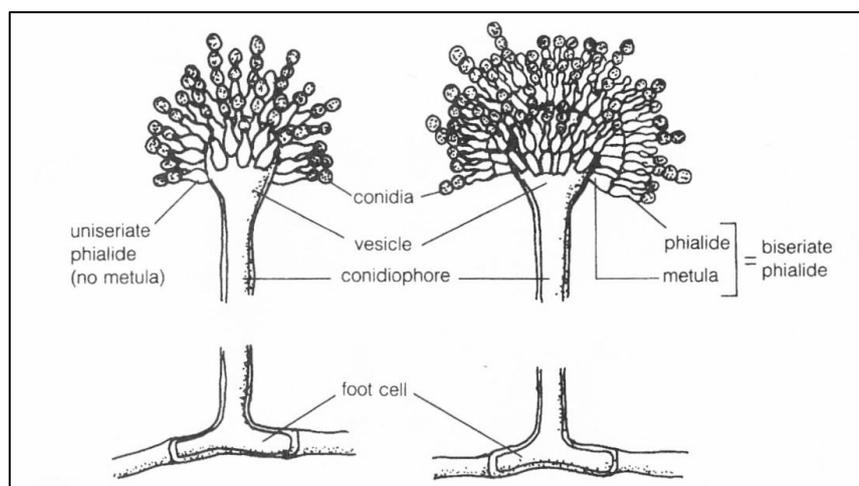
**Tabla 1: Características macroscópicas y microscópicas de las especies de *Aspergillus* más frecuentes en clínica.**

	Características microscópicas	Características macroscópicas	
		Anverso	Reverso
<i>A. fumigatus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uniseriado</li> <li>- Fiálides en los 2/3 superiores de la vesícula</li> </ul> 		
<i>A. flavus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uni/biseriado</li> <li>- Fiálides cubren toda la vesícula</li> <li>- El conidióforo es rugoso</li> </ul> 		
<i>A. niger</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Biseriado</li> <li>- Fiálides cubren toda la vesícula</li> </ul> 		
<i>A. terreus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Biseriado</li> <li>- Fiálides crecen en la parte superior de la vesícula</li> </ul> 		

Adaptado de [17].

Las especies de *Aspergillus* se desarrollan como formas miceliales hialinas en cultivo. Crecen rápidamente en medios de cultivo micológico formando colonias algodonosas cuyo color varía dependiendo de la especie y las condiciones de crecimiento. Crecen a temperatura ambiente aunque en el

laboratorio se incuban a 30 - 37°C. A nivel microscópico, sus hifas son septadas, de 2,5 a 8,0  $\mu\text{m}$  de diámetro [17]. En la **Figura 1** se muestra un esquema de la estructura del conidióforo. Los conidióforos son hifas especializadas en cuyo extremo apical se disponen las células conidiógenas o fiálides. A partir de las fiálides se originan las esporas asexuales o conidias que son los propágulos infecciosos a partir de los cuales se desarrollará la fase micelial del hongo. Los conidióforos tienen estructura unicelular aunque pueden distinguirse tres partes bien diferenciadas: (i) la célula pie, es la sección final que une el conidióforo con el micelio; (ii) la estipe, es la sección cilíndrica situada debajo de la vesícula y (iii) la vesícula, el extremo apical hinchado en el que se disponen las fiálides. Si las fiálides nacen directamente de la vesícula se habla de cabezas conidiales uniseriadas, mientras que si existe una estructura intermedia entre ambas (métula) se habla de cabezas conidiales biseriadas [18]. Esta característica se utiliza para la identificación de las especies junto a la disposición de las fiálides en torno a la vesícula y las características macroscópicas (**Tabla 1**) [17].



**Figura 1: Esquema de la estructura microscópica del conidióforo [18].**

En muchas especies de *Aspergillus* se ha descrito reproducción sexual (teleomorfa). Taxonómicamente, éstas especies pertenecen a 11 géneros diferentes, siendo los más importantes *Eutorium* (*Aspergillus* subgénero *Aspergillus*), *Neosartorya* (*Aspergillus* subgénero *Fumigati*) y *Emericella* (*Aspergillus* subgénero *Nidulantes*) [19]. Las especies teleomorfas que se han aislado en muestras clínicas hasta el momento son *N. pseudofischeri* (anamorfo, *A. thermomutatus*), *N. fischeri* (anamorfo, *A. fischerianus*), *N. hiratsukae* (anamorfo, *A. hiratsukae*), *N. udagawae* (anamorfo, *A. udagawae*) y *N. laciniosa* [15,20–23].

Durante años se ha priorizado el nombre de la especie teleomorfa en aquellas especies en las que se hubiera descrito reproducción sexual. Sin embargo, desde el año 2012, el Código Internacional de Nomenclatura de algas, hongos y plantas rechaza la nomenclatura dual para las especies con nombres diferentes según el estado sexual (teleomorfo) o asexual (anamorfo). A la hora de elegir uno de los dos nombres se concede igual importancia a ambos, independientemente de si corresponde a la fase sexual o asexual, pero se prioriza la nomenclatura más utilizada [19].

La especie que con más frecuencia produce aspergilosis es *A. fumigatus*, seguida de *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger* [24]. *A. terreus* se ha relacionado con infecciones más graves, probablemente debido a su perfil de resistencia a antifúngicos como la anfotericina B que hacen que el manejo del paciente sea más complicado [25]. En un estudio realizado en Francia, la especie más frecuentemente aislada en pacientes con AI fue *A. fumigatus* con un 79,7 % de las muestras positivas, porcentaje muy por encima del 4,5 % que supusieron cada una de las otras especies aisladas como *A. niger*, *A. flavus*, *A.*

*nidulans* y *A. terreus* [26]. En un estudio poblacional realizado en 29 hospitales españoles, se investigó la epidemiología y resistencia antifúngica de los hongos filamentosos aislados en tejidos, hemocultivos y muestras respiratorias. El género *Aspergillus* supuso el 86,3 % de los aislamientos, seguido de *Scedosporium* spp con un 4,7 %, el orden *Mucorales* 2,5 %, *Penicillium* spp 2,2 % y *Fusarium* spp, 1,2 %. Dentro del género *Aspergillus*, las especies más frecuentes fueron *A. fumigatus* (48,5 %), *A. flavus* (8,4 %), *A. terreus* (8,1 %), *A. tubingensis* (sección *Nigri*, 6,8 %) y *A. niger* (6,5 %). Las especies crípticas supusieron el 12 % de los aislados y el 40 % de éstas presentaron resistencia a todos los antifúngicos analizados. Los autores concluyen que las especies crípticas de *Aspergillus* podrían estar subestimadas y su correcta identificación es relevante a nivel clínico debido a su perfil de resistencia [27,28].

## 1.2. Presentaciones clínicas

El espectro y la gravedad de las aspergilosis varían según la forma de infección y el estado inmune del paciente. Aunque la vía de infección más frecuente es la inhalación de conidias, también se ha descrito la traslocación de esporas a partir del tracto gastrointestinal o la inoculación directa del hongo tras una cirugía o un traumatismo [29,30]. En pacientes inmunocompetentes la afectación suele ser local, mientras la infección invasora se observa en pacientes inmunodeprimidos principalmente. Aunque es excepcional, se han descrito casos de AI en pacientes inmunocompetentes, siendo la puerta de entrada más frecuente la inoculación directa tras un traumatismo, o por abuso de drogas por vía intravenosa [31]. Se han descrito también casos de AI de

origen nosocomial, principalmente relacionados con materiales protésicos contaminados o poscirugía, por contaminación del aire del quirófano [30]. En la **Tabla 2** se presenta la clasificación de las aspergilosis y a continuación se describen las presentaciones clínicas más frecuentes. Se debe tener en cuenta que muchas de estas formas clínicas se pueden solapar.

**Tabla 2: Clasificación de las infecciones causadas por *Aspergillus* spp.**

Infección en el huésped inmunodeprimido	Infección relacionada con daño tisular o cuerpo extraño	Infección en el huésped inmunocompetente
Aspergilosis cutánea primaria	Infección de quemaduras	Infecciones superficiales o no invasoras -Aspergilosis cutánea -Otomycosis -Rinosinusitis -Aspergilosis broncopulmonar saprofítica -Traqueobronquitis
Aspergilosis pulmonar -Traqueobronquitis invasora -Aspergilosis necrotizante crónica -Aspergilosis pulmonar invasora	Aspergiloma	Manifestaciones alérgicas -Aspergilosis broncopulmonar alérgica -Asma alérgica -Rinitis alérgica -Sinusitis alérgica -Alveolitis alérgica extrínseca -Neumonitis hipersensibilizante
Aspergilosis invasora (diseminada)	Endocarditis sobre válvula protésica y prótesis vascular	Infección invasora
Rinosinusitis (crónica)	Osteomielitis	Toxicosis o micotoxicosis
Infección del sistema nervioso central	Queratitis y endoftalmitis	
Aspergilosis gastrointestinal	Empiema y aspergilosis pleural Peritonitis	

Adaptado de [32].

### 1.2.1. Aspergilosis cutánea

La afectación de la piel por *Aspergillus* spp da lugar a la aparición de máculas, pápulas, nódulos o placas. La vía de infección puede ser primaria si hay una lesión en la piel por un traumatismo, cateterismo, quemadura, etc. o bien secundaria, por extensión a partir de una estructura contigua o diseminación hematógena. Las principales poblaciones de riesgo de aspergilosis cutánea primaria son los grandes quemados, neonatos y receptores de TOS. Mientras que la forma secundaria es más frecuente en receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) o pacientes hematológicos. Las heridas quirúrgicas pueden infectarse con *Aspergillus* spp debido a inoculación traumática o por exposición a elevados recuentos de esporas. En este caso, suele aparecer fiebre, induración de la herida, enrojecimiento e hinchazón. La mortalidad es del 30 - 75 % [33].

### 1.2.2. Aspergilosis pulmonar

Es la localización más frecuente ya que la vía de infección más habitual es mediante la inhalación de conidias [11,29]. Sus manifestaciones varían dependiendo del estado inmunitario del paciente y de su enfermedad de base. La gravedad es muy diferente en cada uno de los cuadros clínicos:

#### **1.2.2.1. Aspergilosis broncopulmonar alérgica**

Se debe a la hipersensibilidad a antígenos (Ag) de *Aspergillus* spp. Afecta principalmente a pacientes asmáticos, individuos atópicos, o con fibrosis quística. Cursa con episodios repetidos de obstrucción bronquial, inflamación e

impactos mucosos que en estadios avanzados pueden dar lugar a bronquiectasias centrales e incluso fibrosis pulmonar. Las manifestaciones clínicas son sibilancias, expectoración, dolor pleurítico y fiebre. En ausencia de tratamiento el daño pulmonar puede ser irreversible. El diagnóstico es fundamentalmente clínico aunque es típico que los anticuerpos (Ac) frente a *Aspergillus* spp de tipo inmunoglobulina (Ig) E e IgG estén elevados. El tratamiento, que va dirigido al control de los episodios agudos y a limitar el daño pulmonar a largo plazo, se basa en el empleo de corticoides orales para suprimir la respuesta inflamatoria y la hipersensibilidad más que en erradicar al microorganismo [29].

#### **1.2.2.2. Aspergiloma**

Es un tipo de infección local que se produce cuando el hongo se establece en una cavidad preexistente debido a otras patologías pulmonares previas como tuberculosis o sarcoidosis. La bola fúngica o aspergiloma está producida por hifas, células inflamatorias, fibrina, mucus y restos tisulares. Generalmente es asintomática, aunque puede cursar con hemoptisis, tos y disnea. En este caso puede ser necesaria la resección quirúrgica del aspergiloma o el tratamiento con itraconazol [29].

#### **1.2.2.3. Aspergilosis necrotizante crónica**

Es un tipo de aspergilosis semiinvasora. Tras la infección local se produce afectación del parénquima pulmonar (necrosis tisular e inflamación aguda o crónica) de forma indolente durante meses o incluso años. La invasión vascular y diseminación a otros órganos son raras. Es posible el desarrollo de una bola fúngica sin necesidad de cavidad preexistente (a diferencia del

aspergiloma). Las manifestaciones clínicas son fiebre, malestar, fatiga, tos y hemoptisis. Los pacientes afectados son principalmente aquellos con enfermedad pulmonar previa (enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), tuberculosis, fibrosis quística, etc.), aunque también puede afectar a pacientes levemente inmunodeprimidos como diabéticos, alcohólicos, malnutridos, etc. Es necesario tratamiento antifúngico con anfotericina B, voriconazol o itraconazol [29].

#### **1.2.2.4. Traqueobronquitis**

Afecta más comúnmente a receptores de trasplante de pulmón, pero también puede afectar a receptores de otro tipo de TOS, pacientes hematológicos y pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Las manifestaciones clínicas son disnea, tos y sibilancias. La imagen de tórax puede ser normal o bien pueden observarse áreas de engrosamiento de la vía aérea, infiltrados parcheados, consolidación o nódulos [29]. Se ha propuesto la clasificación de la traqueobronquitis en tres tipos [34]:

- *Obstructiva*: la obstrucción de la vía aérea se debe a las hifas del hongo pero no hay invasión y la inflamación es baja.
- *Ulcerativa*: hay invasión focal de la mucosa traqueobronquial por las hifas.
- *Pseudomembranosa*: se da una amplia inflamación e invasión del árbol traqueobronquial con aparición de pseudomembranas recubriendo la mucosa, compuestas de detritus necróticos e hifas.

Generalmente, el pronóstico es favorable con un tratamiento antifúngico adecuado.

#### **1.2.2.5. *Aspergilosis pulmonar invasora***

Afecta principalmente a pacientes neutropénicos, receptores de TOS o TPH. En los últimos años su incidencia en pacientes con EPOC y pacientes que requieren ingreso en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) ha aumentado. Se produce tras la inhalación de conidias debido a que el sistema inmune no es capaz de contener la infección, cediendo a la invasión pulmonar que se caracteriza por angioinvasión, trombosis intravascular e infarto tisular [35]. Los síntomas son inespecíficos y son similares a los de una bronconeumonía; fiebre que no cede a los antibióticos, tos, expectoración y disnea. Puede cursar con dolor pleurítico debido a la invasión vascular y hemoptisis [29]. La tríada clásica en pacientes neutropénicos son fiebre, dolor pleurítico y hemoptisis. Es la forma de aspergilosis más grave y puede limitarse a la invasión del tejido pulmonar o diseminarse a otros tejidos por contigüidad o a través del torrente sanguíneo, pudiendo afectar al cerebro (hemorragia intracraneal, meningitis, absceso epidural), piel, riñones, etc. [36]. Debido a su elevada mortalidad es necesario un diagnóstico precoz y una rápida instauración de tratamiento antifúngico adecuado [37].

#### **1.2.3. *Aspergilosis diseminada***

Tras la invasión de un órgano, la infección puede diseminarse a otras localizaciones por extensión directa o por vía hematógena tras la angioinvasión de los vasos. Esta presentación clínica es rara, especialmente en el paciente inmunocompetente, de hecho, desde 1980 solo se han publicado 6 casos [31]. Es necesario demostrar la infección en dos o más órganos no contiguos para el

diagnóstico de aspergilosis diseminada [38]. Los órganos más frecuentemente afectados son el cerebro, los riñones, el hígado y los ojos. El pronóstico es muy malo, especialmente en el caso de que haya afectación cerebral. El tratamiento debe realizarse con voriconazol, pudiendo añadir una equinocandina durante las primeras dos semanas de tratamiento [37].

#### **1.2.4. Rinosinusitis**

Las manifestaciones clínicas son prácticamente iguales a las de una mucormicosis: congestión nasal, fiebre y dolor facial, especialmente alrededor de los ojos. Si hay afectación de las órbitas, se añaden síntomas como visión borrosa, proptosis y quemosis. La infección puede extenderse a los vasos cerebrales, dando lugar a trombosis del seno cavernoso y manifestaciones del sistema nervioso central [39]. El tratamiento requiere antifúngicos sistémicos (voriconazol) pudiendo realizar terapia secuencial a vía oral si se observa mejoría.

Cuando la afectación de los senos o la mucosa nasal se prolongan durante más de doce semanas pese al abordaje médico y se evidencia inflamación, se habla de rinosinusitis crónica. Entre el 8 y el 12 % de las rinosinusitis crónicas son debidas a alergia fúngica. El tratamiento va dirigido a drenar los senos, reducir la inflamación y erradicar la infección [40].

### 1.2.5. Infección del sistema nervioso central

La afectación del sistema nervioso central puede ocurrir por extensión de una infección en los senos paranasales, por inoculación directa o bien como consecuencia de una aspergilosis diseminada (vía hematológica). Las manifestaciones clínicas son convulsiones y signos neurológicos focales. Pueden desarrollarse aneurismas micóticos que si se rompen dan lugar a hemorragia cerebrovascular, subaracnoidea y/o formación de un empiema. Se trata de una infección muy grave con muy mal pronóstico. El tratamiento de primera línea es el voriconazol, cuya concentración en el sistema nervioso central alcanza el 50 % de la concentración plasmática [41].

### 1.2.6. Endocarditis

El género *Aspergillus* es el segundo agente etiológico de endocarditis fúngica tras *Candida* spp. Afecta principalmente a pacientes con válvula protésica y la infección suele ocurrir durante la cirugía, por contaminación en el quirófano con esporas fúngicas. Las manifestaciones clínicas son fiebre y fenómenos embólicos [30]. Nuevamente, el pronóstico es malo, alcanzando una mortalidad de casi el 100 % pese al abordaje quirúrgico y al tratamiento antifúngico, probablemente debido al retraso en el diagnóstico. Los sistemas automatizados de hemocultivo tienen una muy baja sensibilidad para detectar el crecimiento de *Aspergillus* spp, lo que dificulta aún más el diagnóstico [6]. El envío del material embólico tomado durante la cirugía es de gran utilidad ya que permite la visualización microscópica de las hifas, orientando el diagnóstico [30].

### 1.2.7. Queratitis y endoftalmitis

La endoftalmitis es la infección del globo ocular y su diagnóstico y tratamiento representan una urgencia médica con el fin de preservar la visión. La mayoría de los casos tienen su origen en la inoculación directa por un traumatismo o una cirugía, aunque también es posible la extensión de la infección a partir de la córnea (queratitis). Es más frecuente en personas relacionadas con la agricultura o la jardinería [42]. La endoftalmitis endógena por diseminación hematógena de *Aspergillus* spp es rara y se observa principalmente en pacientes inmunocomprometidos. Los pacientes presentan dolor ocular y alteraciones visuales. La infección progresa hacia la destrucción de los componentes del ojo, lo que concluye generalmente con la pérdida de la visión. El pronóstico es malo y en algunas ocasiones es necesaria la enucleación ocular. El tratamiento es fundamentalmente con voriconazol tanto por vía sistémica como local (intravítreo o intracameral) [43].

### 1.2.8. Aspergilosis gastrointestinal

En este caso la vía de adquisición de la infección no es la inhalación de las esporas o su inoculación, sino su ingestión. A diferencia de *Candida* spp, las esporas de *Aspergillus* spp no se desarrollan en la mucosa del tracto digestivo. Sin embargo, en pacientes con mucositis en los que aparecen grandes úlceras, las esporas pueden colonizar el intestino [44]. Las manifestaciones clínicas son enterocolitis, apendicitis, úlceras colónicas, dolor abdominal y sangrado. Los factores de riesgo son la neutropenia, la

administración de glucocorticoides y la rotura de la mucosa. El tratamiento, salvo contraindicación, es con voriconazol.

El objeto principal del presente trabajo es la AI y por tanto a continuación se profundiza en su patogénesis, factores y pacientes en riesgo, la situación epidemiológica actual, así como su diagnóstico y tratamiento.

### 1.3. Patogénesis de la aspergilosis invasora

Las especies de *Aspergillus* son saprófitos ambientales ubicuos, presentes en el suelo, la vegetación y el agua. El ciclo infeccioso de *Aspergillus* spp comienza con la producción de conidias (esporas asexuales) que se dispersan fácilmente en el aire. Se calcula que una persona puede inhalar 200 conidias al día [11]. Sin embargo, en personas sanas no se produce patología ya que las conidias son fácilmente eliminadas [3].

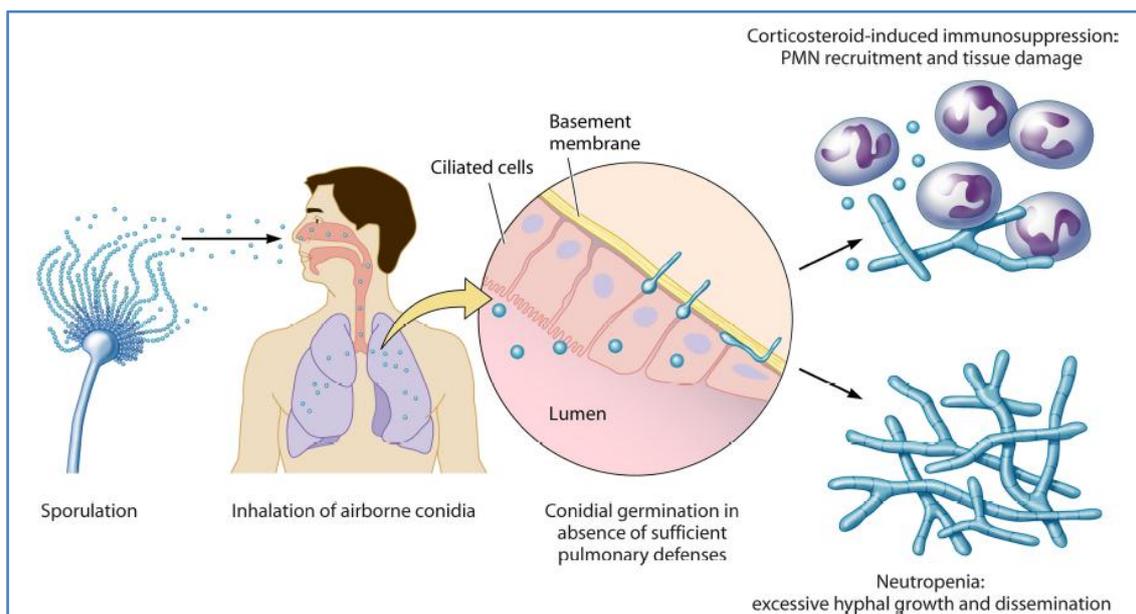


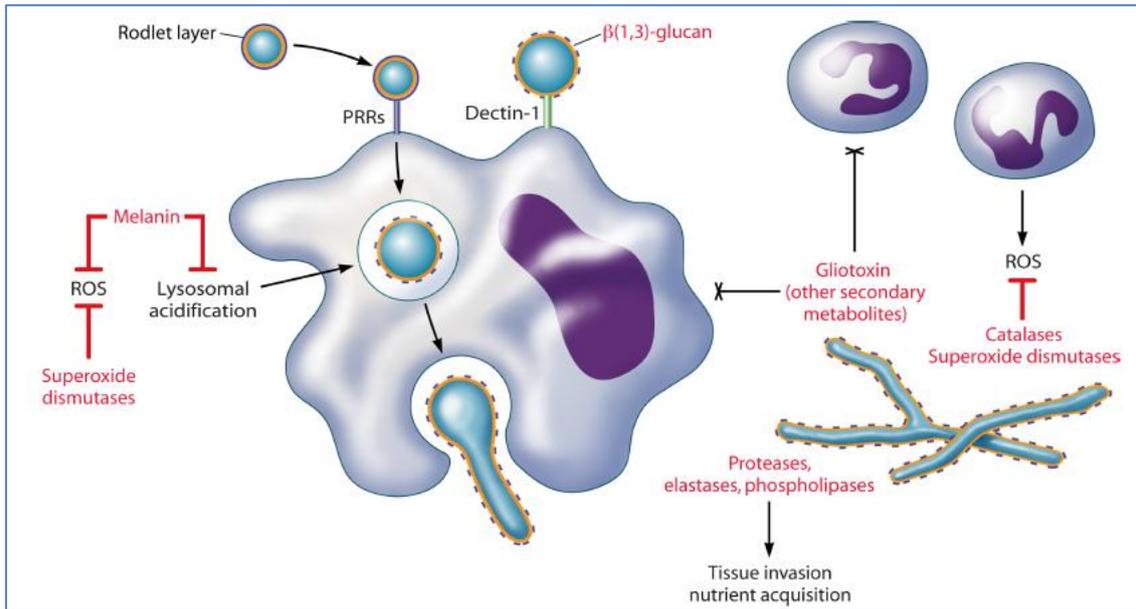
Figura 2: Ciclo de vida infeccioso de *A. fumigatus* [11].

La primera línea de defensa frente a *Aspergillus* spp la constituyen el aclaramiento ciliar del microorganismo de las vías respiratorias y el acceso limitado a los alvéolos debido al tamaño de las conidias (**Figura 2**). Si las conidias alcanzan los alvéolos, los macrófagos son capaces de fagocitarlas y destruirlas. Esto da comienzo a una respuesta proinflamatoria que incluye el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares (PMN), los cuales intervienen en la destrucción extracelular de las conidias cuando las células germinan. En las etapas más tempranas de la infección también se activa el complemento, lo que permite la opsonización y destrucción del microorganismo [4].

Los macrófagos alveolares son un elemento fundamental en la respuesta inmune frente a las conidias de *Aspergillus* spp. El reconocimiento del microorganismo se produce a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés “Pattern Recognition Receptor”) como el receptor de tipo dectina-1 y los receptores de tipo Toll (TLR) 2 y 4 (**Figura 3**). Los TLR2 reconocen conidias o hifas de *Aspergillus* spp, mientras que los TLR4 sólo reconocen las hifas [11]. Se han descrito polimorfismos en los genes que codifican los TLR4 y algunos haplotipos se han asociado a un mayor riesgo de AI [4]. Por su parte, el receptor de tipo dectina-1 reconoce específicamente el carbohidrato  $\beta(1,3)$ -glucano presente en la pared de las conidias germinadas y de las hifas [11]. Los macrófagos alveolares son capaces de destruir las conidias por generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y acidificación del fagolisosoma.

Los neutrófilos reconocen al microorganismo de modo similar a los macrófagos, a través de TLRs y dectina-1. La defensa frente a *Aspergillus* spp

incluye mecanismos oxidativos, como la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, y no oxidativos.



**Figura 3: Esquema de las interacciones entre *Aspergillus* spp y el sistema inmune innato (macrófagos y neutrófilos) [11].**

La degranulación del neutrófilo es la responsable de los mecanismos no oxidativos ya que sus gránulos contienen gran número de compuestos antimicrobianos como proteasas, defensinas, lisozima, etc. Los neutrófilos también pueden formar agregados de conidias y prevenir su germinación [11].

En cuanto a la respuesta inmune adaptativa, mucho menos importante que la innata, se producen Acs regulados por los linfocitos T colaboradores (Th) de tipo 2, pero no tienen carácter protector ni sirven para el diagnóstico ya que la seroconversión no es uniforme. Las citoquinas producidas por los linfocitos Th de tipo 1: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukina 12 (IL-12) y 15 (IL-15), tienen un papel mucho más importante en la defensa frente a *Aspergillus* spp ya que aumentan la

producción de superóxido y la actividad antifúngica de los neutrófilos y de los fagocitos mononucleares [7].

El microorganismo por su parte trata de evadir la respuesta inmune enmascarando el  $\beta(1,3)$ -glucano para no ser reconocido por los receptores correspondientes y la melanina presente en su pigmento bloquea las ROS. Las hifas, también son capaces de producir superóxido dismutasas y catalasas que neutralizan las ROS [11]. Además, *Aspergillus* spp es capaz de producir metabolitos secundarios durante el crecimiento de las hifas que contribuyen a su patogénesis. Entre ellos, la gliotoxina (GT) es el mejor caracterizado. Su actividad biológica se debe a la presencia de un puente disulfuro en su estructura y se le han atribuido múltiples efectos inmunosupresores [45]. En el **apartado 1.8.2.3** se profundiza sobre dicha toxina.

Si el hongo es capaz de evadir el sistema inmune, germina y las hifas crecen e invaden los tejidos, pudiendo alcanzar la vasculatura. Durante la angiainvasión, pequeños fragmentos de hifas pueden llegar al torrente sanguíneo e invadir el endotelio de otros lugares, lo que da lugar a la aspergilosis diseminada por vía hematológica [11].

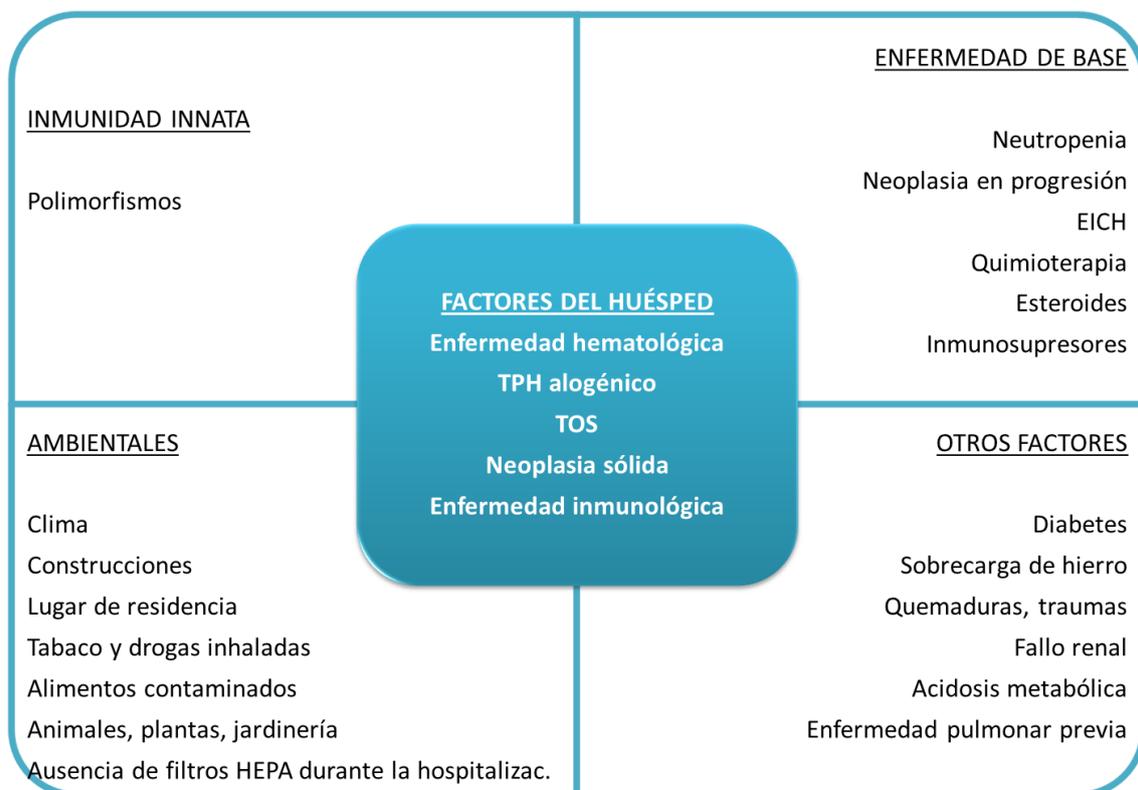
#### **1.4. Factores y pacientes de riesgo**

Los principales factores de riesgo para la AI son:

- Exposición ambiental a una elevada concentración de conidias.
- Rotura de las barreras mucocutáneas por cirugía o traumatismo.

- Inmunosupresión: neutropenia, alteración de la capacidad fagocítica, disminución de la inmunidad celular y uso de corticoides u otros inmunosupresores [46].

Se han propuesto más factores de riesgo tanto relacionados con el paciente como con el ambiente, como se puede ver en la **Figura 4**. Algunos de estos factores se explican a continuación.



**Figura 4: Factores de riesgo que afectan a la condición del huésped.** Adaptado de [47].

Los polimorfismos genéticos del TLR4, la IL-1  $\beta$ , la  $\beta$ -defensina y la dectina-1 afectan a la respuesta inmune innata y se han asociado con un mayor riesgo de AI, al igual que el deterioro en la producción de ROS [48].

El uso de terapias inmunosupresoras (quimioterapia, corticoides) ha aumentado en los últimos años, de manera que microorganismos oportunistas pueden provocar infecciones graves en pacientes que reciben estos fármacos [2]. Sin embargo, no todos los agentes inmunosupresores tienen el mismo efecto y se deben diferenciar los fármacos que producen neutropenia de los que afectan a la capacidad fagocítica. Por ejemplo, la ciclofosfamida es un agente alquilante que se une al ADN e interfiere en la replicación celular. Como consecuencia, se deplecionan los leucocitos circulantes, incluyendo los neutrófilos y se produce neutropenia [11]. La AI en pacientes neutropénicos se caracteriza por trombosis y hemorragia debido al rápido crecimiento de las hifas. En cambio, la administración de corticoides disminuye la capacidad fagocítica de los macrófagos, mientras los neutrófilos son reclutados a los pulmones dónde se produce un ambiente inflamatorio que da lugar a daño tisular [16]. En este caso es la respuesta inmune incontrolada la que lleva a la muerte al paciente, mientras que durante la neutropenia, la causa es el crecimiento incontrolado del hongo [11]. La AI se caracteriza en este caso por necrosis, inflamación y un desarrollo limitado del hongo. En los pacientes hematológicos y receptores de TPH, la neutropenia es el factor de riesgo clásicamente asociado a AI, mientras que en los receptores de TOS es la disfunción fagocítica por corticoides [48].

La primoinfección y la reactivación de citomegalovirus se consideran factores de riesgo de AI, especialmente en receptores de hígado y riñón [1]. Citomegalovirus es un virus inmunosupresor *per se* que disminuye la respuesta inmune celular y además, podría tener efecto sobre la función de los macrófagos [29]. Otro virus que se ha relacionado con mayor riesgo de AI es el

virus de la gripe H1N1. El análisis del microbioma del epitelio pulmonar de pacientes con gripe H1N1 presenta un mayor número de *Pseudomonas* spp, las cuales interactúan con *Aspergillus* spp favoreciendo su colonización [49].

Los pacientes de UCI son la segunda población de riesgo de AI por detrás de los pacientes hematológicos y trasplantados. En particular, presentan un mayor riesgo de AI aquellos pacientes con EPOC que reciben corticoides y los pacientes con cirrosis hepática alcohólica [48]. A su condición de base se une el tratamiento prolongado con antibióticos y la necesidad de ventilación mecánica o catéteres venosos centrales que afectan negativamente a las defensas del paciente [50].

Los factores ambientales pueden aumentar el riesgo y la gravedad de la AI. Durante los trabajos de construcción, por ejemplo, se remueve tierra y se genera gran cantidad de polvo que puede ayudar a que las conidias de *Aspergillus* spp se dispersen. La hospitalización de pacientes con alto riesgo de neutropenia en habitaciones sin filtros HEPA también se considera factor de riesgo de AI [47]. Por otra parte, el uso de antifúngicos de forma masiva en la agricultura, ha hecho que algunos hongos como *Aspergillus* spp, presenten una sensibilidad disminuida a antifúngicos de primera línea como el voriconazol o posaconazol y resistencia a itraconazol [51]. En pacientes con AI por este tipo de aislados, el tratamiento con azoles ha resultado ser insatisfactorio [52].

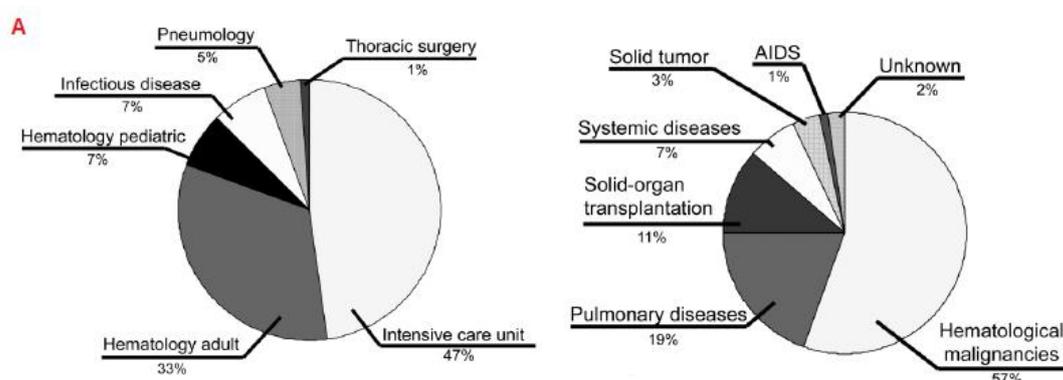
### 1.4.1. Pacientes de riesgo

Teniendo en cuenta los factores de riesgo anteriormente citados, los pacientes con mayor riesgo de sufrir AI son:

- Enfermos con neutropenia ( $< 500$  neutrófilos/ $\text{mm}^3$  durante más de 10 días): leucemia mieloide aguda (LMA), síndrome mielodisplásico o TPH alogénico.
- Pacientes con tratamiento inmunosupresor por enfermedad injerto contra huésped (EICH).
- Receptores de TOS, sobre todo de pulmón y corazón.
- Pacientes infectados por el VIH sin tratamiento con antirretrovirales y  $< 100$  CD4+/ $\mu\text{L}$ .
- Pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (un tipo de inmunodeficiencia primaria caracterizada por mutaciones en la enzima NADPH oxidasa).
- Pacientes tratados con adalimumab, alemtuzumab, infliximab o etanercept, bloqueantes de TNF- $\alpha$ .
- Pacientes críticos no hematológicos.
- Pacientes con EPOC en tratamiento crónico con corticoides.
- Enfermos con cirrosis hepática o enfermedad hepática avanzada.
- Pacientes con cirugía mayor compleja.

Pese a que la AI haya afectado clásicamente a pacientes neutropénicos, un estudio realizado en Francia describiendo las características de todos los pacientes que habían padecido dicha enfermedad en un periodo de seis años demostró que la AI no se limita a dicha población [53]. Los pacientes neutropénicos supusieron el 59 % de los casos de AI, mientras que los no

neutropénicos supusieron el 41 % de los casos. La enfermedad de base más frecuente fue la hematológica (57 % de los pacientes), siendo la LMA la principal patología (**Figura 5b**). El 19 % de los pacientes presentaban enfermedad pulmonar como EPOC o asma tratadas con corticoides. El motivo de ingreso de los pacientes fue por fallo respiratorio o para recibir terapia citotóxica. En el momento del diagnóstico de la AI, el 47 % de los pacientes se hallaban ingresados en UCI y el 33 % en Hematología (**Figura 5a**).



**Figura 5: A) Distribución de casos de AI por unidad de hospitalización. B) Factores de riesgo y enfermedad de base de los pacientes con AI [53].**

Se ha estratificado el riesgo de AI en bajo, medio y alto para las dos poblaciones que más frecuentemente presentan esta infección: los pacientes hematológicos y los pacientes de UCI tal y como se muestra en la **Tabla 3** y la **Tabla 4**.

**Tabla 3: Estratificación del riesgo de AI en pacientes hematológicos.**

Alto	Intermedio	Bajo
Neutropenia > 14 días	Neutropenia 7 - 14 días	Neutropenia < 7 días
Inducción/rescate LMA	LMA consolidación	Mieloma múltiple
TPH alogénico	TPH alogénico < 40 años, HLA idénticos	Linfoma
EICH		TPH autólogo

Adaptado de [54].

En los pacientes de alto riesgo se recomienda la profilaxis antifúngica con posaconazol [54–56]. Su uso ha disminuido la incidencia de AI por debajo del 3 % por lo que en los últimos años es más frecuente encontrar pacientes de UCI o EPOC con AI [2].

**Tabla 4: Estratificación del riesgo de AI en pacientes de UCI.**

Alto	Intermedio	Bajo
TPH alogénico	Corticoides (> 7 días)	TOS no pulmonar
Neutropenia	TPH autólogo	Corticoides (< 7 días)
LMA	EPOC (estadio IV)	Gran quemado
	Cirrosis en UCI (> 7 días)	Malnutrición
	Neoplasia órgano sólido	Cirugía cardíaca
	VIH	UCI (> 21 días)
	TOS (pulmón)	
	Inmunosupresores	

Adaptado de [50].

## 1.5. Epidemiología

Se estima que cada año tienen lugar aproximadamente 200.000 casos de AI en el mundo y que el 50 % se da en pacientes hematológicos [48]. En España, se calcula que la incidencia de AI es de 2,75 por cada 100.000 habitantes [57]. Se ha descrito una mortalidad en receptores de TOS y TPH de entre el 74 % y el 92 % y se estima que entre el 9,3 % y el 16,9 % de las muertes durante el primer año postrasplante son debidas a AI [5]. Además, la incidencia de AI en pacientes con EPOC e ingresados en UCI ha ido en aumento en los últimos años, por lo que estos grupos de pacientes también se han incluido en la revisión epidemiológica [48].

### 1.5.1. Pacientes hematológicos

La incidencia y mortalidad de la AI en pacientes hematológicos depende de factores como el tipo de enfermedad de base, el tipo de trasplante (allogénico vs autólogo), el tipo de acondicionamiento utilizado y el momento de aparición de la infección. Las leucemias agudas y los trastornos linfoproliferativos crónicos son las principales enfermedades de base en pacientes hematológicos con AI. La LAM y el linfoma fueron las enfermedades más frecuentes entre pacientes con AI en un estudio epidemiológico realizado en Francia [26]. Se ha estimado una incidencia de AI del 7 % en pacientes con LAM [46]. Respecto al tipo de trasplante, la incidencia de AI en pacientes receptores de TPH allogénicos se estima en el 11,3 % mientras que entre los pacientes con TPH autólogo se mantiene considerablemente más baja (1,6 %) [46]. La infección fúngica se produce entre el día 40 y 180 postrasplante en el 76 % de los casos y el 16 % más tarde del sexto mes postrasplante. Se ha descrito una mortalidad en receptores de TPH de entre el 66,6 % y el 80 % sin que se observen diferencias entre las infecciones de inicio temprano frente a las de inicio tardío [5]. Finalmente, los regímenes mieloablativos producen una neutropenia severa y prolongada haciendo a los pacientes susceptibles a infecciones fúngicas y oportunistas, mientras que los regímenes de acondicionamiento de baja intensidad (no mieloablativos), preferidos en los últimos años, producen menor toxicidad mielopoyética y de las mucosas, pero son altamente inmunosupresores [5].

## 1.5.2. Receptores de órgano sólido

### 1.5.2.1. Pulmón

Entre el 25 y el 30 % de los pacientes receptores de pulmón están colonizados por *Aspergillus* spp, sin embargo, tan solo el 6 % de los pacientes desarrolla infección, en la mayor parte de los casos como traqueobronquitis o infección bronquial asintomática. La AI puede suponer en torno al 32 % de las infecciones, diseminándose en el 22 % de los casos. La media de inicio de la infección es de cinco meses y medio postrasplante. Los pacientes a los que se trasplanta un único pulmón tienen mayor incidencia de AI que si el trasplante es bilateral. La mayoría de las infecciones se producen en el pulmón nativo, sugiriendo que el foco era preexistente. Estos pacientes tienen mayor probabilidad de padecer EPOC como enfermedad concomitante, la cual se sabe que predispone a la colonización de las vías respiratorias por *Aspergillus* spp. La tasa de mortalidad es del 67 % al 82 % [5].

