

VNiVERSiDAD D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
HEMATOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

TERAPIA ANTICIPADA DE ASPERGILOSIS INVASORA EN
PACIENTES ONCOHEMATOLÓGICOS DE ALTO RIESGO
MEDIANTE EL USO DE PCR PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE
ASPERGILLUS. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS
DE LA VÍA NFKB Y SU IMPLICACIÓN EN LA ASPERGILOSIS
INVASORA

María Teresa Villaescusa de la Rosa

2015

D^a. Lourdes Vázquez López, Doctora en Medicina, Médico Adjunto de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca.

CERTIFICA:

Que el trabajo realizado bajo mi dirección por D^a. María Teresa Villaescusa de la Rosa, titulado “TERAPIA ANTICIPADA DE ASPERGILOSIS INVASORA EN PACIENTES ONCOHEMATOLÓGICOS DE ALTO RIESGO MEDIANTE EL USO DE PCR PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE ASPERGILLUS. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LA VÍA NF κ B Y SU IMPLICACIÓN EN LA ASPERGILOSIS INVASORA” reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación

En Salamanca, a veintidós de Mayo de dos mil quince

“La alegría esta en la lucha, en el esfuerzo, en el sufrimiento que supone la lucha y no en la victoria misma”.

Mahatma Gandhi

AGRADECIMIENTOS

Son más de cinco años los que me ha llevado realizar este trabajo y durante este tiempo muchas personas han formado parte de mi vida, por lo que es muy probable que olvide a alguien. Por ello quiero disculparme de forma anticipada.

A Lourdes Vázquez, mi directora de tesis, mi maestra. Por sus enseñanzas durante toda la residencia, por haberme inculcado su orden y su constancia a la hora del trabajo diario. Porque cuando tengo un paciente especialmente malo me sigue viniendo a la mente tu frase “esto seguro que es un hongo” y casi siempre es verdad. Mi interés por el mundo de las infecciones, especialmente las de origen fúngico es obra tuya. Por haber confiado en mí siempre, gracias.

A mi tutora de tesis, Consuelo del Cañizo, por su sensatez, su aplomo y su búsqueda de la perfección. Siempre recordaré que fue mi primera adjunta en mi llegada a la planta de Hematología en esos duros inicios de R2.

A Jesús San Miguel, por haber liderado el gran equipo en que él tuvo la suerte de formarme como hematóloga. Su capacidad de trabajo, de realizar las cosas de forma intachable es algo que espero que de algún modo haya contagiado a todos aquellos que hemos pasado por sus manos.

A Lola Caballero, por enseñarme a pensar antes de hablar y no estar como “las vacas al tren”. Por haberme regalado casi un año con sus pacientes de trasplante alogénico. Nunca podré agradecerte la confianza que depositaste en mí.

A Belén Vidriales, una de mis tutoras de residentes. Por ser siempre tan cariñosa con todos nosotros. Tampoco puedo olvidar que fue contigo con quien hice mi primera guardia de residente.

A todos los adjuntos del Servicio de Hematología y Hemoterapia de Hospital Universitario de Salamanca durante mi estancia allí: Mariví, Norma, José Antonio, Fermín, Ramón, Marcos, Jesús María, Enrique, María Jesús, Mercedes, María, Alejandro, Ignacio, José Ramón y Olga. Trabajar con vosotros ha sido siempre un lujo.

A mis compañeros de residencia, Jesús, Enrique y Juan, Jennifer y Lucía, Teresa, Elena y Tomás, Iris, Mónica, Jorge y Estefanía, Alba, Ana y Silvia, Miriam, Chema y Oriana. Compañeros de viaje en los malos y en los muchos buenos momentos. Mi residencia sin vosotros nunca habría sido igual.

A todo el personal de la cuarta planta de Hematología de Salamanca, por hacerme esos años tan felices. A las data manager Irene, Magdalena y especialmente a Eva, que me ayudo tanto con las muestras de este estudio cuando dejé Salamanca. A Manoli y Marta, por “colar siempre” a los pacientes del estudio porque ya estaba el mensajero esperando.

A Pilar Llamas, que un día me dio la oportunidad de trabajar con ella. Por liderar el equipo que hace que todas las mañanas vaya a trabajar con una sonrisa, gracias.

A todos mis compañeros del día a día, Elena, José Luis, Marian, Carlos S., Carlos B., Elham, Raquel, Sol, Rosa, Raúl , Teresa, Rocío y Mireia. Trabajar en la Fundación Jiménez Díaz es un placer gracias a vuestra profesionalidad, pero sobre todo gracias a vuestra inmensa calidad humana.

A mis residentes Silvia, Mavi, María, María José, Claudia, Carlos, Tamara y Sara por aguantarme en mis malos momentos y por contagiarme la ilusión de seguir siempre aprendiendo.