### 1.5.2.2. Hígado

En las muestras respiratorias de pacientes trasplantados de hígado es muy infrecuente aislar *Aspergillus* spp, pero este hallazgo tiene un elevado valor predictivo positivo (VPP) de aspergilosis pulmonar (41 % a 72 %). La incidencia en estos pacientes es de entre el 1 y el 8 %. La infección se produce al inicio del periodo postrasplante, con una media de inicio de 16 - 17 días. La tasa de mortalidad en estos pacientes ha disminuido del 92 % en la década de los noventa al 60 % en los últimos años debido en parte a los avances en cirugía y manejo del paciente trasplantado [5].

### **1.5.2.3. Corazón**

El aislamiento de *Aspergillus* spp en muestra respiratoria de pacientes receptores de corazón, al igual que los receptores de hígado, es altamente predictivo de aspergilosis pulmonar. Alcanza una incidencia de entre el 3,3 % y el 14 %. El 75 % de las infecciones suceden antes de 90 días postrasplante. Su tasa de mortalidad varía entre el 53 % y el 78 % [5].

### **1.5.2.4. Riñón**

La menor incidencia se observa en pacientes receptores de riñón (0,7 % al 4 %), sin embargo, la mortalidad es muy elevada; en torno al 75 - 80 % [5].

## **1.5.3. Pacientes en Unidades de Cuidados Intensivos**

Al igual que los pacientes con EPOC, aquellos que requieren ingreso en UCI escapan a los grupos de riesgo clásicos para la AI (neutropenia, enfermedad hematológica y trasplante). Sin embargo, la infección por *Aspergillus* spp se está convirtiendo en una etiología infecciosa importante. Esto es debido a que la estancia en UCI les hace más proclives a desarrollar deficiencias inmunológicas que les convierten en susceptibles a las infecciones fúngicas. Muchos de los pacientes que requieren este tipo de cuidados tienen un sistema inmune debilitado debido a otras patologías de base: EPOC, diabetes mellitus, malnutrición, enfermedades autoinmunes, etc. Se ha descrito una tasa de AI del 3,7 % en pacientes de UCI sin enfermedad hematológica, con una mortalidad que excede el 90 %. En el mismo estudio, tras ajustar factores correctores, la mortalidad atribuible a AI fue del 18,9 % [58].

**Tabla 5: Epidemiología de la AI en diferentes pacientes de riesgo.**

	<b>Incidencia %</b>	<b>Inicio infección</b>	<b>Mortalidad %</b>
<b>TPH autólogo</b>	11,3	20 días	78 - 92
<b>TPH alogénico</b>	1,6	78 días	78 - 92
<b>Trasplante pulmón</b>	3 - 14	5,5 meses	67 - 82
<b>Trasplante corazón</b>	3,3 - 14	> 90 días	53 - 78
<b>Trasplante hígado</b>	1 - 8	16 - 17 días	60 - 92
<b>EPOC</b>	22	-	41,2
<b>Pacientes de UCI</b>	3,7	-	90

Adaptado de [5,46,58,59].

#### **1.5.4. Pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica**

En los últimos años se ha descrito una mayor incidencia de AI en pacientes con EPOC. Debido a la patología pulmonar de base, los pacientes son más sensibles a la colonización por *Aspergillus* spp, a lo que se une el tratamiento prolongado con corticoides y antibióticos de amplio espectro. En un estudio realizado en España en el que se estudiaba el valor del aislamiento de *Aspergillus* spp en muestra respiratoria de pacientes con EPOC, la probabilidad de padecer AI fue del 22 %. En estos pacientes el porcentaje de supervivencia fue del 59,8 % con una mortalidad atribuible a *Aspergillus* spp del 4,6 %. Entre los pacientes con AI probable la mortalidad atribuible fue del 20,7 % [59].

#### **1.6. Diagnóstico de la aspergilosis invasora**

De acuerdo con los factores de riesgo y las presentaciones clínicas anteriormente mencionadas, se debe sospechar AI en pacientes neutropénicos, receptores de trasplante, tratados con altas dosis de corticoides o inmunodeprimidos que presenten fiebre que no responde al tratamiento

antibiótico con tos, expectoración productiva y disnea. La invasión vascular por el hongo puede dar lugar a trombos que producen pequeños infartos pulmonares y que se manifiestan clínicamente como dolor pleurítico. Puede aparecer hemoptisis, derrame pleural y neumotórax [29].

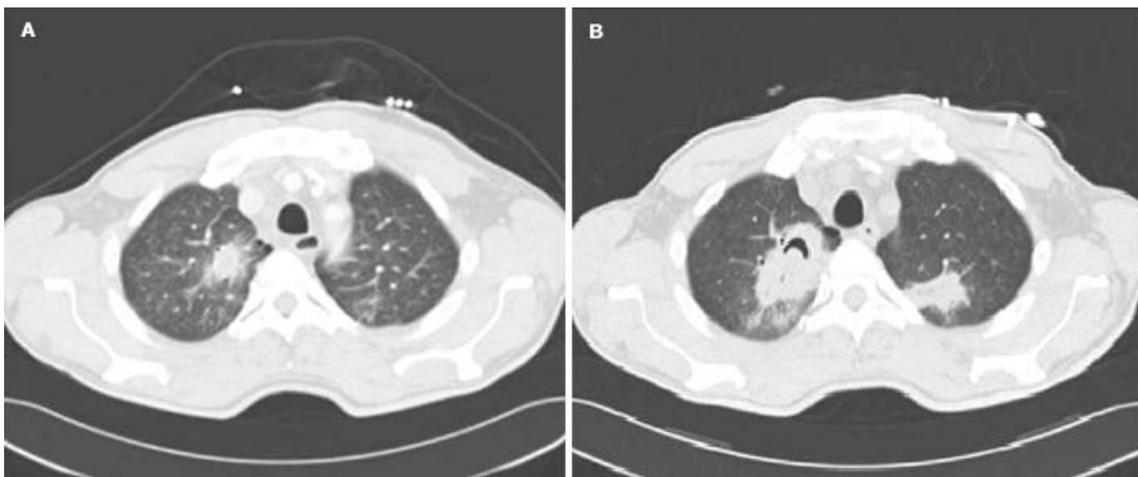
El diagnóstico se realiza mediante técnicas de imagen, broncoscopía, histología y microbiología, los cuales se describen a continuación.

### 1.6.1. Técnicas de imagen

Las manifestaciones radiológicas pueden ser variables y dependen del huésped. En el paciente neutropénico, inicialmente se observan densidades en “vidrio deslustrado” rodeando un nódulo, lo que se conoce como “signo del halo” (**Figura 6a**). Las opacidades en vidrio deslustrado se deben a áreas focales o difusas, mal definidas, en las que la densidad del pulmón está aumentada pero se conservan los márgenes de los vasos y los bronquios subyacentes. Refleja hemorragia en el área que rodea al hongo. En las fases más avanzadas de la infección estas lesiones nodulares pueden cavitarse (de forma simultánea a la recuperación de los neutrófilos) y formar el signo de la «media luna aérea» (**Figura 6b**). Sin embargo, los signos específicos (nódulos y cavitaciones) son menos frecuentes que otros menos inespecíficos como la consolidación, los infiltrados en “vidrio deslustrado” o el derrame pleural [53].

Las radiografías son poco sensibles para la detección de lesiones sugestivas de AI. En la radiografía de tórax se pueden observar infiltrados pulmonares nodulares que, aunque no son diagnósticos, sí se asocian a un

pronóstico de gravedad. Otros signos radiológicos de AI pulmonar son las condensaciones en forma de cuña, localizadas en la pleura basal, o las lesiones cavitarias. Las primeras no suelen detectarse en la radiografía y las segundas, como se ha comentado, aparecen de forma tardía en el curso de la infección. Generalmente es necesario recurrir a la tomografía computerizada (TC), que ha demostrado ser una técnica más sensible y específica. Permite la visualización del “signo del halo”, que es un hallazgo precoz de AI [60]. El “signo del halo” también puede encontrarse en otras infecciones pulmonares angioinvasivas por mucorales, *Fusarium* spp y *Scedosporium* spp, pero estos hongos no suelen ser invasores [61].



**Figura 6: Imágenes de tomografía computerizada.** a) Signo del halo, b) Signo de media luna aérea [62].

### 1.6.2. Fibrobroncoscopia

Consiste en la introducción de un broncoscopio a través de las vías respiratorias. Un broncoscopio es una sonda flexible que permite la visualización del tracto respiratorio y la obtención de muestras del tracto respiratorio inferior sin contaminación con microbiota de la orofaringe para

tinción histológica e investigación microbiológica. La indicación de la broncoscopia es el diagnóstico de neumonía en el paciente inmunodeprimido, la neumonía nosocomial y la asociada a ventilación mecánica. Las muestras más empleadas son el broncoaspirado selectivo (BAS), el lavado broncoalveolar (LBA) y la biopsia transbronquial. A través del broncoscopio se pueden introducir agujas, pinzas o cepillos para obtener muestras. El BAS consiste en la aspiración de secreciones bronquiales a través de un catéter enclavado en un bronquio distal. El LBA consiste en la instilación de volúmenes variables de suero fisiológico estéril en cantidades que oscilan entre 20 y 100 mL. Después de cada instilación se hace una aspiración para recuperar el máximo volumen de líquido posible, formado por una mezcla del suero fisiológico y secreción broncoalveolar. En la biopsia, el broncoscopio se utiliza para obtener una pequeña muestra de tejido peribronquial o alveolar. En las etiologías infecciosas su papel es muy limitado, se utiliza cuando existe sospecha de etiología sobreañadida por neoplasia o sarcoidosis [8].

### **1.6.3. Histología**

Tanto las muestras respiratorias obtenidas mediante fibrobroncoscopia como las biopsias obtenidas en casos de AI, se envían para estudio histológico. Las muestras se tiñen con tinciones convencionales para hongos, como la de metenamina argéntica de Gomori y el ácido peryódico de Schiff [63]. Las hifas también se pueden visualizar con la tinción de eosina-hematoxilina [64]. Las hifas de *Aspergillus* spp que se observan son hialinas, tabicadas y ramificadas en ángulo agudo [4].

### 1.6.4. Microbiología

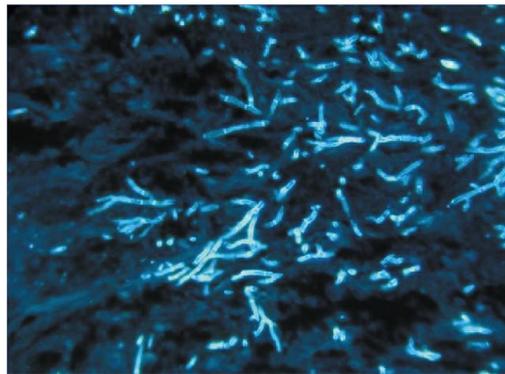
El patrón de referencia del diagnóstico microbiológico de la AI es el cultivo ya que permite la identificación de la especie así como la realización de pruebas de sensibilidad antifúngica. Las muestras más utilizadas son las respiratorias. Siempre que sea posible, es preferible la investigación microbiológica en muestras respiratorias bajas, obtenidas mediante broncoscopio. La inestabilidad clínica de los pacientes puede contraindicar la realización de la broncoscopia. Las muestras de vías respiratorias altas como el esputo también pueden ser analizadas, pero hay que tener en cuenta que pueden representar colonización por *Aspergillus* spp en lugar de infección [65]. El crecimiento de *Aspergillus* spp a partir de hemocultivos es casi excepcional, incluso en infecciones como la endocarditis, en la que tan sólo el 6,4 % de los hemocultivos es positivo [30]. En el caso de aspergilosis diseminada, el tipo de muestra variará según el órgano afectado, por ejemplo en el caso de osteomielitis se toma una biopsia ósea; si hay afectación del sistema nervioso central, se toma líquido cefalorraquídeo (LCR); en el caso de endoftalmitis se enviará humor acuoso/vítreo, etc.

Las pruebas microbiológicas que se pueden realizar son:

#### 1.6.4.1. Microscopía

El examen directo de las muestras es una técnica que puede proporcionar información muy útil de forma rápida. Es necesaria la digestión previa con hidróxido de potasio, lo que permite clarificar las muestras con abundantes células y restos celulares y observar la morfología y la pigmentación fúngica en el microscopio óptico [64].

En caso de disponer de un microscopio de fluorescencia, se puede añadir un compuesto fluorescente que facilite la visualización de estructuras fúngicas. Uno de los fluorocromos más utilizados es el blanco de calcoflúor ya que presenta afinidad por polisacáridos con uniones  $\beta$ -glucosídicas (glucanos, quitina, celulosa, etc.) presentes en los hongos y otros organismos, pero ausentes en los tejidos de mamíferos [63].



**Figura 7: Biopsia tisular mostrando hifas septadas tras tinción con blanco de calcoflúor [66].**

#### **1.6.4.2. Cultivo**

Las especies de *Aspergillus* spp se cultivan con facilidad y crecen rápidamente en los medios de cultivo habituales (Sabouraud y agar Czapek-Dox). En la **Tabla 1** del **apartado 1.1** se resumen las características macroscópicas y microscópicas para la identificación de *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger* a nivel de sección.

#### **1.6.4.3. Detección de antígenos circulantes**

Se basa en la detección de Ags de *Aspergillus* spp en suero, LBA o LCR. Son técnicas muy utilizadas en los Servicios de Microbiología ya que han demostrado ser marcadores precoces de AI y sirven para la monitorización del

tratamiento antifúngico. Algunas han sido aceptadas en los criterios internacionales de la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (EORTC, por sus siglas en inglés European Organization for Research and Treatment of Cancer) y del Grupo de Estudio de las Micosis (MSG, por sus siglas en inglés Mycoses Study Group) para el diagnóstico de AI probable [67]. Los más utilizados son el GM, el (1→3)β-D-glucano (BG) y los ácidos nucleicos. Estas técnicas junto con otras emergentes se desarrollan con mayor profundidad en el **apartado 1.8**.

### 1.7. Clasificación de la aspergilosis invasora

En el año 2002, un grupo internacional de expertos, formado por miembros de la EORTC y del MSG, del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de los Estados Unidos, elaboraba la primera clasificación de las IFIs. El objetivo era estandarizar las definiciones que hasta el momento se estaban utilizando en los diferentes estudios, debido a que existía una gran heterogeneidad en los criterios de inclusión de pacientes. Dichos expertos revisaron la literatura científica existente hasta aquel momento y determinaron que la AI se podía clasificar en posible, probable o probada en función de las evidencias diagnósticas [68]. En el año 2008, debido a los avances en las técnicas de imagen, como el uso de la TC, y a las nuevas evidencias de la utilidad de las pruebas diagnósticas (GM, BG y ácidos nucleicos) las definiciones del año 2002 fueron revisadas y modificadas [67]. Las definiciones del año 2008 siguen vigentes en la actualidad y se describen a continuación.

### 1.7.1. Aspergilosis invasora posible

Esta categoría se reserva a pacientes que cumplan criterios clínicos y factores del huésped de AI, pero para los que no existe evidencia micológica de infección por *Aspergillus* spp y en los que otros agentes etiológicos han sido excluidos. Los factores del huésped son [67]:

- Neutropenia reciente ( $< 500$  neutrófilos/mm<sup>3</sup> durante más de 10 días) al inicio de la infección fúngica.
- TPH alogénico.
- Uso prolongado de corticoides a una dosis media mínima de 0,3 mg/kg/día equivalente a prednisona durante más de tres semanas.
- Tratamiento durante los 90 días anteriores con inmunosupresores de células T como ciclosporina, inhibidores de TNF- $\alpha$ , Ac monoclonales específicos (como alentuzumab) o análogos de nucleósidos.
- Inmunodeficiencia hereditaria grave (como enfermedad granulomatosa crónica o inmunodeficiencia severa combinada).

Los criterios clínicos varían en función de la localización de la infección y su objetivo es evidenciar dicha infección:

- *Infección del tracto respiratorio inferior*: es necesaria la visualización de uno de los siguientes signos en la TC:
  - o Lesión densa, bien circunscrita con presencia o no de signo del halo.
  - o Signo de media luna aérea.
  - o Cavidades

- *Traqueobronquitis*: visualización mediante broncoscopía de ulceración traqueobronquial, nódulos, placas, pseudomembranas o escaras.
- *Infección nasosinusal*: observación de sinusitis mediante técnicas de imagen junto a al menos uno de los siguientes signos:
  - o Dolor agudo localizado (incluyendo el dolor irradiado hacia el ojo).
  - o Úlcera nasal con escara negra.
  - o Extensión desde los senos paranasales a las barreras óseas, incluida la órbita.
- *Infección del sistema nervioso central*: uno de los siguientes signos:
  - o Lesiones focales en las técnicas de imagen.
  - o Engrosamiento meníngeo en la TC o en la resonancia magnética.

### **1.7.2. Aspergilosis invasora probable**

Además de los criterios clínicos y factores del huésped, es necesaria al menos una evidencia micológica para hablar de AI probable:

- *Directa*: Visualización de elementos fúngicos mediante microscopía, o aislamiento del hongo en cultivo de esputo, LBA o cepillo bronquial.
- *Indirecta*: detección de Ags: BG en suero o GM en suero/plasma, LBA o LCR.

### **1.7.3. Aspergilosis invasora probada**

Esta categoría es independiente de que se cumplan factores del huésped o criterios clínicos ya que requiere:

- Histología, citología o microscopía directa que evidencie hifas ramificadas con un ángulo inferior a 45° en una muestra, obtenida mediante aspiración con aguja o biopsia, en la que se observe daño tisular. Debe aislarse *Aspergillus* spp en cultivo ya que sus hifas son indistinguibles de las de *Fusarium* spp y *Scedosporium* spp. De lo contrario sólo se podrá clasificar como IFI probada, pero no como AI probada.
- Crecimiento de *Aspergillus* spp en muestra normalmente estéril obtenida mediante un procedimiento estéril, por ejemplo, LCR.

## 1.8. Biomarcadores en el diagnóstico de aspergilosis invasora

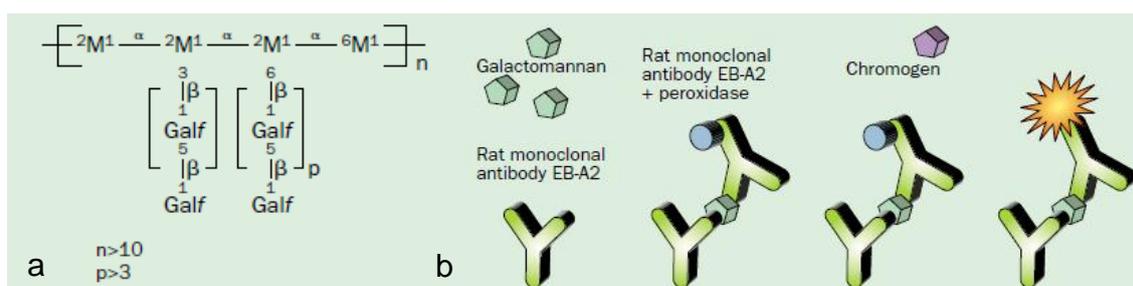
A continuación se describen las características de los biomarcadores empleados para el diagnóstico de AI tanto en la práctica clínica habitual como los nuevos biomarcadores que están en investigación.

### 1.8.1. Biomarcadores empleados en la práctica clínica

#### 1.8.1.1. Galactomanano

El GM es un polisacárido de la pared celular de *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp e *Histoplasma capsulatum* [69]. Está compuesto por una cadena de mananos con unión  $\alpha(1\rightarrow2)$  de los que cuelgan residuos de galactofuranósido  $\beta(1\rightarrow5)$  [66]. En la **Figura 8a** puede verse su estructura. En el año 1992, Styne y colaboradores desarrollaron un Ac monoclonal de tipo

IgM capaz de reconocer los residuos de galactofuranósido presentes en el GM [70], como se puede observar en la **Figura 8b**. Esto dio lugar al desarrollo de un ensayo de tipo inmunoenzimático que hoy en día está comercializado por Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU). Esta técnica se encuentra autorizada por las agencias europea y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés Food and Drug Administration) para el diagnóstico de AI. Los resultados se informan como un índice de densidad óptica (DO) que se obtiene del cociente entre la DO de la muestra y la media de las DOs de los controles de valor umbral. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se considera positivo un índice de lectura superior a 0,5 en suero, si bien se recomienda volver a analizar la misma muestra y solicitar una nueva para confirmar el resultado positivo. El fabricante no define punto de corte para muestras de LBA, LCR u orina. Sin embargo, la FDA ha aprobado y recomendado recientemente un punto de corte de 1,0 para muestras de LBA [71].



**Figura 8: Estructura del galactomannano y esquema del inmunoensayo para su detección.** a) Estructura del GM, b) Esquema del inmunoensayo para detección de GM [66].

El índice de lectura utilizado como punto de corte influye en la sensibilidad y especificidad clínica de la técnica: a menor punto de corte, mayor sensibilidad y menor especificidad y viceversa. Sin embargo, debido a la

elevada mortalidad de la AI en pacientes neutropénicos, se acepta el índice de 0,5 con el fin de diagnosticar el 95 - 100 % de los casos de AI, según datos de la FDA [71].

El rendimiento diagnóstico del GM en pacientes inmunocomprometidos ha sido objeto de numerosos estudios. Cabe destacar un metaanálisis publicado en el año 2006 en el que se describió una sensibilidad del 61 % y una especificidad del 93 % [72]. Posteriormente, en el año 2015, se obtuvieron valores similares (sensibilidad del 78 % y especificidad del 81 %) en un metaanálisis publicado en la Librería Cochrane [73].

Los factores que pueden afectar al rendimiento diagnóstico del GM se pueden dividir en biológicos y epidemiológicos:

- *Factores biológicos*: lugar y especie de *Aspergillus* causante de la infección, microambiente en el lugar de la infección, nivel de inmunosupresión, aclaramiento renal, metabolismo hepático, presencia de Ac frente a GM, conservación de la muestra y pretratamiento de la muestra.
- *Factores epidemiológicos*: tipo de población, estrategia de obtención de la muestra (diagnóstica vs cribado), prevalencia de la infección, punto de corte utilizado y la experiencia del laboratorio [66].

Se han descrito varias fuentes de falsos positivos para el GM como pueden ser la administración concomitante de antibióticos  $\beta$ -lactámicos semisintéticos como piperacilina y amoxicilina o la translocación de componentes fúngicos desde el intestino al torrente sanguíneo en pacientes con mucositis [69,74,75]. En la **Tabla 6** se resumen las fuentes de falsos

positivos y negativos para GM y BG. En ambos casos, la principal causa de falsos negativos es la administración previa de antifúngicos [76].

**Tabla 6: Principales limitaciones del GM y BG en el diagnóstico de AI.**

	<b>Galactomanano</b>	<b>(1→3)β-D-glucano</b>
<b>Reactividad cruzada</b>	<i>Aspergillus</i> spp, <i>Fusarium</i> spp, <i>Paecilomyces</i> spp, <i>Penicillium</i> spp, <i>Acremonium</i> spp, <i>Alternaria</i> spp, <i>Wangiella dermatitidis</i> , <i>H. capsulatum</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Emmonsia</i> spp	<i>Pneumocystis jiroveci</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Fusarium</i> spp, <i>H. capsulatum</i> , <i>Candida</i> spp, <i>Acremonium</i> spp, <i>Trichosporon</i> spp, <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Aspergillus</i> spp
<b>Falsos positivos</b>	Antibióticos β-lactámicos semisintéticos, mucositis grave o EICH, hisopos de algodón	<b>Antibióticos β-lactámicos semisintéticos, hemodiálisis o hemofiltración con membranas de celulosa, bacteriemia, transfusión de sangre o derivados filtrados con membrana de celulosa, exposición a gasas, infusiones de albúmina e inmunoglobulinas</b>
<b>Falsos negativos</b>	<b>Uso de antifúngicos</b>	<b>Uso de antifúngicos</b>

Adaptado de [69].

### **1.8.1.2. (1→3)β-D-glucano**

El BG es un polisacárido presente en la pared celular de la mayoría de las especies fúngicas (*Candida* spp, *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp y *Pneumocystis* spp) excepto en *Lichtheimia* spp (antes *Absidia* spp), *Mucor* spp y *Rhizopus* spp. *Cryptococcus* spp produce niveles bajos de BG, por lo que las infecciones por este hongo no pueden diagnosticarse mediante esta técnica [77]. La prueba diagnóstica se basa en la capacidad del BG de activar la cascada de coagulación en el lisado de amebocitos del cangrejo *Limulus polyphemus*. Dicha prueba está comercializada por varias empresas, siendo el más utilizado el ensayo de Fungitell™ (Associates of Cape Cod Inc, Falmouth,

MA, EEUU) [69]. Se trata, por tanto, de una prueba diagnóstica panfúngica que ha mostrado validez en el diagnóstico de AI en pacientes hematológicos, en el diagnóstico de candidiasis invasora de origen abdominal y en el diagnóstico de neumonía por *P. jiroveci* tanto en pacientes VIH positivos como negativos [78]. Es una técnica aceptada por los criterios EORTC/MSG para la clasificación de AI probable.

Para la interpretación de los resultados en el diagnóstico de AI, se considera negativo un valor inferior a 60 pg/mL, los valores entre 60 y 79 pg/mL se consideran indeterminados y los valores superiores a 80 pg/mL se consideran positivos. La sensibilidad para el diagnóstico de AI es del 76 % y la especificidad es del 85 % [79].

En cuanto a las fuentes de falsos positivos o reactividad cruzada, quizás el más importante sea la bacteriemia por bacilos gramnegativos como *Pseudomonas aeruginosa* [80]. La elevada cantidad de falsos positivos (ver **Tabla 6**), ha limitado el uso del BG en el cribado y diagnóstico de AI en pacientes hematológicos [81]. Pese a que el BG está aceptado por los criterios EORTC/MSG del 2008, en un estudio reciente publicado por un grupo de expertos, la utilidad clínica del BG se pone en duda [82].

### **1.8.1.3. Detección de ácidos nucleicos**

En general, las técnicas basadas en biología molecular presentan una alta sensibilidad y especificidad y se ven poco afectadas por el uso de antifúngicos. Se pueden utilizar en varios tipos de muestra, incluyendo muestras respiratorias, histológicas y sangre. Sin embargo, la falta de estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la

necesidad de personal cualificado han hecho que su uso en clínica no se generalice y que no se contemple en los criterios EORTC/MSG para el diagnóstico de AI. Se han desarrollado PCRs panfúngicas y PCRs específicas de género o especie. Hay diferentes formatos de PCR que pueden ser aplicados al diagnóstico de la IFI, siendo la más recomendable la PCR a tiempo real que permite cuantificar el ADN presente en la muestra clínica y minimizar el riesgo de contaminaciones cruzadas y, por tanto, de falsos positivos. En los últimos años se han comercializado sistemas de PCR a tiempo real que permiten la detección de algunas especies *Aspergillus* spp (Myconostica MycAssay™ *Aspergillus*, Myconostica Ltd, Manchester, Reino Unido) o de *Candida* spp y de *Aspergillus* spp (Septifast™, Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza). Esto supone un paso importante para la instauración de estos sistemas en el ámbito clínico porque aportan estandarización a las técnicas [83,84].

Pese a que la amplificación de ácidos nucleicos de *Aspergillus* spp mediante PCR se ha llevado a cabo durante más de dos décadas, como se ha comentado, no fue aceptada en las definiciones del grupo de consenso EORTC/MSG para el diagnóstico de AI debido a su falta de estandarización [67]. En el año 2006, el grupo de consenso de PCR fúngica de Reino Unido publicaba recomendaciones para el diagnóstico de AI mediante PCR [85]. Ese mismo año, en el congreso de la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal (ISHAM, por sus siglas en inglés International Society for Human and Animal Mycoses) se fundaba la Iniciativa Europea Aspergillus-PCR (EAPCRI), cuyo objetivo fundamental es el desarrollo de metodología estandarizada para la realización de la PCR y su validación mediante ensayos clínicos, para que esta prueba pueda ser incorporada en los criterios diagnósticos y las

definiciones del grupo de consenso EORTC/MSG [86]. Dicha iniciativa está formada principalmente por expertos europeos, incluyendo más de 60 centros.

La EAPCRI publicaba en el año 2010 una serie de recomendaciones para la realización de la PCR basadas en un estudio multicéntrico en el que participaron 24 centros [87]. En dicho estudio, se probaba la validez analítica de la PCR para la detección de ADN de *Aspergillus* spp en sangre completa. Se observó que el proceso de extracción de ADN es limitante y que afecta a la eficiencia de la PCR. De acuerdo con lo observado en el estudio, la EAPCRI recomienda que se utilice sangre completa anticoagulada con EDTA (ya que la heparina se relaciona con inhibición de la PCR y el citrato de sodio con contaminación). Son necesarios al menos 3 mL de muestra y es necesario lisar las células de las series roja y blanca antes de la rotura mecánica de la pared fúngica con bolas de vidrio o cerámica. La lisis de la pared fúngica debe hacerse mediante vorteo en lugar de por digestión ya que se obtiene un mejor rendimiento y se ahorra tiempo. Una vez lisada la pared del hongo, se pueden utilizar métodos comerciales para la extracción del ADN, obteniéndose en general una buena sensibilidad y especificidad analíticas. Se debe utilizar un control negativo de la extracción para evitar contaminaciones y es recomendable añadir un control positivo. En cuanto a la amplificación mediante PCR, la mayoría de sistemas son eficientes, siendo los sistemas a tiempo real aquellos con los que se obtiene un mejor rendimiento diagnóstico. Debe utilizarse un control interno de PCR con el fin de comprobar la amplificación. En general, todas las muestras deben analizarse por duplicado con el fin de aclarar resultados contradictorios.

Cinco años después, en el año 2015, la EAPCRI publicaba un artículo de revisión de la evidencia clínica de la PCR en el diagnóstico de AI que concluye que existe suficiente evidencia científica para incluir esta prueba en los criterios EORTC/MSG [82]. Según dos metaanálisis, la sensibilidad de la PCR en suero es del 84 - 88 % y la especificidad es del 75 - 76 % [88,89]. Como fuentes de falsos positivos, se han descrito reactivos de biología molecular o tubos de recogida de muestra contaminados [90,91]. Al igual que ocurría con otros biomarcadores, el uso de antifúngicos puede dar lugar a falsos negativos [92].

Desde el punto de vista diagnóstico, el LBA sería una muestra más adecuada que la sangre ya que los diferentes metaanálisis describen una especificidad muy elevada, del 94,1 al 94,5 % [93,94], mientras que la sensibilidad en sangre es menor (76,8 - 79,6 %). Debido a que la colonización del tracto respiratorio por *Aspergillus* spp es una fuente de falsos positivos para la PCR en LBA, el cribado de pacientes usando esta técnica debería realizarse en sangre [95].

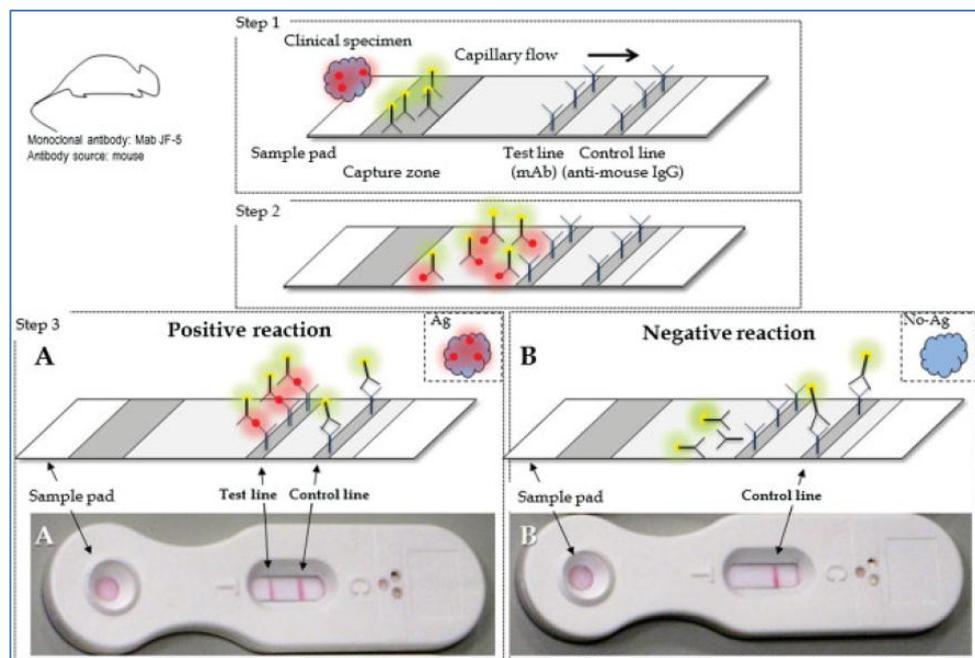
### **1.8.2. Biomarcadores en investigación**

Pese a que los biomarcadores serológicos (Ags y ácidos nucleicos) han supuesto un gran avance en el diagnóstico de los pacientes con AI, no están exentos de ciertas limitaciones y sigue sin haber un único patrón de referencia para el diagnóstico de AI [96]. Debido a la elevada morbimortalidad que sigue produciendo esta infección, es necesario desarrollar nuevas técnicas diagnósticas, cuya utilidad clínica debe ser demostrada en diferentes

poblaciones y estrategias de manejo del paciente [79]. A continuación se describen las técnicas que actualmente están en investigación.

### **1.8.2.1. Dispositivo de flujo lateral**

Es la técnica para la que existen más estudios. Se basa en la detección específica de una glicoproteína extracelular mediante el Ac monoclonal JF5. Se ha desarrollado en un formato tipo “inmunocromatografía” de fácil interpretación (**Figura 9**). Requiere poca manipulación de la muestra por lo que es ideal para el diagnóstico “a pie de cama”, ya que se obtienen resultados en 15 minutos. Además, presenta una banda de control de la prueba en el propio dispositivo.



**Figura 9: Representación esquemática del dispositivo de flujo lateral y su interpretación [69].**

Se ha descrito una sensibilidad del 68 % y una especificidad del 87 % para el diagnóstico de pacientes hematológicos en muestras de sangre. Por el contrario, el rendimiento diagnóstico en LBA en diferentes poblaciones de pacientes es más halagüeño, habiéndose descrito una sensibilidad global del

73 % y una especificidad global del 90 %. Esta prueba ha mostrado su mayor rendimiento diagnóstico en pacientes con TOS en los que se alcanza una sensibilidad del 94 % y una especificidad del 92 % [97].

Actualmente los dispositivos de flujo lateral no se están usando por problemas de fabricación, aunque se espera su producción para finales del año 2017. Siguen siendo necesarios más estudios antes de recomendar su uso en la rutina clínica [97].

#### **1.8.2.2. Compuestos orgánicos volátiles**

Se ha propuesto que los pacientes infectados por *Aspergillus* spp exhalan ciertos compuestos orgánicos volátiles que pueden ser detectados en su aliento [98]. Concretamente, parece que el 2-pentil-furano podría ser detectado en este tipo de pacientes con la ayuda de “narices electrónicas”, obteniéndose una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 83,3 %. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder detectar las posibles fuentes de reacciones cruzadas y para asegurar su utilidad clínica [79].

#### **1.8.2.3. Gliotoxina**

La GT es una toxina que pertenece al grupo de las epipolítidioxopiperazinas (ETP). Las ETP son metabolitos secundarios tóxicos producidos únicamente por hongos. Se caracterizan por la presencia de un puente disulfuro en su estructura, responsable de su actividad [99].



**Figura 10: Estructura química de la GT.**

#### 1.8.2.3.1. Síntesis

Los 13 genes que codifican las enzimas necesarias para la síntesis de la GT se encuentran agrupados en el cromosoma 6 en un cluster denominado *gli*. Dicho cluster está regulado por un factor de transcripción ( $Zn_2$ -Cys<sub>6</sub>) codificado por *gliZ* [100]. En la **Figura 11** puede verse un esquema de la síntesis de la GT, la cual comienza con la unión de dos aminoácidos (fenilalanina y serina). Esta unión la cataliza la enzima GliP, una péptido sintasa no ribosomal, que también es la responsable de la ciclación del dipéptido para dar lugar a la dicetopiperazina. La evidencia de que el cluster *gli* es el responsable de la producción de GT se basa en: (i) la delección de los genes *gliZ* y/o *gliP* en cepas de *A. fumigatus* Af293, CEA10 y B5233 elimina la síntesis de la GT, mientras que la restitución de los genes restaura su producción [101,102]; y (ii) la delección de *gliZ* impide la expresión de los genes restantes del cluster, mientras que su sobreexpresión da lugar a niveles mayores de GT comparada con el tipo salvaje [100]. Tras la síntesis de la dicetopiperazina, ésta es hidroxilada por la enzima GliC (citocromo P [CYP] 450 monooxigenasa) con liberación de H<sub>2</sub>O. Posteriormente, la enzima GliG cataliza el ataque nucleófilo de dos moléculas de glutatión (GSH) a través de los residuos de azufre. Es decir, que la GliG es una GSH S-transferasa que sulfuriza la GT. A

continuación, la glutamiltransferasa GliK y la dipeptidasa GliJ catalizan la escisión de los residuos provenientes del glutamato y la glicina del GSH. La enzima GliI escinde el enlace C-S y da lugar a una molécula intermedia que es metilada por la enzima GliN, formándose la ditiol gliotoxina (SH<sub>2</sub>-GT), que es la forma reducida de la toxina. La SH<sub>2</sub>-GT es capaz de generar ROS y de conjugarse con proteínas a través de puentes de cisteína [99].

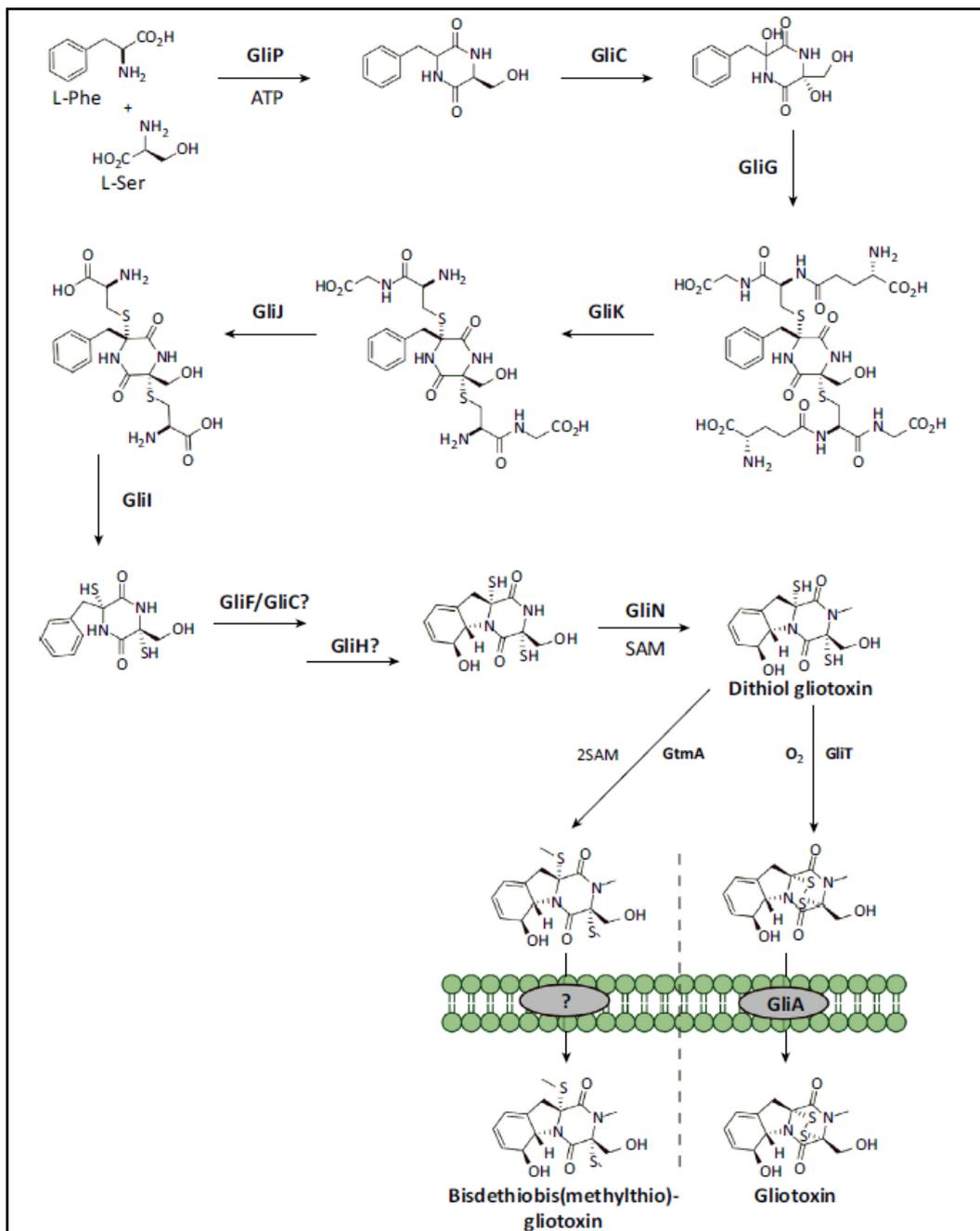


Figura 11: Ruta biosintética de GT y bmGT [103].

Como las ROS son tóxicas para el propio hongo, este debe protegerse de la SH<sub>2</sub>-GT transformándola en otras moléculas no reactivas; la GT oxidada y la bis(metilio)glitoxina (bmGT) [103,104]. La primera se sintetiza a través de la formación de un puente disulfuro catalizado por la GliT y la segunda por la metilación de las dos moléculas de azufre por la bis-tiometiltransferasa, GtmA.

Se sabe que la GT es expulsada del interior celular a través de una bomba de eflujo codificada por *gliA* que además es capaz de expulsar la GT extracelular, cumpliendo así una doble función; autoprotección de la GT sintetizada en el interior celular y expulsión de la GT extracelular. La secreción de la GT al espacio extracelular contribuye a la virulencia de *Aspergillus* spp [105].

#### 1.8.2.3.2. Regulación de la síntesis de GT

Respecto a la regulación de la síntesis de GT, además del factor de transcripción codificado por *gliZ* (dedo de Zinc), Dolan y cols. han descrito recientemente un mecanismo de regulación negativa de la GT fuera del cluster *gli* que codifica una GT bis-tiometiltransferasa llamada GtmA [106]. Como se ha mencionado, la función de GtmA es metilar los grupos ditiol de la forma SH<sub>2</sub>-GT. Se ha visto, que la GT exógena induce la expresión de *gtmA*, lo que reduce la cantidad de GT por un mecanismo doble: atenuar la expresión de *gli* y utilizar la SH<sub>2</sub>-GT como sustrato para la síntesis de bmGT en lugar de GT. Otro efecto de la GT exógena es inducir la expresión de *gliT*, aumentando la forma oxidada de la GT y contribuyendo por tanto a la autoprotección (**Figura 12**). Además, se ha descrito que GliT confiere resistencia a la GT exógena y previene la depleción irreversible de las reservas de GSH intracelular, el cual

se consume durante la reducción de la forma oxidada de GT [107]. Curiosamente, *gliZ* no regula la expresión de *gliT*, lo que enfatiza la función protectora de *gliT* frente a SH<sub>2</sub>-GT. Muchos otros elementos reguladores (LaeA, GipA, VeA...) intervienen en la síntesis y regulación de la cantidad de GT [103], pero su descripción excede el objetivo de este trabajo. Mencionar simplemente que cada vez existe una evidencia mayor de la interrelación entre el metabolismo primario y secundario (incluyendo la GT) en los hongos con todo lo que ello conlleva a nivel de sistemas de regulación [108].

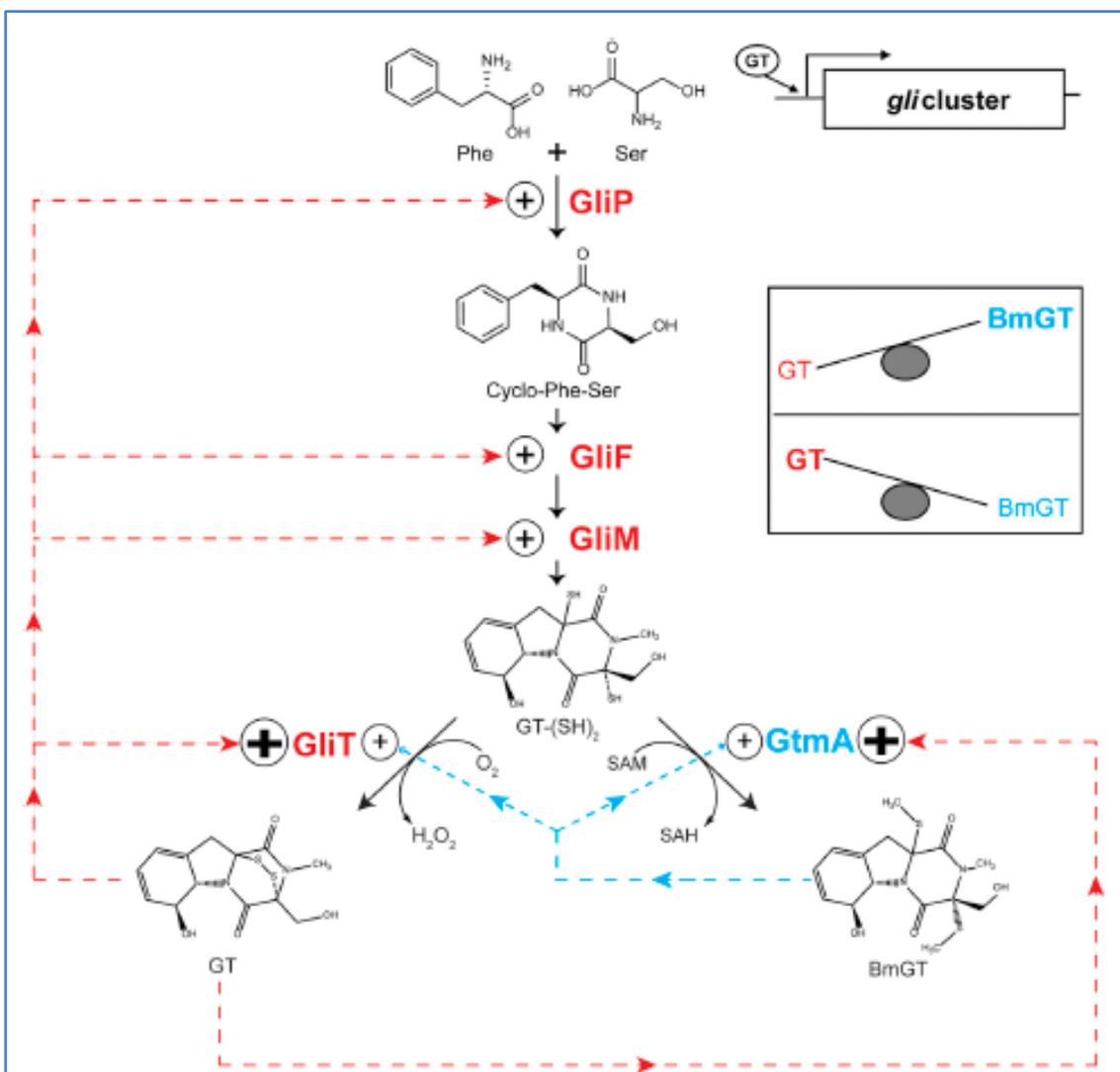


Figura 12: Regulación de la síntesis de GT mediada por *bmGT* [106].

#### 1.8.2.3.3. Mecanismo de acción

Como se ha comentado anteriormente, la GT es un factor de virulencia ya que gracias al puente disulfuro presente en su estructura, puede unirse a las proteínas a través de los residuos de cisteína y generar ROS. Se cree que la generación de ROS es la responsable de la toxicidad de la GT y se produce por reacciones redox entre la forma oxidada (GT) y reducida (SH<sub>2</sub>-GT) [103]. La reducción de la GT a SH<sub>2</sub>-GT sucede con gasto de GSH [103]. Se han demostrado los efectos inmunosupresores de la toxina *in vitro*: inhibición de la fagocitosis, bloqueo de la respuesta inflamatoria y de la producción de citoquinas (por inhibición del factor de transcripción NF-κB), así como inhibición de la degranulación de los mastocitos [109–111]. Además, inhibe la NADPH oxidasa de los neutrófilos necesaria para la generación de ROS en la explosión oxidativa [112]. Finalmente, la GT facilita la apoptosis en monocitos y macrófagos por activación de la vía de las caspasas y liberación de factores apoptogénicos a partir de las mitocondrias [113]. Este efecto no se observa en los neutrófilos, aunque sí que afecta a su capacidad fagocítica [114].

En cuanto a los modelos *in vivo*, se han observado conclusiones diferentes dependiendo del modelo de inmunosupresión empleado. En los modelos murinos inmunodeprimidos con corticoides y ciclofosfamida (agente alquilante que se une al ADN e impide la replicación de los neutrófilos), no se observó diferencia en la mortalidad entre los ratones infectados con aislados salvajes frente a aislados  $\Delta gliP$  o  $\Delta gliZ$  [100,101,115]. Sin embargo, en los modelos en los que los ratones eran inmunodeprimidos únicamente con corticoides (no neutropénicos), la GT fue un determinante de virulencia

[45,115]. Esto sugiere que los neutrófilos son una importante diana para la GT y por tanto en los ratones que carecen de dicha diana (neutropénicos) la GT es un factor de virulencia menos importante [115]. La relevancia clínica de la GT radica, por tanto, en los pacientes que reciben altas dosis de corticoides, como pueden ser los receptores de TPH en tratamiento de la EICH [102].

#### 1.8.2.3.4. Especies productoras

Se ha descrito producción de GT en los siguientes géneros/especies: *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Gliocladium* spp, *Trichoderma virens*, *Colletotrichum gloeoporoides* y *Pseudallescheria* spp (MFB165) [99,106,116,117]. El análisis bioinformático del genoma de la división Ascomycota reveló que algunas especies no presentan el cluster responsable de la síntesis de ETP, entre ellas *A. nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Coccidioides immitis*, al igual que *C. neoformans* (división Basidiomycota) [118]. El patógeno oportunista productor de GT más importante es *A. fumigatus*, responsable de la mayoría de los casos de AI [119]. Se ha tratado de correlacionar la producción de GT con la invasividad ya que en un estudio un elevado porcentaje de aislados provenientes de pacientes oncológicos con AI eran productores de GT [120]. Además, en otro estudio en el que se comparaba la producción de GT entre aislados clínicos y ambientales, el porcentaje de aislados productores fue mayor entre los primeros [121]. Sin embargo, en un trabajo reciente los autores no encontraron relación entre el origen del aislamiento de *A. fumigatus* y la producción de GT [122]. En el mismo estudio, analizaron además los complejos de especies *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger*: todas las especies produjeron GT pero en un porcentaje menor. La concentración de GT también fue inferior comparada con la

detectada en *A. fumigatus* [122]. Esto ya se había observado en un estudio previo en el que *A. fumigatus* fue la especie productora de mayores concentraciones de GT en el mayor porcentaje de aislamientos (93 %), seguida de *A. niger* (75 %), *A. terreus* (25 %) y *A. flavus* (4 %) [123].

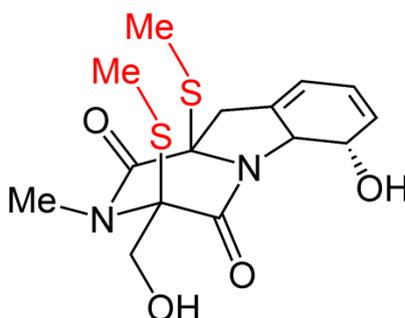
#### 1.8.2.3.5. Validez diagnóstica

A la luz de estos resultados, la GT se ha propuesto como marcador diagnóstico de AI [120,124,125], ya que (i) se produce durante la fase de invasión por lo que podría ser un marcador precoz de infección, (ii) es producida por las especies más frecuentemente aisladas en clínica, lo que contribuye a su sensibilidad diagnóstica y (iii) no es producida por otros patógenos oportunistas importantes como *Candida* spp, lo que contribuye a la especificidad de la técnica [126]. Las técnicas utilizadas para la detección de GT han sido tanto la cromatografía líquida como la cromatografía en capa fina de alta eficacia (HPTLC). El número de pacientes y muestras analizadas en estos estudios es muy bajo por lo que no se ha podido concluir la utilidad de este marcador. A diferencia de estos trabajos, se ha descrito que la GT es rápidamente captada por las células por lo que resulta difícil de detectar en fluidos biológicos [127,128]. Esto se debe a que el puente disulfuro presente en su estructura química la hace muy reactiva e inestable [129].

#### 1.8.2.4. Bis(metiltio)gliotoxina

La bmGT se sintetiza a partir de la SH<sub>2</sub>-GT por la enzima GtmA. Esta enzima está codificada por el gen *gtmA* en el cromosoma 2 y es dependiente de S-adenosil-metionina (SAM) [106]. Los grupos metilo necesarios para la síntesis de bmGT provienen de la SAM. La SAM es un cosustrato común que

interviene en las reacciones metabólicas y en la transferencia de grupos metilo al ADN y a las proteínas [130].



**Figura 13: Estructura química de la bmGT.**

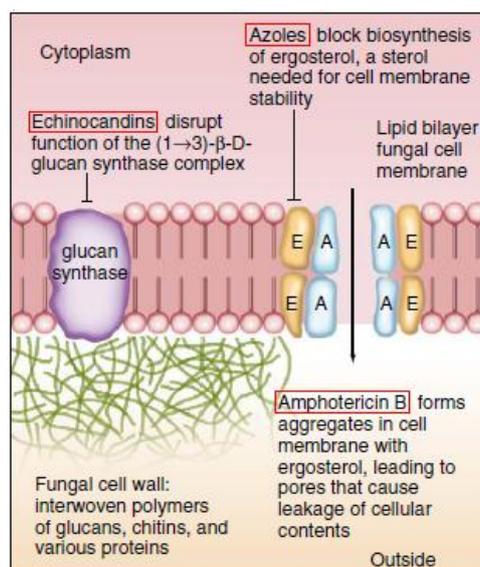
Por tanto, la GtmA aumenta los niveles de bmGT y de S-adenosil-homocisteína, con gasto de SAM. La S-adenosil-homocisteína es posteriormente reconvertida a SAM por el ciclo de la metionina. De esta manera, se puede considerar que la GtmA actúa como enlace entre la síntesis de GT y el metabolismo primario [131]. Se desconoce la enzima que expulsa la bmGT al exterior celular pero su eflujo es independiente de la GliA, bomba capaz de expulsar la GT del interior celular [106]. Como se ha descrito en el **apartado 1.8.2.3.2**, a diferencia de la GT, la bmGT carece de actividad redox y su única función es la regulación de los niveles de GT (**Figura 12**). Cuando los niveles de GT aumentan, se induce la expresión de GtmA, que transforma la SH<sub>2</sub>-GT en bmGT. La depleción de GT por conversión a bmGT reduce la expresión del cluster *gli*, lo que se traduce en la reducción de los niveles de GT. Además la bmGT induce su propia síntesis y la de la GT oxidada para detoxificar la SH<sub>2</sub>-GT [103].

Se ha descrito la presencia de 124 homólogos de GtmA en la división Ascomycota [106]. También se ha detectado bmGT en el sobrenadante de

cultivos de *Aspergillus* spp, siendo mayor el porcentaje de aislados productores de bmGT que de GT en *A. fumigatus* (93 % vs 74 % respectivamente) [132]. Debido a que la bmGT carece de puente disulfuro en su estructura, es una molécula menos reactiva y más estable que la GT, la cual es rápidamente expulsada del interior celular donde se asocia a diferentes células [128,129]. Esto podría explicar el hecho de que la bmGT se detecte más frecuentemente en el suero de pacientes en riesgo de AI que la GT, lo que convierte a la bmGT en una molécula más adecuada como marcador diagnóstico de AI [132].

## 1.9. Antifúngicos

En los últimos años, el número de antifúngicos aprobados y comercializados para el tratamiento de infección fúngica ha aumentado [133]. A continuación se revisan los principales antifúngicos sistémicos con actividad frente a *Aspergillus* spp.



**Figura 14: Esquema del mecanismo de acción de diferentes clases de antifúngicos.** Adaptado de [4].

### 1.9.1. Triazoles

Son compuestos obtenidos mediante síntesis química. El miconazol fue el primer azol aprobado para el tratamiento de las micosis sistémicas por vía intravenosa en la década de los 70, pero actualmente se encuentra en desuso. La estructura básica es el anillo de imidazol, compuesto por cinco átomos con dos nitrógenos en posición 1 y 3. Con el fin de mejorar la estabilidad de estas moléculas y de reducir los efectos adversos de los imidazoles, se introdujo un tercer átomo de nitrógeno, dando lugar a los triazoles. Fluconazol e itraconazol son triazoles de primera generación. Fluconazol no tiene actividad frente a hongos filamentosos (excepto dermatofitos) pero sí frente a levaduras como *Candida* spp. Los triazoles de segunda generación más utilizados son: voriconazol y posaconazol, presentan ventajas farmacocinéticas y farmacodinámicas sobre los de primera generación.

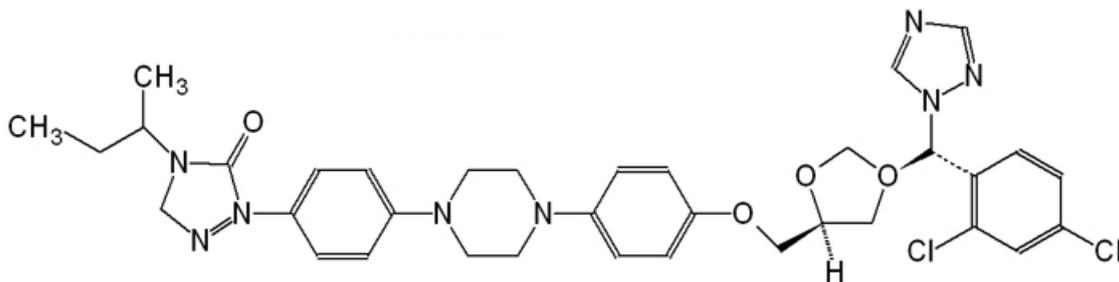
Todos ellos actúan en la membrana celular del hongo, donde inhiben la síntesis de ergosterol (principal componente de la membrana) bloqueando la enzima dependiente de CYP450, lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilasa. De esta manera, deja de sintetizarse ergosterol a partir del lanosterol, lo que incrementa la permeabilidad de la membrana y da lugar a la lisis celular (**Figura 14**) [134]. Los triazoles son inhibidores del complejo enzimático CYP450, pero además son metabolizados por esta vía, por lo que pueden existir interacciones con numerosos fármacos:

- Rifampicina, carbamacepina y fenobarbital son potentes inductores del CYP450 que disminuyen la concentración de azoles.

- Gemfibrocilo y claritromicina son inhibidores del CYP450 que pueden dar lugar a altas dosis de voriconazol e itraconazol respectivamente, aumentando el riesgo de efectos adversos.
- Ciclosporina, derivados de la vinca, sirolimus, tacrolimus y warfarina son algunos ejemplos de fármacos metabolizados por el CYP450. Su administración conjunta con azoles (inhiben su metabolismo) puede dar lugar a dosis tóxicas.

#### **1.9.1.1. Itraconazol**

Triazol de primera generación comercializado en 1984. Es activo frente a *Candida* spp, *Aspergillus* spp, hongos dermatofitos y endémicos [135].



**Figura 15: Estructura química del itraconazol [4].**

Las especialidades farmacéuticas disponibles son cápsulas, solución oral y solución para perfusión intravenosa. Actualmente, en España se encuentran comercializadas las cápsulas y la solución para perfusión [136]. Las cápsulas, a diferencia de la solución para perfusión, no están indicadas en el tratamiento de infecciones sistémicas debido a su absorción errática [133]. La solución intravenosa se administra a una dosis de 200 mg/12 h los dos primeros días y el tratamiento se continúa a 200 mg/día [2].

La absorción del itraconazol varía dependiendo de la especialidad farmacéutica utilizada: (i) las cápsulas tienen una absorción variable que aumenta con la comida y un bajo pH gástrico, que se puede conseguir con bebidas de cola o zumos. Sin embargo, los fármacos antiácidos disminuyen su absorción [137]. La biodisponibilidad de las cápsulas es del 55 % [138]; (ii) la solución oral está formulada con ciclodextrina, lo que solubiliza el itraconazol y aumenta su absorción. La biodisponibilidad es del 75 % aproximadamente. No se ve alterada por el pH gástrico y la máxima absorción se consigue con el estómago vacío. La ciclodextrina es un anillo de moléculas de glucosa que pueden albergar una molécula lipófila como el itraconazol en su interior. Se utiliza tanto en la solución oral como en la intravenosa. Esta molécula puede acumularse en pacientes con insuficiencia renal cuando reciben la formulación intravenosa, mientras que en la formulación oral no se absorbe [138].

Tanto el itraconazol como su metabolito activo, hidroxiiitraconazol, presentan una elevada unión a proteínas plasmáticas. La fracción de fármaco libre tiene una elevada penetración tisular, alcanzando altos niveles en pulmón, riñón y epidermis, mientras que las concentraciones en ojo y LCR son del orden de trazas [139].

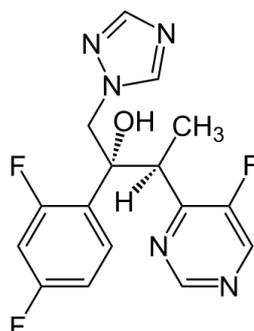
El metabolismo es hepático a través del CYP450 (en particular la isoenzima CYP3A4) dando lugar a más de 30 metabolitos. Más del 15 % del fármaco se elimina en heces y la eliminación urinaria de metabolitos inactivos es de aproximadamente el 40 %. Las infecciones urinarias no pueden tratarse con itraconazol ya que el fármaco activo no aparece en orina [133].

Itraconazol ha mostrado eficacia en la profilaxis y tratamiento de la aspergilosis y aspergilosis broncopulmonar alérgica [135,140]. En cuanto a las recomendaciones de las guías clínicas, la solución oral o intravenosa de itraconazol en la profilaxis de AI en pacientes con LMA tiene una evidencia B-I, mientras que en pacientes con EICH grave en TPH alogénico aumenta hasta A-II [54]. Las cápsulas presentan una menor biodisponibilidad que la solución oral, por lo que no están indicadas en la profilaxis de este tipo de pacientes, pero podrían ser útiles en la terapia secuencial de aspergilosis sistémica. En cuanto al tratamiento de la AI, el itraconazol se reserva como antifúngico de rescate, prefiriendo otros fármacos para el tratamiento de primera línea [141].

Los efectos adversos incluyen intolerancia gastrointestinal y edema periférico. Existe relación entre toxicidad y concentraciones plasmáticas elevadas de itraconazol [142]. Debido a la absorción errática del itraconazol y a que no tiene propiedades farmacocinéticas lineales, se recomienda su monitorización para guiar la toma de decisiones clínicas. Los niveles plasmáticos en profilaxis deben estar por encima de 0,5 mg/L y entre 1 - 2 mg/L durante el tratamiento [143].

#### ***1.9.1.2. Voriconazol***

Es un triazol de segunda generación de amplio espectro antifúngico: *Aspergillus* spp, *Candida* spp, *Scedosporium* spp y *Fusarium* spp. Se ha demostrado su actividad fungicida frente a *Aspergillus* spp [144] y es el tratamiento de primera línea de la AI de acuerdo con las recomendaciones, entre otras, de las Sociedades Española y Americana de Enfermedades Infecciosas [37,54,56].



**Figura 16: Estructura química del voriconazol [4].**

Se encuentra disponible en comprimidos orales o solución para perfusión. Requiere una dosis de carga el primer día de 6 mg/kg/12 h intravenosa o 400 mg/12 h vía oral, seguidas de 4 mg/kg/día o 300 mg/12 h respectivamente. Se puede realizar profilaxis con voriconazol oral (200 mg/12 h) en pacientes que reciban TPH alogénico [2].

La absorción oral del voriconazol es buena, empeorando en presencia de comida. Su biodisponibilidad es superior al 90 % [145].

El voriconazol es un fármaco con capacidad lipófila, con un volumen de distribución y una unión a proteínas intermedias, por lo que penetra bien en las capas acuosas pero también tiene una buena penetración tisular, incluso a LCR [139].

Su metabolismo es hepático, a través de las enzimas CYP2C19, 2C9 y 3A4. No presenta metabolitos activos. Existen polimorfismos en el gen CYP2C19 que juegan un papel importante en la variabilidad interindividual ya que los metabolizadores lentos (portadores de un gen delecionado o defectivo que se traduce en una proteína con función disminuida) eliminan más lentamente el fármaco y por tanto tienen una mayor exposición sistémica a éste

y mayor riesgo de efectos adversos [133]. Además, el metabolismo del fármaco puede saturarse dando lugar a una cinética no lineal en la que no se pueden predecir los niveles plasmáticos tras cambios en la dosis [143]. Menos del 2 % del voriconazol se excreta por vía urinaria como fármaco inalterado, por lo que no debe utilizarse en el tratamiento de infección urinaria [145].

Su eficacia y seguridad fueron demostradas en un estudio multicéntrico aleatorizado en el que se comparaba con anfotericina B desoxicolato [146]. El tratamiento con voriconazol se asoció con una mayor probabilidad de respuesta parcial o completa y una menor mortalidad. Además, hubo menos cambios de antifúngico debido a efectos adversos en el grupo de pacientes tratados con voriconazol que en el de tratados con anfotericina B. Lamentablemente, no hay estudios comparando la eficacia y seguridad de voriconazol frente a las fórmulas lipídicas de anfotericina B, las cuáles han mostrado un buen perfil de seguridad y una menor nefrotoxicidad que la anfotericina B convencional [147].

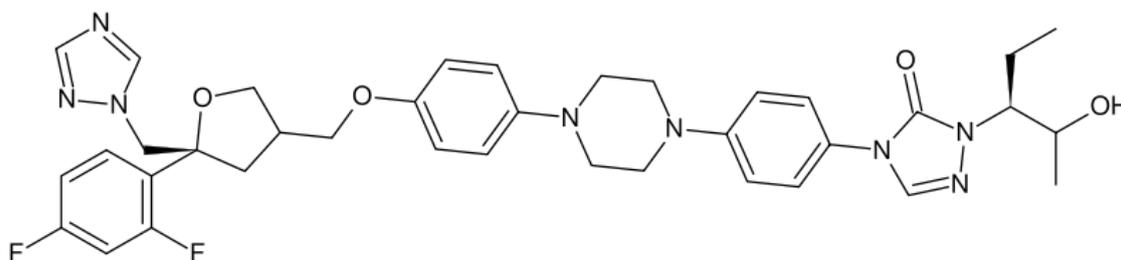
Sin embargo, como todos los fármacos, no está exento de efectos adversos. Algunos de los más comunes son alteraciones visuales, toxicidad neurológica y toxicidad cutánea. Las alteraciones visuales (fotopsia, fotofobia, cambios en los colores, etc.) son transitorias y parecen estar relacionadas con altas concentraciones plasmáticas de voriconazol. En el caso de la toxicidad neurológica se correlaciona con niveles plasmáticos superiores a 5,5 mg/L e incluye agitación, confusión, alucinaciones visuales y auditivas. Estos efectos ceden cuando la concentración plasmática disminuye [148]. Finalmente, se ha observado asociación entre el uso prolongado de voriconazol y el desarrollo de cáncer de piel en pacientes receptores de trasplante de pulmón [149]. Otras

manifestaciones clínicas de toxicidad cutánea incluyen rash tras la exposición solar.

Debido a que el voriconazol no posee propiedades farmacocinéticas ni farmacodinámicas lineales, que puede haber una gran variabilidad interpersonal y que existe una correlación entre la concentración plasmática y la eficacia y toxicidad, se recomienda su monitorización [133]. El rango terapéutico del voriconazol se ha estimado entre 1 - 5,5 mg/L; los niveles plasmáticos en valle inferiores a dicha concentración se asocian con mayor probabilidad de fracaso terapéutico y niveles superiores con riesgo de encefalopatía [148].

#### ***1.9.1.3. Posaconazol***

El posaconazol fue aprobado en el año 2005 y presenta como ventaja respecto al voriconazol, un espectro ampliado frente a hongos mucorales [150].



**Figura 17: Estructura química del posaconazol [4].**

En España se encuentra comercializado en forma de suspensión oral, comprimidos gastroresistentes y concentrado para solución para perfusión [136]. Está aprobado para profilaxis de infección fúngica en pacientes hematológicos y para el tratamiento de rescate de AI en pacientes oncohematológicos [54]. La dosis habitual de los comprimidos

gastroresistentes y de la formulación intravenosa es de 300 mg/día con una dosis de carga (300 mg/12 h el primer día), tanto para la profilaxis como para el tratamiento. La suspensión oral se dosifica tres veces al día en profilaxis y cuatro veces al día en tratamiento [133].

La absorción del posaconazol está favorecida por las comidas grasas y la acidez gástrica que proporcionan por ejemplo, las bebidas de cola, probablemente debido a una mayor solubilidad del principio activo. Por el contrario, fármacos antiácidos disminuyen su absorción [151]. Esto hace que su absorción sea muy variable, especialmente en el caso de la suspensión oral, mientras que los comprimidos gastroresistentes están formulados en un polímero que limita la disolución en el estómago y maximiza su absorción en el intestino delgado [152]. La absorción se satura a partir de 800 mg/día, por lo que es mejor la administración de varias dosis bajas que una única dosis alta. En el caso de los comprimidos gastroresistentes, la administración de una única dosis diaria da lugar a concentraciones plasmáticas correctas y con menos variabilidad interpersonal [153]. Es un fármaco lipófilo, con un gran volumen de distribución y unión a proteínas plasmáticas, que penetra bien en tejidos no acuosos [139]. Su metabolismo es hepático y se excreta como fármaco inactivo en orina y heces.

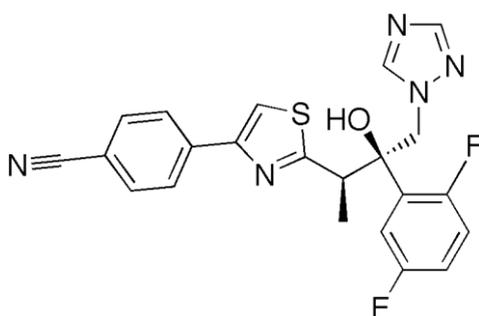
El posaconazol ha mostrado eficacia en el tratamiento de AI en pacientes intolerantes o con infección refractaria a itraconazol o anfotericina B en un estudio multicéntrico [154]. Sin embargo, su mayor utilidad es en la profilaxis de infección fúngica en pacientes con neutropenia, en los que es el fármaco de elección [37,54,55].

Los efectos adversos del posaconazol son principalmente las alteraciones gastrointestinales. En general el posaconazol tiene un mejor perfil de seguridad que otros triazoles. Se debe tener en cuenta en pacientes con insuficiencia renal que la formulación intravenosa incluye ciclodextrina, que se puede acumular, como ocurre en el caso del itraconazol y del voriconazol y por tanto, se debe ajustar la dosis [54,133].

Debido a las diferencias en la absorción (sobre todo en el caso de la suspensión oral) y a que los pacientes con diarrea y mucositis pueden presentar concentraciones plasmáticas bajas, se recomienda la monitorización de este antifúngico. Dada la relación existente entre los niveles plasmáticos y la eficacia, se recomienda una concentración plasmática superior a 0,5 - 0,7 mg/L durante la profilaxis y concentraciones superiores a 1 mg/L en el caso de tratamiento [155,156]. No hay evidencia de que niveles elevados se correlacionen con toxicidad.

#### ***1.9.1.4. Isavuconazol***

Es el último triazol aprobado por las agencias del medicamento para el tratamiento de AI y mucormicosis, se trata por tanto de un antifúngico de amplio espectro.

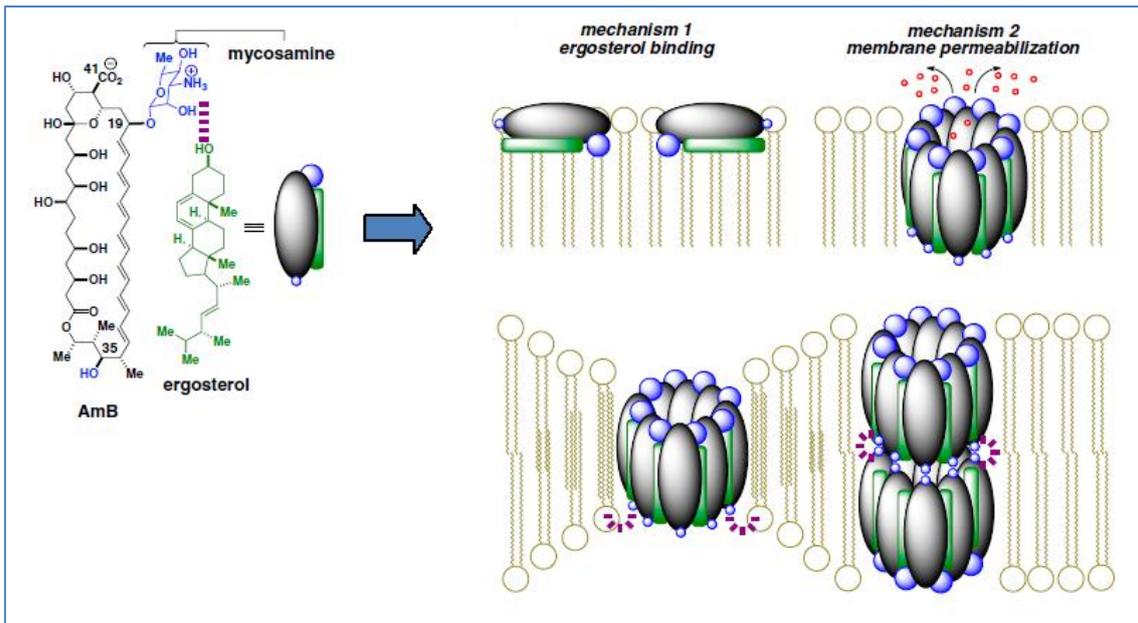


**Figura 18: Estructura química del isavuconazol.**

Presenta varias ventajas con respecto a los triazoles previos; es hidrosoluble, tiene una buena biodisponibilidad por vía oral y una farmacocinética lineal. Se encuentra disponible en formulación oral e intravenosa (sin ciclodextrina ya que no es necesario solubilizarlo) [157]. En España estas formulaciones aún no han sido comercializadas aunque se encuentran aprobadas. Recientemente se ha publicado un estudio de no inferioridad de fase 3, que lo compara con voriconazol en el tratamiento de primera línea de AI, en el que isavuconazol ha mostrado ser seguro y eficaz [158]. La dosis de isavuconazol empleada en dicho estudio fue de 200 mg/8 h los dos primeros días, seguido de una dosis de 200 mg/día. En la última guía europea para el tratamiento de AI en pacientes con leucemia y receptores de TPH publicada a principios de 2017, el isavuconazol se encuentra recogido como fármaco de primera línea, con un grado de evidencia A-I, debido a su perfil de eficacia y a ser mejor tolerado que el voriconazol (que se mantiene como fármaco de primera línea con evidencia de grado A-I) [56].

### 1.9.2. Polienos

La anfotericina B es un antifúngico macrocíclico y poliénico producido mediante fermentación por *Streptomyces nodosus*. Fue descubierto en la década de los 50. Debido a su estructura (**Figura 19**), es capaz de unirse al ergosterol de la membrana celular de forma irreversible y formar poros que alteran su permeabilidad (**Figura 14**) [159].



**Figura 19: Estructura química y mecanismo de acción de la anfotericina B.** Adaptado de [159].

Tiene actividad frente a la mayoría de hongos clínicamente relevantes como *Candida* spp, *Aspergillus* spp y mucorales. Pese a su amplio uso durante las últimas décadas, se han descrito pocas resistencias adquiridas. Sin embargo, algunas especies presentan resistencia intrínseca, como es el caso de *A. terreus*, *Fusarium* spp y *Scedosporium* spp. Además, la exposición de *Candida lusitanae* a anfotericina B puede provocar resistencia [160].

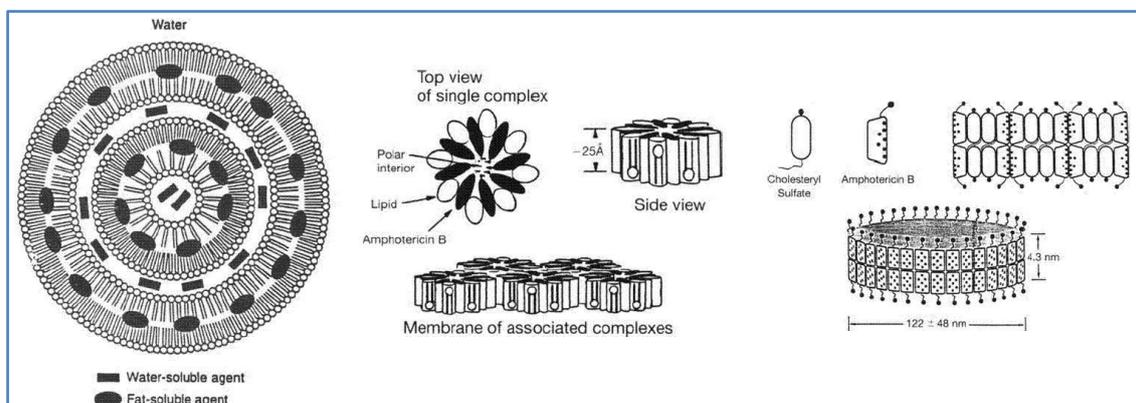
Es una molécula anfipática, con baja solubilidad en agua. Inicialmente se formuló junto a desoxicolato en forma de suspensión micelar para facilitar su administración intravenosa. Desgraciadamente esta forma farmacéutica resulta muy nefrotóxica ya que provoca vasoconstricción de las arteriolas renales y a que se une al colesterol de las membranas de los humanos (con menor afección que al ergosterol fúngico) presentes en el túbulo renal, dañándolos [147]. También aparecen efectos adversos relacionados con la administración: fiebre,

escalofríos, artralgias, vómitos, dolor de cabeza... Por este motivo, se han desarrollado formulaciones lipídicas (**Figura 20**) que permiten administrar una mayor dosis de antifúngico con menor toxicidad:

- *Anfotericina B liposomal*: los liposomas son vesículas formadas por una membrana (bicapa lipídica). Los fosfolípidos presentes en estas membranas tienen una “cabeza” polar hidrosoluble y una “cola” apolar liposoluble. Estos fosfolípidos se disponen formando una esfera en la que las cabezas quedan en contacto con el agua y las colas quedan en el interior. En este ambiente lipófilo, se pueden introducir moléculas anfipáticas como la anfotericina B [161].
- *Anfotericina B dispersión lipídica*: la anfotericina B se intercala entre los lípidos formando una estructura con forma de cinta [161].
- *Anfotericina B dispersión coloidal*: en este caso, dos moléculas de anfotericina B se unen a dos moléculas de sulfato de colesterol (un metabolito del colesterol) formando un tetrámero con una zona hidrofílica y otra hidrofóbica. Varios tetrámeros se unen quedando la zona hidrofílica de la anfotericina hacia el exterior [147]. Los fosfolípidos sintéticos tienen una mayor afinidad por la anfotericina B que el colesterol de las membranas celulares del epitelio renal, por lo que se libera menos fármaco y se reduce la toxicidad que provoca [147].

Las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la anfotericina B difieren según la forma farmacéutica aunque existen algunas generalidades: (i) no se absorbe por vía oral por lo que solo está disponible para perfusión intravenosa o nebulización; (ii) se distribuye lentamente a los tejidos, donde se

acumula; (iii) la penetración en LCR y en el ojo es baja; (iv) se desconoce la vía de metabolismo y no se han identificado metabolitos; (v) la excreción urinaria y biliar representa tan solo el 5 % de la dosis eliminada [139].



**Figura 20: Esquema de las diferentes formulaciones farmacéuticas de la anfotericina B.** Izquierda) liposoma, centro) dispersión lipídica, derecha) dispersión coloidal [161].

Las tres formulaciones lipídicas están aprobadas para tratamiento de rescate de la AI, además, la anfotericina B liposomal se ha empleado durante años en el tratamiento empírico del paciente neutropénico febril [55]. La dosis de anfotericina B liposomal es de 3 a 5 mg/kg/día. En un estudio en pacientes con AI probable o probada se comparó este régimen con uno de dosis mayores (10 mg/kg/día) a las que la anfotericina B liposomal alcanza niveles plasmáticos máximos. La tasa de respuesta fue similar pero la nefrotoxicidad fue mayor en el grupo de pacientes que recibió dosis altas [162].

La monitorización de anfotericina B no está recomendada ya que la eficacia clínica y la toxicidad están más relacionadas con la forma farmacéutica que con la concentración plasmática [133]. Sin embargo, conforme se vayan obteniendo más datos clínicos puede que la evidencia cambie [156]. De hecho,

en un estudio *in vitro* reciente, comprobaban que existía sinergia entre anfotericina B y voriconazol cuando la exposición era a dosis bajas de anfotericina B y dosis altas de voriconazol. Este régimen era más eficaz que la monoterapia con cualquiera de los dos antifúngicos por lo que recomendaban la monitorización en pacientes tratados con ambos fármacos [163].

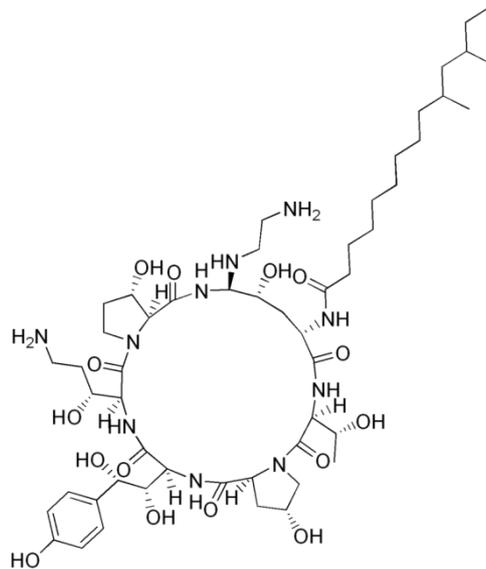
### 1.9.3. Equinocandinas

Las equinocandinas son la última clase de antifúngicos descubierta. Tienen estructura de lipopéptido y su síntesis es por modificación sintética de los derivados de fermentación de algunos hongos. Inhiben de forma no competitiva la enzima necesaria para la síntesis de (1→3)β-D-glucano de la pared celular del hongo (**Figura 14**). La integridad osmótica, la división y el crecimiento fúngico se ven comprometidos ya que el glucano y la quitina son los principales polisacáridos de la pared del hongo [164]. Dependiendo de la proporción de glucano presente en la pared celular, las equinocandinas serán más activas, de esta manera, *Candida* spp tiene una elevada proporción y por tanto se considera que las equinocandinas son fungicidas, mientras que la cantidad de glucano en la pared de *Aspergillus* spp es menor y sólo se consideran fungistáticas. Son muy activas frente a *Pneumocystis* spp, pero el orden Mucorales, *Fusarium* spp y *Scedosporium* spp no presentan enlace glucosídico β(1→3) y en *C. neoformans* predominan los enlaces β(1→6) [165].

Las tres equinocandinas (caspofungina, anidulafungina y micafungina) presentan características farmacocinéticas y farmacodinámicas y perfiles de seguridad similares. Ninguna de ellas se absorbe por vía oral, por lo que su

administración es exclusivamente intravenosa. Son moléculas grandes con elevada unión a proteínas plasmáticas, por lo que se distribuyen mal a tejidos acuosos [139]. Caspofungina y micafungina se excretan en la orina y las heces tras sufrir metabolismo hepático, mientras que anidulafungina se degrada en el plasma de forma no enzimática y sufre excreción hepática [165].

La única equinocandina aprobada para el tratamiento de rescate de la AI es la caspofungina [166]. Sin embargo, se considera que anidulafungina y micafungina tienen eficacia similar. La experiencia clínica de las equinocandinas es mayor en terapia combinada que en monoterapia, por lo que en el **apartado 1.9.4** se revisa el papel de la terapia con dos antifúngicos en el tratamiento de la AI.



**Figura 21: Estructura química de la caspofungina [4].**

En general, las equinocandinas son bien toleradas y presentan menos efectos adversos que otras clases de antifúngicos. Las reacciones adversas más frecuentes son reacciones de hipersensibilidad o relacionadas con la

infusión, particularmente cuando la infusión de anidulafungina supera 1,1 mg/minuto [165]. También pueden dar lugar a hepatotoxicidad con elevación de la fosfatasa alcalina y aminotransferasas [166].

No existe indicación para la monitorización de los niveles de equinocandinas ya que su farmacocinética es lineal y no se conoce relación concentración-toxicidad [167].

#### **1.9.4. Terapia combinada**

Algunos expertos recomiendan la terapia combinada de equinocandina y voriconazol en el tratamiento inicial de la AI. Esto se basa en un estudio aleatorizado en el que se comparaba la eficacia y seguridad de la monoterapia con voriconazol vs el tratamiento conjunto de anidulafungina y voriconazol en el tratamiento de AI en pacientes hematológicos y receptores de TPH. En este estudio la mortalidad en el grupo que recibió tratamiento combinado fue menor que en el de monoterapia (19,5 % vs 27,8 %), siendo esta diferencia más notoria cuando el diagnóstico de AI se había realizado precozmente mediante GM [168]. En las formas diseminadas o avanzadas de AI, la terapia combinada no parece ser superior a la monoterapia [2]. En otro estudio retrospectivo en el que se comparaba voriconazol vs voriconazol combinado con caspofungina en receptores de TPH, no se encontraron diferencias en la evolución clínica entre ambos grupos [166].