A Ignacio Gadea y su equipo del Servicio de Microbiología de la Fundación Jiménez Díaz por las bonitas fotos que me han cedido.

A los componentes del GRUCINI, por permitirme realizar este trabajo. A todos los participantes del grupo PCRAGA, por su inmejorable labor en este estudio.

A Juan Sainz y su equipo del GENYO, por su excelente trabajo de análisis de los polimorfismos genéticos.

A mis mejores amigas, Raquel, Beatriz y Laura. Por estar siempre ahí y hacerme la vida más feliz.

A la mejor familia que podría tener. A mis padres, Salvador y Teresa, por sus enseñanzas, su ayuda, su ánimo, su cariño y su confianza en mi.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. IMPORTANCIA DE LA INFECCIÓN FUNGICA POR ASPERGILLUS EN EL PACIENTE HEMATOLÓGICO DE ALTO RIESGO	21
• Incidencia de la aspergilosis invasora	21
• Mortalidad de la aspergilosis invasora	23
1.2. FACTORES DE RIESGO PARA LA INFECCIÓN FÚNGICA POR ASPERGILLUS	24
• Inmunosupresión del paciente con cáncer	28
• Alteración del mecanismo de defensa frente a aspergillus	30
• Predisposición genética a la aspergilosis invasora	31
• Polimorfismos de un solo nucleótido e implicación en diferentes enfermedades complejas	31
○ Clasificación, localización e implicaciones de los SNP funcionales	32
• La vía de señalización NFκB y su importancia en el desarrollo de la aspergilosis invasora	36
• La importancia del tiempo	38
• Neutropenia	40
• Nuevos tratamientos para la enfermedad de base	40
• Sobrecarga de hierro	41
• Nuevas modalidades de trasplante	41
• El uso de esteroides	43
1.3. ASPERGILLUS	45
1.4. EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN FÚNGICA	48

1.5. TECNICAS DIAGNÓSTICAS DE LA INFECCIÓN	
FUNGICA POR ASPERGILLUS	52
• Examen microscópico	53
• Cultivos microbiológicos	53
• TACAR	55
• 1-3 β - D-glucano	56
• Galactomanano	58
• PCR de aspergillus	66
• Lateral Flow Device	71
2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	75
- HIPOTESIS	77
- OBJETIVO PRINCIPAL	77
- OBJETIVOS SECUNDARIOS	77
3. MATERIAL Y MÉTODOS	79
- A. ESTUDIO PCR-AGA	81
• Criterios de inclusión	81
• Criterios de exclusión	81
• Aspectos éticos del protocolo	82
• Proceso de asignación a cada grupo	84
• Extracción de muestras biológicas	84
• Resultados microbiológicos	85
• Manejo de la neutropenia febril	86
• Definiciones del estudio	86
• Descripción del tratamiento	89
• Periodos del estudio	89
• Cálculo del tamaño muestral	90

• Análisis estadístico	90
- B. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LA VIA NFKB	91
• Población de estudio	91
• Metodología del genotipado	92
• Análisis estadístico	93
4. RESULTADOS	95
- A. ESTUDIO PCR-AGA	97
• Población del estudio	97
• Realización de pruebas diagnósticas	99
• Incidencia de aspergilosis invasora al final de periodo de seguimiento	100
• Anticipación de pruebas diagnósticas	102
• Uso de tratamientos antifúngicos a excepción de fluconazol profiláctico	103
• Mortalidad	104
- B. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LA VIA NFKB	105
• Población del estudio	105
• Polimorfismos estudiados	107
• Asociación entre los polimorfismos de la vía NFKB y la aspergilosis invasora	107
5. DISCUSIÓN	111
6. CONCLUSIONES	127

7. MATERIAL DERIVADO DE LOS TRABAJOS	131
8. BIBLIOGRAFÍA	135
9. ANEXOS	157
10. PERMISOS	171
11. ABREVIATURAS	177

1.- INTRODUCCIÓN

El objetivo de este trabajo es comparar la efectividad de la técnica de detección del antígeno de galactomanano (AGA) sólo o en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) de *Aspergillus fumigatus* en el diagnóstico precoz de la infección fúngica por *Aspergillus*.

La técnica de detección del antígeno de galactomanano, es una técnica ya validada y de uso en la práctica clínica habitual. Estudios previos apoyan la hipótesis de que la PCR de *Aspergillus* podría anticiparse a la positivización del antígeno de galactomanano, por lo que su uso en combinación con las técnicas usadas actualmente, repercutiría en un diagnóstico más temprano y con ello, en un mejor pronóstico de los pacientes afectados por una infección fúngica por *Aspergillus*.

Por otra parte, la presencia de ciertos polimorfismos genéticos se ha asociado con un aumento de riesgo de desarrollo de la infección fúngica por *Aspergillus*. Por ello, hemos querido realizar un estudio de los polimorfismos de algunos de los genes implicados en la vía de señalización del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B (NFκB) y ver su implicación como factor de riesgo o factor protector en el desarrollo de este tipo de infección fúngica.