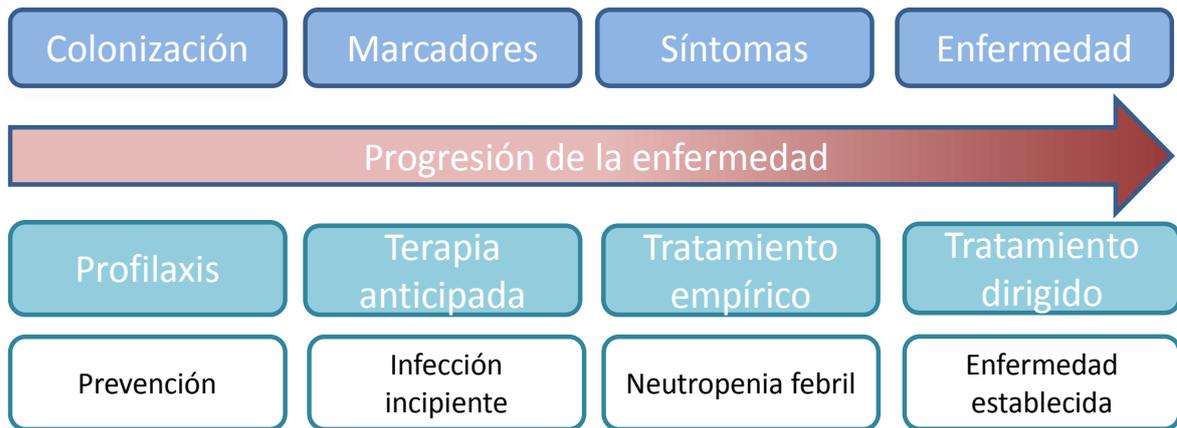
Debido al diferente mecanismo de acción de las equinocandinas y la anfotericina B, se cree que la terapia combinada en este caso podría tener

interés, sin embargo, no se han llevado a cabo ensayos clínicos aleatorizados que lo demuestren.

Se acepta que la terapia combinada entre anfotericina B y triazoles tiene efecto antagonista debido a que los triazoles disminuyen la cantidad de ergosterol al que tiene que unirse la anfotericina B [169]. Un estudio *in vitro* reciente sugiere que esto sólo ocurre cuando el hongo se expone a dosis altas de anfotericina B y a dosis bajas de voriconazol, mientras que existe sinergia cuando se invierte la exposición a estos dos antifúngicos [163].

### **1.10. Utilidad de los biomarcadores en diferentes estrategias terapéuticas**

La introducción de los biomarcadores serológicos en la práctica clínica ha supuesto un gran avance en el diagnóstico de los pacientes con AI. En un estudio realizado post-mortem en el año 1999, se evidenció que el GM se anticipa una media de 6 días a la aparición de signos clínicos de infección [170]. En otro estudio publicado en el año 2002 por Maertens y cols., el cribado seriado de GM precedía entre 8 y 9 días la aparición de signos radiológicos de infección en el 80 - 88,8 % de los pacientes [171]. Esto despertó un gran interés en la utilidad del GM como marcador precoz de AI. Se han estudiado diversas estrategias de manejo de los pacientes en riesgo de AI en las que los biomarcadores se utilizan tanto para diagnóstico como para guiar el inicio anticipado del tratamiento antifúngico (**Figura 22**).



**Figura 22: Tipos de estrategias terapéuticas en el manejo del paciente hematológico de alto riesgo.** Adaptado de [172].

### 1.10.1. Profilaxis antifúngica en pacientes en riesgo de aspergilosis invasora

El objetivo de la profilaxis primaria es la prevención de la infección en los pacientes de riesgo. Las guías nacionales recomiendan la profilaxis con posaconazol en los pacientes oncohematológicos de alto riesgo: (i) aquéllos en los que se prevea que van a presentar neutropenia grave ( $< 500$  neutrófilos/mm<sup>3</sup>) prolongada más de 14 días, (ii) los pacientes en fase de inducción o de rescate de LMA, (iii) los receptores de TPH y (iv) los pacientes que reciben altas dosis de corticoides por EICH. La profilaxis primaria debe considerarse además en pacientes con riesgo moderado de IFI: (i) neutropenia severa entre 7 y 14 días, (ii) LMA en fase de consolidación, (iii) TPH-alogénico, HLA idéntico en pacientes menores de 40 años [54]. Ver **Tabla 3** en el **apartado 1.4.1**.

La duración de la profilaxis en los pacientes neutropénicos graves debe ser hasta la recuperación estable ( $> 500$  neutrófilos/mm<sup>3</sup>). En el caso de los

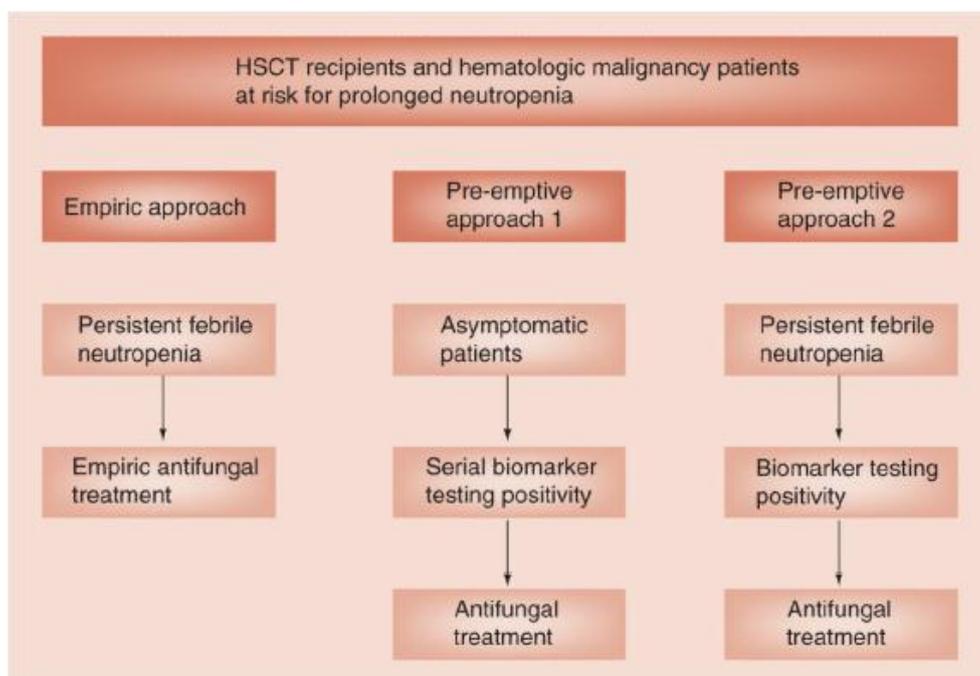
receptores de TPH debe mantenerse hasta el día +120. En el caso de EICH grave, debe prolongarse [54].

La profilaxis frente a hongos filamentosos tiene implicaciones directas sobre la utilidad de los biomarcadores en el cribado de pacientes de alto riesgo. Por una parte, se ha descrito que disminuye la sensibilidad de las técnicas diagnósticas como el GM [76]. Por otra parte, disminuye la incidencia de AI al 5 % aproximadamente lo que afecta directamente a la probabilidad pre-test y por tanto al rendimiento diagnóstico [173]. Por este motivo, varios estudios concluyen que la utilidad del cribado con GM en pacientes recibiendo posaconazol o micafungina es baja, mientras que su utilidad aumenta si el GM se solicita cuando existe sospecha clínica de AI [174–176]. Concretamente, en un estudio reciente, el VPP del cribado en pacientes asintomáticos era tan sólo del 11,9 % mientras que si la prueba se solicitaba por sospecha clínica, ascendía al 89,7 % [177]. Esto se debe a que pese a la profilaxis antifúngica, existe la posibilidad de una infección de brecha. En el estudio anteriormente citado, la incidencia de AI probable/probada en pacientes recibiendo profilaxis con posaconazol fue del 1,9 %. En otro estudio reciente en pacientes recibiendo profilaxis con posaconazol, la incidencia fue del 1,65 % y el único factor asociado a infección de brecha eran los niveles séricos de posaconazol bajos; inferiores a 0,3 mg/L [155].

La recomendación de los expertos actualmente es que, en los pacientes de alto riesgo de AI recibiendo profilaxis, los biomarcadores se reserven para el diagnóstico si existe sospecha clínica. El uso de biomarcadores se debe evitar en pacientes asintomáticos [37,69,172].

### 1.10.2. Estrategias de terapia antifúngica anticipada

Debido a que los biomarcadores serológicos se anticipan entre 8 y 9 días a los signos y síntomas de AI, se han propuesto nuevas estrategias terapéuticas basadas en estas pruebas. Se trataría, por tanto, de administrar antifúngicos a los pacientes con infección establecida (detectada mediante biomarcadores) sin que haya evidencia clínica de enfermedad, anticipándose así a la aparición de signos clínicos [54].



**Figura 23: Uso de biomarcadores en diferentes estrategias terapéuticas [178].**

La terapia antifúngica anticipada (TAA) puede perseguir dos objetivos: el primero sería reducir la incidencia de AI mediante la detección de biomarcadores seriados en pacientes asintomáticos y el segundo, guiar el tratamiento antifúngico, con el fin de administrarlo únicamente a pacientes con alta probabilidad de infección y evitarlo en los que es poco probable que estén padeciendo una AI. En esta segunda estrategia, los biomarcadores seriados se

realizarían a los pacientes de alto riesgo en un contexto de neutropenia febril persistente pese a tratamiento antibiótico [178]. Ambas estrategias están esquematizadas en la **Figura 23**.

Varios estudios han tratado de comparar la utilidad de la TAA con la terapia antifúngica empírica (TAE). En todos ellos la TAA mostró una reducción significativa del uso de antifúngicos respecto a la TAE, pero no demostró una reducción de la mortalidad [179,180]. Por el contrario, la utilidad en cuanto a la reducción de la incidencia de AI es controvertida, ya que algunos autores han descrito una mayor incidencia de AI en el grupo con TAA [181], mientras que en otros estudios la TAA parecía disminuir la incidencia de AI [182,183]. No existen estudios que hayan analizado la eficacia y seguridad de la TAA frente a la TAE, por tanto, actualmente no existe suficiente evidencia científica para recomendar la TAA [69].

### 1.10.3. Tratamiento empírico

Se debe considerar la TAE en pacientes de alto riesgo (principalmente aquéllos con neutropenia grave prolongada más de siete días) que persistan febriles tras 4 - 7 días de tratamiento antibiótico de amplio espectro en los que se desconozca el foco de la fiebre. En estos pacientes, los biomarcadores podrían guiar la retirada de la TAE siempre que los pacientes permanezcan estables, sin signos clínicos ni radiológicos de infección fúngica y en cuyos cultivos (de cualquier parte del cuerpo) no se hayan aislado hongos (como *Candida* spp o *Aspergillus* spp) [55].

Los pacientes que no hayan recibido profilaxis con antifúngicos, tienen mayor probabilidad de padecer una infección por *Candida* spp por lo que se podría iniciar tratamiento con fluconazol. Si el paciente ha recibido profilaxis con fluconazol, puede presentar una infección por una especie de *Candida* resistente a este azol o por un hongo filamentoso, por lo que se podría iniciar la terapia con voriconazol, una equinocandina o anfotericina B. La elección dependerá de la epidemiología local, la toxicidad y el coste. En el caso de que el paciente hubiera recibido profilaxis con antifúngicos activos frente a hongos filamentosos, se recomienda cambiar a otra clase de antifúngico por la posibilidad de resistencia a azoles [55]. En nuestro país la resistencia a azoles es baja (2,2 % a 3,6 % dependiendo del azol utilizado [27]), por lo que la causa más probable de ineficacia del tratamiento es la falta de niveles terapéuticos, sobre todo en el caso de administración del antifúngico por vía oral [184].

#### **1.10.4. Tratamiento dirigido**

El tratamiento específico o dirigido hace referencia a la terapia antifúngica una vez establecido el diagnóstico de AI [54]. Idealmente, el aislamiento del hongo en cultivo permite conocer tanto la especie infectante como realizar pruebas de sensibilidad antifúngica y conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI) que predice la probabilidad de éxito o fracaso terapéutico. Lamentablemente, el crecimiento del hongo en cultivo tiene una baja sensibilidad: los hemocultivos casi siempre son negativos y en el caso de las muestras respiratorias, el volumen sembrado limita la sensibilidad [8,185].

Por ello, en muchas ocasiones, el diagnóstico de AI se basa en la clínica, las imágenes radiológicas y la detección de biomarcadores séricos.

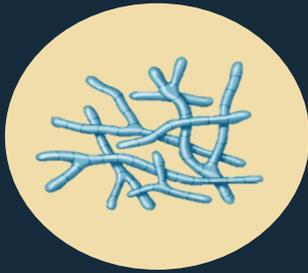
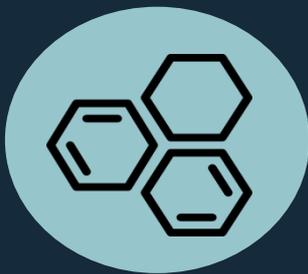
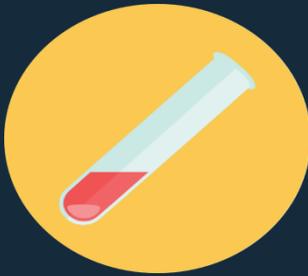
Existen varios antifúngicos disponibles para el tratamiento de la AI, cuyas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas se han desarrollado en el **apartado 1.9**. Sin embargo, el antifúngico de elección para el tratamiento de la AI es el voriconazol [37,54,56]. Las principales recomendaciones de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas publicadas en 2016 incluyen [37]:

- Inicio precoz del tratamiento antifúngico en pacientes con alta sospecha de AI.
- Tratamiento con voriconazol para la mayoría de las formas de AI (pulmonar, del sistema nervioso central, endocarditis, endoftalmitis, osteomielitis...)
- Además del tratamiento antifúngico, se debe restituir el sistema inmune del paciente, reduciendo los tratamientos inmunosupresores y recuperando la neutropenia.
- La resección quirúrgica de los tejidos infectados está recomendada para las lesiones focalizadas y de fácil acceso.
- La AI no es una contraindicación absoluta para recibir quimioterapia o TPH.

Estas recomendaciones pueden variar en función de la situación clínica del paciente, de su situación inmunológica y del tipo de infección [37].

### **1.10.5. Combinación de biomarcadores**

Como se ha visto hasta el momento, no existe un biomarcador que sea patrón de referencia de AI, todos tienen limitaciones, reactividades cruzadas, etc. Una estrategia que parece tener gran utilidad es combinar dos biomarcadores para el manejo del paciente, especialmente en el cribado. De esta forma, en un metaanálisis reciente en el que se evaluaba el rendimiento diagnóstico del GM en suero y la PCR en sangre completa para el cribado de AI en pacientes de alto riesgo, se obtenían buenas sensibilidades y especificidades para cada marcador (92 - 84 % y 90 - 76 %, respectivamente). Sin embargo, cuando se realizan las dos pruebas, la sensibilidad alcanza el 99 % tomando como positivo al menos uno de los marcadores. Por otra parte, si ambos marcadores son positivos, la especificidad alcanza el 98 % [186]. En un ensayo clínico en el que comparaba la utilidad del GM frente a la combinación de GM y PCR, el cribado con dos biomarcadores se asoció a un diagnóstico precoz y una menor incidencia de AI que si el cribado se hacía solo con GM [175]. Si bien estas estrategias han mostrado utilidad en algunos estudios, es necesario continuar las investigaciones, poniendo especial énfasis en los algoritmos de manejo del paciente en los que el abordaje sea integral, con el fin de obtener los mejores resultados diagnósticos y reducir el uso de antifúngicos empíricos [79].



## Antecedentes y objetivos



## 2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La prevalencia de la AI ha ido en aumento en la última década, pese a que en los pacientes de alto riesgo (LAM y TPH) recibiendo profilaxis antifúngica ha disminuido por debajo del 3 % [2,54]. Su mortalidad continua siendo inaceptablemente alta, alrededor del 50 %, por lo que son necesarios todos los esfuerzos para ofrecer a los pacientes un diagnóstico precoz que conlleve un inicio temprano del tratamiento [69,79]. Guiar la terapia empírica y anticipada a través de biomarcadores requiere de un profundo conocimiento de los mismos y, en muchas ocasiones, es necesario la combinación de varios para obtener el mejor rendimiento diagnóstico y facilitar la toma de decisiones [9]. Debido a las limitaciones de las pruebas diagnósticas actuales ya descritas, son necesarios tanto el desarrollo de nuevos biomarcadores como su validación clínica y el análisis de su utilidad en la práctica clínica real [78].

Nuestro grupo de investigación caracterizó en un modelo de ratón de AI que la GT es un factor de virulencia de *A. fumigatus* que favorece el establecimiento de la infección [45,187]. Asimismo, caracterizó el mecanismo a través del cual la GT ejercía su función tóxica sobre las células del huésped [113]. Durante los últimos años, hemos analizado la presencia de productos del metabolismo secundario de *A. fumigatus*, incluyendo la GT y su forma metilada inactiva bmGT, en muestras de suero humanas [132]. Este trabajo supuso la validación analítica de la detección de bmGT en suero. Se describieron

parámetros analíticos como el límite de detección y cuantificación, la selectividad y especificidad, la eficiencia, el intervalo lineal y el rango de trabajo, la exactitud y la precisión [132]. Sin embargo, eran necesarios estudios clínicos para completar la validación de la detección de bmGT en el diagnóstico de AI. En el trabajo mencionado anteriormente, además de muestras humanas se analizó la frecuencia de producción de bmGT por la especie *A. fumigatus* [132]. Continuando con dicha línea de investigación, en la presente tesis se han realizado tanto estudios *in vivo* en suero de pacientes como *in vitro*, en filtrado celular fúngico. Los estudios *in vivo* han tenido como finalidad la validación clínica de la bmGT en el diagnóstico de AI y la caracterización de los parámetros diagnósticos (sensibilidad, especificidad, reactividad cruzada...). Los estudios *in vitro* han servido para profundizar en el conocimiento de la bmGT como biomarcador, ya que se ha caracterizado la distribución de especies productoras y el efecto de la adición de sustancias como la GT y el antifúngico voriconazol sobre dicha producción.

Por todo ello, el **objetivo principal** de esta tesis ha sido:

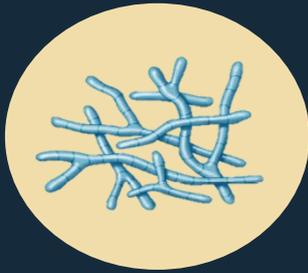
*“Conocer la distribución de especies productoras de bmGT y evaluar la validez clínica de la detección serológica de bmGT en el diagnóstico y manejo de los pacientes en riesgo de AI”*

Para llevar a cabo dicho objetivo, han sido necesarios los siguientes

**objetivos intermedios:**

1. Analizar la producción *in vitro* de GT y bmGT por diferentes especies de *Aspergillus* y otros hongos oportunistas con el fin de conocer la distribución de especies productoras de ambas toxinas.
2. Evaluar la capacidad de producción de bmGT a partir de GT exógena por el género *Aspergillus* y otros hongos oportunistas para determinar la distribución de especies potencialmente productoras de bmGT.
3. Evaluar el efecto del voriconazol sobre la producción de GT y bmGT en aislados de *A. fumigatus* con la finalidad de averiguar si la presencia de antifúngico disminuye la capacidad de producción de toxinas.
4. Comparar el rendimiento diagnóstico de la detección serológica de bmGT con el GM. Se pretende determinar si la bmGT es un mejor biomarcador de AI que el GM, el método diagnóstico más empleado en la práctica clínica.
5. Determinar si la presencia en sangre de hongos oportunistas diferentes de *Aspergillus* interfiere en la detección de bmGT. Para ello, se determinó la presencia de bmGT en pacientes con fungemia.
6. Correlacionar la presencia de bmGT con la gravedad, comparando la mortalidad y la necesidad de antifúngicos entre los pacientes con bmGT detectable y los que no.
7. Evaluar el aclaramiento sérico de bmGT en presencia de niveles terapéuticos de voriconazol, con el fin de determinar *in vivo* el efecto de los antifúngicos sobre la cinética del biomarcador.





## Materiales y métodos



## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Análisis de la producción de GT y bmGT *de novo*

Se analizó la producción *in vitro* de GT y bmGT en diferentes especies del género *Aspergillus* y otros hongos oportunistas.

#### 3.1.1. Procedencia de los aislados

La procedencia de los aislados era fundamentalmente clínica, aunque también se analizaron algunos aislados ambientales. Los aislados clínicos procedían en su mayoría del Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS) de Zaragoza. Se analizaron varios aislados de especies crípticas cuya procedencia fue el Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, cortesía del Dr. Bouza y la Dra. Peláez. Finalmente, se obtuvieron aislados ambientales y clínicos del Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis (Países Bajos) cortesía del Dr. Meis.

#### 3.1.2. Pase de archivo

La siembra se realizó a partir de los archivos en agar Sabouraud con cloranfenicol en pico de flauta (OXOID, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Para ello, en cabina de flujo laminar de nivel II, se flameó una espátula

micológica que se introdujo en el vial de archivo tras dejar enfriar. A continuación, cogimos un pequeño fragmento de hongo, lo depositamos en la base del agar en pico de flauta y sacamos la espátula micológica dibujando un zigzag en el pico de flauta. Los aislados así sembrados, se incubaron a 37°C durante dos o tres días o hasta obtener un micelio pigmentado.

### **3.1.3. Cultivo en medio líquido**

A partir de las siembras en pico de flauta, se realizó una suspensión de conidias en agua destilada estéril. Para ello, se impregnó un hisopo estéril en Tween 20, se recogieron las conidias y se dispersaron en agua estéril. El Tween 20 es un tensioactivo que favorece la dispersión de las conidias en agua, impidiendo la formación de agregados. Posteriormente, se ajustó la turbidez de conidias en un espectrofotómetro DINKO D-100 (DINKO, Barcelona, España) a 12 McFarland, que se corresponde con  $3 - 5 \times 10^7$  ufc/mL. Dicha suspensión se añadió a frascos de cuello inclinado de 50 mL (FALCON, Radnor, Pennsylvania) en relación 1/10 al medio de cultivo líquido, el cual era el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Lonza, Basilea, Suiza) suplementado con ácido hidroxietil-piperazinetanosulfónico (HEPES) (25 mM), glucosa (20 g/L) y glutamina (2 mM). Todo el proceso se llevó a cabo en cabina de flujo laminar. Los cultivos en medio líquido se incubaron a 37°C durante 4 días. Pasado este tiempo se extrajo una alícuota de aproximadamente 2 mL utilizando una aguja para atravesar el septum del tapón. Dicha alícuota se congeló en un tubo estéril a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

### 3.1.4. Extracción química de GT y bmGT

Se trata del paso previo al análisis de GT y bmGT mediante HPTLC. El objetivo de dicha extracción es solubilizar ambos metabolitos en una fase no-acuosa y desechar la fase acuosa que contiene una gran cantidad de sustancias fúngicas que dificultarían la posterior separación y análisis mediante HPTLC. La GT y la bmGT son poco solubles en agua pero su solubilidad es mayor en sustancias como metanol o diclorometano (DCM). El DCM es un disolvente polar aprótico muy volátil, por lo que se eligió para la extracción, que se realizó de acuerdo al siguiente protocolo [132]:

- Se toman las alícuotas de 2 mL obtenidas de los cultivos líquidos y se depositan en frascos de vidrio opaco de 20 mL.
- Se vierten unos 10 mL de DCM (PanReac AppliChem, Barcelona, España) en cada frasco de vidrio. El DCM es insoluble e inmiscible en agua por lo que se forman dos fases; la fase no-acuosa compuesta por el DCM en la parte inferior del frasco, y la fase acuosa que contiene el sobrenadante de los cultivos.
- Se cierran fuertemente los frascos y se agitan mediante vórtex durante 30 segundos para mezclar bien ambas fases.
- Se abre el tapón de cada frasco y se deja que ambas fases se separen durante 5 minutos.
- Con una micropipeta, se trasvasa la fase no-acuosa a otro frasco de vidrio opaco de 20 mL limpio y seco.
- Se evapora la fase no-acuosa en corriente de argón o de nitrógeno para eliminar todo el DCM.

- Se vierte 1 mL de DCM por las paredes del frasco intentando redissolver toda la GT y/o bmGT que haya podido quedar en la pared durante la evaporación.
- Se trasvasa nuevamente el volumen de DCM que contiene la toxina disuelta a un vial de 1,5 mL de vidrio.
- Se vuelve a evaporar el DCM en corriente de argón o nitrógeno para poder concentrar más la muestra.
- Finalmente, se resuspende el contenido del vial en 100  $\mu$ L de DCM, que serán analizados mediante HPTLC.

### **3.1.5. Detección y cuantificación de GT y bmGT mediante HPTLC**

El objetivo fundamental de cualquier tipo de cromatografía es la separación de los componentes de una mezcla en base a sus diferentes propiedades físico-químicas. Se basa en la distribución de sustancias entre dos fases, una móvil y otra estacionaria. La primera, también conocida como eluyente, de naturaleza líquida o gaseosa tiene como misión arrastrar las sustancias a través de la fase fija. En la fase estacionaria o fija se produce la separación de la mezcla. Las separaciones se basan en las diferencias de distribución de los solutos entre el adsorbente (fase estacionaria) y el disolvente o eluyente (fase móvil) de acuerdo con sus respectivas isothermas de adsorción. Las sustancias se visualizan una vez desarrollada la placa mediante su color, absorción ultravioleta (UV) o revelado específico que produce una reacción coloreada.

El equipo de HPTLC empleado durante este ensayo, como se puede observar en la **Figura 24**, estaba compuesto por un inyector de muestras Linomat IV (Camag, Muttenz, Suiza), una cámara de desarrollo horizontal de elución (Camag), un escáner para cromatografía en capa fina, TLC Scanner IV (Camag) y el Software WinCats (Camag).



**Figura 24: Esquema del procesamiento de muestras mediante HPTLC.**

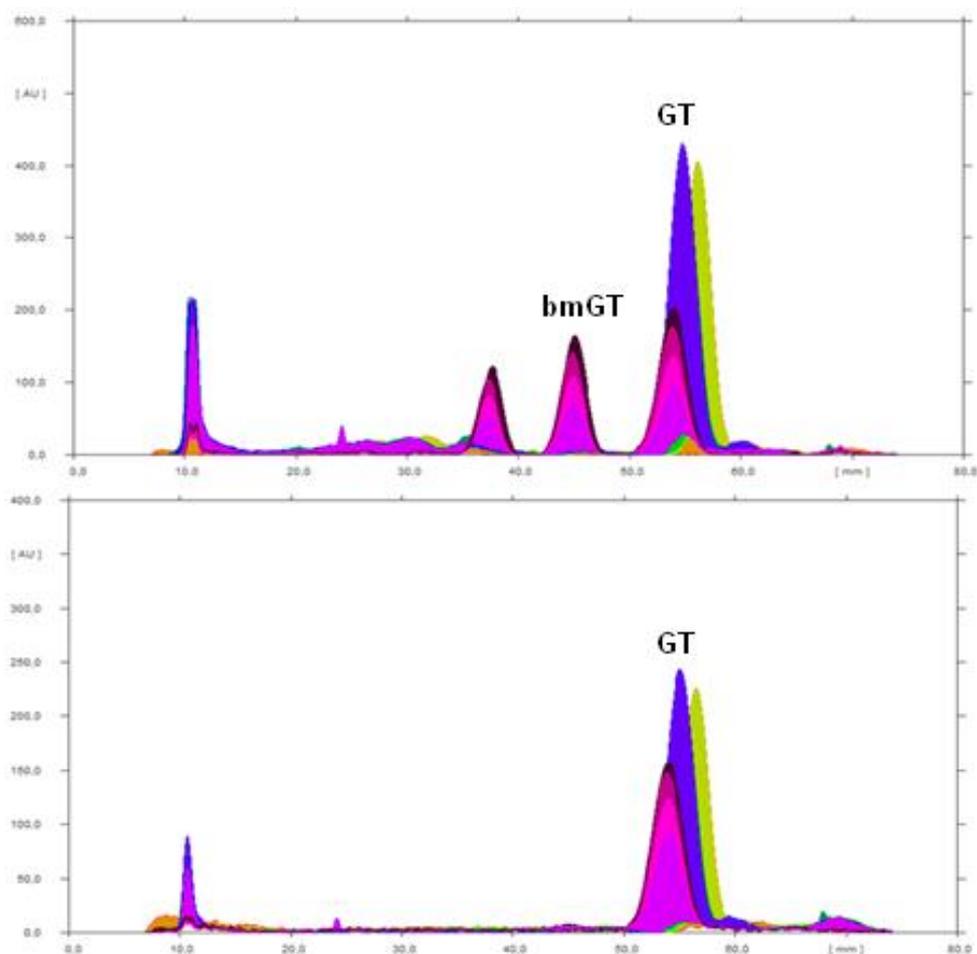
Una vez realizada la extracción química de GT y bmGT según se ha descrito en el apartado anterior, las muestras eran inyectadas en las placas cromatográficas de 10 cm x 10 cm. Estas placas están compuestas por un vidrio que actúa como soporte de la fase estacionaria, que es silicagel o gel de sílice. El inyector de muestras empleado, Linomat IV, es semiautomático; la carga de la muestra en la jeringuilla Hamilton de 100  $\mu$ L es manual, pero su aplicación en la placa cromatográfica es automática. Este automatizado permite reducir el tiempo empleado durante el proceso, así como la mejora en la precisión y la reproducibilidad de la técnica. La aplicación de la muestra se hace en modo de spray, es decir, la muestra que sale de la jeringa es dispersada por una corriente de nitrógeno para ser aplicada correcta y

homogéneamente sobre la placa cromatográfica. La corriente de nitrógeno también ayuda a evaporar el disolvente que contiene la muestra, en este caso DCM, permitiendo que el analito quede fijo en la placa cromatográfica.

Posteriormente, se introduce la placa cromatográfica en una cámara horizontal de elución donde se añade la fase móvil, la cual avanza por capilaridad a lo largo de la fase estacionaria. La fase móvil es una mezcla de tetrahidrofurano 58 %, heptano 40 % y acetonitrilo 2 % (PanReac). Esta mezcla es capaz de arrastrar ambas toxinas. Transcurridos 25 minutos, la fase móvil alcanza el otro extremo de la placa cromatográfica y la elución se detiene. Durante este proceso ambas toxinas se separan lo suficiente para que se puedan observar dos picos cromatográficos diferenciados en el cromatograma y posibilitar su posterior detección y cuantificación.

A continuación, se saca la placa de la cámara horizontal de elución y se coloca en el escáner para cromatografía en capa fina, TLC Scanner IV, que permite la evaluación de los cromatogramas. En un primer análisis, se lleva a cabo un barrido completo de cada carril en el que se encuentran las muestras a las longitudes de onda ( $\lambda$ ) deseadas. Las  $\lambda$  seleccionadas para el presente estudio fueron 273 nm ( $\lambda_{273}$ ) y 350 nm ( $\lambda_{350}$ ), ya que la bmGT presenta un pico de absorción a  $\lambda_{273}$  y la GT presenta dos picos de absorción, uno a  $\lambda_{273}$  y otro a  $\lambda_{350}$  (**Figura 26**). De esta forma, el aparato localizará todas las sustancias que absorban a esas  $\lambda$  en cada carril de la placa, permitiendo crear un gráfico de la absorción de luz a dicha  $\lambda$  respecto a la posición en la placa de la sustancia que absorbe (**Figura 25**). La bmGT migra entre 40 y 50 mm y la GT migra a una distancia entre 50 y 60 mm. Si el analito correspondiente absorbe a las  $\lambda$  seleccionadas y la distancia de migración coincide con la del patrón, se puede

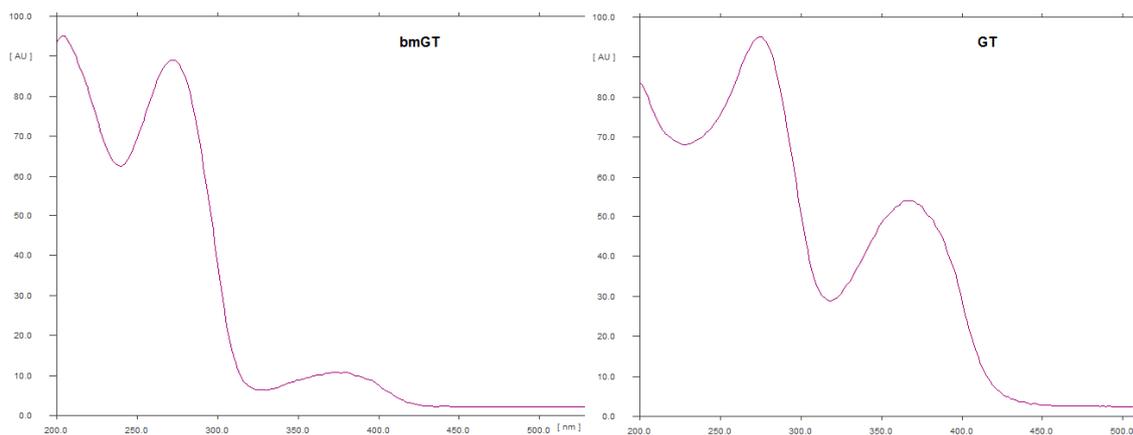
afirmar que en dicho carril hay toxina. Todo ello se corrobora además con la realización del espectro en el UV visible.



**Figura 25: Cromatogramas de absorción a  $\lambda_{273}$  (arriba) y  $\lambda_{350}$  (abajo).** Se muestran los cromatogramas de una placa en la que se han inyectado 4 patrones de concentración creciente de GT y bmGT (colores violeta a morado) y dos muestras de cultivos a los que se ha añadido GT exógena (colores azul y verde). En la gráfica de arriba puede advertirse la presencia de bmGT en cuatro muestras ya que se observa un pico de absorción a  $\lambda_{273}$  a una distancia de migración entre 40 - 50 mm. La GT está presente en seis muestras ya que existe pico de absorción a la distancia de 50 - 60 mm tanto a  $\lambda_{273}$  (arriba) como  $\lambda_{350}$  (abajo). Nótese el aumento del tamaño de los picos para los patrones (colores violeta a morado), correspondiente a concentraciones crecientes (0,3 - 0,9 mg/L).

En un segundo análisis, el escáner se desplaza sobre la placa cromatográfica a las posiciones en las que había absorción a las  $\lambda$  indicadas y

realiza un barrido de absorción en el rango de  $\lambda_{200-700}$  (UV cercano-visible). En la **Figura 26** se pueden observar los espectros de absorción de la GT y la bmGT en dicho rango. Con este barrido, se comprueba que las sustancias tienen un espectro igual al de los patrones con el fin de confirmar la presencia de GT y bmGT.



**Figura 26: Espectros de absorción de bmGT y GT en la región UV-visible.** La bmGT presenta un único pico de absorción a  $\lambda_{273}$  mientras que la GT presenta además un segundo pico a  $\lambda_{350}$ .

Además de la localización concreta de cada mancha en la placa y de los espectros de absorción, el TLC Scanner IV con ayuda del software WinCats es capaz de determinar el área bajo la curva de absorción de cada mancha, permitiendo de esta forma la posterior cuantificación de dicha sustancia. La absorbancia se relaciona linealmente con la superficie de la mancha y con la masa. La cuantificación de toxinas se realiza por extrapolación del área bajo la curva de la muestra con respecto a la recta de calibrado. La recta de calibrado se lleva a cabo inyectando, además de las muestras, diferentes volúmenes de un patrón de concentración conocida en cuatro carriles. Los volúmenes inyectados son 3, 5, 7 y 9  $\mu\text{L}$  de patrón de concentración 0,1 mg/L de GT y

bmGT (Enzo Life Science, Farmingdale, NY, EEUU), los cuales mostrarán picos de absorción crecientes en el cromatograma.

### **3.2. Análisis de la producción de bmGT tras la adición de GT exógena**

El objetivo de este experimento fue conocer si aquellos aislados que no eran capaces de producir bmGT *de novo*, podían producirla a partir de una fuente de GT exógena.

#### **3.2.1. Procedencia de los aislados y pase de archivo**

Se analizaron 5 aislados clínicos procedentes del HUMS de las especies de *Aspergillus no-fumigatus* más frecuentemente aisladas en humanos; *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. nidulans* que no habían producido bmGT *de novo*. Para realizar el pase de archivo, se procedió como se ha descrito en el apartado 3.1.2.

#### **3.2.2. Cultivo en medio líquido**

El medio líquido empleado en este análisis fue Czapek Dox (BD Difco™, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EEUU) suplementado con glutamina (2 mM) y HEPES (25 mM). Se añadieron 9 mL de dicho medio a un frasco de cuello inclinado de 50 mL (FALCON) y se inocularon con 1 mL de

suspensión de conidias como se ha descrito en el **apartado 3.1.3**. Los frascos se incubaron a 37°C durante dos días.

### **3.2.3. Adición de GT**

Transcurridas 45 h de incubación, adicionamos GT (Enzo Life Science) a una concentración final de 2,5 mg/L. A las muestras control se les adicionó 100 µL de metanol. A partir del sobrenadante, se tomaron alícuotas de 2 mL tras 0, 3 y 6 h de la adición. Las alícuotas se congelaron en cámara de - 20°C hasta su posterior análisis.

### **3.2.4. Extracción química, detección y cuantificación de GT y bmGT mediante HPTLC**

La extracción, detección y cuantificación de GT y bmGT mediante HPTLC se llevó a cabo tal y como se ha descrito en los **apartados 3.1.4 y 3.1.5**.

## **3.3. Análisis de la producción de GT y bmGT en presencia de voriconazol**

En este caso se analizó la producción de GT y bmGT en presencia de diferentes concentraciones de voriconazol en el medio de cultivo con el fin de evaluar si el antifúngico interfiere en la producción o la detección de las toxinas.

### 3.3.1. Procedencia de los aislados y pase de archivo

Se analizaron 8 aislados clínicos de *A. fumigatus* procedente del HUMS que habían producido bmGT *de novo*. Para realizar el pase de archivo, se procedió tal y como se ha descrito en el **apartado 3.1.2**.

### 3.3.2. Cultivo en medio líquido

En este caso el medio utilizado para el cultivo líquido volvió a ser RPMI 1640 (Lonza) suplementado con HEPES, glucosa y glutamina tal y como se ha descrito en el **apartado 3.1.3**. Brevemente, con un hisopo estéril impregnado en Tween 20 se recogieron las conidias de un medio sólido y se realizó una suspensión en agua estéril de concentración 12 McFarland. Un mL de esta suspensión se añadió a un frasco de cuello inclinado de 50 mL al que previamente habíamos añadido 9 mL del medio líquido.

### 3.3.3. Adición de voriconazol

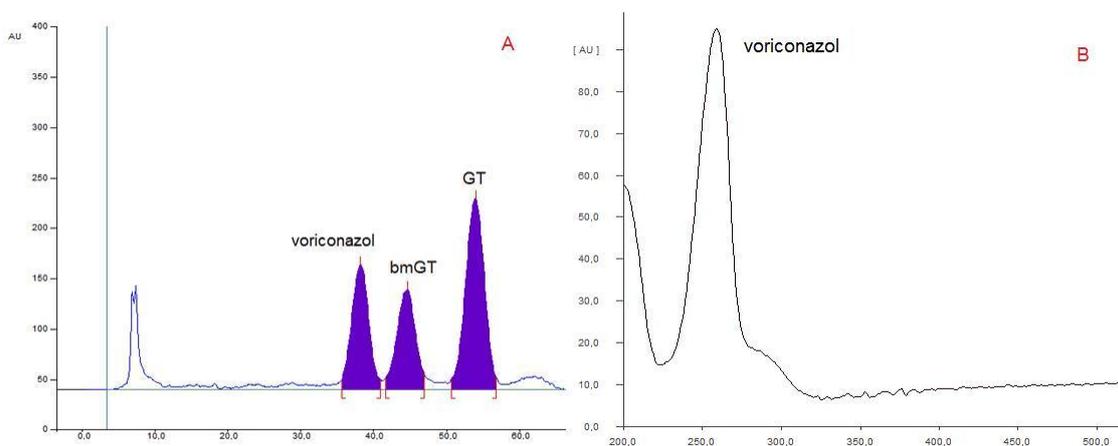
Se analizó la producción de GT y bmGT en presencia de cuatro concentraciones diferentes de voriconazol. Para ello, añadimos la cantidad correspondiente de voriconazol (Sigma Aldrich, San Luis, MO, EEUU) para obtener una concentración final de 0,125 mg/L, 0,25 mg/L, 0,50 mg/L y 1 mg/L en los frascos de cuello inclinado. La incubación se realizó a 37°C durante 96 h. Transcurrido el periodo de incubación, se tomaba una alícuota de 2 mL que se guardaba congelada a - 20°C hasta su posterior procesamiento.

### 3.3.4. Extracción química de voriconazol

El voriconazol, al igual que la GT y la bmGT, es soluble en DCM por lo que la extracción química se puede llevar a cabo tal y como se ha descrito en el apartado 3.1.4. Esto implica que llevando a cabo una única extracción química para cada muestra de cultivo, se puede analizar mediante HPTLC la presencia de las dos toxinas, GT y bmGT, y el voriconazol.

### 3.3.5. Detección y cuantificación de voriconazol mediante HPTLC

La detección y cuantificación de voriconazol mediante HPTLC se llevó a cabo de modo análogo a la de la GT y la bmGT. Tras su extracción química con DCM, las muestras son inyectadas en placas cromatográficas con ayuda del inyector semiautomático Linomat IV. Posteriormente, la placa es introducida en una cámara de elución utilizando una mezcla de tetrahidrofurano, heptano y acetonitrilo como fase móvil (ver apartado 3.1.5 para más detalles).



**Figura 27: a) Cromatograma de una muestra patrón de voriconazol, bmGT y GT. b) Espectro de absorción del voriconazol en la región UV visible. A) Se muestra el cromatograma a  $\lambda_{273}$  de una muestra patrón de bmGT, GT y voriconazol a concentración 0,1 mg/L. Nótese que el voriconazol, presenta absorción a  $\lambda_{273}$ , pese a que su pico de absorción máximo es a  $\lambda_{250}$ , tal y como se puede observar en B).**

Finalmente, la placa se introduce en el escáner UV y se analiza la presencia de voriconazol. Se debe tener en cuenta que el voriconazol migra a una distancia de 35 mm en la placa cromatográfica y que su pico de absorción máximo se obtiene a 250 nm ( $\lambda_{250}$ ), lo que significa que es necesario un barrido adicional a dicha  $\lambda$  para comprobar que el espectro es el correspondiente al voriconazol (**Figura 27**).

### 3.3.6. Ensayo de viabilidad fúngica

Se llevó a cabo un estudio de viabilidad fúngica con el fin de determinar la proliferación de *Aspergillus* spp a las diferentes concentraciones de voriconazol analizadas. Para ello, se llevó a cabo la prueba de reducción de la sal de tetrazolio, hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)-carbonil]-2H-tetrazolio (XTT), descrita por Meletiadis y cols [188].

El fundamento de dicha prueba consiste en un cambio de coloración debido a la conversión de la sal de tetrazolio en sal de formazán. Los electrones necesarios para dicha reducción provienen del NADPH producido por las deshidrogenasas mitocondriales durante la glicólisis. Esta biorreducción solo es posible en las células viables, y por tanto existe relación entre la reducción y el número de células viable. El XTT tiene una tonalidad amarilla clara o incluso incolora en disolución acuosa. Su estructura química se caracteriza por la presencia de un anillo con cuatro átomos de nitrógeno y uno de carbono unidos por dos dobles enlaces (**Figura 28**). Tras el ataque nucleófilo de dicho anillo, su estructura se rompe, dando lugar a la sal de

formazán, que tiene una coloración anaranjada viva con un máximo de absorción a 475 nm ( $\lambda_{475}$ ).

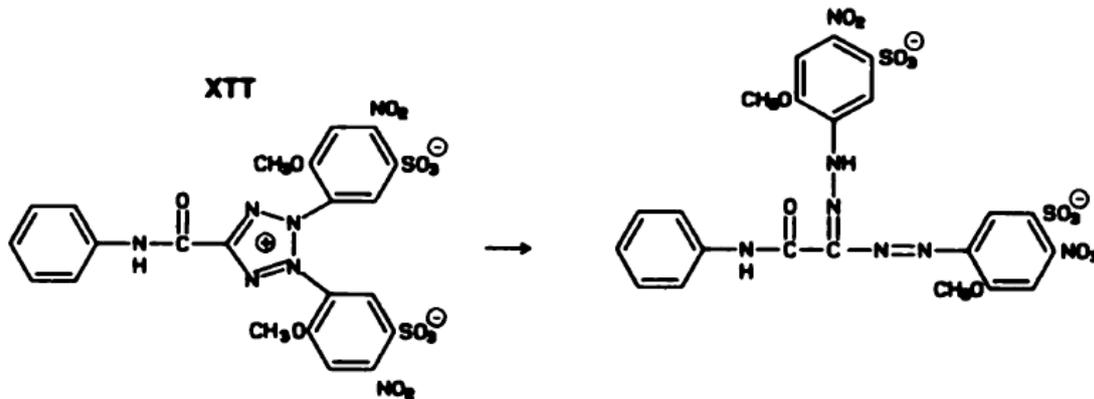


Figura 28: Estructura química de la sal de tetrazolio, XTT (izquierda), y de su derivado reducido, la sal de formazán (derecha) [189].

Para llevar a cabo dicho ensayo, se utilizaron microplacas de 96 pocillos redondos. Tras la incubación de 96 h según se ha descrito en el **apartado 3.3.3**, se tomaba una alícuota de 200  $\mu$ L del cultivo y se añadía en un pocillo de la microplaca y se procedía a medir la absorbancia a  $\lambda_{475}$  en un espectrofotómetro iMark (Bio-Rad). Posteriormente se añadían 20  $\mu$ L de una disolución de XTT de concentración 1 mg/mL y se incubaba la placa a 37°C durante 4 h. Pasado el tiempo de incubación, se volvía a medir la absorbancia a  $\lambda_{475}$ , obteniéndose la diferencia de absorbancias. Los datos se obtuvieron por duplicado y la diferencia de absorbancia se calculó como la media de ambas medidas.

Adicionalmente, el crecimiento fúngico se determinó macroscópicamente, mediante la visualización de una monocapa fúngica en el fondo de los frascos de cuello inclinado.

### **3.4. Utilidad de la bmGT en el diagnóstico y manejo de pacientes en riesgo de aspergilosis invasora**

La utilidad de la detección serológica de bmGT en pacientes en riesgo de AI se ha determinado mediante varios estudios que incluyen: (i) el análisis de su validez clínica, (ii) la correlación entre la presencia de bmGT y la gravedad clínica, (iii) el efecto del voriconazol en la detección de bmGT y (iv) las posibles fuentes de reactividad cruzada. Asimismo, se describe el comportamiento de la bmGT en tres casos clínicos de AI probada. Estos estudios tienen en común el origen de los pacientes, el método de obtención y conservación del suero, la determinación de GM y la cuantificación de GT, bmGT y voriconazol, así como la recogida de datos clínicos y microbiológicos.

#### **3.4.1. Validación clínica de la detección de bmGT en el diagnóstico de aspergilosis invasora**

La validación clínica de una técnica diagnóstica consiste en conocer su rendimiento diagnóstico (definido por parámetros como sensibilidad, especificidad, VPP, valor predictivo negativo [VPN], etc.) en casos y controles bien establecidos por un patrón de referencia, así como determinar las posibles fuentes de falsos positivos y negativos [82].

Los parámetros más sencillos que definen el rendimiento diagnóstico de una prueba son la sensibilidad y la especificidad, es decir, su precisión o capacidad para discriminar individuos sanos de enfermos. La sensibilidad y la especificidad son propiedades intrínsecas a la prueba diagnóstica, y definen su

validez independientemente de cuál sea la prevalencia de la enfermedad en la población a la cual se aplica. Sin embargo, estos parámetros carecen de utilidad en la práctica clínica, siendo fundamental conocer el VPP y el VPN de la técnica. Estos parámetros predicen la probabilidad de que el resultado obtenido en la prueba diagnóstica sea correcto. Es decir, la probabilidad de padecer enfermedad si se obtiene un resultado positivo en la prueba. Lamentablemente, el VPP y VPN se ven afectados por la prevalencia de la enfermedad, por lo que resulta necesario determinar otros índices de valoración que sean a la vez clínicamente útiles y no dependan de la prevalencia de la enfermedad en la población a estudiar. Los parámetros que cumplen dichos requisitos, son la razón de verosimilitud positiva y negativa, que miden cuánto más probable es un resultado concreto (positivo o negativo) según la presencia o ausencia de enfermedad. En definitiva, la razón de verosimilitud positiva es el cociente entre la fracción de verdaderos positivos (sensibilidad) y la fracción de falsos positivos ( $1 - \text{especificidad}$ ) [190]. La representación gráfica de estos parámetros se conoce como curva Característica Operativa del Receptor (COR). El área bajo dicha curva se convierte así en el mejor indicador de la capacidad predictiva de la técnica, independientemente de la prevalencia de la enfermedad en la población de referencia y en base al cual se podrán establecer comparaciones entre diferentes pruebas diagnósticas [191].

En nuestro estudio, se ha comparado la detección de bmGT con el biomarcador más utilizado en clínica, el GM. El patrón de referencia empleado para definir los casos y los controles han sido los criterios EORTC/MSG [67]. Como dichos criterios admiten la detección sérica de GM en la clasificación de

Al probable, se introduce un sesgo para la comparación de la bmGT con el GM. Para evitar dicho sesgo, se utilizaron dos estrategias: (i) excluir el GM de la definición de caso de AI probable, quedando esta categoría reservada a pacientes con cultivo micológico positivo y (ii) añadir la bmGT a los criterios EORTC/MSG de AI probable, al igual que ocurre con el GM [174].

Por tanto, hemos comprobado la validez clínica de la detección serológica de bmGT mediante HPTLC en el diagnóstico de AI y comparado su rendimiento diagnóstico con el del GM usando los criterios EORTC/MSG y dos modificaciones de éstos como patrón de referencia, mediante análisis de la curva COR.

#### ***3.4.1.1. Pacientes***

Se incluyeron en el estudio pacientes ingresados en el HUMS entre mayo y diciembre de 2013 a los que se solicitó la determinación de GM. La inclusión de pacientes en el estudio fue prospectiva si presentaban enfermedad de base (enfermedad hematológica, oncológica o TOS) o factores del huésped (neutropenia de duración mayor a 10 días, TPH alogénico, uso prolongado de corticoides, tratamiento con inmunosupresores de células T) de acuerdo a los criterios EORTC/MSG [67].

#### ***3.4.1.2. Sueros***

Durante el periodo de ingreso de los pacientes se enviaba suero dos veces por semana para la detección de GM al Servicio de Microbiología del HUMS. Una vez recibidos, eran centrifugados a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 8 minutos. Una pequeña alícuota era conservada a - 20°C hasta su envío al Instituto de Carboquímica para el posterior análisis de GT, bmGT y

voriconazol. El resto de la muestra se conservaba refrigerada hasta la detección de GM.

#### **3.4.1.3. Detección de GM**

La detección de GM se llevó a cabo en el Servicio de Microbiología del HUMS. En dicho Servicio, se utiliza el reactivo comercial Platelia™ Aspergillus EIA (BioRad) que es una determinación inmunoenzimática en sándwich en microplacas. El ensayo utiliza Ac monoclonales de rata EBA-2 frente al GM. Estos Ac se encuentran recubriendo la microplaca y reconocen el Ag de los sueros que lo contienen. Posteriormente se añade un reactivo conjugado: un Ac monoclonal frente a GM unido a peroxidasa. En presencia de Ag, se forma un complejo Ac monoclonal - GM - Ac monoclonal - peroxidasa. Los pocillos se lavan para eliminar el material que no se haya unido. A continuación se añade una solución cromógena de tetrametilbencidina que es oxidada por la enzima peroxidasa de los complejos que no se han eliminado durante el lavado para producir una sustancia coloreada azul. Mediante la adición de ácido la reacción se detiene y debido al cambio de pH, el color cambia de azul a amarillo. Se determina la absorbancia de los controles (positivo, negativo y punto de corte) y de las muestras con un espectrofotómetro a  $\lambda_{450}$  y se calcula el índice de absorbancia mediante DO de cada muestra. La técnica se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Se consideraron positivos aquellos resultados con valores de DO  $\geq 0,5$ . Se solicitó un nuevo suero para confirmación de DO bajas ( $< 0,7$ ).

#### **3.4.1.4. Extracción química de GT, bmGT y voriconazol**

Una vez recibidos los sueros en el Instituto de Carboquímica, se llevó a cabo el análisis de la presencia de GT, bmGT y voriconazol. Al igual que en el caso de las muestras de cultivo, la extracción química de los tres analitos se realizó de forma conjunta: en un frasco de vidrio de 1,5 mL se añadieron 280 µL de suero y 1 mL de DCM. Se cerró el frasco y se vortió durante al menos 30 segundos. La fase no-acuosa se trasvasó a un frasco limpio con la ayuda de una micropipeta y se evaporó el DCM en una corriente de nitrógeno con el fin de concentrar lo máximo posible la toxina. Se añadieron 100 µL de DCM con el fin de resuspender el extracto seco que hubiera quedado en las paredes del frasco y recuperar toda la toxina y antifúngico previamente extraídos para su posterior análisis.

#### **3.4.1.5. Detección y cuantificación de GT, bmGT y voriconazol mediante HPTLC**

La detección y cuantificación de GT, bmGT y voriconazol mediante HPTLC se realizó de acuerdo al procedimiento anteriormente descrito para las muestras de cultivo (**apartados 3.1.5 y 3.3.5**).

#### **3.4.1.6. Recogida de datos**

La recogida de datos fue retrospectiva, mediante revisión de las Historias Clínicas, tanto en formato electrónico como en papel. Se recogieron datos demográficos y clínicos. Los datos microbiológicos se obtuvieron a través del Sistema de Información de Laboratorio del Servicio de Microbiología.

### **3.4.2. Correlación entre la detección de bmGT y la gravedad clínica**

Debido a que los criterios EORTC/MSG se diseñaron para permitir la estandarización de pacientes en los ensayos clínicos y epidemiológicos [67], su uso en la práctica clínica real tiene limitaciones, principalmente en los casos de AI posible. Independientemente de dichos criterios, quisimos analizar si existe relación entre la presencia de bmGT y la gravedad clínica. Para ello, definimos la gravedad clínica mediante dos parámetros: la mortalidad a los 30 días y la necesidad de tratamiento antifúngico.

#### ***3.4.2.1. Pacientes y sueros***

Los pacientes incluidos en el estudio fueron los incluidos en el estudio de validación clínica, de acuerdo con lo descrito en el **apartado 3.4.1.1**.

Los sueros empleados en el estudio así como su manipulación y forma de conservación se encuentran descritos anteriormente, en el **apartado 3.4.1.2**.

#### ***3.4.2.2. Detección de GM, GT y bmGT***

El método de detección de GM se encuentra descrito en el **apartado 3.4.1.3**. El método de extracción de GT y bmGT a partir de suero se encuentra recogido en el **apartado 3.4.1.4** y el método de cuantificación de GT y bmGT mediante HPTLC se ha descrito previamente en el **apartado 3.1.5**.

#### ***3.4.2.3. Recogida de datos***

La recogida de datos, fue común al estudio de validación clínica y se realizó tal y como se ha descrito anteriormente (**apartado 3.4.1.6**).

### 3.4.3. Efecto del voriconazol en la detección de bmGT

Como se ha visto anteriormente, las terapias antifúngicas afectan directamente a la detección de biomarcadores como el GM ya que producen falsos negativos [68,75]. Siguiendo este razonamiento, hemos querido analizar el efecto del voriconazol en la detección de bmGT. Para ello, hemos analizado la relación entre los niveles terapéuticos y subterapéuticos de voriconazol y la presencia de bmGT.

#### 3.4.3.1. Pacientes y sueros

Los pacientes incluidos en el estudio fueron aquellos descritos en el **apartado 3.4.1.1** que recibieron tratamiento con voriconazol.

La manipulación y conservación de los sueros de dichos pacientes hasta la detección de GT, bmGT y voriconazol se encuentra descrita en el **apartado 3.4.1.2**.

#### 3.4.3.2. Detección de bmGT y voriconazol

La detección y cuantificación de bmGT y voriconazol se realizó mediante HPTLC en el Instituto de Carboquímica. Como se ha visto anteriormente, la extracción de bmGT y voriconazol a partir de suero se realizó en un solo paso (ver **apartado 3.4.1.4**). Su cuantificación se realizó mediante HPTLC según lo descrito en el **apartado 3.1.5**.

#### 3.4.3.3. Recogida de datos

La recogida de datos fue común al estudio de validación clínica descrito anteriormente en el **apartado 3.4.1.6**.

#### **3.4.4. Reactividad cruzada**

Con el objetivo de determinar las posibles fuentes de falsos positivos para bmGT debidas a infecciones por hongos diferentes de *Aspergillus* spp, se analizó la presencia de este biomarcador en el suero de pacientes con fungemia probada. El hecho de analizar específicamente los pacientes con fungemia se debe a que los hongos son los únicos microorganismos capaces de producir ETP [99] y a que algunos autores han descrito la capacidad de *Candida* spp de producir GT [192,193]. Para ello, se analizó la presencia de GT y bmGT en el suero de pacientes con fungemia probada.

##### **3.4.4.1. Pacientes**

Se incluyeron en el estudio pacientes ingresados en Hematología y UCI del HUMS entre octubre de 2013 y febrero de 2017 con fungemia probada mediante aislamiento micológico en el hemocultivo y para los que hubiese al menos una muestra de suero obtenida el mismo día de la extracción del hemocultivo.

##### **3.4.4.2. Sueros**

Los sueros debían haber sido obtenidos el mismo día de la extracción del hemocultivo. Una vez recibidos en el Servicio de Microbiología, eran centrifugados durante 8 minutos a 3000 rpm, como se ha descrito anteriormente. La conservación hasta su posterior análisis en el Instituto de Carboquímica fue en cámara de - 20°C.

##### **3.4.4.3. Detección de GT y bmGT**

La extracción así como la cuantificación de GT y bmGT a partir de suero, se han descrito previamente en los **apartados 3.4.1.4 y 3.1.5** respectivamente.

#### **3.4.4.4. Recogida de datos**

La recogida de datos fue retrospectiva, mediante revisión de las Historias Clínicas en formato electrónico y consulta del Sistema Informático de Laboratorio del Servicio de Microbiología. Se recogieron datos demográficos, clínicos y microbiológicos.

### **3.5. Comité de ética**

Los pacientes incluidos en los estudios de utilidad de la bmGT en el diagnóstico y manejo de AI, fueron debidamente informados de que una pequeña cantidad del suero extraído durante su asistencia iba a ser analizado con fines de investigación y pasaría a formar parte de una colección de sueros, lo cual contaba con la aprobación del Comité de Ética de Aragón (PI15/0203).

### **3.6. Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos de la revisión de Historias Clínicas y los resultados de GT, bmGT y voriconazol a partir de las muestras de suero y de filtrados fúngicos, se dispusieron en bases de datos con formato Excel (Microsoft Corporation, Albuquerque, NM, EEUU) para su análisis.

### 3.6.1. Estadística descriptiva

Los indicadores y parámetros utilizados para la descripción de las variables han sido:

- *Variables cualitativas:* se presentaron mediante distribución de frecuencias y/o porcentaje de cada categoría, las variables: sexo, enfermedad de base, incidencia de AI, mortalidad, tratamiento antifúngico y etiología de la fungemia, en los estudios *in vivo*. Las variables cualitativas así descritas en los estudios *in vitro* fueron: especies fúngicas analizadas y distribución de especies productoras de GT y bmGT.
- *Variables cuantitativas:* en los estudios *in vivo*, las variables edad, concentración sérica de bmGT y de voriconazol se presentan con indicadores de tendencia central: media, y de dispersión: desviación estándar (DE). En los estudios *in vitro*, las variables concentración de GT, bmGT y voriconazol se presentan con indicadores de tendencia central: media, y de dispersión: error estándar de la media (EEM).
- *Exactitud/Precisión diagnóstica:* se elaboraron tablas de contingencia tanto para la bmGT como para el GM en función de los diferentes patrones de referencia (i) criterios EORTC/MSG de AI, (ii) criterios EORTC/MSG excluyendo el GM y (ii) criterios EORTC/MSG incluyendo la bmGT; y se determinaron los parámetros descriptivos de validez diagnóstica: sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y área bajo la curva COR. Para ello, se consideraron positivos para GM aquellos sueros con índice de DO superior a 0,5 y positivos para bmGT los sueros con concentraciones superiores a 0,05 mg/mL. Se siguieron las directrices de comunicación sobre los estudios de precisión de pruebas diagnósticas (STARD) [194].

### 3.6.2. Estadística analítica

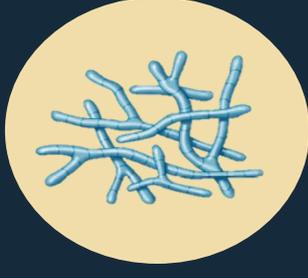
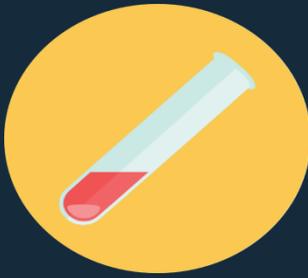
La relación entre variables se consideró estadísticamente significativa para  $p \leq 0,05$  obtenida mediante las siguientes pruebas estadísticas:

- *Variables cualitativas*: cuando las variables a estudio eran cualitativas, se investigó su asociación mediante pruebas de contraste de hipótesis. Se crearon tablas de contingencia que posteriormente fueron sometidas a comparación de proporciones por la prueba de Chi cuadrado de Pearson o la prueba exacta de Fisher y se obtuvieron las razones de probabilidad (OR, del inglés “odds ratio”) con un intervalo de confianza (IC) del 95 %. Se analizó así la relación entre la presencia de bmGT en suero y la mortalidad, así como la necesidad de tratamiento antifúngico.
- *Variables cuantitativas*: cuando una de las variables a estudio era cuantitativa se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para la comparación de medias de pruebas no paramétricas, por ejemplo, para comparar la media de bmGT en los pacientes que murieron respecto a los que no murieron. La comparación múltiple de las medias de las variables no paramétricas se realizó con la prueba de Fisher y la prueba de Dunn, por ejemplo, en la comparación de bmGT producida de media por las diferentes especies de *Aspergillus*. La relación entre dos variables cuantitativas se analizó mediante pruebas de regresión, por ejemplo, la concentración de bmGT a diferentes concentraciones de voriconazol.
- *Rendimiento diagnóstico*: la comparación entre los parámetros de rendimiento diagnóstico de la bmGT se compararon con los del GM mediante pruebas de contraste de hipótesis, Chi cuadrado, arriba descritas.

### 3.6.3. Programas informáticos

Los programas informáticos empleados para la obtención de indicadores descriptivos y analíticos han sido.

- IBM SPSS 15.0 (IBM Analytics): programa de análisis estadístico.
- EPIDAT 3.1: programa de análisis estadístico y epidemiológico desarrollado por la Dirección General de Salud de la Junta de Galicia, de acceso libre.
- Prism 6 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, EEUU): programa que permite tanto la realización de pruebas estadísticas como el análisis y la organización de datos. Resulta además muy útil para elaborar y editar gráficas.
- Excel: hoja de cálculo “Estudio de la capacidad predictiva de una prueba diagnóstica” disponible en la web Fisterra [190].



Resultados



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Producción de GT y bmGT *de novo*

En primer lugar, analizamos la capacidad de *Aspergillus* spp y otros hongos oportunistas de producir GT y bmGT *in vitro*, con el fin de conocer la distribución de especies productoras.

Inicialmente se llevaron a cabo cinéticas de producción de las toxinas a 7 días. Se analizaron 4 aislados de *A. fumigatus*, 3 aislados de *A. terreus* y *A. niger* y 2 de *A. flavus*. Para ello, en un frasco de cuello inclinado de 250 mL se añadieron 90 mL de medio RPMI 1640 suplementado con HEPES (25 mM), glucosa (20 g/L) y glutamina (2 mM) y 10 mL de la suspensión de hifas y conidias (en el caso de los hongos filamentosos) o de levaduras y pseudohifas (en el caso de los hongos levaduriformes). Se tomó una muestra de 2 mL cada día durante siete días y se analizó la presencia de GT y bmGT como se ha descrito en los **apartados 3.1.4** y **3.1.5** de Materiales y Métodos. De esta manera se determinó que el día óptimo para la detección de dichas toxinas en cultivos del género *Aspergillus* era el cuarto día (no se muestran los resultados). Además, ningún género diferente de *Aspergillus* (**Tabla 7**) produjo GT ni bmGT *de novo* en los siete días en los que se realizaron los análisis.

Una vez determinado el día óptimo para la detección de GT y bmGT en *Aspergillus* spp, se procedió a analizar los aislados. Para ello, se procedió tal y como se describe en Materiales y Métodos (**apartado 3.1**). En total se

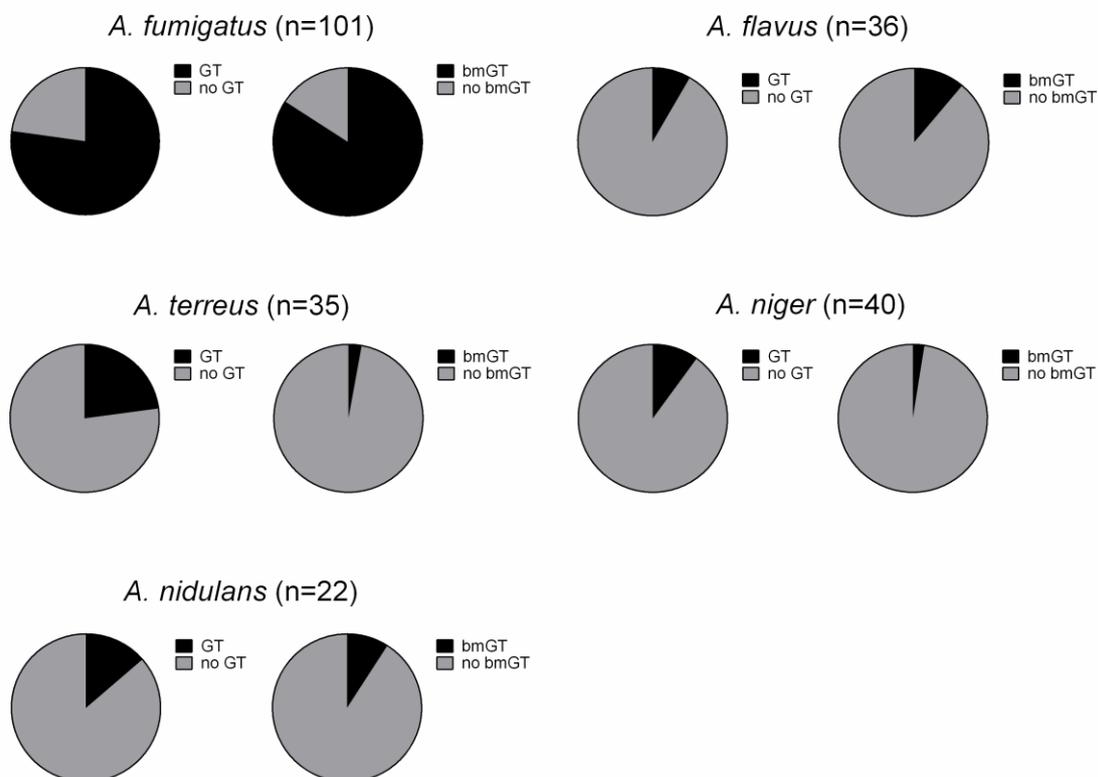
analizaron 234 aislados del género *Aspergillus* y 8 aislados de otros géneros. En la **Tabla 7** puede verse el desglose del número de aislados analizados por especie.

**Tabla 7: Especies y número de hongos oportunistas analizados**

Especie	Número (% total)
<b>Género <i>Aspergillus</i></b>	
<i>A. fumigatus</i>	101 (41,74)
<i>A. flavus</i>	36 (14,88)
<i>A. terreus</i>	35 (14,46)
<i>A. niger</i>	40 (16,52)
<i>A. nidulans</i>	22 (9,20)
<b>Otros hongos filamentosos oportunistas</b>	
<i>Fusarium solani</i>	1 (0,4)
<i>Mucor velutinous</i>	1 (0,4)
<i>Penicillium sp</i>	1 (0,4)
<i>Rhizopus sp</i>	1 (0,4)
<i>Scedosporium apiospermum</i>	1 (0,4)
<b>Otras levaduras oportunistas</b>	
<i>Candida albicans</i>	1 (0,4)
<i>Candida krusei</i>	1 (0,4)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1 (0,4)

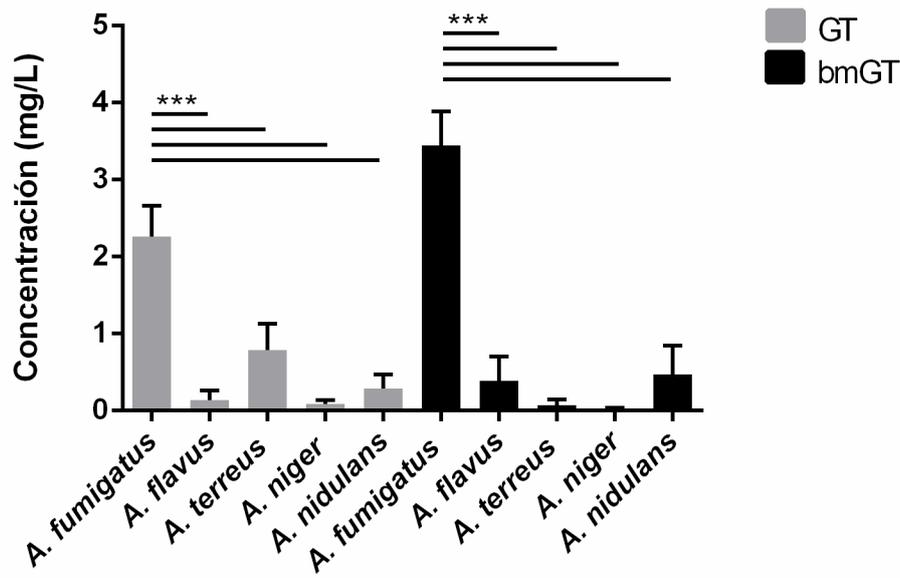
De los 234 aislados de *Aspergillus* analizados, 101 correspondían a la especie *A. fumigatus* y suponían el 41,74 % del total. De estos aislados, se detectó producción de GT en 78 (77,23 %) y bmGT en 85 (84,16 %). Ambas toxinas se pudieron detectar en 76 aislados (74,24 %). La concentración media de GT producida fue  $2,26 \pm 0,40$  mg/L (media  $\pm$  EEM) y la de bmGT  $3,45 \pm 0,44$  mg/L. De los 36 aislados (14,88 %) de *A. flavus* analizados, tan solo 3 (8,33 %) produjeron GT y 4 (11,11 %) bmGT. Curiosamente, ningún aislado produjo ambos metabolitos a la vez. La concentración de GT detectada fue  $0,14 \pm 0,13$  mg/L y la de bmGT fue  $0,39 \pm 0,31$  mg/L. El número de *A. terreus* analizado fue similar al de *A. flavus*, 35 (14,46 %), pero la tasa de aislados que produjeron GT fue mayor, 8 (22,86 %), sin que esta diferencia fuera significativa ( $p > 0,05$ ).

Tan sólo un aislado (2,86 %) de *A. terreus* produjo bmGT el cual además fue capaz de producir GT. La concentración de GT producida de media por los 8 aislados productores fue  $0,79 \pm 0,34$  mg/L. La concentración de bmGT que produjo el único aislado productor fue 2,48 mg/L. En el caso de *A. niger* se analizaron 40 aislados (16,52 %). Tan sólo 4 aislados (10 %) produjeron GT, en una concentración que de media fue baja,  $0,09 \pm 0,05$  mg/L. De nuevo, tan solo se detectó bmGT en un aislado (2,5 %), que también era productor de GT, en una concentración de 0,74 mg/L. Finalmente, se analizaron 22 aislados de *A. nidulans* (9,20 %). De éstos, tres aislados (13,64 %) produjeron GT y dos de ellos también produjeron bmGT (9,09 %). De media se detectaron  $0,28 \pm 0,19$  mg/L de GT y  $0,47 \pm 0,38$  mg/L de bmGT. En la **Gráfica 1** se puede observar la tasa de producción de las dos toxinas en diferentes especies de *Aspergillus*.



**Gráfica 1: Porcentaje de aislados de diferentes especies de *Aspergillus* spp productores de GT y bmGT.**

De estos resultados se deduce que *A. fumigatus* es la especie que más frecuentemente produce GT y bmGT, y que además lo hace en concentraciones significativamente superiores al resto de las especies analizadas ( $p < 0,001$ ) (**Gráfica 2**).



**Gráfica 2: Concentración de GT y bmGT producidas por diferentes especies de *Aspergillus*.** La comparación de la concentración media de GT y bmGT producidas por *A. fumigatus* fue estadísticamente superior que para el resto de complejos de especies ( $p < 0.001$ ), lo que se representa mediante \*\*\* en la gráfica.

Tal y como se ha comentado previamente, no se produjo GT ni bmGT por ninguna de las especies diferentes de *Aspergillus* spp: *F. solani*, *M. velutinosus*, *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp, *S. apiospermum*, *C. albicans*, *C. krusei* y *C. neoformans*.

Adicionalmente, se analizaron 18 aislados de especies crípticas de la sección *Fumigati*, cortesía del Dr. Bouza y la Dra. Peláez del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Se han observado diferencias en la sensibilidad a antifúngicos y en el perfil de metabolitos secundarios producido

por diferentes especies crípticas [27,195] por lo que consideramos oportuno determinar la capacidad de algunas de ellas de producir GT y bmGT.

**Tabla 8: Producción de GT y bmGT por diferentes especies crípticas de origen clínico.**

ID	Especie	Origen	GT (mg/L)	bmGT (mg/L)
B5	<i>A. calidoustus</i>	Espuito	0,93	2,29
B3	<i>A. fumigatiaffinis</i>	Espuito	0,82	1,52
B6	<i>A. fumigatiaffinis</i>	Espuito	0,48	1,75
B7	<i>A. fumigatiaffinis</i>	Espuito	-	1,51
A1	<i>A. lentulus</i>	Espuito	-	-
A2	<i>A. lentulus</i>	Espuito	-	-
A4	<i>A. lentulus</i>	Espuito	-	-
A5	<i>A. lentulus</i>	Espuito	-	-
A6	<i>A. lentulus</i>	Uña	-	-
A7	<i>A. lentulus</i>	Espuito	-	-
B8	<i>A. lentulus</i>	Espuito	-	-
C4	<i>A. lentulus</i>	Espuito	1,40	1,46
C5	<i>A. lentulus</i>	Espuito	-	-
C9	<i>A. lentulus</i>	BAS	2,91	3,10
D1	<i>A. lentulus</i>	Espuito	-	-
A3	<i>A. novofumigatus</i>	Espuito	-	-
A9	<i>N. udagawae</i>	Espuito	-	-
B1	<i>N. udagawae</i>	Espuito	1,27	2,54

ID: identificación, -: no se detecta.

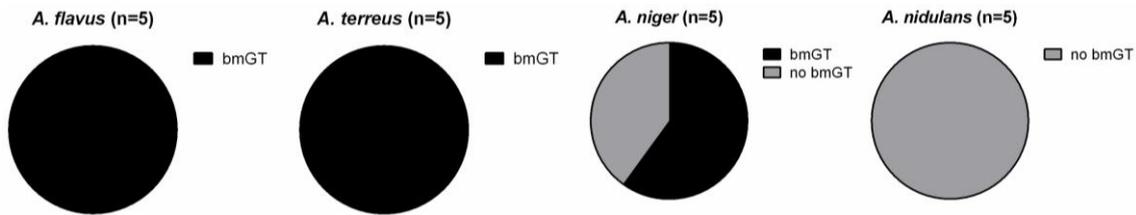
En la **Tabla 8** se muestra la distribución de especies crípticas productoras de GT y bmGT. Aunque el número de aislados analizados de cada especie es muy variable, se pueden obtener varias conclusiones: excepto la especie *A. novofumigatus*, el resto de especies analizadas (*A. calidoustus*, *A. fumigattiaffinis*, *A. lentulus* y *N. udagawae*) ha mostrado capacidad de producir GT y bmGT en al menos un aislado. La especie *A. fumigattiaffinis* parece la que mayor tasa de producción de toxinas presenta, ya que de los tres aislados analizados, los tres han producido bmGT (100 %) y dos han producido GT (66

%). *A. lentulus* ha sido la especie de la que más aislados se han analizado y, pese a que algunos de ellos tienen la capacidad de producir dichas toxinas, la tasa de producción ha sido baja (18 %).

#### 4.2. Producción de bmGT tras la adición de GT exógena

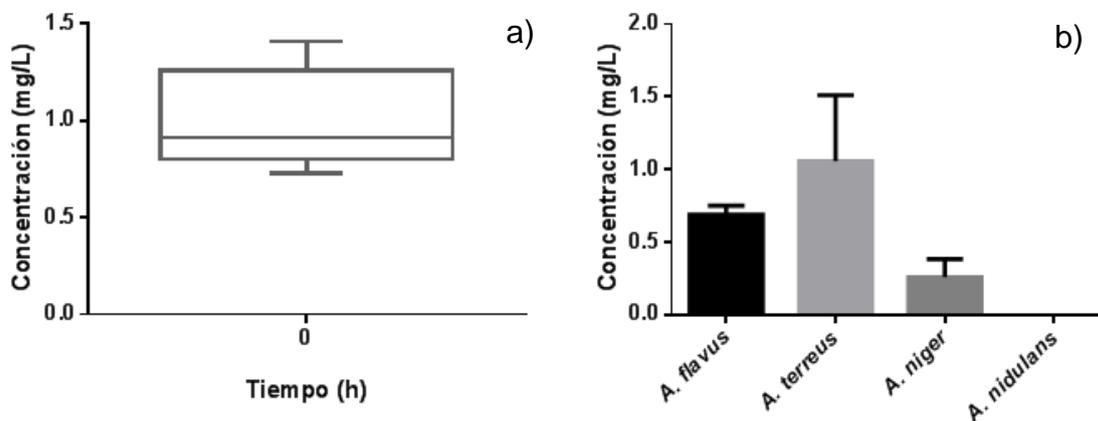
Debido a que tan solo un pequeño porcentaje de los aislados de *Aspergillus no-fumigatus* produjeron bmGT *de novo*, se analizó si dichos aislados eran capaces de producir este derivado metilado a partir de una fuente exógena de GT. Con esto, se pretendía dilucidar si los aislados realmente eran incapaces de producir bmGT o si no se detectaba debido a otros factores tales como las condiciones de cultivo, la sensibilidad analítica de la técnica utilizada o el tiempo de muestreo. Para ello, se cultivaron en medio líquido, tal y como se describe en el **apartado 3.2.2** de Materiales y Métodos, 5 aislados de *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* y *A. nidulans* que no habían producido GT ni bmGT en el experimento anterior. Transcurridas 45 h de incubación se les añadió GT. Se tomó una muestra tras dicha adición y a las 3 y 6 h de incubación y se analizó la presencia de bmGT.

Como se puede observar en la **Gráfica 3**, a modo de resumen, todos los aislados de *A. flavus* y *A. terreus* (100 %) fueron capaces de producir bmGT a partir de la GT exógena. A diferencia de estas especies, no todos los aislados de *A. niger* fueron capaces de producir bmGT, sino que lo hicieron 3 de los 5 aislados analizados (60 %). Ninguno de los 5 aislados de *A. nidulans* fue capaz de metilar la GT para producir bmGT.



**Gráfica 3: Porcentaje de aislados capaces de producir bmGT a partir de GT en diferentes especies de *Aspergillus*.**

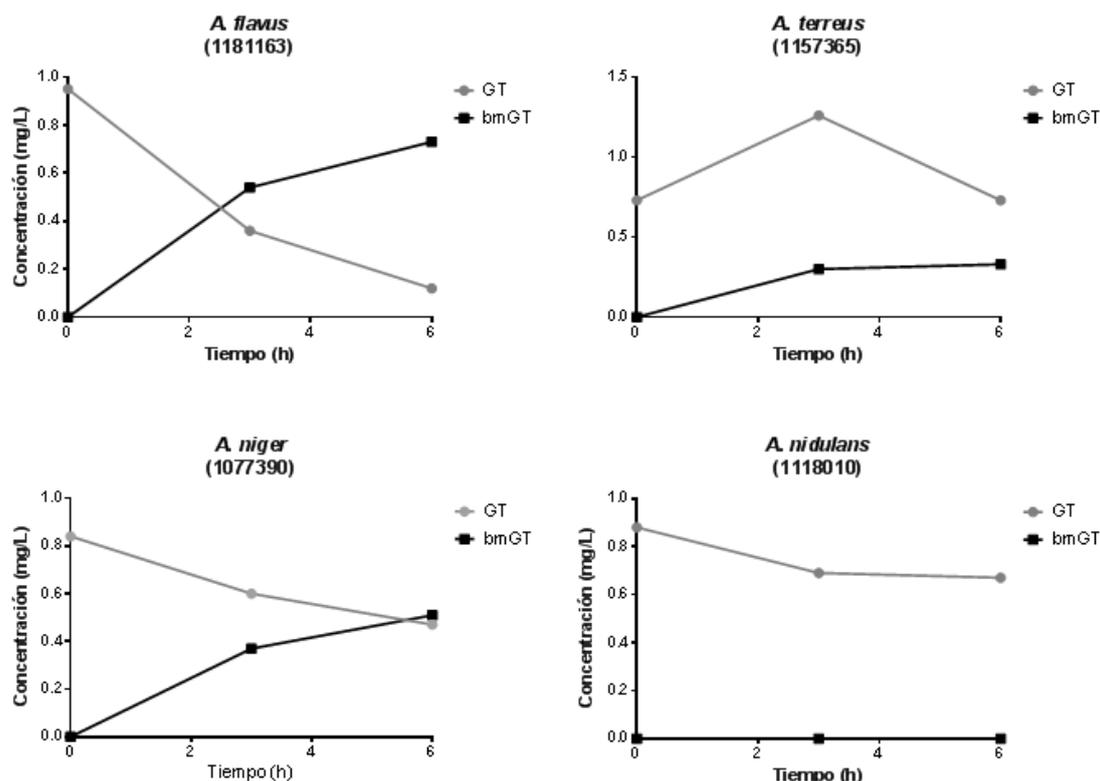
La concentración final de GT en cada frasco de cuello inclinado fue de 2,5 mg/L. De media, la concentración de GT recuperada fue  $1,01 \pm 0,06$  mg/L (media  $\pm$  EEM). La concentración media de bmGT producida a las 3 h tras la adición de GT por los 5 aislados de *A. flavus* fue  $0,69 \pm 0,06$  mg/L. *A. terreus* produjo las mayores concentraciones, siendo la media de  $1,06 \pm 0,45$  mg/L. En cambio, *A. niger* produjo las menores concentraciones, siendo la media de  $0,26 \pm 0,12$  mg/L, mientras que *A. nidulans* no produjo bmGT.



**Gráfica 4: a) Concentración de GT en los cultivos control, b) Concentración media de bmGT en las especies de *Aspergillus* analizadas.**

Entre los aislados que produjeron bmGT, resulta curioso observar como a tiempo 0, cuando se acaba de añadir la GT exógena, no ha dado tiempo a que se produzca bmGT, sin embargo, a las 3 y 6 h, la concentración de bmGT

aumenta en detrimento de la de GT (**Gráfica 5**). Por tanto, el metabolismo de la GT para producir bmGT es un fenómeno que se produce muy rápido, a diferencia de lo que ocurría con la producción *de novo*, en la que eran necesarios varios días de incubación para su producción.



**Gráfica 5: Producción de bmGT tras la adición de GT exógena en diferentes especies de *Aspergillus* a lo largo de 6 h.**

También se analizaron 8 aislados diferentes de *Aspergillus* spp: 2 *Fusarium* spp, 1 *Rhizopus* sp, 1 *C. neoformans*, 1 *C. krusei*, 1 *C. glabrata*, 1 *C. parapsilosis* y 1 *C. orthopsilosis*. En la **Tabla 9** se pueden observar los resultados obtenidos para 3 de estos aislados: ninguna de las especies de dicha tabla ni el resto de especies analizadas, produjo bmGT a partir de la GT exógena adicionada.

**Tabla 9: Producción de bmGT tras la adición de GT exógena en 3 géneros diferentes de *Aspergillus*.**

Especie (n° ID micro)	Exposición vs control	Tiempo (h)	GT (mg/L)	bmGT (mg/L)
<i>Fusarium</i> sp (1207240)	GT (2,5 mg/L)	0	1,01	-
		3	0,84	-
		6	0,84	-
<i>C. krusei</i> (963272)	GT (2,5 mg/L)	0	1,02	-
		3	0,96	-
		6	0,95	-
<i>C. neoformans</i> (1115228)	GT (2,5 mg/L)	0	0,91	-
		3	1,17	-
		6	0,95	-

ID: identificación, -: no se detecta.

### 4.3. Producción de GT y bmGT en presencia de voriconazol

Debido a que el uso de antifúngicos es la principal causa de falsos negativos en la detección de biomarcadores [69,76], quisimos analizar si la presencia de voriconazol interfiere en la producción y detección de GT y bmGT *in vitro*. Para ello, se analizaron 8 aislados de *A. fumigatus* que previamente habían mostrado capacidad de producir ambas toxinas *de novo*. Tal y como se describe en el **apartado 3.3** de Materiales y Métodos, se evaluó el efecto de cuatro concentraciones diferentes de voriconazol: 0,125 mg/L, 0,25 mg/L, 0,50 mg/L y 1 mg/L. Asimismo, se determinó la viabilidad fúngica mediante visualización macroscópica y mediante el ensayo de XTT descrito en el **apartado 3.3.6** de Materiales y Métodos.