1.1.- IMPORTANCIA DE LA INFECCIÓN FÚNGICA POR ASPERGILLUS EN EL PACIENTE HEMATOLÓGICO DE ALTO RIESGO

INCIDENCIA DE LA ASPERGILOSIS INVASORA

La importancia de las infecciones fúngicas ha aumentado en los últimos años, y en muchos casos supera a la enfermedad de base como causa de la muerte en pacientes hematológicos de alto riesgo (1).

En las últimas décadas se ha observado un incremento de la incidencia de las infecciones fúngicas por *aspergillus spp.* (2).

El incremento en el número de individuos con algún tipo de inmunosupresión, y especialmente con descenso de la capacidad de respuesta del sistema inmune celular, es la causa más importante para el ascenso de este tipo de infecciones.

Las infecciones fúngicas invasivas (IFI) constituyen en la actualidad, la principal causa de morbi-mortalidad por infección en pacientes hematológicos de alto riesgo, fundamentalmente en pacientes con neutropenia inducida por quimioterapia y en pacientes receptores de un trasplante de progenitores hematopoyéticos (3).

Aproximadamente, entre un 10 y un 50% de los pacientes hematológicos con neutropenia marcada o receptores de un trasplante de progenitores hematopoyéticos, tienen un episodio de IFI durante la evolución de su enfermedad. Estas infecciones son debidas fundamentalmente a *Candida spp.* y *Aspergillus spp.*(4).

En un estudio observacional, prospectivo, multicéntrico, desarrollado en 234 pacientes sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos con IFI, la aspergillosis invasiva (AI) fue la causa más frecuente de infección fúngica (59.2%), seguida de la candidiasis invasiva (24.8%), las zigomicosis (7.2%), y otros hongos (6,8%) (5).

Los pacientes hematológicos de mayor riesgo para este tipo de infección son aquellos diagnosticados de leucemia aguda mieloblástica en tratamiento quimioterápico de inducción a la remisión, con un periodo de neutropenia profunda prolongado. Con frecuencia es debida al subtipo *Aspergillus fumigatus* y el órgano más frecuentemente afecto suele ser el pulmón (6).

En un estudio realizado por el M.D. Anderson Cancer Center se estudiaron los hongos causantes de la muerte en autopsias realizadas a pacientes con

leucemia aguda mieloblástica en dos periodos diferentes: 1990-1999 y 2000-2008. El número de casos de aspergillus permaneció estable, con un descenso claro del número de candidiasis en el último periodo (7).

Igualmente, en el caso de los pacientes sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, la AI es la infección fúngica más frecuente con una incidencia que se sitúa entre el 4% y el 10% (8). Estudios que comparan la incidencia en pacientes HLA (antígenos leucocitarios humanos) idénticos y no idénticos demuestran que esta incidencia pueden variar entre un 7,3% en los primeros y un 10,5% en los segundos (9).

Los resultados anteriormente comentados muestran que el uso de profilaxis y tratamientos empíricos en pacientes neutropénicos, con buena cobertura para *Candida spp.* han logrado disminuir las tasas de infección y mortalidad asociadas a este hongo. Sin embargo, en el caso de *Aspergillus spp.* y otras micosis emergentes los resultados no han sido tan espectaculares.

MORTALIDAD DE LA ASPERGILOSIS INVASORA

La mortalidad por AI en pacientes hematológicos de alto riesgo continúa siendo muy elevada, aunque en los últimos años se observa una tendencia descendente. Las series con mejores resultados de mortalidad la sitúan en torno al 30%, aunque series algo más antiguas alcanzan casi un 90% de mortalidad (10,11,12). Estas tasas tan elevadas, son un claro ejemplo de que esta entidad es diagnosticada de forma muy tardía (8).

Lin y colaboradores revisaron los casos publicados de aspergilosis en la literatura en el periodo comprendido entre 1995 y 1999. La mortalidad global en este grupo fue del 58%, siendo del 88% en pacientes sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos y del 90% en aquellos con enfermedad diseminada o afectación del sistema nervioso central (13).

Sin embargo, los datos más recientes no parecen ser tan decepcionantes y las tasas de mortalidad han ido descendiendo en los últimos años, probablemente gracias al uso de mejores agentes antifúngicos, las mejoras en las técnicas de diagnóstico precoz y las mejoras implantadas en el campo del trasplante alogénico, con regímenes de acondicionamiento de menor intensidad y un injerto más rápido gracias al uso de la sangre periférica como fuente de progenitores hematopoyéticos (14,15).