En la **Tabla 10** pueden observarse las concentraciones de GT y bmGT obtenidas en presencia de diferentes concentraciones de voriconazol. En general, a concentraciones bajas de antifúngico (0,125 - 0,25 mg/L), los

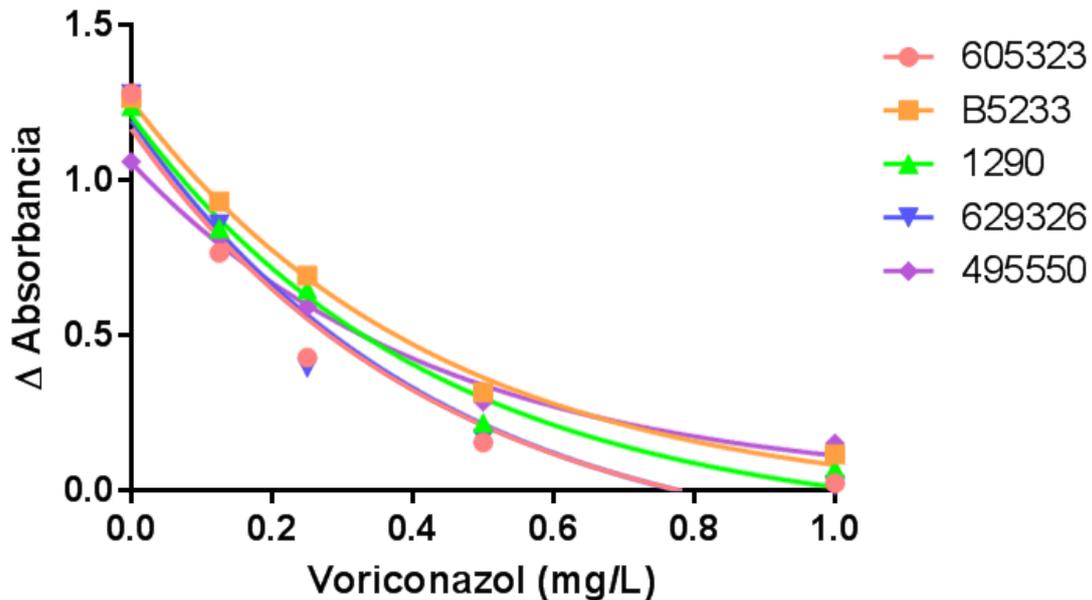
aislados mantienen la capacidad de producir ambas toxinas, mientras que a concentraciones más elevadas (0,5 mg/L), cuatro de los aislados han perdido la capacidad de producir bmGT, manteniendo la producción de GT. Finalmente, a la concentración de 1 mg/L de voriconazol, tan solo dos aislados mantienen la capacidad de producir bmGT y/o GT. Además, la observación macroscópica del crecimiento fúngico se correlacionó con la producción de una o ambas toxinas, mientras que en ausencia de crecimiento, no se detectó GT ni bmGT.

**Tabla 10: Producción de GT y bmGT por ocho aislados de *A. fumigatus* en presencia de diferentes concentraciones de voriconazol.**

ID	Voriconazol (0,125 mg/L)		Voriconazol (0,25 mg/L)		Voriconazol (0,5 mg/L)		Voriconazol (1 mg/L)	
	GT (mg/L)	bmGT (mg/L)	GT (mg/L)	bmGT (mg/L)	GT (mg/L)	bmGT (mg/L)	GT (mg/L)	bmGT (mg/L)
605323	2,49	2,28	2,01	1,27	0,03	-	-	-
838	1,26	1,41	1,00	-	-	-	-	-
1290	1,85	2,56	1,67	1,65	1,08	0,60	0,09	0,15
547858	0,05	1,45	0,25	0,45	1,32	0,50	-	-
678005	2,12	2,15	1,59	1,48	0,99	0,34	-	-
629326	2,05	2,02	1,96	1,70	0,84	-	-	-
495550	0,14	0,97	0,91	0,85	0,62	0,20	0,03	-
475317	0,53	0,78	1,52	1,74	0,50	-	-	-

ID: identificación, -: no se detecta.

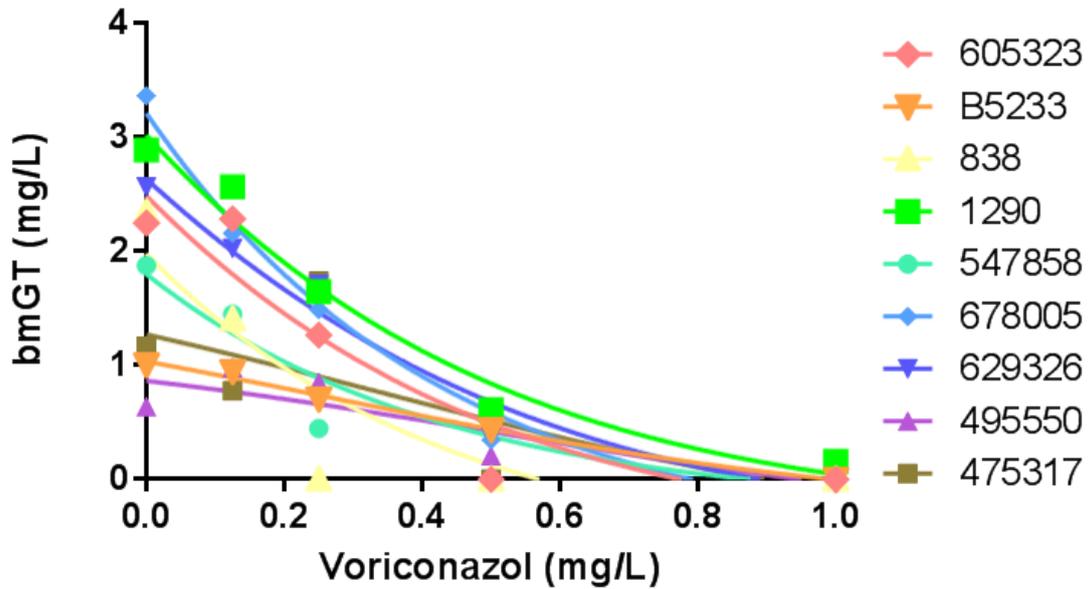
La prueba de reducción del XTT mostró una relación inversa entre la concentración de voriconazol y la absorbancia (regresión no lineal,  $R^2$ : 0,95 - 0,99): a concentraciones bajas de voriconazol, el hongo permanece viable (absorbancia alta) mientras que a concentraciones elevadas de antifúngico (1 mg/L), la viabilidad del hongo disminuye (absorbancia baja). Es decir, a mayores concentraciones de voriconazol, existen menos células fúngicas viables (**Gráfica 6**).



**Gráfica 6: Correlación entre absorbancia y concentración de voriconazol en el ensayo de XTT.** Los símbolos muestran las medidas reales y la línea muestra la regresión no lineal.

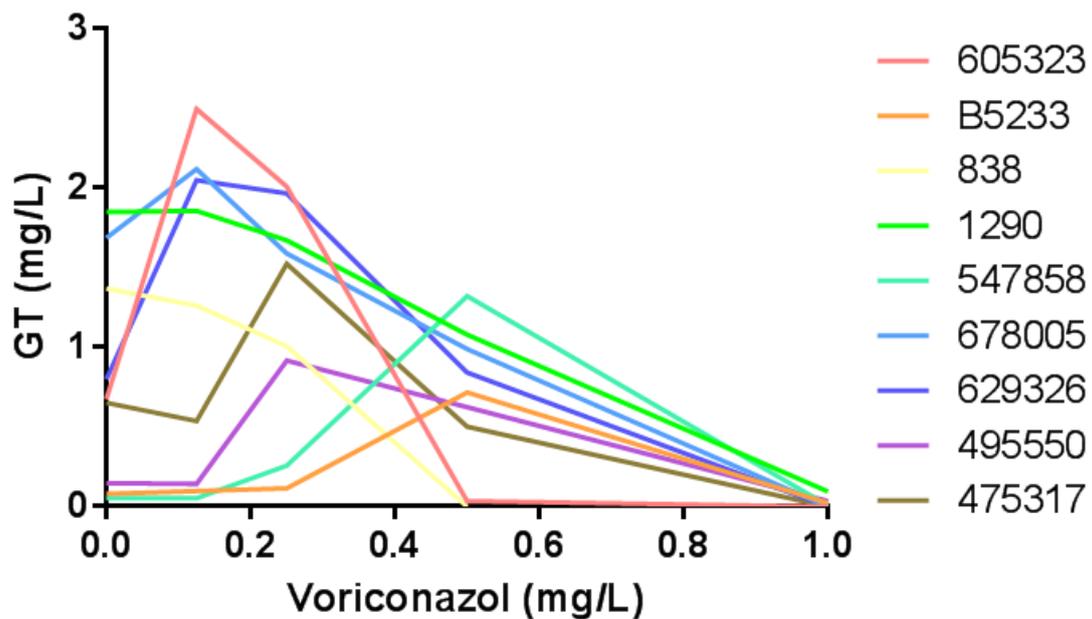
Por tanto, cabría esperar que la capacidad del hongo para producir metabolitos secundarios disminuya a medida que aumenta la concentración de voriconazol. Sin embargo, esto sólo ocurre para la bmGT: existe una relación inversa entre concentración de voriconazol y la concentración de bmGT (regresión no lineal,  $R^2$ : 0,52 - 0,99). Tal y como que se puede observar en la **Gráfica 7**, a menor concentración de voriconazol, los aislados son capaces de producir más toxina. A concentración alta de voriconazol (1 mg/L), los aislados dejan de producir bmGT.

En cambio, en el caso de la GT, algunos aislados han mostrado una mayor producción de GT a concentraciones crecientes de voriconazol, hasta llegar a una concentración en la que la producción disminuía (**Gráfica 8**).



**Gráfica 7: Correlación entre producción de bmGT y concentración de voriconazol.** La línea de color muestra la curva de regresión entre la concentración de voriconazol y la de bmGT, a menor concentración de voriconazol, los aislados son capaces de producir más toxina. Los símbolos muestran los valores reales.

Por tanto, no hemos encontrado relación entre los niveles de voriconazol y la concentración de GT producida por los aislados.



**Gráfica 8: Concentración de GT detectada a diferentes concentraciones de voriconazol.**

#### 4.4. Utilidad de la bmGT en el diagnóstico y manejo de aspergilosis invasora

Además de los experimentos realizados *in vitro* para conocer el comportamiento de la bmGT en presencia de sustancias exógenas y la distribución de especies capaces de producirla, se han llevado a cabo estudios *in vivo*. El objetivo de estos estudios ha sido fundamentalmente conocer la utilidad de la detección de la bmGT en el diagnóstico y manejo de los pacientes en riesgo de AI. En este caso el término utilidad hace referencia tanto al diagnóstico (validación clínica, fuentes de reactividad cruzada), como al manejo de pacientes (correlación con la gravedad clínica y efecto de los niveles terapéuticos de voriconazol en el aclaramiento de la bmGT). Finalmente, se describe el comportamiento de la bmGT en tres casos de AI probada.

##### 4.4.1. Validación clínica de la detección de bmGT en el diagnóstico de aspergilosis invasora

Durante el periodo de estudio, se recibieron sueros correspondientes a 105 pacientes en el Servicio de Microbiología para análisis de GM. No fue posible la recogida de datos de 18 pacientes según lo descrito en el **apartado 3.4.1.6** de Materiales y Métodos, debido a que la Historia Clínica no estaba disponible o los datos recogidos eran insuficientes. Además, ocho pacientes no cumplían los criterios de inclusión, por lo que finalmente fueron 79 los pacientes incluidos en el estudio, en 90 episodios de hospitalización y se analizaron 357 sueros.

Respecto a las características de los pacientes, el 67 % eran hombres y la edad media fue de  $64,9 \pm 16,9$  años. La enfermedad de base más frecuente fue hematológica (75,6 %), seguida de la enfermedad oncológica (18,9 %) y de pacientes receptores de TOS (4,4 %).

De acuerdo con los criterios EORTC/MSG [67], hubo diez episodios de AI posible (11,1 %), cinco episodios de AI probable (5,5 %) y un episodio de IFI probada (1,1%) por histopatología que también se clasificó como AI probable por detección de GM en suero y aislamiento de *A. fumigatus* en BAS. Dadas estas evidencias, es altamente probable que el agente etiológico de dicha IFI fuera *A. fumigatus* por lo que nos referiremos a este caso como AI probada. Así, la incidencia de AI probable/probada fue del 6,6 %. Los otros cinco episodios de AI probable se debieron en cuatro casos al aislamiento fúngico en muestra respiratoria (tres *A. fumigatus* y una infección mixta por *A. terreus* y *A. flavus*) y en un caso a la detección de GM en suero. Estos datos, junto con los resultados de GM y bmGT séricos, así como el número de muestras analizadas, el tratamiento recibido y la mortalidad en los diferentes casos de AI posible/probable/probada están recogidos en la **Tabla 11**.

Cabe destacar que además de la bmGT, en todos los sueros se analizó la presencia de GT y que fue negativa en todos ellos, por lo que en adelante solo hablaremos de la bmGT.

#### Casos de AI probable/probada

Se recibieron 12 sueros de los 4 casos de AI probable y un suero del paciente con IFI probada. En el caso de IFI probada (**Tabla 11**, caso 1) el suero fue positivo tanto para GM como para bmGT. Hubo dos casos de AI probable

con crecimiento de *A. fumigatus* en muestra respiratoria de los que se tomó una única muestra de suero para análisis (**Tabla 11**, casos 2 y 3). Ambos biomarcadores concordaron y fueron positivos en uno de estos casos y negativos en el otro. En el resto de casos de AI probable, se recibieron varios sueros por caso: en los casos 4 y 6 de la **Tabla 11**, ambos biomarcadores coincidieron en al menos una muestra y fueron positivos, mientras que en el caso 5 de la **Tabla 11**, solo fue positiva la bmGT mientras que no se detectó GM.

#### Casos de AI posible

De los 10 casos con AI posible se recibieron y analizaron 34 sueros. De acuerdo con la definición de caso posible, estos pacientes presentaban factores del huésped y signos clínicos y radiológicos de enfermedad sin evidencia micológica de infección fúngica (cultivo o GM), por lo que clínicamente se consideró que no presentaban AI. De estos diez episodios, en dos casos el GM fue dudoso (índice DO = 0,5 - 0,7), pero este resultado no se confirmó en la muestra siguiente por lo que se consideró negativo. Estos dos pacientes, que corresponden al caso 11 y 16 de la **Tabla 11**, murieron a los 16 y a los 8 días del envío de la primera muestra respectivamente. Además, recibieron tratamiento antifúngico empírico con antimicóticos de amplio espectro. En ambos casos se detectó bmGT en suero, lo que apoyaría el diagnóstico probable de AI y la utilidad de la bmGT en su diagnóstico. Lamentablemente, no se realizó autopsia a dichos pacientes, por lo que se desconoce la causa del exitus.

Tabla 11: Resultados de GM, bmGT y GT séricos de los casos de AI posible, probable y probada.

Caso	EORTC/ MSG	N° sueros recibidos	Resultados de los biomarcadores (número de sueros)						bmGT (mg/L)	Cultivo	Mortalidad (días)	Tipo de tto	ATF
			GM(+) bmGT (-)	GM(-) bmGT (+)	GM y bmGT (+)	GM y bmGT (-)	GM y bmGT (+)	GM y bmGT (-)					
1	Probada	1	0	0	1	0	0	0	10,38	<i>A. fumigatus</i>	1	Dirigido	Vor
2	Probable	1	0	0	1	0	0	0	13,68	<i>A. fumigatus</i>	4	Dirigido	Csf
3	Probable	1	0	0	0	0	1	0	ND	<i>A. fumigatus</i>	4	Dirigido	Vor
4	Probable	4	0	0	1	2	1	0	2,17- 18,68	Neg	15	Dirigido	Csf, AmB, Vor
5	Probable	4	0	0	0	2	2	0	2,60- 2,80	<i>A. flavus + A. terreus</i>	14	Dirigido	Vor
6	Probable	2	0	0	1	0	1	0	35,10	<i>A. fumigatus</i>	86	Dirigido	Vor
7	Posible	1	0	0	0	1	0	0	44,90	Neg	-	Sin tratamiento	ATF
8	Posible	2	0	0	0	1	1	0	10,45	Neg	39	Empírico	Vor, Csf
9	Posible	1	0	0	0	0	1	0	ND	Neg	-	Empírico	Mcf
10	Posible	2	0	0	0	0	2	0	ND	Neg	25	Sin tratamiento	ATF
11	Posible	2	0	0	0	1	1	0	0,86	Neg	16	Empírico	AmB, Csf, Vor
12	Posible	7	0	0	0	0	7	0	ND	Neg	-	Empírico	Vor
13	Posible	2	0	0	0	1	1	0	9,33	Neg	33	Empírico	AmB
14	Posible	1	0	0	0	0	1	0	ND	Neg	7	Empírico	Vor
15	Posible	14	0	0	0	6	8	0	21,54- 90,29	Neg	55	Empírico	AmB, Csf, Vor
16	Posible	2	0	0	0	2	0	0	7,23- 14,47	Neg	8	Empírico	AmB, Mcf

Tto: tratamiento, ATF: antifúngico, Neg: negativo, ND: no se detecta, vor: voriconazol, csf: caspofungina, mcf: micafungina, AmB: anfotericina B

De los ocho casos restantes, en los que no se detectó GM, en cuatro se detectó bmGT y en otros cuatro no. Respecto a los que presentaron bmGT, tres de ellos (casos 8, 13 y 15 de la **Tabla 11**) requirieron tratamiento antifúngico empírico y murieron entre 33 y 55 días. El cuarto paciente (**Tabla 11**, caso 7) no recibió tratamiento antifúngico y fue dado de alta. La cuantificación de bmGT en el único suero que se recibió de este paciente fue de 44,90 mg/L. Debido a que la recogida de datos fue retrospectiva, no se pudieron analizar los fármacos que este paciente recibió por vía parenteral con el fin de detectar una posible fuente de falsos positivos.

De los cuatro casos en los que no se detectó bmGT (**Tabla 11**, casos 9, 10, 12 y 14), dos recibieron tratamiento antifúngico empírico y fueron dados de alta (casos 9 y 12). Un paciente no recibió tratamiento antifúngico y murió a los 25 días (caso 10) y otro murió a los 7 días, habiendo recibido tratamiento antifúngico con voriconazol (**Tabla 11**, caso 14).

#### Casos sin AI

Se analizaron 310 sueros de los 74 episodios restantes en los que no se cumplía la definición de caso posible/probable/probado. Veinte sueros de 15 pacientes fueron falsos positivos para GM y 12 sueros de nueve pacientes fueron positivos para bmGT. Los 278 sueros restantes fueron negativos para ambos biomarcadores.

**4.4.1.1. Rendimiento de la bmGT y del GM en el diagnóstico de aspergilosis invasora según la clasificación EORTC/MSG**

En un primer análisis se determinó la validez clínica de la bmGT y se comparó con la del GM, usando como patrón de referencia la clasificación de los episodios según las definiciones de caso EORTC/MSG [67]. Se consideraron como verdaderos positivos los casos de AI probable/probada y como verdaderos negativos los casos sin AI. Se excluyeron del análisis los casos de AI posible debido a la imposibilidad de determinar si los pacientes sufrían o no infección fúngica. Se calculó la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y la curva COR. En la **Tabla 12** se encuentran recogidos los valores de los diferentes parámetros diagnósticos analizados para cada biomarcador.

**Tabla 12: Parámetros de rendimiento diagnóstico de bmGT, GM y la combinación de ambos según diferentes patrones de referencia.**

	bmGT			GM			bmGT y GM
	EORTC	EORTC menos	EORTC más	EORTC	EORTC menos	EORTC más	EORTC
		GM	bmGT		GM	bmGT	
<b>S (%)</b>	61,5	55,6	76,0	30,8	33,3	20,0	30,8
<b>E (%)</b>	93,0	92,2	96,1	94,2	94,0	93,4	100
<b>VPP (%)</b>	25,0	15,6	59,4	16,7	12,5	18,5	100
<b>VPN (%)</b>	98,5	98,8	98,2	97,3	98,2	93,9	97,5
<b>ABC</b>	0,768	0,756	0,865	0,659	0,680	0,566	0,538

S: sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, ABC: área bajo la curva COR

Como podemos ver en dicha tabla, utilizando como patrón de referencia la clasificación EORTC/MSG, la sensibilidad, VPP y VPN fueron mayores para la bmGT que para el GM mientras que el GM mostró una especificidad ligeramente superior. Asimismo, el área bajo la curva COR fue mayor para

bmGT (0,768, IC 95 %, 0,631 - 0,904) que para GM (0,659, IC 95 %, 0,521 - 0,798), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,06$ ). Esto puede deberse a que se consideró cualquier valor de bmGT superior a cero como positivo.

**4.4.1.2. Rendimiento de la bmGT y del GM en el diagnóstico de aspergilosis invasora excluyendo el GM de los criterios micológicos de la clasificación EORTC/MSG**

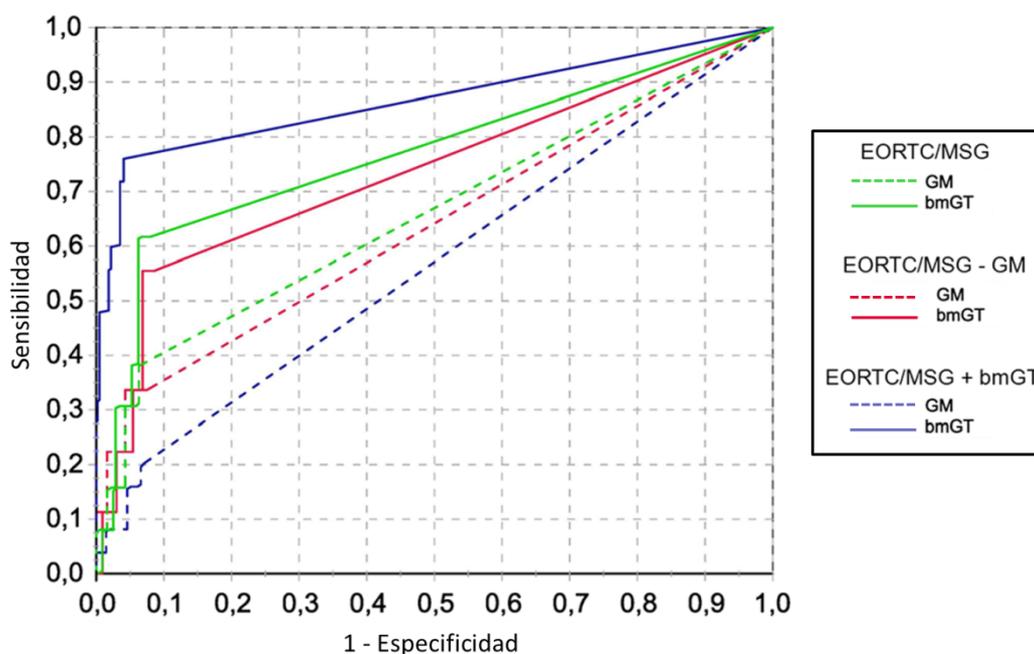
En este caso, se comparó el rendimiento diagnóstico de la bmGT con el del GM usando como patrón de referencia los criterios EORTC/MSG sin el GM, de manera que sólo se consideraron como casos probables aquellos con crecimiento fúngico en muestra biológica. Como se ha apuntado en el **apartado 3.4.1** de Materiales y Métodos, esto es necesario porque el GM forma parte de los propios criterios EORTC/MSG y por tanto se incluye un sesgo en la comparación directa. Los resultados obtenidos con esta modificación de la clasificación fueron similares a los obtenidos con la clasificación original, probablemente porque solo un paciente se clasificó como probable debido al GM (caso 4 de la **Tabla 11**). Así, la sensibilidad, especificidad, VPP y el VPN fueron 55,6, 92,2, 15,6 y 98,8 %, respectivamente para bmGT y 33,3, 94,0, 12,5 y 98,2 %, respectivamente para GM. El área bajo la curva COR para bmGT fue 0,756 (IC 95 %, 0,563 - 0,904) y 0,680 para GM (IC 95 %, 0,468 - 0,805) sin que la diferencia fuera estadísticamente significativa ( $p = 0,17$ ). Estos valores están recogidos en la **Tabla 12**.

**4.4.1.3. Rendimiento de la bmGT y del GM en el diagnóstico de aspergilosis invasora incluyendo la bmGT en los criterios micológicos de la clasificación EORTC/MSG**

Finalmente, se compararon los parámetros diagnósticos de la detección de bmGT con los de la detección de GM incluyendo la bmGT entre los criterios micológicos de AI probable. Así, se introduce un sesgo ya que los casos de AI posible con bmGT detectable pasan a ser probables. Sin embargo, este análisis es necesario para dar el mismo peso a la detección de bmGT que a la de GM, ya que éste último no es el patrón de referencia. De esta manera, se obtenía la mayor sensibilidad y VPP para bmGT, siendo 76 y 59,4 % respectivamente (**Tabla 12**). Por el contrario, el GM alcanza la sensibilidad más baja, 20 % y el VPP es similar al obtenido en la comparación con los criterios EORTC/MSG. La especificidad fue alta (> 93 %) para ambos biomarcadores. El área bajo la curva COR fue superior para la bmGT (0,865, IC 95 %, 0,778 - 0,952) que para el GM (0,566, IC 95 %, 0,485 - 0,647), siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ).

En la **Gráfica 9** se pueden observar las curvas COR de ambos biomarcadores según los diferentes criterios de comparación arriba descritos.

Como podemos ver en la **Tabla 12**, la combinación de ambos biomarcadores dio lugar a los valores de especificidad, VPP y VPN más elevados, siendo 100 %, 100 % y 97,5 % respectivamente, lo que sugiere que una estrategia de retirada de antifúngicos basada en ambos biomarcadores podría ser útil para el manejo de pacientes con AI.



**Gráfica 9: Curva COR para GM y bmGT según diferentes patrones de referencia.** Los patrones de referencia empleados son (i) EORTC/MSG (verde), (ii) EORTC/MSG excluyendo el GM de los criterios micológicos (rojo) y (iii) EORTC/MSG incluyendo bmGT en los criterios micológicos (azul).

Finalmente, el análisis de la curva COR tomando como patrón de referencia los criterios EORTC/MSG, sugirió un punto de corte de 2,17 mg/L de bmGT con el que se obtiene una sensibilidad del 61,5 % y una especificidad 93,6 %.

#### 4.4.2. Correlación entre la detección de bmGT y la gravedad clínica

Durante el estudio de validación clínica de la bmGT, quedaron patentes las limitaciones de los criterios EORTC/MSG en el diagnóstico de certeza de pacientes con AI posible/probable. Inicialmente estas limitaciones se solventaron mediante dos subanálisis: (i) excluir el GM de los criterios y (ii)

añadir la bmGT a los criterios, tal y como se ha descrito previamente. Debido a que los criterios EORTC/MSG no aportaron toda la información necesaria, principalmente en los casos de AI posible, quisimos analizar si existía relación entre la presencia de bmGT y la gravedad clínica. La gravedad clínica se ha definido mediante dos parámetros, la mortalidad y la necesidad de tratamiento antifúngico.

#### **4.4.2.1. Correlación con la mortalidad**

La mortalidad global a los 30 días fue del 21,1 % (19/90). Entre los pacientes con AI posible, la mortalidad a los 30 días fue del 40 % (4/10) y entre los pacientes con AI probable/probada fue del 83,3 % (5/6). La mortalidad fue menor en el grupo de pacientes sin AI, 13,5 % (10/74). Se analizó la correlación entre la mortalidad y la presencia de bmGT y GM. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad entre los pacientes con y sin GM positivo (OR 1,3; IC 95 %, 0,4 - 4,2;  $p = 0,62$ ). Pero sí que se halló diferencia en la mortalidad entre los pacientes con y sin bmGT detectable (OR 3,2; IC 95 %, 1,1 - 9,6;  $p = 0,03$ ). Además, los pacientes que murieron tenían significativamente más cantidad de bmGT en suero que los que no fallecieron ( $2,36 \pm 4,76$  mg/L vs  $1,4 \pm 7,58$  mg/L,  $p < 0,01$ ). Estos resultados indican la posible utilidad de la bmGT como marcador pronóstico de la enfermedad.

#### **4.4.2.2. Correlación con el tratamiento antifúngico**

La necesidad de tratamiento antifúngico para el manejo de los pacientes se analizó como criterio indirecto de gravedad clínica. Fueron 34 los pacientes que recibieron tratamiento antifúngico: 12 de ellos como terapia dirigida y 22

empíricamente. Los 12 episodios en los que se requirió tratamiento antifúngico dirigido se correspondieron a seis casos de AI probable/probada y los otros seis a pacientes con GM positivo pero que no cumplían otros criterios EORTC/MSG de AI probable. Respecto a los 22 casos restantes, 7 AI posible y 15 sin AI, recibieron tratamiento antifúngico empírico para el manejo de episodios de neutropenia febril o infección respiratoria. Hubo correlación estadísticamente significativa entre la presencia de bmGT y la necesidad de tratamiento antifúngico para el manejo del paciente (OR: 5,68; IC 95 %: 1,61 - 19,99,  $p = 0,01$ ). Esto podría reflejar una peor situación clínica y por tanto, la detección de bmGT podría correlacionarse con una peor evolución de la enfermedad.

Además, tres pacientes recibieron profilaxis con posaconazol. Ninguno de ellos desarrolló AI pero el GM fue positivo en uno de ellos. Esta detección fue considerada un falso positivo de GM por los clínicos. No se detectó bmGT en el suero de este paciente, lo que podría indicar una mayor utilidad de este marcador entre los pacientes en profilaxis.

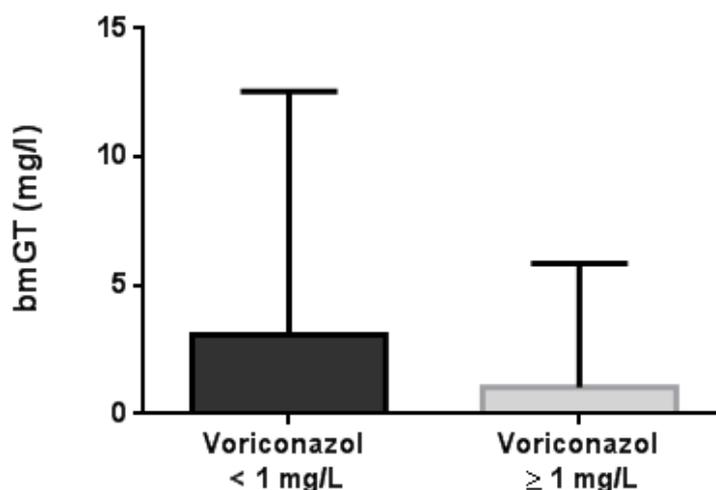
#### **4.4.3. Efecto del voriconazol en la detección de bmGT**

Con el fin de conocer el efecto del voriconazol en la detección de bmGT, hemos analizado la relación entre la presencia de bmGT y los niveles terapéuticos y subterapéuticos de voriconazol.

Durante el periodo de estudio, 25 pacientes recibieron tratamiento con voriconazol. En 15 casos se administró voriconazol como fármaco de primera

línea en monoterapia, mientras que en los 10 casos restantes se administró en combinación o tras haber recibido previamente antifúngicos de amplio espectro de otras clases.

Hubo 99 muestras con voriconazol detectable mediante HPTLC según lo descrito en el **apartado 3.4.1.5** de Materiales y Métodos. De éstas, 26 muestras presentaban valores de voriconazol inferiores a 1 mg/L (0,22 - 0,99 mg/L), considerados como subterapéuticos y 73 presentaban valores superiores a 1 mg/L (1 - 8,73 mg/L). No hubo diferencias significativas entre los valores medios de bmGT en los pacientes con niveles terapéuticos ( $3,08 \pm 1,86$  mg/L) respecto a los pacientes con niveles subterapéuticos ( $1,02 \pm 0,57$  mg/L,  $p = 0,16$ , prueba U de Mann-Whitney), tal y como se puede observar en la **Gráfica 10**. Esto podría indicar que la bmGT no se ve afectada por el voriconazol y por tanto, el número de falsos negativos debido a este tratamiento antifúngico es previsiblemente bajo.



**Gráfica 10:** Concentración media de bmGT en pacientes con niveles subterapéuticos y terapéuticos de voriconazol analizados mediante HPTLC. La barra muestra la DE.

Adicionalmente comparamos la cantidad de bmGT en pacientes tratados con un solo antifúngico respecto a los tratados con varios antifúngicos y aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p = 0,143$ , prueba U de Mann Whitney), se aprecia que de media los pacientes tratados con varios antifúngicos presentaban menor cantidad de bmGT que los tratados con un solo antifúngico (0,68 mg/L vs 3,05 mg/L).

#### 4.4.4. Reactividad cruzada

Durante el periodo de estudio, hubo 37 casos de fungemia en pacientes oncohematológicos del HUMS. El género *Candida* representó el hongo más frecuentemente aislado, contando con un 86 % de los aislamientos. Muy por debajo se sitúa el porcentaje de aislamientos de *C. neoformans*, tan sólo el 8 %. Finalmente, hubo dos aislamientos (6 %) de *Fusarium* spp. Sin embargo, no se disponía de suero archivado de todos los pacientes (ya que su manejo no requirió el envío de esta muestra al Servicio de Microbiología). Finalmente, fueron 18 los pacientes de los que se pudo recuperar muestra de suero y analizar la presencia de bmGT.

**Tabla 13: Resultado de bmGT en el suero de pacientes con fungemia por hongos diferentes de *Aspergillus* spp.**

Germen	n° de muestras	bmGT (-)	bmGT (+)
<i>C. albicans</i>	2	2	0
<i>C. glabrata</i>	4	3	1
<i>C. krusei</i>	2	2	0
<i>C. orthopsilosis</i>	1	1	0
<i>C. parapsilosis</i>	4	4	0
<i>C. neoformans</i>	3	3	0
<i>Fusarium</i> spp	2	2	0

Como se puede observar en la **Tabla 13**, tan solo uno de los 18 sueros analizados presentó bmGT detectable. Este suero procedía de una paciente con fungemia por *C. glabrata* y presentó una concentración de bmGT de 25,34 mg/L. Dicha paciente se encontraba ingresada en UCI por insuficiencia respiratoria aguda debida a una neumonía nosocomial tras una resección del intestino delgado por isquemia intestinal. Había recibido antibióticos de amplio espectro y corticoides. La TC mostraba infiltrados en vidrio deslustrado y se le realizó broncoscopía en la que no se observaron lesiones endobronquiales. Se mandaron BAS y LBA a Microbiología pero no se aisló ningún germen. Lamentablemente el resultado positivo de bmGT no se pudo corroborar en otra muestra de suero ni analizar por duplicado ya que el volumen de suero era muy bajo. Tampoco se investigó la presencia de GM.

Por otra parte, si la reactividad cruzada fuera específica de la especie *C. glabrata*, cabría esperar que alguna de las otras 3 muestras de pacientes con fungemia por esta especie hubiera sido positiva, pero no fue así.

#### **4.4.5. Comportamiento de la bmGT en casos de infección fúngica invasora probada**

A continuación se describen tres casos de AI probada en los que se determinó la presencia de bmGT sérica. El primero de los casos se corresponde con el caso probado descrito en el **apartado 4.4.1**, mientras que los otros dos son casos posteriores al periodo de dicho estudio. La determinación de bmGT fue positiva en los tres casos, lo que sugiere la utilidad

de dicho biomarcador en el diagnóstico de AI. Además, se describe la cinética de la bmGT en relación a la clínica de los pacientes y al tratamiento antifúngico.

**4.4.5.1. Infección fúngica invasora diseminada por probable *Aspergillus fumigatus***

Hombre de 62 años con antecedentes de nefrectomía derecha por carcinoma de células renales en 2005, fibrilación auricular en tratamiento con ácido acetilsalicílico, intervenido quirúrgicamente de tabique nasal en 2001 y antiguo trabajador en ambiente contaminado por polvo de mineral sin protección respiratoria. Acude a urgencias del HUMS por temblor, torpeza y debilidad en la mano izquierda de unos diez días de evolución. No presenta fiebre ni tos. No presenta alteraciones en la exploración general excepto debilidad en la extremidad superior izquierda. El hemograma y la TC cerebral realizados son normales por lo que es diagnosticado de síndrome de túnel carpiano y dado de alta.

Acude de nuevo a urgencias al día siguiente tras sufrir un episodio de paralización del brazo izquierdo en flexopronación. Refiere dolor en la región axilar desde hace 4 días coincidiendo con inicio de pérdida de movilidad en los dedos. Durante la exploración sufre una contracción tónica y mínimamente clónica de la extremidad superior izquierda que desaparece a los 2 - 3 minutos, por lo que es diagnosticado de epilepsia e ingresa en el Servicio de Neurología para completar el estudio. Durante su ingreso se realizan electroneurogramas de repetición que no muestran descargas epileptiformes. Se realiza resonancia magnética cerebral que muestra una lesión ocupante de espacio en la región frontal derecha sugestiva de tumor glial de alto grado. También se realiza TC

de tórax y abdomen que muestra múltiples nódulos pulmonares en ambos hemitórax sugestivos de metástasis pulmonares. Ante estos hallazgos el paciente es trasladado al Servicio de Neurocirugía. Se realiza tomografía de emisión de positrones torácico sin encontrar lesiones con actividad metabólica-maligna intrapulmonar. El paciente es dado de alta en tratamiento con levetiracetam (1500 mg/12 h) y dexametasona (4 mg/8 h) y se programa cirugía de la lesión frontal 23 días después.

Sin embargo, el paciente acude de nuevo a urgencias a las dos semanas por astenia y disnea de mínimos esfuerzos. Presenta insuficiencia respiratoria aguda con saturación de O<sub>2</sub> del 91 %, imagen parcheada bilateral y dos focos consolidativos en ambas bases pulmonares en la radiografía de tórax. El hemograma muestra neutrofilia ( $7,7 \times 10^3$  neutrófilos/mm<sup>3</sup>) con desviación izquierda (93,6 %) y linfopenia ( $0,2 \times 10^3$  linfocitos/mm<sup>3</sup>). La proteína C reactiva es de 44,31 mg/dL y la procalcitonina de 1,28 mg/mL. La TC cerebral muestra numerosas lesiones focales hipodensas de localización cortico-subcortical que sugieren émbolos sépticos, la lesión frontal derecha presenta sangrado. El paciente presenta bajo nivel de conciencia y es trasladado a la UCI donde requiere intubación orotraqueal y conexión a ventilación mecánica. Ante la presencia de émbolos sépticos, se realiza ecocardiograma transtorácico que no muestra alteraciones destacables. Se inicia tratamiento antibiótico y antifúngico empírico de amplio espectro. Se envía BAS, hemocultivo y LCR al Servicio de Microbiología. Tan solo crece el BAS: *A. fumigatus* y *C. glabrata*. Ante este hallazgo, se envía suero para detección de GM, cuyo índice de lectura de DO es superior al rango de la técnica. Asimismo, se realiza detección de bmGT de acuerdo a lo descrito en

los **apartados 3.4.1.4 y 3.4.1.5** de Materiales y Métodos. El resultado obtenido es de 6,84 mg/L de bmGT. El paciente presenta inestabilidad hemodinámica a pesar de fluidoterapia con aminas vasoactivas. Ante el deterioro de la función renal se inicia hemodiafiltración. Finalmente evoluciona hacia fracaso multiorgánico, aumento de la presión intracraneal y muerte.

Se realiza autopsia que confirma el diagnóstico de IFI diseminada a encéfalo, ambos pulmones, corazón, riñón izquierdo, páncreas e intestinos delgado y grueso y glioblastoma frontoparietal derecho grado IV.

#### **4.4.5.2. Infección fúngica invasora de senos paranasales por *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus flavus***

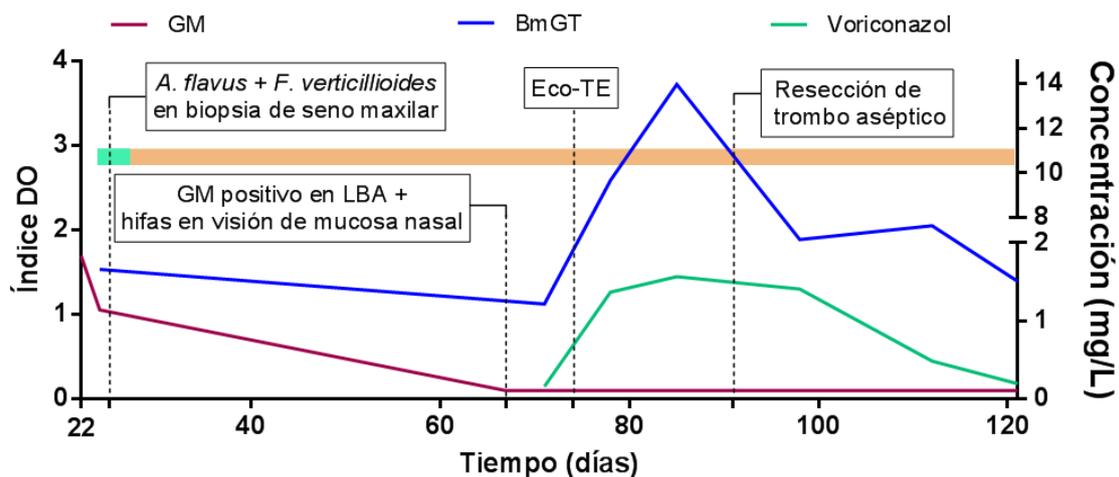
Hombre de 18 años afecto de leucemia linfoblástica tipo B con antecedente de cirugía por necrosis ósea aséptica de cadera izquierda, en tratamiento por recaída medular. Ingresó de forma programada en el Servicio de Oncopediatría del HUMS para la administración del primer ciclo de consolidación (dexametasona, vincristina, citarabina, metotrexato, ciclofosfamida). A los diez días de la administración de quimioterapia el paciente presenta neutropenia severa que se prolonga durante 21 días.

Durante el episodio neutropénico, el paciente presenta fiebre y ante el aislamiento de *Escherichia coli* en el hemocultivo se añade amikacina al tratamiento empírico con cefepime iniciado previamente. Ante la persistencia de la fiebre, se añade teicoplanina al tratamiento. A los 15 días del inicio de la neutropenia severa, inicia un cuadro de celulitis periorbitaria, edema, enrojecimiento y dolor a la palpación del seno maxilar derecho, coincidiendo con un resultado positivo para GM (índice de lectura de DO = 1,7). La

concentración de bmGT hallada en dicha muestra fue de 1,6 mg/L (ver **Gráfica 11**). Se realiza TC orbitario-facial, se envía aspirado nasofaríngeo para estudio microbiológico y se inicia tratamiento con voriconazol. Se aísla *A. flavus* en el aspirado. La TC muestra celulitis orbitaria derecha y sinusitis bilateral. Al día siguiente es intervenido quirúrgicamente mediante endoscopia nasosinusal y se envían biopsias a los Servicios de Microbiología y Anatomía Patológica. El estudio anatomopatológico confirmó necrosis e infiltración del tejido y de las estructuras vasculares por hongos septados con ramificaciones en ángulo agudo. Se aisló *A. flavus* y *F. verticillioides* en las biopsias. Se realiza TC pulmonar y se observan consolidaciones en ambos pulmones rodeados de halo en vidrio deslustrado compatibles con aspergilosis angioinvasiva. Se inicia tratamiento con anfotericina B liposomal y nebulizada tres días a la semana. La detección de GM se negativiza tras el inicio de tratamiento antifúngico. Ante la mejoría clínica, el paciente es dado de alta para continuar el tratamiento antifúngico en el Hospital de Día del HUMS.

Tres semanas después el paciente ingresa para intervención quirúrgica endoscópica y broncoscopía. Se envía mucosa de ambas fosas nasales al Servicio de Anatomía Patológica y tanto mucosa como LBA al Servicio de Microbiología. Anatomía Patológica informó inflamación y ulceración en el seno maxilar derecho sin presencia de estructuras fúngicas. Tampoco se aisló ningún microorganismo en las biopsias aunque se observaron hifas en la visión directa. Asimismo, no se aislaron microorganismos en los LBAs enviados, sin embargo, la detección de GM en estas muestras fue positiva (índice de lectura de DO superior al rango de la técnica en LBA de lóbulo superior derecho y 0,85 en LBA de lóbulo inferior izquierdo). La posterior detección seriada de GM

permaneció negativa, sin embargo, la detección de bmGT se mantuvo positiva. Ante la posibilidad de un falso positivo de bmGT, se recogieron todos los fármacos administrados por vía parenteral al paciente durante 24 h y se analizaron en busca de bmGT. Se obtuvieron muestras de amoxicilina-ácido clavulánico, furosemida, metamizol y dexketoprofeno, pero ninguna de ellas mostró bmGT por lo que se descartó la posibilidad de un falso positivo. Además, para confirmar la presencia de bmGT, se extrajo la toxina a partir de una muestra de suero del paciente y se analizó mediante espectrometría de masas. El paciente fue dado de alta y permaneció en seguimiento en consultas externas.



**Gráfica 11: Evolución de los biomarcadores y niveles de voriconazol a lo largo del tiempo.** El día +22 del ingreso del paciente, el índice de DO del GM es positivo por lo que se inicia tratamiento con voriconazol (banda verde). Dos días más tarde se envía una nueva muestra de suero que es positiva tanto para GM como para bmGT. El día +28 se añade al tratamiento anfotericina B (banda naranja) y la detección de GM se negativiza. La bmGT permanece detectable. El día +67 el paciente es intervenido quirúrgicamente y se realiza fibrobroncoscopía, tomando muestra de biopsia y LBA. El GM en LBA es positivo pero en suero sólo se detecta bmGT. Posteriormente se comienza a monitorizar los niveles de voriconazol, que no alcanzan el rango terapéutico (1 - 5 mg/L) hasta el día +78. El paciente permanece en tratamiento con voriconazol y anfotericina B y los niveles de bmGT van en descenso hasta finalmente negativizarse (Eco-TE: ecocardiograma transesofágico).

Acude una semana después para valoración de la función pretrasplante y se evidencia taquicardia de 185 latidos por minuto. Se realiza ecocardiograma en el que se visualiza un trombo en la válvula tricúspide, a descartar endocarditis fúngica vs trombosis intracavitaria. Se inicia tratamiento con heparina sódica y se mantiene tratamiento antifúngico consistente en voriconazol por vía oral y anfotericina B nebulizada e intravenosa tres días por semana, junto con instilación de colirio de anfotericina B en las fosas nasales. Días más tarde se realiza cirugía cardíaca con apertura de aurícula derecha y resección de masa, friable y con calcificaciones, adherida a la pared lateral derecha. Se envía muestra a Anatomía Patológica y Microbiología. La muestra enviada a Anatomía Patológica se identifica como material trombótico con extensas áreas de calcificación, sin detectarse microorganismos. Tampoco se aíslan hongos en Microbiología y la visión directa es difícil debido a la consistencia pétreo de la muestra, por lo que finalmente se diagnostica de trombosis intracavitaria y se descarta endocarditis infecciosa. Actualmente, el paciente evoluciona favorablemente y continúa en tratamiento antifúngico a la espera de TPH autólogo de donante hermano haploidéntico. Finalmente la detección de bmGT sérica se negativizó tres meses después.

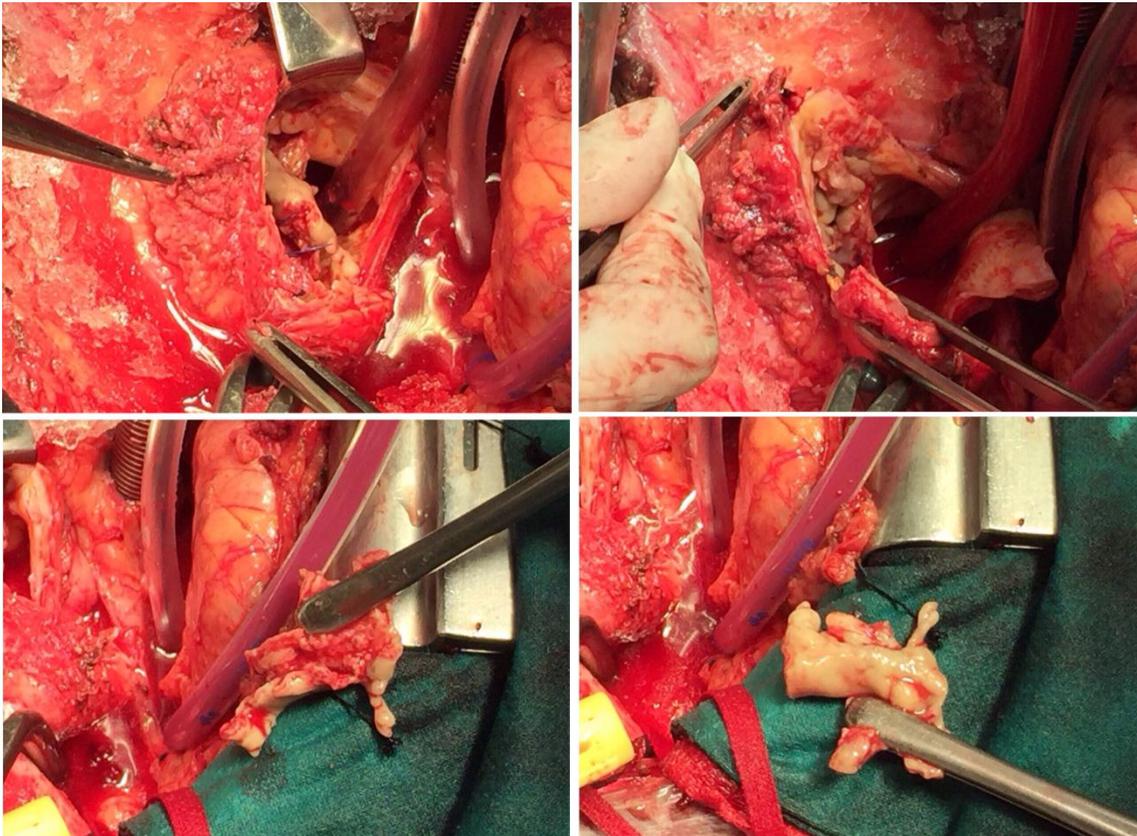
**4.4.5.3. Aspergilosis diseminada por *Aspergillus fumigatus* en paciente inmunocompetente**

Hombre de 70 años con antecedentes de recambio de válvula aórtica cinco años antes y prótesis de cadera 3 años antes. Acude a urgencias del HUMS por visión borrosa. La exploración oftalmológica mostró efecto Tyndall positivo y turbidez vítrea. Se diagnostica de uveítis y se inicia tratamiento corticoide, siendo dado de alta. Acude tres días después a la consulta de

Oftalmología para revisión, donde finalmente se diagnostica de endoftalmitis endógena, por lo que ingresa para realizar una vitrectomía. Durante la intervención se obtiene humor vítreo que se envía para cultivo microbiológico y se realiza lavado intravítreo con vancomicina y voriconazol. También se inicia tratamiento sistémico con vancomicina (1 g/12 h). Durante su estancia en la planta sufre un episodio isquémico del miembro inferior izquierdo. Se realiza una TC de las arterias periféricas y del tórax y se objetiva una oclusión de la arteria *pedis dorsalis* y un trombo en el arco de la aorta asociado a una pequeña disección. Se realiza ecocardiograma transtorácico que descarta endocarditis infecciosa. Se realiza una nueva TC que en esta ocasión muestra un aneurisma micótico en la aorta torácica ascendente que incluye un trombo mural. Se inicia tratamiento antibiótico empírico de amplio espectro con daptomicina (10 mg/kg/día), cloxacilina (4 g/4 h) y gentamicina (240 mg/12 h). También se lleva a cabo sustitución de la aorta ascendente. Durante la cirugía se extrae abundante material friable entre la prótesis aórtica y el aneurisma micótico de aspecto infeccioso que se envía a Microbiología y Anatomía Patológica (**Figura 29**). El informe de la tinción de Gram sugiere la presencia de hifas por lo que el mismo día de la intervención se inicia tratamiento con caspofungina (70 mg/día el primer día seguido de 50 mg/día) y voriconazol (6 mg/kg cada 12 h el primer día, seguido de 4 mg/kg cada 12h).

El paciente permaneció estable las 48 - 72 h del posoperatorio, lo que permitió despertar y extubar, tan sólo presentó una leve insuficiencia renal (creatinina sérica en torno a 3 mg/dL). Posteriormente desarrolló insuficiencia respiratoria grave con afectación bilateral en la radiografía. Se envió BAS a Microbiología y se aisló *Klebsiella oxytoca* (sin aislamiento de hongos) que se

trató con meropenem (2 g/8 h). No toleró bien la ventilación mecánica no invasiva por lo que fue necesario intubarlo de nuevo. Presentó fracaso renal agudo que no respondía a tratamiento y fue preciso realizar hemodiafiltración venovenosa continua. Tras el tratamiento antibiótico presentó mejoría respiratoria y fue posible extubar al paciente, sin llegar a recuperar la función renal, por lo que se pasó a hemodiálisis intermitente.



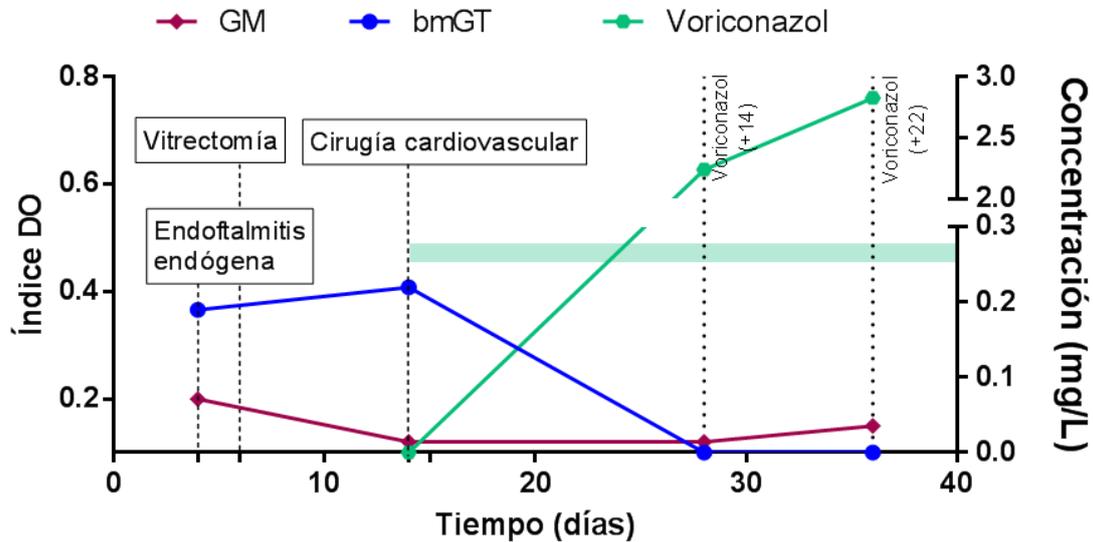
**Figura 29: Resección de material friable adherido a la prótesis aórtica durante la cirugía de sustitución de aorta ascendente.**

Posteriormente presentó empeoramiento hemodinámico y del estado general que precisó reiniciar drogas vasoactivas y acabó presentando parada cardiorrespiratoria por disociación electromecánica, de la que salió tras reanimación cardiopulmonar avanzada de diez minutos de duración. Preciso intubación orotraqueal y drogas vasoactivas. Finalmente sobrevino shock

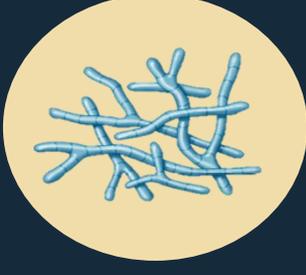
séptico con insuficiencias respiratoria y renal graves. Durante las últimas 48 h presenta un fallo hepático agudo con ictericia, elevación de transaminasas (aspartato aminotransferasa: 6342 U/L, alanina aminotransferasa: 2480 U/L), bilirrubinemia, coagulopatía e hipoglucemia, rápido deterioro hemodinámico refractario al tratamiento y exitus.

Respecto a los estudios complementarios llevados a cabo, el estudio anatomopatológico de la aorta obtenido durante el recambio mostró la presencia de estructuras fúngicas y de un aneurisma abscesificado. En esa misma muestra en la que se habían observado hifas septadas en la tinción de Gram, se aisló *A. fumigatus. sensu stricto*. Este mismo microorganismo se identificó en la muestra de humor vítreo enviada días antes durante la vitrectomía (ver **Gráfica 12**). Inicialmente con el fin de descartar toxoplasmosis, se envió una muestra de suero que presentó IgM e IgG de *Toxoplasma* spp positivas. La avidéz de la IgG también fue positiva por lo que se recuperó el humor vítreo y se envió al Centro Nacional de Microbiología para realizar PCR de *Toxoplasma* spp que fue negativa. Ese mismo suero fue analizado en busca de GM, GT y bmGT. Se envió otro suero el día de la cirugía y otros dos más tras iniciar el tratamiento antifúngico y en todos ellos se analizó la presencia de GM, GT y bmGT. El GM fue consistentemente negativo (índice de lectura inferior a 0,5) en las cuatro muestras, al igual que la GT. Los dos sueros obtenidos previo inicio de tratamiento antifúngico mostraron bmGT en concentración 0,19 - 0,22 mg/L, mientras que en los dos sueros obtenidos tras el inicio del tratamiento no se detectó bmGT. La detección de bmGT apoya el diagnóstico de AI diseminada pese a que el GM fuera negativo y sugiere su utilidad independientemente del estatus inmunológico del paciente, es decir,

que su utilidad no se limitaría a pacientes hematológicos de alto riesgo de AI. Estos resultados también sugieren que el tratamiento antifúngico podría negativizar este biomarcador, al igual que sucede con otros marcadores [69].



**Gráfica 12: Evolución de los biomarcadores y niveles de voriconazol a lo largo del tiempo.** El paciente ingresa por diagnóstico de endoftalmitis endógena a los cuatro días del inicio de los síntomas. Ese mismo día se obtiene una muestra de suero que es negativa para GM y positiva para bmGT. Dos días más tarde se realiza vitrectomía y se manda humor vítreo a Microbiología, en el que se aísla *A. fumigatus*. Tras un episodio trombótico se realiza TC de aorta donde se visualiza aneurisma micótico, por lo que el paciente es intervenido. El día de la cirugía, se envía otro suero y material trombótico a Microbiología. Se visualizan hifas en la tinción de Gram del trombo por lo que se inicia tratamiento con voriconazol (banda verde). La bmGT es positiva en dicho suero. Posteriormente, se envían dos sueros más para monitorización de niveles de voriconazol, que se hallan en rango terapéutico mientras que la bmGT se ha aclarado del suero.



Discusión

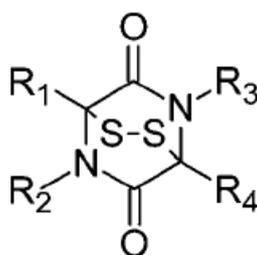


## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Estudios de producción de GT y bmGT *in vitro*

Desde su descubrimiento en el año 1936, la GT ha despertado un gran interés debido inicialmente a su actividad antifúngica y antivírica y más recientemente a su utilidad como antitumoral [196].

La GT pertenece a la clase de toxinas denominadas ETPs, que son metabolitos secundarios producidos exclusivamente por hongos. La molécula común en las 14 toxinas pertenecientes a las ETPs es un anillo de piperazina con un puente disulfuro (**Figura 30**) [99].



**Figura 30:** Estructura química genérica de las ETPs [99].

Se sabe que la producción de toxinas es discontinua entre las diferentes especies y que hongos genéticamente no relacionados pueden producir la misma toxina. Por ejemplo, *A. fumigatus* produce GT mientras *A. nidulans* no la produce y tanto *Aspergillus* spp como *Penicillium* spp pueden producirla [99,118,197].

Aunque la producción de GT *in vitro* se ha descrito fundamentalmente en aislados de origen marino: *Penicillium* spp, *Trichoderma virens* (antes conocido como *G. virens*), *Colletotrichum gloeopporoides*, *Pseudallescheria* spp (MFB165), etc. [99,106,116–118], los únicos patógenos humanos en los que se ha aislado GT son *Aspergillus* spp y *C. albicans* [192,198].

La biosíntesis de GT en el género *Candida* es controvertida. El primer trabajo en el que se describió su aislamiento data de 1991 [192]. En dicho estudio, los autores analizaban 50 aislados de *C. albicans* mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Sin embargo, la identificación de la sustancia como GT se limitaba a que presentara un tiempo de retención igual al de la GT comercial, sin que se identificara por otros métodos como espectrometría de masas o tiempo de vuelo. Por ello, ya en el título del artículo los autores admiten esta limitación “Producción de una sustancia similar a la GT por aislados clínicos de levaduras” [192]. A diferencia de estos autores, en nuestro trabajo no hemos sido capaces de detectar GT ni bmGT en ninguna de las dos especies de *Candida* analizadas (*C. albicans* y *C. krusei*) durante siete días. Nuestros resultados son acordes a un estudio en el que se analizaron un total de 100 aislados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* y no pudieron detectar la toxina en ninguno de los cultivos [126].

En cambio, la producción de GT por el género *Aspergillus* ha sido demostrada por numerosos autores y está completamente aceptada por la comunidad científica, especialmente en la especie *A. fumigatus* [99]. Se sabe que esta especie es la que produce GT con más frecuencia y en mayores concentraciones [122,123]. Mientras que otras especies de *Aspergillus* no-

*fumigatus* producen GT con una frecuencia variable tal y como se puede observar en la **Tabla 14**.

**Tabla 14: Número de aislados productores de GT y bmGT de diferentes especies de *Aspergillus* según varios estudios.**

	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. niger</i>	Referencia
<b>GT</b>	40	4	27	9	[123]
<b>(%)</b>	(93)	(18)	(25)	(75)	
<b>[GT]<sub>media</sub> (mg/L)</b>	0,628	0,062	0,169	0,603	
<b>GT</b>	100	15	27	16	[122]
<b>(%)</b>	(97)	(13)	(37)	(56)	
<b>[GT]<sub>media</sub> (mg/L)</b>	5,75	0,07	0,31	0,1	
<b>GT</b>	47	-	-	-	[132]
<b>(%)</b>	(74)	-	-	-	
<b>[GT]<sub>media</sub> (mg/L)</b>	2,078	-	-	-	
<b>bmGT</b>	47	-	-	-	
<b>(%)</b>	(93)	-	-	-	
<b>[bmGT]<sub>media</sub> (mg/L)</b>	2,579	-	-	-	
<b>GT</b>	78	3	8	4	Vidal-García y cols. 2017
<b>(%)</b>	(77)	(8,33)	(23)	(10)	
<b>[GT]<sub>media</sub> (mg/L)</b>	2,26	0,14	0,79	0,09	
<b>bmGT</b>	85	4	1	1	
<b>(%)</b>	(84)	(11)	(3)	(2,5)	
<b>[bmGT]<sub>media</sub> (mg/L)</b>	3,45	0,39	0,07	0,02	

El porcentaje de *A. fumigatus* productor de GT en nuestro estudio es ligeramente inferior al descrito por otros autores (77 % vs 93 - 97 %) [122,123]. Lo mismo ocurre para *A. flavus* (8,33 % vs 13 - 18 %), y es muy similar a lo descrito en *A. terreus* (23 % vs 25 - 37 %). Sin embargo, nuestro porcentaje de aislados de *A. niger* productores de GT fue menor al de los estudios previos (10 % vs 56 - 75%). En cuanto a la concentración media de GT detectada en los filtrados celulares, en nuestro caso doblaba la descrita por otros autores para *A. flavus* y *A. terreus* y era similar a lo descrito para *A. fumigatus* y *A. niger*.

Estas diferencias pueden ser debidas a que se ha visto que las condiciones de cultivo son determinantes para la producción de GT [199,200]. Además, se sabe que no todos los aislados de *Aspergillus* spp de una misma

especie producen GT y bmGT. De hecho, la presencia de los clusters génicos responsables de la biosíntesis de ambas toxinas es discontinua dentro de las diferentes especies [118]. Volviendo a las condiciones de cultivo, se han descrito como óptimas, una temperatura de cultivo de 37°C y una concentración de glucosa de 30 g/L [199]. La producción de GT comienza a las 24 - 29 h de incubación y alcanza su máximo de producción en torno a las 48 h aunque se puede seguir detectando hasta las 96 - 100 h [123,199]. Nuestros propios experimentos realizando cinéticas de producción de toxinas durante siete días (no se muestran los datos) indicaron que no era hasta el día 4 cuando se empezaba a detectar bmGT en la mayoría de los aislados y que la producción se mantenía hasta los 7 días. Por ello la obtención de las muestras se realizó tras 4 días de incubación, con el fin de detectar el mayor número posible de aislados productores, pese a que la concentración obtenida no fuese la máxima. En nuestro ensayo hemos utilizado la temperatura de incubación de 37°C descrita como óptima. Sin embargo, la concentración de glucosa empleada ha sido 20 g/L que aunque no es la óptima, permite el crecimiento del hongo y la recuperación de toxinas y ha sido empleada por otros autores [123,199].

Respecto a las especies crípticas, la mayoría de los estudios de producción de GT se han centrado en la sección *Fumigati*, debido a que *A. fumigatus* es la especie productora por excelencia. Se ha descrito producción de GT por las especies *N. pseudofischeri* y *N. udagawae* [201,202]. Algunos autores han sido incapaces de detectar GT en filtrados celulares de *A. lentulus* y *A. fumigatiaffinis* o lo han hecho en concentraciones muy bajas (0,01 mg/L) [195,202]. Sin embargo, entre los aislados analizados en nuestro estudio, una

pequeña fracción de aislados de *A. lentulus* produjo GT en cantidades considerables. Además, varios aislados de *A. fumigatiaffinis* produjeron GT, aunque a una concentración baja (0,48 – 0,82 mg/L) comparada con *A. fumigatus*. Por último, confirmamos la capacidad de algunos aislados de *N. udagawae* de producir dicha toxina [201] y describimos la producción de GT por *A. calidoustus* por primera vez. El único aislado de *A. novofumigatus* analizado no ha sido productor de GT, lo que concuerda con lo descrito hasta ahora [202].

En cuanto a la distribución de especies productoras de bmGT descritas en la literatura, encontramos una situación similar a la de la GT: se ha descrito su producción fundamentalmente por hongos marinos y endofíticos en estudios cuya finalidad era investigar la biodiversidad de sustancias con interés farmacológico [116,117,197,203]. Su biosíntesis en especies patógenas humanas solo se ha demostrado para *A. fumigatus*, *A. nidulans* y *A. niger* [106,132,204,205]. A diferencia de lo que ocurre para *A. fumigatus*, la producción de bmGT en estas dos especies (*A. niger* y *A. nidulans*) no se ha descrito *de novo* sino tras la adición de GT exógena [204,205]. No se ha descrito producción de bmGT en especies crípticas.

En nuestro estudio hemos observado que *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* y *A. nidulans* son capaces de producir bmGT *de novo*. Junto con las especies crípticas *A. fumigatiaffinis*, *A. calidoustus*, *N. udagawae* y *A. lentulus*. Por otra parte, se ha ratificado que *A. niger* es capaz de producir bmGT a partir de una fuente exógena de GT y se ha descrito este hallazgo para *A. terreus* y *A. flavus* por primera vez. Hemos comprobado que en estas dos últimas especies la metilación se produce de forma consistente, ya que todos los aislados

analizados han sido capaces de producir bmGT. Curiosamente, *A. niger*, la especie para la que se ha descrito específicamente una metilasa responsable de la producción de bmGT [204], produjo bmGT a partir de GT en un porcentaje (60 %) inferior a *A. flavus* y *A. terreus* (100%). La capacidad de producir bmGT por *A. nidulans* solo se ha descrito en un estudio y en un aislamiento y contrasta con el resultado obtenido en nuestro estudio en el que se analizaron varios aislados y ninguno de ellos fue capaz de producir bmGT [205]. De nuevo, las condiciones de cultivo, así como la heterogeneidad en la expresión del gen responsable de la síntesis de bmGT dentro de una misma especie, podrían ser el motivo de esta discrepancia. Para esta especie en particular (*A. nidulans*), se ha descrito que las condiciones de fermentación habituales no permiten el aislamiento de todos los metabolitos que el hongo tiene capacidad de producir [206].

Nuestro estudio para conocer la capacidad de producción de GT y bmGT tanto *de novo* como a partir de una fuente de GT exógena en diferentes hongos, constituye el más amplio realizado hasta la fecha. En resumen, nuestros resultados coinciden con la literatura en las siguientes observaciones:

- *A. fumigatus*, *N. udagawae*, *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger* tienen capacidad de sintetizar GT aunque con frecuencia variable y siendo *A. fumigatus* la especie que en mayor concentración y frecuencia produce GT [122,123,132].
- Las especies de *Candida* no tienen capacidad de sintetizar GT ni bmGT [126].
- *A. fumigatus* y *A. niger* son capaces de producir bmGT a partir de una fuente exógena de GT [106,204].

Discrepan de la literatura en:

- *A. lentulus* y *A. fumigatiaffinis* no producen GT [195,202], ya que en nuestro estudio sí que han mostrado capacidad de producirla.
- *A. nidulans* no ha sido capaz de producir bmGT a partir de GT en nuestro estudio, en contraposición a lo descrito en la literatura [205].

Finalmente, las siguientes observaciones no se habían descrito hasta la fecha:

- Un porcentaje variable de aislados de *A. fumigatiaffinis*, *A. calidoustus*, *N. udagawae*, *A. lentulus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. nidulans* son capaces de producir bmGT *de novo*.
- En nuestro estudio todos los aislados de *A. terreus* y *A. flavus* y el 60 % de los aislados de *A. niger* fueron capaces de producir bmGT a partir de GT exógena.
- Otros hongos filamentosos comúnmente aislados en humanos carecen de la capacidad de producir GT *de novo* y bmGT tanto *de novo* como a partir de GT exógena.

Con todo ello, se puede concluir que las especies de *Aspergillus* más frecuentemente aisladas en humanos tienen la capacidad de producir bmGT mientras que otros hongos filamentosos y levaduras son incapaces de producirla, por lo que la bmGT es un marcador específico de AI.

Es cierto que las condiciones de laboratorio no permiten conocer con exactitud la frecuencia y distribución dentro de cada una de las especies, ya que son muchas las variables que afectan a la producción [199,200]. No

debemos olvidar que la bmGT es un producto del metabolismo secundario, es decir, confiere una ventaja de supervivencia y se ve afectado por factores como la presencia de otros microorganismos o la disponibilidad de metales en el nicho ecológico [207]. Las condiciones de laboratorio no nos permiten reflejar con exactitud lo que ocurre *in vivo*, cuando el hongo infecta a un organismo y despliega todo su armamento y factores de virulencia para contribuir a la patogenicidad, condiciones en las que la producción de GT y bmGT podrían estar estimuladas. Serán necesarios estudios en modelos animales para conocer si aislados que carecen de la capacidad de producir toxinas *in vitro*, desarrollan esta capacidad *in vivo* y por tanto la bmGT puede detectarse en suero de animales infectados. Por otra parte, las bajas tasas de producción de bmGT halladas en algunas especies de *Aspergillus*, no significan necesariamente que la bmGT sea un biomarcador poco adecuado de AI, ya que su validez vendrá determinada por su sensibilidad y especificidad clínicas, independientemente de que se detecten las toxinas en las condiciones de laboratorio.

Los estudios *in vitro*, pese a tener limitaciones, nos dan información valiosa. En el contexto de la validación clínica y analítica de un biomarcador, es importante conocer las fuentes de desviación de los resultados. En el caso del GM, se sabe que el uso de antifúngicos no sólo es una fuente de falsos negativos, sino que disminuye sus valores [69,76,208]. Dado que la bmGT se podría detectar en suero de pacientes con sospecha de AI tratados con voriconazol, analizamos si *in vitro* la presencia de voriconazol en el medio disminuye o anula la capacidad de producción de dicho biomarcador.

Nuestros resultados indican una relación entre la concentración de voriconazol en el medio, la producción de bmGT y la proliferación celular: a mayores concentraciones de voriconazol, se produce menos bmGT porque hay menos hongo viable. Esto podría tener implicaciones tanto *in vivo*, ya que el aclaramiento de la bmGT podría ser un marcador de respuesta al tratamiento. Cabe destacar que las concentraciones de voriconazol empleadas en el estudio se corresponden con las CMI's más frecuentes en aislados de *A. fumigatus* según los datos del Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana [209].

A diferencia de lo que ocurre con la bmGT, no hemos hallado relación entre los niveles crecientes de voriconazol y la menor producción de GT, lo que indica que en el caso de poder detectar la GT *in vivo*, ésta no sería un buen marcador de respuesta al antifúngico.

En conjunto, los datos obtenidos sugieren que la bmGT podría ser un marcador específico de AI y que el aclaramiento de la toxina podría correlacionarse con niveles de antifúngico capaces de inhibir la proliferación fúngica. Esto podría tener gran relevancia clínica ya que *in vivo* se traduciría en la erradicación de la infección sugiriendo la posible utilidad como marcador de respuesta al tratamiento.

## 5.2. Utilidad de la bmGT en el diagnóstico y manejo de la aspergilosis invasora

El diagnóstico de la AI sigue siendo difícil pese a los importantes avances realizados en los últimos años. Las manifestaciones clínicas no son específicas y el diagnóstico de certeza se basa en procedimientos invasivos que no siempre es posible realizar, debido a las condiciones del paciente. Por ello, algunos autores sugieren la necesidad de desarrollar nuevos biomarcadores que permitan diagnosticar esta grave enfermedad de manera sensible, específica y rápida [78,79]. Además, estos marcadores podrían guiar el inicio del tratamiento antifúngico precoz para aumentar su eficacia o la retirada del mismo y reducir así el coste sanitario y la posibilidad de efectos secundarios [9].

Uno de estos nuevos biomarcadores podría ser la GT, que según algunos autores se puede detectar en suero de pacientes en riesgo de AI [120,124,125]. Lewis y cols. detectaron GT en suero mediante HPLC/espectrometría de masas en tándem [120]. En su estudio, cuatro de los cinco pacientes con aislamiento o evidencia histopatológica de aspergilosis presentaron GT en suero; un paciente que no tuvo GT detectable, tenía una lesión cerebral de la que se aisló *A. fumigatus*. Dos pacientes sin AI tuvieron GT en suero. Los autores hallaron que los pacientes con AI documentada tenían cantidades de GT sérica significativamente superiores a los pacientes sin AI. Puri y cols. validaron la detección de GT para el diagnóstico de AI mediante HPTLC pero solo analizaron los sueros de cuatro pacientes con AI probable/probada [124]. Más recientemente, Cerqueira y cols. han analizado

mediante HPLC/espectrometría de masas en tándem la presencia de GT en 30 sueros de pacientes con sospecha de AI en comparación con el GM [125]. De los 20 sueros en los que el GM no se detectaba, tampoco se detectó GT en 17 sueros, mientras que tres muestras tuvieron niveles de GT por debajo del límite de cuantificación, que era 10 ng/mL. De las 10 muestras con GM detectable, cinco tuvieron también GT detectable pero tres de ellas por debajo del límite de cuantificación. Las cinco muestras restantes fueron negativas para GT. Debido al bajo número de muestras analizadas, los autores solo pudieron concluir que su técnica presentaba buen rendimiento analítico pero no determinaron su rendimiento en el diagnóstico clínico. A diferencia de estos estudios, en nuestra cohorte, no hubo ningún paciente al que se detectara GT en suero, pese a utilizar una técnica cromatográfica apropiada para ello [132]. Esto podría explicarse por el hecho de que la GT es muy reactiva y es rápidamente incorporada a los tejidos y células por lo que se aclara de los fluidos biológicos, tal y como otros autores y nosotros mismos hemos observado [127,128,132]. Por todo ello y de acuerdo a nuestros resultados, la bmGT parece ser un marcador más adecuado que la GT ya que puede detectarse de manera fiable en suero.

En el presente trabajo, se ha validado la detección de un nuevo biomarcador, la bmGT, en el diagnóstico de AI y se ha comparado su rendimiento diagnóstico con el del GM. Los resultados obtenidos son prometedores y sugieren que ambos biomarcadores usados en combinación podrían detectar específicamente infecciones causadas por el hongo *Aspergillus* spp y guiar el inicio del tratamiento antifúngico.

La detección de GM mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”) ha supuesto un enorme avance en el diagnóstico y manejo de pacientes en riesgo de infección desde su desarrollo hace más de veinte años [210]. Los estudios evaluando su rendimiento diagnóstico son numerosos, lo que ha dado lugar a la elaboración de metaanálisis [72,73,186]. En dos de ellos en los que se evaluó el rendimiento del GM sérico en el diagnóstico de AI, la sensibilidad era de aproximadamente el 70 % y la especificidad del 90 %. Estos valores variaban en función del punto de corte establecido; cuanto mayor es el índice de GM considerado como positivo, menor es la sensibilidad y mayor la especificidad obtenidas [72,73]. En un estudio reciente, el cribado con GM de pacientes de riesgo (incluyendo pacientes asintomáticos) mostraba un VPN del 100 % y VPP del 11,8 % [177]. Sin embargo, este último parámetro aumentaba a 89,6 % cuando la detección de GM se realizaba a pacientes con sospecha de AI. Nuestro estudio se ha llevado a cabo como cribado de pacientes de riesgo, por lo que el bajo VPP observado para el GM (16,7 %) está en concordancia con lo descrito en dicho estudio.

El diagnóstico y tratamiento de la AI no puede basarse en una única prueba que además muestra un bajo VPP. Por tanto, los algoritmos basados en poblaciones de alto riesgo, criterios clínicos y la combinación de biomarcadores son la mejor estrategia para el diagnóstico y manejo de los pacientes. Estas estrategias, han demostrado disminuir el uso de antifúngicos empíricos sin aumentar la mortalidad [174,211]. Nuestros resultados indican que la detección de GM y bmGT en combinación, aumenta sustancialmente el VPP (100 %), manteniendo una buena especificidad y VPN (100 % y 97 % respectivamente).

Esta observación sugiere la utilidad de la detección conjunta de ambos marcadores en el inicio y la retirada del tratamiento antifúngico. La combinación de distintos biomarcadores es una práctica que ya ha sido evaluada en otros trabajos y que nace del elevado número de falsos positivos de GM, principalmente en pacientes de alto riesgo que reciben profilaxis [176,177]. Como ejemplo, en dos ensayos recientes en los que se ha evaluado la PCR en combinación con la detección de GM, se redujo el uso de antifúngicos empíricos, la incidencia de AI y el diagnóstico se realizó de forma más precoz [175,180]. Sería interesante realizar estudios similares en combinación con bmGT.

Volviendo a nuestros resultados, también sugieren que la detección de bmGT es más sensible que la detección de GM en el diagnóstico de AI, manteniendo una especificidad similar y un VPP superior. El punto de corte óptimo de bmGT de acuerdo al índice de Youden es 2,17 mg/L. La sensibilidad obtenida con dicho punto de corte es 61,5 % y la especificidad es 93,6%. De tal manera que todos menos uno de los casos de AI probable/probada y cinco de los diez casos de AI posible incluidos en el estudio de validación, presentaron niveles de bmGT superiores a dicho punto de corte. Es difícil determinar el valor de la presencia de bmGT en pacientes con AI posible ya que podría tener dos explicaciones: (i) que estos pacientes tuvieran una AI pero que debido a la baja sensibilidad del GM y del cultivo micológico [66,185], estos fueran falsamente negativos; o (ii) que la presencia de bmGT se deba a falsos positivos o reactividad cruzada.

La reactividad cruzada se debe a la producción del analito por microorganismos diferentes del microorganismo problema [212]. En el caso de

la bmGT, como se ha comentado anteriormente, los estudios realizados *in vitro* indican que hongos comúnmente aislados en clínica (*C. neoformans*, *Candida* spp, *Fusarium* spp, etc.) no son capaces de producir bmGT, por lo que no cabría esperar falsos positivos debidos a estos microorganismos. Esto se ha comprobado en nuestro estudio de reactividad cruzada realizado en pacientes con fungemia probada. De las 18 muestras analizadas, tan solo una ha sido positiva para bmGT. Esta muestra provenía de un paciente con candidemia por *C. glabrata* y su valor de bmGT ascendía a 25,34 mg/L. Curiosamente, las otras tres muestras de pacientes con candidemia por *C. glabrata* fueron negativas, lo que contrasta con la elevada concentración de bmGT hallada en esta muestra. Los estudios de producción *de novo* y metilación de GT exógena en la especie *C. glabrata* indican que este especie no es capaz de producir bmGT. Hubiera sido interesante repetir la determinación de bmGT en suero, lo que hubiera contribuido a conocer si ocurrió algún fallo durante el análisis, pero debido al bajo volumen de suero que se archiva no ha sido posible. Pese a que la reactividad fuera secundaria a fungemia por *C. glabrata*, esta especie supone el 13,4 % de los casos de candidemia que a su vez representan el 42,6 % de los casos de IFI en pacientes con enfermedad hematológica [1,213]. Es decir, que en el peor de los escenarios en el que una de cada cuatro candidemias por *C. glabrata* interfiriera en la detección de bmGT, sólo significaría el 1,44 % de interferencia. Por comparar esta reactividad con la de otros biomarcadores comercializados, se sabe que el GM está presente en la pared de otros hongos diferentes de *Aspergillus* spp (*Fusarium* spp, *Penicillium* spp, *C. neoformans*, etc.), por lo que infecciones o colonizaciones por estos microorganismos pueden dar lugar a falsos positivos en el diagnóstico de AI

[69,214]. Debido a la baja invasividad y prevalencia de estas infecciones, < 2 %, se acepta que no afectan al rendimiento diagnóstico de la prueba [71].

Además, en el caso del GM se han descrito falsos positivos debidos a la administración de sustancias por vía parenteral como antibióticos semisintéticos o derivados sanguíneos, entre otros [69,75,215]. En nuestro estudio, no fue posible analizar las preparaciones parenterales administradas a los pacientes con AI posible pero sí que analizamos las administradas a un paciente con infección probada de senos nasales por *A. flavus* y *F. verticillioides*. En este paciente, la detección de bmGT permaneció positiva durante varias semanas en las que no se detectó GM en suero. El análisis de los fármacos que se le administraron durante 24 h, no probó la presencia de bmGT. Este hecho junto con la detección de GM en la muestra del LBA a los 67 días del diagnóstico de la infección sinusal, sugiere que la persistencia de la bmGT en suero no se debía a un falso positivo sino a una infección no resuelta.

Se ha descrito la cinética de la bmGT en tres casos de AI probada. En el primer caso, tan sólo se analizó una muestra de suero, que fue positiva tanto para GM como para bmGT. El diagnóstico definitivo tras la realización de la autopsia, reveló afectación multiorgánica de corazón, pulmones, riñón, páncreas, intestinos y encéfalo. El aislamiento de *A. fumigatus* en BAS y la detección de GM en suero son criterios de AI probable, por lo que de no haberse realizado autopsia, el diagnóstico hubiera sido de infección probable. La detección de más de un biomarcador específico de *Aspergillus* spp podría tener utilidad en el diagnóstico de certeza, aunque queda clara la necesidad de realización de autopsias para obtener un diagnóstico definitivo [170].

En el segundo caso, el diagnóstico de AI de senos nasales se ha confirmado mediante la visualización en la biopsia de infiltrado tisular y vascular junto al aislamiento micológico de *A. flavus* y *F. verticillioides* en dicha muestra. Durante este episodio el paciente presentó GM y bmGT detectables en suero. La afectación pulmonar se evidenció por la presencia de consolidaciones rodeadas de halo en vidrio deslustrado y aislamiento de *A. flavus* en aspirado nasofaríngeo. Debido a la inestabilidad inicial del paciente, no pudo realizarse broncoscopía hasta casi un mes después de iniciado el tratamiento antifúngico. La muestra de LBA fue positiva para GM mientras que éste no fue detectable en suero, a diferencia de la bmGT que permaneció positiva. Esto podría deberse a que el tratamiento antifúngico negativice el GM en suero [76] y por tanto se interpretaría como un falso negativo. Otra posibilidad es que la presencia de bmGT en suero se deba a un falso positivo, pero esta posibilidad, como ya se ha comentado previamente, es poco probable.

En el tercer caso, la bmGT ha mostrado utilidad en el diagnóstico de AI en un paciente inmunocompetente. Sin embargo, la bmGT se detectó en valores bajos, por debajo del punto de corte de 2,17 mg/L establecido en el estudio de validación clínica. Esto indica que probablemente dicho punto de corte sea válido para la población hematológica incluida en el estudio pero que podría ser diferente para otras poblaciones. Por el contrario, el GM fue negativo en las cuatro muestras analizadas, pese a que el paciente presentaba afectación diseminada. Esto puede deberse a la presencia de Ac frente a *Aspergillus* spp que interfieren en el rendimiento del inmunoensayo de GM y que el GM puede ser consumido por el sistema retículo endotelial de los pacientes inmunocompetentes provocando un falso negativo [66]. Por tanto, la

posible utilidad de la bmGT en el diagnóstico de AI en pacientes inmunocompetentes es muy interesante debido a la baja sensibilidad del GM en esta población [67]. Además, la cinética observada para la bmGT en este caso, en el que fue detectable en el diagnóstico inicial del paciente y que se negativizó a los días de instaurar el tratamiento antifúngico, sugiere una correlación entre los niveles de bmGT y eficacia del tratamiento. Lamentablemente, en este caso el aclaramiento de bmGT no se correlacionó con la supervivencia del paciente pese a que presentara niveles de voriconazol en rango terapéutico, lo cual se han correlacionado con éxito terapéutico [216]. Probablemente debido a que son muchas las variables que interfieren en esta relación como el momento de inicio de la terapia, la carga fúngica, etc.