La utilización de antibióticos y antivíricos más eficaces también han redundado en una mejoría en el pronóstico de las infecciones de origen bacteriano y vírico. Así mismo, la amplia profilaxis frente a *Candida spp.* hace que esta levadura no sea un problema relevante en nuestra práctica clínica diaria. Pero todo ello ha ocasionado un aumento de las infecciones por hongo filamentoso que, en el momento actual, son la mayor causa de mortalidad por infección en el paciente trasplantado (4).

No obstante todos estos datos están infraestimados, como demuestra un estudio en el que se analizaron las autopsias realizadas a pacientes con hemopatías, demostrando que un 75% de las infecciones fúngicas no fueron diagnosticadas en vida del paciente, por lo que parece que la estrategia empleada actualmente para el diagnóstico precoz es aún insuficiente (16).

1.2.- FACTORES DE RIESGO PARA LA INFECCIÓN FÚNGICA POR ASPERGILLUS

Son muchos los grupos que han intentado estratificar a los pacientes hematológicos según el riesgo de desarrollar una infección fúngica.

En el año 2000, Prentice y colaboradores establecen 4 grupos de pacientes hematológicos con diferente riesgo para desarrollar una infección fúngica. En este punto, considera pacientes de alto riesgo aquellos con colonización por *Candida spp.* en más de una localización, el diagnóstico de leucemia aguda mieloblástica, el uso de irradiación corporal total como terapia de acondicionamiento en el

trasplante y el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos HLA idéntico. En el grupo de mayor riesgo incluye aquellos pacientes con neutropenia muy grave ($<0.1 \times 10^9/l$) durante más de 3 semanas, o grave ($<0.5 \times 10^9/l$) durante más de 5 semanas, la colonización por *Candida tropicalis*, el trasplante HLA no idéntico y el no relacionado, la presencia de enfermedad injerto contra huésped, el uso de esteroides y ciertos tratamientos quimioterápicos como las altas dosis de citarabina o análogos de purinas como la fludarabina (17).

En los pacientes sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos pueden distinguirse claramente dos periodos con diferentes factores de riesgo predominantes. Existe un primer periodo (aproximadamente hasta los 40 días post-trasplante) en los que la enfermedad de base, el tipo de trasplante (fuente de progenitores y manipulación del inóculo) y la presencia de enfermedad por Citomegalovirus (CMV) son los factores de riesgo predominantes. A partir del día 40 post-trasplante, la manipulación del inóculo también tiene gran peso, además del estatus seropositivo para CMV tanto del donante como del receptor, así como la enfermedad por CMV y virus respiratorios. Pero es sin duda la presencia de enfermedad injerto contra receptor (EICH) y su tratamiento basado en esteroides lo que más peso tiene a la hora de aumentar el riesgo de desarrollo de una infección fúngica (9).

Otro trabajo algo más reciente estudió los factores de riesgo en 163 episodios aspergilosis que se produjeron en una serie de 1248 pacientes sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos y confirmó los resultados de estudios anteriores, asociando la sobrecarga férrica como factor de riesgo independiente del periodo del trasplante (precoz o tardío) (18).

Estos factores de riesgo aún permanecen vigentes en el momento actual, pero además existen una serie de factores emergentes como las infecciones víricas y su tratamiento, la linfopenia o el aumento de los depósitos de hierro. Además han aparecido nuevos fármacos que son usados tanto para el control de la enfermedad de base, como son determinados anticuerpos monoclonales como el alemtuzumab, como para la terapia de acondicionamiento en diferentes tipos de

trasplante, que, dado su efecto inmunosupresor, vendrían a incrementar el número de sujetos en riesgo para este tipo de infecciones (19).

El grupo español de trasplante hematopoyético (GETH) también ha intentado estratificar el riesgo de desarrollar una infección fúngica dividiendo a los pacientes hematológicos en 3 grupos y considerando por primera vez alto riesgo a aquellos pacientes diagnosticados de leucemia aguda linfoblástica en tratamiento de inducción y rescate. En estos pacientes el uso de esteroides de forma prolongada es fundamental para el desarrollo de la infección fúngica. Este trabajo además permite modular el riesgo de infección fúngica en base a diferentes comorbilidades, inmunosupresores y factores ambientales, permitiendo que pacientes, que a priori serían considerados de riesgo bajo o intermedio, puedan llegar a ser considerados pacientes de alto riesgo (20).

El grupo francés llevó a cabo un estudio retrospectivo analizando aquellos factores de riesgo relacionados con la mortalidad atribuible a aspergilosis invasora. Los factores que en un análisis multivariante demostraron un aumento de riesgo de muerte significativos fueron la monocitopenia, la presencia de derrame pleural y la presencia de EICH, así como el tratamiento con altas dosis de esteroides en el momento del diagnóstico (12).

La importancia de la estratificación del riesgo de desarrollar una IFI se basa en que aquellos pacientes de más riesgo se podrían beneficiar de una profilaxis antifúngica, una monitorización más intensa y un tratamiento más precoz.

Uno de los estudios más interesantes que pretende estratificar los factores de riesgo ha sido llevado a cabo por el grupo italiano y publicado recientemente. En este estudio prospectivo se analizan 881 pacientes con leucemia aguda mieloblástica de nuevo diagnóstico. De estos, 54 pacientes desarrollaron una infección fúngica por hongo filamentoso probable o probada, y fueron comparados con 667 pacientes sin evidencia de IFI, que se consideraron controles. En una primera fase se estudiaron los factores de riesgo previos al inicio de la quimioterapia y en una segunda fase los factores de riesgo pos-tratamiento. Entre

los factores de riesgo pre-tratamiento, el análisis univariante consideró como factores de riesgo significativos la edad mayor de 50 años, tener un estado funcional malo, el consumo de tabaco y cocaína, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la diabetes mellitus, trabajos o aficiones que conlleven una exposición a agentes fúngicos y las obras en el domicilio en los 6 meses previos. Sorprendentemente el sobrepeso parecía reducir el riesgo de IFI. Con respecto a los factores de riesgo post-tratamiento, la presencia de esofagitis grado 3-4 aumentaba el riesgo de IFI, mientras que la profilaxis antifúngica, y más concretamente la profilaxis con Posaconazol emergía como factor protector. El análisis multivariante de los factores de riesgo pre y post-tratamiento confirmó la importancia de un mal estado funcional, el trabajo con riesgo de exposición a esporas fúngicas, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y las reformas en el domicilio como factores de riesgo pre-tratamiento, así como el efecto protector del sobrepeso. Con respecto a los factores de riesgo post-tratamiento sólo 3 mantuvieron la significación: la esofagitis y los días de neutropenia como factores de riesgo, y la profilaxis con Posaconazol como factor protector (21).

Conocemos los factores de riesgo de la infección fúngica, pero ¿tienen todos el mismo peso?, ¿es posible realizar una escala de riesgo de desarrollo de la infección fúngica, de manera que podamos individualizar el riesgo de cada paciente?. Para ello el grupo italiano ha realizado un estudio en dos fases. En una primera fase revisaron de forma retrospectiva 1709 ingresos hospitalarios correspondientes a 840 pacientes con neoplasias hematológicas en el periodo comprendido entre 2005 y 2008, y recogieron datos de 17 factores de riesgo tanto epidemiológicos como relacionados con el tratamiento. Posteriormente realizaron una validación prospectiva con 1746 ingresos correspondientes a 855 pacientes en el periodo comprendido entre 2009 y 2012. De las 17 variables, sólo 11 se asociaron a IFI en el análisis univariante, y de estas, tan sólo 4 mantuvieron la significación en el análisis multivariante. Estas variables fueron la neutropenia prolongada, la linfopenia o linfopenia funcional en pacientes sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, los antecedentes de IFI y la neoplasia no controlada. Se asignó una puntuación a cada una de las 4 variables según su peso de modo que se obtenía una puntuación entre 0 y 13. El análisis por

curvas ROC demostró que 6 era el punto de corte óptimo para discriminar aquellos pacientes de bajo riesgo (con <1% de IFI) de los de alto riesgo (>5% de IFI). De este modo se podrían seleccionar aquellos pacientes de mayor riesgo, que requieren un manejo más agresivo y que se pueden beneficiar de intensificar la profilaxis y las técnicas diagnósticas (22).

De forma más pormenorizada, podemos ver la importancia de estos factores de riesgo:

INMUNOSUPRESIÓN DEL PACIENTE CON CANCER

Los pacientes con neoplasias de origen hematológico tienen por definición una alteración de la capacidad de respuesta del sistema inmune; es decir, una inmunodeficiencia, tanto por su patología de base como por el tratamiento que esta requiere. La razón es que la población celular neoplásica reside dentro del sistema inmune y las células residuales estarán expuestas a una quimioterapia agresiva lo que conlleva un grado de inmunodeficiencia mucho mayor.

El tipo de inmunodeficiencia, si es más celular o humoral, varía según la patología de base del enfermo, el momento de la enfermedad y los tratamientos recibidos a lo largo de esta. El sistema inmune tiene una serie de mecanismos de defensa contra las infecciones, y según se alteren unos y/u otros el paciente estará predispuesto a un tipo u otro de infecciones. En la tabla 1 se puede observar un resumen de los diferentes defectos inmunitarios y su relación con la predisposición a desarrollar diferentes infecciones (23).