No hemos hallado diferencias en la concentración de bmGT entre los pacientes con niveles de voriconazol en rango terapéutico con respecto a los pacientes con niveles subterapéuticos, lo que sugiere que el tratamiento antifúngico no afecta a la detección del marcador y que el aclaramiento de la toxina depende de otros factores como la CMI del hongo. Será necesario averiguar cómo este parámetro interfiere en el aclaramiento de la toxina.

Por el contrario, según nuestros resultados, la presencia de bmGT se correlaciona con una mayor mortalidad y necesidad de tratamiento antifúngico. Debido a que tanto la mortalidad como la necesidad de antifúngicos son parámetros indicativos de gravedad, podría haber una correlación entre la detección de bmGT y la progresión de la enfermedad. Además, los niveles elevados de bmGT se correlacionan con la mortalidad por lo que la detección de ciertos niveles de bmGT o su persistencia también podría tener valor como marcador de mal pronóstico. Serán necesarios estudios similares a los

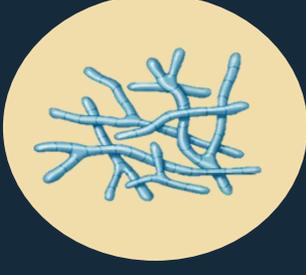
realizados con el GM para poder llegar a dicha conclusión. En el caso de GM, en un estudio realizado en pacientes receptores de TPH, el incremento del índice de DO de 1,0 con respecto al obtenido en la semana anterior, se correlacionaba con una mayor mortalidad [217]. En otros estudios, se ha hallado correlación entre su aclaramiento sérico y la respuesta al tratamiento [96,218]. Pese a ello, el GM no se acepta como criterio de punto final para los ensayos clínicos por las definiciones de respuesta al tratamiento establecidas por la EORTC/MSG [219].

Las principales limitaciones de este trabajo han sido la obtención retrospectiva de los datos y el bajo número de casos de AI probable/probada. Por ello, actualmente se está llevando a cabo un estudio multicéntrico y prospectivo que permita confirmar los resultados observados.

A la luz de estos resultados, un resultado positivo de bmGT merece atención y aunque el inicio de la terapia antifúngica no se pueda basar en un único resultado positivo de bmGT, su detección sí que puede derivar en un mejor seguimiento del paciente: la toma de una nueva muestra para confirmar el resultado positivo, la realización de pruebas de imagen, etc., como ocurre para otros marcadores [180]. Son necesarios más estudios que permitan determinar la estrategia óptima para el manejo de estos pacientes de riesgo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esto siempre dependerá de las particularidades de cada centro, lo que incluye la prevalencia de AI y otras IFI, el tipo de población de riesgo, la estrategia antifúngica (profilaxis, empírica, anticipada o dirigida), el coste y la disponibilidad de las técnicas diagnósticas. En este sentido, cabe aclarar que la técnica utilizada para la detección de bmGT durante el estudio fue la HPTLC, pero estos equipos raramente están

disponibles en los laboratorios de los hospitales. Por esta razón, nuestro grupo está desarrollando un inmunoensayo basado en la técnica ELISA para la detección de bmGT. Esta técnica no requiere personal tan cualificado y su empleo es mucho más frecuente en los laboratorios clínicos, por lo que su implementación en el diagnóstico habitual de los pacientes sería mucho más sencilla. Debido a la elevada morbimortalidad de la AI, se deben realizar todos los esfuerzos necesarios para diagnosticar esta grave enfermedad de la manera más precoz posible, para así tener un impacto positivo en la salud de los pacientes y en el coste de los sistemas de salud [220,221]. De acuerdo con los resultados obtenidos, la detección de bmGT muestra utilidad potencial como herramienta diagnóstica de la AI y del manejo de los pacientes de riesgo. Sin embargo, y como ya se ha argumentado anteriormente, se requieren estudios adicionales con un número superior de pacientes para confirmar nuestras conclusiones y apoyar su implementación en los hospitales.





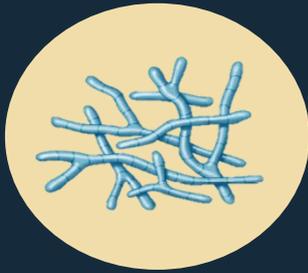
Conclusiones



## 6. CONCLUSIONES

1. *A. fumigatus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. calidoustus*, *N. udagawae*, *A. lentulus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. nidulans* tienen capacidad de sintetizar GT y bmGT aunque con frecuencia variable, siendo *A. fumigatus* la especie que con mayor frecuencia y en mayor concentración las produce.
2. *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus* y *A. niger* son capaces de producir bmGT a partir de una fuente exógena de GT.
3. *A. nidulans* no es capaz de producir bmGT a partir de GT exógena.
4. Otros hongos comúnmente aislados en humanos, incluyendo *Candida* spp carecen de la capacidad de producir GT y bmGT.
5. Las concentraciones crecientes de voriconazol en el medio se correlacionan con una menor producción de bmGT por *A. fumigatus* y una menor proliferación fúngica. Esto no ocurre para la GT.
6. La detección sérica de bmGT es válida para el diagnóstico de AI y muestra un rendimiento superior al del GM.
7. La presencia de bmGT en suero se correlaciona con una mayor mortalidad y necesidad de antifúngicos para el manejo clínico del paciente.
8. No existen diferencias en la cantidad de bmGT detectada de media entre los pacientes con y sin niveles terapéuticos de voriconazol.

9. La reactividad cruzada por producción de bmGT por otros hongos filamentosos y levaduras carece de relevancia diagnóstica.
10. La bmGT ha mostrado ser útil en casos probados de AI, incluso en pacientes inmunocompetentes en los que no se detecta GM.



## Bibliografía



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Pemán J, Salavert M. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(2):90-8.
2. Ruiz-Camps I, Peghin M. Filamentous fungal infections in immunosuppressed patients: prophylaxis and treatment. *Rev Esp Quimioter*. 2015;28(Suppl 1):38-42.
3. Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. Washington DC, USA: ASM Press; 2015.
4. Mandell GL, Dolin R, Bennett JE. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Philadelphia, USA: Churchill Livingstone Elsevier; 2010.
5. Singh N, Paterson DL. *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(1):44-69.
6. Pemán J, Ortiz R, Osseyran F, Pérez-Bellés C, Crespo M, Chirivella M, et al. Native valve *Aspergillus fumigatus* endocarditis with blood culture positive and negative for galactomannan antigen. Case report and literature review. *Rev Iberoam Micol*. 2007;(24):157-60.
7. Kontoyiannis D, Bodey G. Invasive aspergillosis in 2002: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21(3):161-72.
8. Cantón E, García-Rodríguez J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Guinea J. Métodos microbiológicos para el diagnóstico, manejo y estudio de la infección fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(6):375-9.
9. Maertens JA, Blennow O, Duarte RF, Muñoz P. The current management landscape: aspergillosis. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(Suppl 2):ii23-9.
10. Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*. 2008;100(2):205-26.
11. Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(3):447-65.
12. Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, et al. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J Clin Microbiol*. 2009;47(4):877-84.

13. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. Current section and species complex concepts in *Aspergillus*: recommendations for routine daily practice. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1273:18-24.
14. Hong S-B, Go S-J, Shin H-D, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia.* 2005;97(6):1316-29.
15. Balajee SA, Gribskov J, Brandt M, Ito J, Fothergill A, Marr KA. Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12):5996-9.
16. Erjavec Z, Kluin-Nelemans H, Verweij PE. Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(7):625-33.
17. Larone DH. *Medically Important Fungi: A Guide to Identification.* 4th ed. Washington DC, USA: ASM Press; 2002.
18. Abarca ML. Taxonomy and identification of the species involved in nosocomial aspergillosis. *Rev Iberoam Micol.* 2000;17(3):S79-84.
19. Pitt JI, Taylor JW. *Aspergillus*, its sexual states and the new International Code of Nomenclature. *Mycologia.* 2014;106(5):1051-62.
20. Guarro J, Kallas EG, Godoy P, Karenina A, Gené J, Stchigel A, et al. Cerebral Aspergillosis caused by *Neosartorya hiratsukae*, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):989-91.
21. Järv H, Lehtmaa J, Summerbell RC, Hoekstra ES, Samson RA, Naaber P. Isolation of *Neosartorya pseudofischeri* from blood: first hint of Pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2004;42(2):925-8.
22. Vinh DC, Shea YR, Sugui JA, Parrilla-Castellar ER, Freeman AF, Campbell JW, et al. Invasive Aspergillosis due to *Neosartorya udagawae*. *Clin Infect Dis.* 2009;49(1):102-11.
23. Malejczyk K, Sigler L, Gibas CFC, Smith SW. Invasive sino-orbital mycosis in an aplastic anemia patient caused by *Neosartorya laciniosa*. *J Clin Microbiol.* 2013;51(4):1316-9.
24. 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(11):1824-33.
25. Lass-Flörl C, Kofler G, Kropshofer G, Hermans J, Kreczy A, Dierich MP, et al. In-vitro testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* 1998;42(4):497-502.

26. Lortholary O, Gangneux J-P, Sitbon K, Lebeau B, de Monbrison F, Le Strat Y, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007): Invasive aspergillosis surveillance. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(12):1882-9.
27. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, Pemán J, Zapico S, Alvarez M, et al. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):3380-7.
28. Risslegger B, Zoran T, Lackner M, Aigner M, Sánchez-Reus F, Rezusta A, et al. A prospective international *Aspergillus terreus* survey: an EFISG, ISHAM and ECMM joint study. *Clin Microbiol Infect.* 2017;
29. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev.* 2011;20(121):156-74.
30. Pasqualotto AC, Denning DW. Post-operative aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(11):1060-76.
31. Cheon S, Yang MK, Kim C-J, Kim TS, Song K-H, Woo SJ, et al. Disseminated aspergillosis in the immunocompetent host: a case report and literature review. *Mycopathologia.* 2015;180(3-4):217-22.
32. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Landry M. *Manual of Clinical Microbiology.* 9th ed. Washington DC, USA: ASM Press; 2007.
33. Van Burik J-AH, Colven R, Spach DH. Cutaneous aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 1998;36(11):3115-21.
34. Denning DW. Commentary: unusual manifestations of aspergillosis. *Thorax.* 1995;50(7):812-3.
35. Ben-Ami R. Angiogenesis at the mold–host interface: a potential key to understanding and treating invasive aspergillosis. *Future Microbiology.* 2013;8(11):1453-62.
36. Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 1998;26:781-803.
37. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Executive summary: practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;63(4):433-42.
38. 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(3):259-65.
39. Sivak-Callcott JA. Localised invasive sino-orbital aspergillosis: characteristic features. *Br J Ophthalmol.* 2004;88(5):681-7.

40. Rosenfeld RM, Piccirillo JF, Chandrasekhar SS, Brook I, Ashok Kumar K, Kramper M, et al. Clinical practice guideline (update): adult sinusitis executive summary. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015;152(4):598-609.
41. McCarthy M, Rosengart A, Schuetz AN, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. Mold infections of the central nervous system. *N Engl J Med.* 2014;371(2):150-60.
42. Shukla PK, Kumar M, Keshava GBS. Mycotic keratitis: an overview of diagnosis and therapy. *Mycoses.* 2008;51(3):183-99.
43. Durand ML. Bacterial and fungal endophthalmitis. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(3):597-613.
44. Eggimann P, Chevrolet J-C, Starobinski M, Majno P, Totsch M, Chapuis B, et al. Primary invasive aspergillosis of the digestive tract: report of two cases and review of the literature. *Infect.* 2006;34(6):333-8.
45. Sugui JA, Pardo J, Chang YC, Zarembek KA, Nardone G, Galvez EM, et al. Gliotoxin is a virulence factor of *Aspergillus fumigatus*: gliP deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone. *Eukaryotic Cell.* 2007;6(9):1562-9.
46. Pemán J, Quindós G. Aspectos actuales de las enfermedades invasivas por hongos filamentosos. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(4):213-8.
47. Herbrecht R, Bories P, Moulin J-C, Ledoux M-P, Letscher-Bru V. Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients: Risk stratification for invasive aspergillosis. *Ann NY Acad Sci.* 2012;1272(1):23-30.
48. Lass-Flörl C, Cuenca-Estrella M. Changes in the epidemiological landscape of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(suppl\_1):i5-11.
49. Kolwijck E, van de Veerdonk FL. The potential impact of the pulmonary microbiome on immunopathogenesis of *Aspergillus*-related lung disease. *Eur J Immunol.* 2014;44(11):3156-65.
50. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wijngaerden EV. Invasive Aspergillosis in the Intensive Care Unit. *Clin Infect Dis.* 2007;45(2):205-16.
51. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003633.
52. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcázar-Fuoli L, Melchers WJG, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(6):1897-904.

53. 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(5):577-84.
54. Fortún J, Catarralá J, Gavaldá J, Lizasoain M, Salavert M, de la Cámara R, et al. Recomendaciones sobre el tratamiento de la enfermedad fúngica invasiva por *Aspergillus* spp. y otros hongos filamentosos de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(6):435-54.
55. Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, Boeckh MJ, Ito JI, Mullen CA, et al. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2011;52(4):427-31.
56. Tissot F, Agrawal S, Pagano L, Petrikos G, Groll AH, Skiada A, et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Haematologica*. 2017;102(3):433-44.
57. Rodríguez-Tudela JL, Alastruey-Izquierdo A, Gago S, Cuenca-Estrella M, León C, Miro JM, et al. Burden of serious fungal infections in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(2):183-9.
58. 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(6):621-5.
59. Guinea J, Torres-Narbona M, Gijón P, Muñoz P, Pozo F, Peláez T, et al. Pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence, risk factors, and outcome. *Clin Infect Dis*. 2010;16(7):870-7.
60. Caillot D, Casasnovas O, Bernard A, Couaillier JF, Durand C, Cuisenier B, et al. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol*. 1997;15(1):139-47.
61. Georgiadou SP, Sipsas NV, Marom EM, Kontoyiannis DP. The diagnostic value of halo and reversed halo signs for invasive mold infections in compromised hosts. *Clin Infect Dis*. 2011;52(9):1144-55.
62. Maertens J, Meersseman W, Van Bleyenbergh P. New therapies for fungal pneumonia. *Curr Opin Infect Dis*. 2009;22(2):183-90.
63. Llovó J, Pontón J. Diagnóstico microscópico de las micosis. En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio Calvo M, editores. *Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica*. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología - Asociación Española de Micología; 2007.

64. Sánchez Reus F. Procesamiento de las muestras del tracto respiratorio inferior. En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio Calvo M, editores. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología - Asociación Española de Micología; 2007.
65. Cantón Lacasa E, García Rodríguez J, Guinea Ortega J, Martín Mazuelos E, Pemán García J. Métodos microbiológicos para el diagnóstico, manejo y estudio de la infección fúngica invasora. En: Cercenado E, Cantón R, editores. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2012.
66. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(6):349-57.
67. 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(12):1813-21.
68. Ascoglu 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(1):7-14.
69. Miceli MH, Maertens J. Role of non-culture-based tests, with an emphasis on galactomannan testing for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2015;36(5):650-61.
70. Stynen D, Sarfati J, Goris A, Prévost MC, Lesourd M, Kamphuis H, et al. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus* galactomannan. *Infect Immun.* 1992;60(6):2237-45.
71. Food and Drug Administration. Galactomannan. [www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm472606.pdf](http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm472606.pdf).
72. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of Invasive Aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2006;42(10):1417-27.
73. Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, Scholten RJ, Hooft L, Bijlmer HA, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2008;(4):CD007394.
74. Ansorg R, van den Boom R, Rath PM. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses.* 1997;40(9-10):353-7.

75. 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(24):2366-7.
76. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis*. 2005;40(12):1762-9.
77. 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(2):199-205.
78. Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM, Mylonakis E. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for Invasive Fungal Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(3):490-526.
79. Arvanitis M, Mylonakis E. Diagnosis of invasive aspergillosis: recent developments and ongoing challenges. *Eur J Clin Invest*. 2015;45(6):646-52.
80. 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(12):1930-1.
81. Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, Weinbergerova B, Buresova L, Toskova M, et al. Difficulties in using 1,3-beta-D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies-high frequency of false-positive results and their analysis. *J Med Microbiol*. 2010;59(Pt 9):1016-22.
82. White PL, Wingard JR, Bretagne S, Löffler J, Patterson TF, Slavin MA, et al. *Aspergillus* Polymerase Chain Reaction: systematic review of evidence for clinical use in comparison with antigen testing. *Clin Infect Dis*. 2015;61(8):1293-303.
83. White PL, Perry MD, Moody A, Follett SA, Morgan G, Barnes RA. Evaluation of analytical and preliminary clinical performance of Myconostica MycAssay *Aspergillus* when testing serum specimens for diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2011;49(6):2169-74.
84. Danylo A, Courtemanche C, Pelletier R, Boudreault AA. Performance of MycAssay *Aspergillus* DNA real-time PCR assay compared with the galactomannan detection assay for the diagnosis of invasive aspergillosis from serum samples. *Med Mycol*. 2014;52(6):577-83.
85. White PL, Barton R, Guiver M, Linton CJ, Wilson S, Smith M, et al. A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis?: a United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections. *J Mol Diagn*. 2006;8(3):376-84.

86. *Aspergillus* - EAPCRI [Internet]. Disponible en: <http://eapcri.eu/>
87. White PL, Bretagne S, Klingspor L, Melchers WJG, McCulloch E, Schulz B, et al. *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. J Clin Microbiol. 2010;48(4):1231-40.
88. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2009;9(2):89-96.
89. Arvanitis M, Ziakas PD, Zacharioudakis IM, Zervou FN, Caliendo AM, Mylonakis E. PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance. J Clin Microbiol. 2014;52(10):3731-42.
90. Loeffler J, Hebart H, Bialek R, Hagemeyer L, Schmidt D, Serey F-P, et al. Contaminations occurring in fungal PCR assays. J Clin Microbiol. 1999;37(4):1200-2.
91. Harrison E, Stahlberger T, Whelan R, Sugrue M, Wingard JR, Alexander BD, et al. *Aspergillus* DNA contamination in blood collection tubes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;67(4):392-4.
92. Lass-Flörl C, Gunsilius E, Gastl G, Bonatti H, Freund MC, Gschwendtner A, et al. Diagnosing Invasive Aspergillosis during antifungal therapy by PCR analysis of blood samples. J Clin Microbiol. 2004;42(9):4154-7.
93. Sun W, Wang K, Gao W, Su X, Qian Q, Lu X, et al. Evaluation of PCR on bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of Invasive Aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. PLoS One. 2011;6(12).
94. Avni T, Levy I, Sprecher H, Yahav D, Leibovici L, Paul M. Diagnostic accuracy of PCR alone compared to galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a systematic review. J Clin Microbiol. 2012;50(11):3652-8.
95. Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, Poron F, Cordonnier C, Vidaud M, et al. Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. J Clin Microbiol. 1995;33(5):1164-8.
96. Miceli MH, Graziutti ML, Woods G, Zhao W, Kocoglu MH, Barlogie B, et al. Strong correlation between serum *Aspergillus* galactomannan index and outcome of aspergillosis in patients with hematological cancer: clinical and research implications. Clin Infect Dis. 2008;46(9):1412-22.
97. Heldt S, Hoenigl M. Lateral flow assays for the diagnosis of invasive aspergillosis: current status. Curr Fungal Infect Rep. 2017;11(2):45-51.
98. Chambers ST, Syhre M, Murdoch DR, McCartin F, Epton MJ. Detection of 2-pentylfuran in the breath of patients with *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol. 2009;47(5):468-76.

99. Gardiner DM, Waring P, Howlett B. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology*. 2005;151(4):1021-32.
100. Bok JW, Chung D, Balajee SA, Marr KA, Andes D, Nielsen KF, et al. GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect Immun*. 2006;74(12):6761-8.
101. Cramer RA, Gamcsik MP, Brooking RM, Najvar LK, Kirkpatrick WR, Patterson TF, et al. Disruption of a nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus* eliminates gliotoxin production. *Eukaryotic Cell*. 2006;5(6):972-80.
102. Kwon-Chung KJ, Sugui JA. What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? *Med Mycol*. 2009;47(Suppl 1):S97-103.
103. Dolan SK, O'Keeffe G, Jones GW, Doyle S. Resistance is not futile: gliotoxin biosynthesis, functionality and utility. *Trends Microbiol*. 2015;23(7):419-28.
104. Vargas WA, Mukherjee PK, Laughlin D, Wiest A, Moran-Diez ME, Kenerley CM. Role of gliotoxin in the symbiotic and pathogenic interactions of *Trichoderma virens*. *Microbiol*. 2014;160(Pt 10):2319-30.
105. Wang D-N, Toyotome T, Muraosa Y, Watanabe A, Wuren T, Bunsupa S, et al. GliA in *Aspergillus fumigatus* is required for its tolerance to gliotoxin and affects the amount of extracellular and intracellular gliotoxin. *Med Mycol*. 2014;52(5):506-18.
106. Dolan SK, Owens RA, O'Keeffe G, Hammel S, Fitzpatrick DA, Jones GW, et al. Regulation of nonribosomal peptide synthesis: bis-thiomethylation attenuates gliotoxin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chem Biol*. 2014;21(8):999-1012.
107. Schrettl M, Carberry S, Kavanagh K, Haas H, Jones GW, O'Brien J, et al. Self-protection against gliotoxin - a component of the gliotoxin biosynthetic cluster, GliT, completely protects *Aspergillus fumigatus* against exogenous gliotoxin. *PLoS Pathog*. 2010;6(6):e1000952.
108. Sheridan KJ, Dolan SK, Doyle S. Endogenous cross-talk of fungal metabolites. *Front Microbiol*. 2015;5:732.
109. Eichner RD, Al Salami M, Wood PR, Müllbacher A. The effect of gliotoxin upon macrophage function. *Int J Immunopharmacol*. 1986;8(7):789-97.
110. Pahl HL, Krauss B, Schulze-Osthoff K, Decker T, Traenckner EB, Vogt M, et al. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB. *J Exp Med*. 1996;183(4):1829-40.
111. Niide O, Suzuki Y, Yoshimaru T, Inoue T, Takayama T, Ra C. Fungal metabolite gliotoxin blocks mast cell activation by a calcium- and

- superoxide-dependent mechanism: Implications for immunosuppressive activities. *Clin Immunol.* 2006;118(1):108-16.
112. Tsunawaki S, Yoshida LS, Nishida S, Kobayashi T, Shimoyama T. Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. *Infect Immun.* 2004;72(6):3373-82.
113. Pardo J, Urban C, Galvez EM, Ekert PG, Muller U, Kwon-Chung J, et al. The mitochondrial protein Bak is pivotal for gliotoxin-induced apoptosis and a critical host factor of *Aspergillus fumigatus* virulence in mice. *J Cell Biol.* 2006;174(4):509-19.
114. Orciuolo E, Stanzani M, Canestraro M, Galimberti S, Carulli G, Lewis R, et al. Effects of *Aspergillus fumigatus* gliotoxin and methylprednisolone on human neutrophils: implications for the pathogenesis of invasive aspergillosis. *J Leukoc Biol.* 2007;82(4):839-48.
115. Spikes S, Xu R, Nguyen CK, Chamilos G, Kontoyiannis DP, Jacobson RH, et al. Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence. *J Infect Dis.* 2008;197(3):479-86.
116. Li X, Kim S-K, Nam KW, Kang JS, Choi HD, Son BW. A new antibacterial dioxopiperazine alkaloid related to gliotoxin from a marine isolate of the fungus *Pseudallescheria*. *J Antibiot.* 2006;59(4):248-50.
117. Guimarães DO, Borges WS, Vieira NJ, de Oliveira LF, da Silva CHTP, Lopes NP, et al. Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two *Asteraceae* species. *Phytochemistry.* 2010;71(11-12):1423-9.
118. Patron NJ, Waller RF, Cozijnsen AJ, Straney DC, Gardiner DM, Nierman WC, et al. Origin and distribution of epipolythiodioxopiperazine (ETP) gene clusters in filamentous ascomycetes. *BMC Evol Biol.* 2007;7:174.
119. Latgé J-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(2):310-50.
120. Lewis RE, Wiederhold NP, Chi J, Han XY, Komanduri KV, Kontoyiannis DP, et al. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infect Immun.* 2005;73(1):635-7.
121. dos Santos VM, Dorner JW, Carreira F. Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. *Mycopathologia.* 2003;156(2):133-8.
122. Kupfahl C, Michalka A, Lass-Flörl C, Fischer G, Haase G, Ruppert T, et al. Gliotoxin production by clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* strains. *Int J Med Microbiol.* 2008;298(3-4):319-27.
123. Lewis RE, Wiederhold NP, Lionakis MS, Prince RA, Kontoyiannis DP. Frequency and species distribution of gliotoxin-producing *Aspergillus*

- isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12):6120-2.
124. Puri A, Ahmad A, Panda BP. Development of an HPTLC-based diagnostic method for invasive aspergillosis. *Biomed Chromatogr.* 2010;24(8):887-92.
  125. Cerqueira LB, de Francisco TMG, Gasparetto JC, Campos FR, Pontarolo R. Development and validation of an HPLC-MS/MS method for the early diagnosis of aspergillosis. *PLoS ONE.* 2014;9(4):e92851.
  126. Kupfahl C, Ruppert T, Dietz A, Geginat G, Hof H. *Candida* species fail to produce the immunosuppressive secondary metabolite gliotoxin in vitro. *FEMS Yeast Res.* 2007;7:986-92.
  127. Amitani R, Taylor G, Elezis EN, Llewellyn-Jones C, Mitchell J, Kuze F, et al. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infect Immun.* 1995;63(9):3266-71.
  128. Bernardo PH, Brasch N, Chai CLL, Waring P. A novel redox mechanism for the glutathione-dependent reversible uptake of a fungal toxin in cells. *J Biol Chem.* 2003;278(47):46549-55.
  129. Waring P, Newcombe N, Edel M, Lin QH, Jiang H, Sjaarda A, et al. Cellular uptake and release of the immunomodulating fungal toxin gliotoxin. *Toxicon.* 1994;32(4):491-504.
  130. Grillo MA, Colombatto S. S-adenosylmethionine and its products. *Amino Acids.* 2007;34(2):187-93.
  131. Owens RA, O'Keeffe G, Smith EB, Dolan SK, Hammel S, Sheridan KJ, et al. Interplay between gliotoxin resistance, secretion, and the methyl/methionine cycle in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell.* 2015;14(9):941-57.
  132. Domingo MP, Colmenarejo C, Martínez-Lostao L, Müllbacher A, Jarne C, Revillo MJ, et al. Bis(methyl)gliotoxin proves to be a more stable and reliable marker for invasive aspergillosis than gliotoxin and suitable for use in diagnosis. *Diagn Micr Infec Dis.* 2012;73(1):57-64.
  133. Cendejas-Bueno E, Cuenca-Estrella M, Gómez-López A. Clinical indications for therapeutic drug monitoring of antifungal agents. In the way for optimizing the treatment of fungal infection. *Rev Esp Quimioter.* 2014;27(1):1-16.
  134. Zonios DI, Bennett JE. Update on azole antifungals. *Semin Respir Crit Care Med.* 2008;29(2):198-210.
  135. Hope WW, Billaud EM, Lestner J, Denning DW. Therapeutic drug monitoring for triazoles. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21(6):580-6.

136. AEMPS - Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS (CIMA) [Internet]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=buscar>
137. Van Peer A, Woestenborghs R, Heykants J, Gasparini R, Gauwenbergh G. The effects of food and dose on the oral systemic availability of itraconazole in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* 1989;36(4):423-6.
138. Stevens DA. Itraconazole in cyclodextrin solution. *Pharmacother.* 1999;19(5):603-11.
139. Felton T, Troke PF, Hope WW. Tissue penetration of antifungal agents. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(1):68-88.
140. Glasmacher A, Molitor E, Hahn C, Bomba K, Ewig S, Leutner C, et al. Antifungal prophylaxis with itraconazole in neutropenic patients with acute leukaemia. *Leukemia.* 1998;12(9):1338-43.
141. Cartledge JD, Midgely J, Gazzard BG. Itraconazole solution: higher serum drug concentrations and better clinical response rates than the capsule formulation in acquired immunodeficiency syndrome patients with candidosis. *J Clin Pathol.* 1997;50(6):477-80.
142. Lestner JM, Roberts SA, Moore CB, Howard SJ, Denning DW, Hope WW. Toxicodynamics of itraconazole: implications for therapeutic drug monitoring. *Clin Infect Dis.* 2009;49(6):928-30.
143. Andes D, Pascual A, Marchetti O. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(1):24-34.
144. Clancy CJ, Nguyen MH. In vitro efficacy and fungicidal activity of voriconazole against *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998;17(8):573-5.
145. Purkins L, Wood N, Greenhalgh K, Allen MJ, Oliver SD. Voriconazole, a novel wide-spectrum triazole: oral pharmacokinetics and safety. *Br J Clin Pharmacol.* 2003;56(Suppl 1):10-6.
146. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann J-W, et al. Voriconazole versus Amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med.* 2002;347(6):408-15.
147. Hamill R. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs.* 2013;73(9):919-34.
148. Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis.* 2008;46(2):201-11.

149. Singer JP, Boker A, Metchnikoff C, Binstock M, Boettger R, Golden JA, et al. High cumulative dose exposure to voriconazole is associated with cutaneous squamous cell carcinoma in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2012;31(7):694-9.
150. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(3):917-21.
151. Walravens J, Brouwers J, Spriet I, Tack J, Annaert P, Augustijns PP. Effect of pH and comedication on gastrointestinal absorption of posaconazole. *Clin Pharmacokinet*. 2012;50(11):725-34.
152. Noxafil, INN-posaconazole [Internet]. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Assessment\\_Report\\_-\\_Variation/human/000610/WC500168187.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Assessment_Report_-_Variation/human/000610/WC500168187.pdf)
153. Krishna G, Ma L, Martinho M, Preston RA, O'Mara E. A new solid oral tablet formulation of posaconazole: a randomized clinical trial to investigate rising single- and multiple-dose pharmacokinetics and safety in healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(11):2725-30.
154. Walsh TJ, Raad I, Patterson TF, Chandrasekar P, Donowitz GR, Graybill R, et al. Treatment of invasive aspergillosis with posaconazole in patients who are refractory to or intolerant of conventional therapy: an externally controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2007;44(1):2-12.
155. Lerolle N, Raffoux E, Socie G, Touratier S, Sauvageon H, Porcher R, et al. Breakthrough invasive fungal disease in patients receiving posaconazole primary prophylaxis: a 4-year study. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(11):O952-9.
156. Ashbee HR, Barnes RA, Johnson EM, Richardson MD, Gorton R, Hope WW. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(5):1162-76.
157. Miceli MH, Kauffman CA. Isavuconazole: a new broad-spectrum triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis*. 2015;61(10):1558-65.
158. Maertens JA, Raad II, Marr KA, Patterson TF, Kontoyiannis DP, Cornely OA, et al. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *Lancet*. 2016;380(10020):760-9.
159. Gray KC, Palacios DS, Dailey I, Endo MM, Uno BE, Wilcock BC, et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(7):2234-9.

160. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet*. 2002;359(9312):1135-44.
161. Hiemenz JW, Walsh TJ. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. *Clin Infect Dis*. 1996;22(Suppl 2):S133-44.
162. Cornely OA, Maertens J, Bresnik M, Ebrahimi R, Ullmann AJ, Bouza E, et al. Liposomal Amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBiLoad Trial). *Clin Infect Dis*. 2007;44(10):1289-97.
163. Siopi M, Siafakas N, Vourli S, Zerva L, Meletiadis J. Optimization of polyene-azole combination therapy against aspergillosis using an in vitro pharmacokinetic-pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(7):3973-83.
164. Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*. 2003;362(9390):1142-51.
165. Aguilar-Zapata D, Petraitiene R, Petraitis V. Echinocandins: the expanding antifungal armamentarium. *Clin Infect Dis*. 2015;61(Suppl 6):S604-11.
166. Maertens J, Raad I, Petrikos G, Boogaerts M, Selleslag D, Petersen FB, et al. Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis in patients refractory to or intolerant of conventional antifungal therapy. *Clin Infect Dis*. 2004;39(11):1563-71.
167. Goodwin ML, Drew RH. Antifungal serum concentration monitoring: an update. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(1):17-25.
168. Marr KA, Schlamm HT, Herbrecht R, Rottinghaus ST, Bow EJ, Cornely OA, et al. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2015;162(2):81-9.
169. Meletiadis J, Petraitis V, Petraitiene R, Lin P, Stergiopoulou T, Kelaher AM, et al. Triazole-polyene antagonism in experimental invasive pulmonary aspergillosis: in vitro and in vivo correlation. *J Infect Dis*. 2006;194(7):1008-18.
170. Maertens J, Verhaegen J, Demuynck 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(10):3223-8.
171. 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(9):1297-306.

172. Wingard JR. New approaches to invasive fungal infections in acute leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20(1):99-107.
173. Pagano L, Caira M, Cuenca-Estrella M. The management of febrile neutropenia in the posaconazole era: a new challenge? *Haematologica.* 2012;97(7):963-5.
174. Barnes RA, Stocking K, Bowden S, Poynton MH, White PL. Prevention and diagnosis of invasive fungal disease in high-risk patients within an integrative care pathway. *J Infect.* 2013;67(3):206-14.
175. Aguado JM, Vázquez L, Fernández-Ruiz M, Villaescusa T, Ruiz-Camps I, Barba P, et al. Serum galactomannan versus a combination of galactomannan and polymerase chain reaction-based *Aspergillus* DNA detection for early therapy of invasive aspergillosis in high-risk hematological patients: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis.* 2015;60(3):405-14.
176. Vena A, Bouza E, Álvarez-Uría A, Gayoso J, Martín-Rabadán P, Cajuste F, et al. The misleading effect of serum galactomannan testing in high-risk hematology patients receiving prophylaxis with micafungin. *Clin Microbiol Infect.* 2017;
177. Duarte RF, Sánchez-Ortega I, Cuesta I, Arnan M, Patiño B, Sevilla AF de, et al. Serum galactomannan-based early detection of invasive aspergillosis in hematology patients receiving effective antimold prophylaxis. *Clin Infect Dis.* 2014;59(12):1696-702.
178. Riwes MM, Wingard JR. Diagnostic methods for invasive fungal diseases in patients with hematologic malignancies. *Expert Rev Hematol.* 2012;5(6):661-9.
179. Tan BH, Low JGH, Chlebicka NL, Kurup A, Cheah FK, Lin RTP, et al. Galactomannan-guided preemptive vs. empirical antifungals in the persistently febrile neutropenic patient: a prospective randomized study. *Int J Infect Dis.* 2011;15(5):e350-6.
180. Morrissey CO, Chen SC, Sorrell TC, Milliken S, Bardy PG, Bradstock KF, et al. Galactomannan and PCR versus culture and histology for directing use of antifungal treatment for invasive aspergillosis in high-risk haematology patients: a randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(6):519-28.
181. Cordonnier C, Pautas C, Maury S, Vekhoff A, Farhat H, Suarez F, et al. Empirical versus preemptive antifungal therapy for high-risk, febrile, neutropenic patients: a randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis.* 2009;48(8):1042-51.
182. 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(9):1242-50.
183. Hebart H, Klingspor L, Klingebiel T, Loeffler J, Tollemar J, Ljungman P, et al. A prospective randomized controlled trial comparing PCR-based and empirical treatment with liposomal amphotericin B in patients after allo-SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2008;43(7):553-61.
184. Trifilio S, Pennick G, Pi J, Zook J, Golf M, Kaniecki K, et al. Monitoring plasma voriconazole levels may be necessary to avoid subtherapeutic levels in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Cancer-Am Cancer Soc*. 2007;109(8):1532-5.
185. Fraczek MG, Kirwan MB, Moore CB, Morris J, Denning DW, Richardson MD. Volume dependency for culture of fungi from respiratory secretions and increased sensitivity of *Aspergillus* quantitative PCR. *Mycoses*. 2014;57(2):69-78.
186. Arvanitis M, Anagnostou T, Mylonakis E. Galactomannan and PCR based screening for invasive aspergillosis among high-risk hematology patients: a diagnostic meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2015;civ555.
187. Sugui JA, Pardo J, Chang YC, Müllbacher A, Zarembek KA, Galvez EM, et al. Role of *laeA* in the regulation of *alb1*, *gliP*, conidial morphology, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*. 2007;6(9):1552-61.
188. Meletiadiis J, Mouton JW, Meis JFGM, Bouman BA, Donnelly JP, Verweij PE, et al. Colorimetric assay for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*. 2001;39(9):3402-8.
189. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*. 1988;48(17):4827-33.
190. Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. [Internet]. Disponible en:[http://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas\\_diagnosticas/pruebas\\_diagnosticas.asp](http://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp)
191. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem*. 1993;39(4):561-77.
192. Shah DT, Larsen B. Clinical isolates of yeast produce a gliotoxin-like substance. *Mycopathologia*. 1991;116(3):203-8.
193. Shah D, Glover D, Larsen B. In situ mycotoxin production by *Candida albicans* in women with vaginitis. *Gynecol Obstet Invest*. 1995;39(1):67-9.
194. Altman D.G., Bossuyt P.M.M. Diagnostic (STARD) and prognostic (REMARK) studies. *Med Clin*. 2005;125(Supl 1):49-55.

195. Tamiya H, Ochiai E, Kikuchi K, Yahiro M, Toyotome T, Watanabe A, et al. Secondary metabolite profiles and antifungal drug susceptibility of *Aspergillus fumigatus* and closely related species, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus udagawae*, and *Aspergillus viridinutans*. *J Infect Chemother*. 2015;21(5):385-91.
196. Welch TR, Williams RM. Epidithiodioxopiperazines: occurrence, synthesis and biogenesis. *Nat Prod Rep*. 2014;31(10):1376-404.
197. Sun Y, Takada K, Takemoto Y, Yoshida M, Nogi Y, Okada S, et al. Gliotoxin analogues from a marine-derived fungus, *Penicillium* sp., and their cytotoxic and histone methyltransferase inhibitory activities. *J Nat Prod*. 2012;75(1):111-4.
198. Bertling A, Niemann S, Uekötter A, Fegeler W, Lass-Flörl C, von Eiff C, et al. *Candida albicans* and its metabolite gliotoxin inhibit platelet function via interaction with thiols. *Thromb Haemost*. 2010;104(2):270-8.
199. Belkacemi L, Barton RC, Hopwood V, Evans EGV. Determination of optimum growth conditions for gliotoxin production by *Aspergillus fumigatus* and development of a novel method for gliotoxin detection. *Med Mycol*. 1999;37(4):227-33.
200. Watanabe A, Kamei K, Sekine T, Waku M, Nishimura K, Miyaji M, et al. Effect of aeration on gliotoxin production by *Aspergillus fumigatus* in its culture filtrate. *Mycopathologia*. 2004;157(1):245-54.
201. Sugui JA, Vinh DC, Nardone G, Shea YR, Chang YC, Zelazny AM, et al. *Neosartorya udagawae* (*Aspergillus udagawae*), an emerging agent of aspergillosis: how different is it from *Aspergillus fumigatus*? *J Clin Microbiol*. 2010;48(1):220-8.
202. Larsen TO, Smedsgaard J, Nielsen KF, Hansen MAE, Samson RA, Frisvad JC. Production of mycotoxins by *Aspergillus lentulus* and other medically important and closely related species in section *Fumigati*. *Med Mycol*. 2007;45(3):225-32.
203. Liang W-L, Le X, Li H-J, Yang X-L, Chen J-X, Xu J, et al. Exploring the chemodiversity and biological activities of the secondary metabolites from the marine fungus *Neosartorya pseudofischeri*. *Mar Drugs*. 2014;12(11):5657-76.
204. Manzanares-Miralles L, Sarikaya-Bayram Ö, Smith EB, Dolan SK, Bayram Ö, Jones GW, et al. Quantitative proteomics reveals the mechanism and consequence of gliotoxin-mediated dysregulation of the methionine cycle in *Aspergillus niger*. *J Proteomics*. 2016;131:149-62.
205. Scharf D, Habel A, Heinekamp T, Brakhage A, Hertweck C. Opposed effects of enzymatic gliotoxin N- and S-methylations. *J Am Chem Soc*. 2014;136(33):11674-9.

206. Bergmann S, Schümann J, Scherlach K, Lange C, Brakhage AA, Hertweck C. Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat Chem Biol*. 2007;3(4):213-7.
207. Keller NP. Translating biosynthetic gene clusters into fungal armor and weaponry. *Nat Chem Biol*. 2015;11(9):671-7.
208. Salas V, Pastor FJ, Sutton DA, Calvo E, Mayayo E, Fothergill AW, et al. MIC values of voriconazole are predictive of treatment results in murine infections by *Aspergillus terreus* species complex. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(3):1532-4.
209. Eucast2 [Internet]. Disponible en: <https://mic.eucast.org/Eucast2/>
210. 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(2):497-500.
211. Aguilar-Guisado M, Martín-Pena A, Espigado I, Ruiz Perez de Pipaon M, Falantes J, de la Cruz F, et al. Universal antifungal therapy is not needed in persistent febrile neutropenia: a tailored diagnostic and therapeutic approach. *Haematologica*. 2012;97(3):464-71.
212. Camaró-Sala ML, Martínez-García R, Olmos-Martínez P, Catalá-Cuenca V, Ocete-Mochón MD, Gimeno-Cardona C. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(7):e31-6.
213. Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R, et al. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(4):O245-54.
214. Swanink CM, Meis JF, Rijs AJ, Donnelly JP, Verweij PE. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus* galactomannan. *J Clin Microbiol*. 1997;35(1):257-60.
215. Martín-Rabadán P, Gijón P, Alonso Fernández R, Ballesteros M, Anguita J, Bouza E. False-positive *Aspergillus* antigenemia due to blood product conditioning fluids. *Clin Infect Dis*. 2012;55(4):e22-7.
216. Stott KE, Hope WW. Therapeutic drug monitoring for invasive mould infections and disease: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(suppl\_1):i12-8.
217. François B, Corinne A, Thierry L, Annie S, Eliane G, Francis D, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease. *Clin Infect Dis*. 2002;34(7):939-43.
218. Maertens J, Buvé 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(2):355-62.
219. Segal BH, Herbrecht R, Stevens DA, Ostrosky-Zeichner L, Sobel J, Viscoli C, et al. Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer consensus criteria. *Clin Infect Dis*. 2008;47(5):674-83.
220. Menzin J, Meyers JL, Friedman M, Perfect JR, Langston AA, Danna RP, et al. Mortality, length of hospitalization, and costs associated with invasive fungal infections in high-risk patients. *Am J Health Syst Pharm*. 2009;66(19):1711-7.
221. Ashley ED. Pharmacoeconomics of antifungal therapy: current considerations. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;3(8):1039-57.