<p>NEUTROPENIA</p>	<p>Bacterias</p> <ul style="list-style-type: none"> -Cocos gram + · <i>Staphylococcus coagulasa</i> <i>negativo</i> · <i>Staphylococcus aureus</i> · <i>Streptococcus viridans</i> · <i>Enterococcus spp.</i> -Bacilos gram – · <i>Enterobacterias</i> · <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <p>Hongos</p> <ul style="list-style-type: none"> -<i>Candida spp.</i> -<i>Aspergillus spp.</i> -<i>Fusarium spp.</i>
<p>DEFECTO DE LA INMUNIDAD CELULAR</p>	<p>Bacterias</p> <ul style="list-style-type: none"> -<i>Listeria</i> -<i>Nocardia</i> <p>Micobacterias</p> <p>Hongos</p> <ul style="list-style-type: none"> -<i>Pneumocystis jirovecii</i> -<i>Aspergillus spp.</i> -<i>Cryptococcus neoformans</i> <p>Virus</p> <ul style="list-style-type: none"> -<i>Herpes virus</i> -<i>Virus respiratorios</i> -<i>Adenovirus</i> <p>Protozoos</p> <ul style="list-style-type: none"> -<i>Toxoplasma gondii</i>
<p>DEFECTO DE LA INMUNIDAD HUMORAL</p>	<p>Bacterias</p> <ul style="list-style-type: none"> -<i>Streptococcus pneumoniae</i> -<i>Haemophilus influenzae</i>

En los últimos tiempos se ha visto que además de esta primera línea es fundamental la respuesta T-helper mediada por los linfocitos. Esta respuesta inmune puede ser de dos tipos, la Th-1 y la Th-2, caracterizadas por la producción de diferentes tipos de citoquinas. La respuesta Th-1 se caracteriza por la producción de citoquinas pro-inflamatorias que aumentan la capacidad fagocítica de las hifas, y por tanto, sería beneficiosa para la defensa frente a la infección fúngica. La respuesta Th-2 se caracteriza por la producción de otra serie de citoquinas con actividad supresora de la fagocitosis por parte de neutrófilos y macrófagos, y por lo tanto, perjudicial para la defensa frente a la infección fúngica. Existen diferentes estudios que propugnan que una disregulación entre las respuestas Th1 y Th2, a favor de la segunda, podría conllevar un peor pronóstico de la infección fúngica por aspergillus (26). Por otra parte, la infusión de citoquinas relacionadas con la respuesta Th1, podría proteger frente al desarrollo de la aspergilosis invasora (27).

PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A LA ASPERGILOSIS INVASORA POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO E IMPLICACIONES EN DIFERENTES ENFERMEDADES COMPLEJAS

A diferencia de las enfermedades de herencia mendeliana, la mayoría de las enfermedades complejas poseen una etiología multifactorial, en las que el componente genético puede ser de gran importancia.

La secuenciación del genoma humano puso de manifiesto una gran variedad de variantes genéticas que son muy comunes. Dentro de estas variantes genéticas, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son las más frecuentes. Dos grupos independientes que secuenciaron el genoma humano reportaron 1,4 millones y 2 millones de variantes tipo SNP. Ambos genomas compartían un 99,9% de identidad en su secuencia, constituyendo el resto la variabilidad genética y fenotípica entre los individuos. Actualmente existen descritos más de 10 millones de SNP, aunque se ha estimado que pueden llegar a ser unos 20 millones.

Algunos SNP desempeñan un papel biológico importante en el desarrollo de diferentes enfermedades ya que son SNP funcionales, que pueden afectar al gen, al

ácido ribonucleico mensajero (ARN_m) de genes que sintetizan proteínas o a las mismas proteínas.

CLASIFICACIÓN, LOCALIZACIÓN E IMPLICACIONES DE LOS SNP FUNCIONALES

Los SNP funcionales se dividen en tres diferentes grupos:

- SNP reguladores (_rSNP): localizados en los promotores de los genes que sintetizan proteínas, afectando los niveles de expresión génica. Pueden modificar, destruir o crear sitios de unión y reconocimiento para factores de transcripción, alterando de esta manera los niveles de expresión génica y llevando a una sobre o subexpresión de los mismos.
- SNP estructurales (_{sr}SNP): localizados tanto en los ARN_m primarios (contienen intrones), como en los secundarios (ya no contiene intrones), lo que incluye a las regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR), regiones intrónicas y regiones codificantes, afectando a la estructura y función de los ARN, incluyendo el corte y empalme, la regulación de la traducción de los ARN_m a proteínas, la funcionalidad de las proteínas, la estabilidad de los ARN_m y la poliadenilación de los ARN_m entre otros procesos.
- SNP codificantes (_cSNP): localizados en los exones. Afectan a la función de la proteína. A su vez se subdividen en:
 - Sinónimos: si el cambio de nucleótido no cambia el aminoácido. Aunque a priori no deberían conferir susceptibilidad a padecer diferentes enfermedades, recientes estudios han demostrado que este era un concepto equivocado, ya que tienen un papel regulador. Pueden afectar al corte y empalme, aumentar o disminuir la eficiencia del corte y empalme, la estabilidad y estructura de los ARN_m, y a nivel de proteínas, pueden afectar al plegamiento y la estructura de la proteína, la respuesta al tratamiento así como su función biológica normal.
 - No sinónimos: si el cambio de nucleótido cambia el aminoácido (28).

En el caso de la aspergilosis invasora, una de las grandes incógnitas respecto a su desarrollo es la causa por la que pacientes que a priori tienen la misma enfermedad y similares factores de riesgo desarrollan la infección y otros no. Al igual que en otras enfermedades, la posibilidad de que determinados polimorfismos genéticos pudieran predisponer, o incluso proteger de esta infección han sido estudiados de forma pormenorizada por diferentes grupos.

Existen estudios que apoyan la hipótesis de que *aspergillus* es capaz de activar la respuesta inmune innata celular a través de los receptores toll-like 2 y 4. Por lo tanto, parece probable que diferentes polimorfismos genéticos que alteren dichos receptores puedan hacer al paciente más susceptible de tener una infección fúngica. Un estudio analizó una cohorte de 336 receptores de un trasplante de progenitores hematopoyéticos y sus correspondientes donantes no emparentados. Se valoraron un total de 20 polimorfismos en los toll-like receptor 2, 3, 4 y 9, demostrando que la presencia de los polimorfismos S3 y S4 del toll-like receptor 4 aumentaban el riesgo de una aspergilosis invasora. El estudio de validación confirmó que el polimorfismo S4 aumentaba el riesgo de una aspergilosis invasora un 2,49%. Aquellos pacientes cuyo donante era positivo para el polimorfismo, asociado a la seropositividad del citomegalovirus en donante o receptor tenían un incremento claro de la probabilidad de aspergilosis invasora en 3 años, en comparación con aquellos con aquellos con ambos parámetros negativos (12% versus 1%, $p=0.02$), así como un aumento de la mortalidad no relacionada con la recaída (35% versus 22%, $p=0,02$) (29).

Otro estudio retrospectivo posterior comparó un grupo de 44 pacientes sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, que habían desarrollado una aspergilosis invasora probable o probada, con un grupo control de 62 pacientes sometidos al mismo tipo de trasplante que no hubieran desarrollado una aspergilosis invasora. La presencia del polimorfismo 1063A<G del toll-like receptor 4 se asoció al desarrollo de la aspergilosis cuando estaba presente en el donante (Odds ratio=3,77%, IC=95%, $p=0,03$). En el análisis multivariante ajustado por otros parámetros como la presencia de enfermedad injerto contra huésped, la duración de la neutropenia o el estatus de

citomegalovirus, sólo la combinación de los polimorfismos 1063A<G del toll-like receptor 4 e IFNG 874T>A consiguieron mantener la significación ($p=0,033$) con respecto al incremento del riesgo de desarrollar una aspergilosis invasora (30).

El reconocimiento de *Aspergillus Fumigatus* por los leucocitos de estipe mieloide es crucial. Estos leucocitos son activados a través de ciertos receptores de reconocimiento (PRRs). Entre estos, miembros de la familia de las lectinas tipo C parecen ser de gran importancia. Estudios previos apoyan la relación entre la DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), la Dectin-1 (Dendritic cell-associated C-type lectin-1) y la Dectin-2 (Dendritic cell-associated C-type lectin-2) con la respuesta inmune frente a *Aspergillus fumigatus* (31, 32). En un estudio realizado en 182 pacientes hematológicos de alto riesgo de infección fúngica, 75 de los cuales había desarrollado una infección fúngica probable o probada según los criterios de la European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) de 2008 se evaluaron 27 polimorfismos genéticos. La conclusión fue que los pacientes portadores de los genotipos Dectin-1_{rs3901533} T/T, Dectin-1_{rs7309123} G/G y los alelos DC-SIGN_{rs4804800} G, DC-SIGN_{rs11465384} T, DC-SIGN_{rs7248637} A y DC-SIGN_{rs7252229} C, tenían mayor riesgo de desarrollar una aspergilosis invasora (Odds Ratio de 5,59%, 4,91%, 2,75%, 2,70%, 2,39% y 2,05% respectivamente). En cambio, la presencia del DC-SIGN_{rs2287886}_A parecía tener un cierto efecto protector frente al desarrollo de dicha infección (Odds Ratio de 0,6%). También aquellos pacientes con el alelo Dectin-1_{rs3901533}_T y el genotipo Dectin-1_{rs7309123}_G/G positivizaban más el galactomanano (33).

La primera línea de defensa del organismo frente a la infección fúngica es la inmunidad innata, y el principal efector de este sistema son los macrófagos. Estos pueden producir mediadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y la linfoxina α (LT α). Se realizó un estudio de polimorfismos genéticos de ambos, así como del receptor 2 de factor de necrosis tumoral (TNFR2) en 102 pacientes hematológicos y 124 controles, demostrando que un número variable de repeticiones en tándem localizados en la posición -322 del promotor del gen del

TNFR2 se asociaba con un aumento significativo del riesgo de desarrollar una aspergilosis invasora ($p=0,029$) (34).

Un estudio posterior del mismo grupo demostró que polimorfismos del receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1) también predisponían a una aspergilosis invasora. Concretamente, los polimorfismos TNFR1_{+36(A/G)} y TNFR1_{-609(G/T)} se asociaron a la susceptibilidad de desarrollar esta infección ($p=0,033$ y $p=0,018$) respectivamente. Además, el nivel de expresión de ARN_m del TNFR1 era menor en pacientes que habían desarrollado una aspergilosis respecto a aquellos resistentes. Estos polimorfismos, pueden modificar la afinidad de ciertos factores de transcripción que están involucrados en la activación de la vía de señalización del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB) (35).

La fagocitosis de las hifas por los macrófagos alveolares induce producción de diferentes citoquinas proinflamatorias como por ejemplo la Interleukina-10 (IL-10). Diferentes estudios apoyan la hipótesis que un aumento de los niveles de IL-10 se asocia a una menor resistencia a la infección por aspergillus, mientras que la neutralización de esta citoquina protegería frente a esta infección. Los pacientes que tiene una mala evolución de la AI tienen niveles muy elevados de IL-10, mientras que aquellos con una evolución favorable tiene niveles indetectables de esta. La variabilidad en la producción de la IL-10 podría deberse a diferentes polimorfismos que afectan a la región promotora del gen de la IL-10. De este modo, aquellos pacientes portadores del genotipo IL-10_{-1082GG} tienen un aumento de la susceptibilidad para el desarrollo de una aspergilosis invasora ($p=0,0033$), mientras que aquellos portadores del genotipo IL-10_{-1082AA} tienen una mayor resistencia al desarrollo de esta ($p=0,001$) (36).

Otra citoquina proinflamatoria es la Interleukina-1 (IL-1). Un estudio realizado a 110 pacientes hematológicos y 148 controles sanos, mostró que los polimorfismos en IL-1 α , y en IL-1 β no se relacionaban con la presencia de una aspergilosis invasora. Sin embargo, se observó una tendencia a que aquellos pacientes con una aspergilosis tuvieran con mayor frecuencia el genotipo IL-1 β .

511TT en comparación con el grupo de pacientes que no habían desarrollado la infección. El análisis de haplotipos mostró que el haplotipo VNTR2/-889C/-511T estaba fuertemente asociado a la susceptibilidad de desarrollar una aspergilosis invasora ($p=0,020$), mientras que el haplotipo VNTR2/-889C/-511C confería resistencia para el desarrollo de dicha infección ($p=0,028$) (37).

Con respecto a los polimorfismos de otra interleukina, como es la Interleukina 6 (IL-6), un estudio llevado a cabo por el grupo de Granada, no demostró que la presencia de polimorfismos a ese nivel se asociara a un aumento del riesgo de desarrollar una aspergilosis invasora (38).

LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NFκB Y SU IMPORTANCIA EN EL DESARROLLO DE LA ASPERGILOSIS INVASORA

NFκB es un complejo relevante en la regulación de la respuesta celular ante estímulos nocivos. Dado que no requiere la síntesis de proteínas para ser activado, es una vía de acción rápida, por lo que puede ser la primera respuesta celular ante el daño celular.

El complejo NFκB es una familia de factores de transcripción diméricos que en los mamíferos comprende RelA (p65), RelB, c-Rel, NFκB1 (p50) y NFκB2 (p52). Estas proteínas habitualmente forman homodímeros y heterodímeros. En las células no estimuladas los dímeros NFκB son secuestrados en el citoplasma mediante proteínas inhibidoras llamadas IκBs.

NFκB1 y NFκB2 son sintetizadas como precursores, se llaman p105 y p100 respectivamente, y tienen un papel muy importante en el control de la actividad NFκB.

NFκB está regulado de forma muy estrecha mediante dos vías que controlan la proteólisis de IκBs y otras proteínas relacionadas con IκBs:

- Clásica o canónica: ante diferentes señales, normalmente procedentes de fuera de la célula, una IκK-quinasa fosforila IκK, de modo que deja libre NFκB, que entra en el núcleo donde puede activar la expresión de diferentes genes.

- Alternativa o no canónica: El complejo P100 NF- κ B2 - RelB se encuentra inactivo en el citoplasma. Ante diferentes estímulos se activa la quinasa NIK, que a su vez activa los complejos de IKK que fosforilan los complejos NF- κ B p100 lo que conduce a su ubiquitinación, creando transcripcionalmente complejos p52 NF-kB / RelB que se translocan al núcleo e inducen la expresión génica (39).

En la imagen 1 se puede observar la activación de NFKB por ambas vías (40).

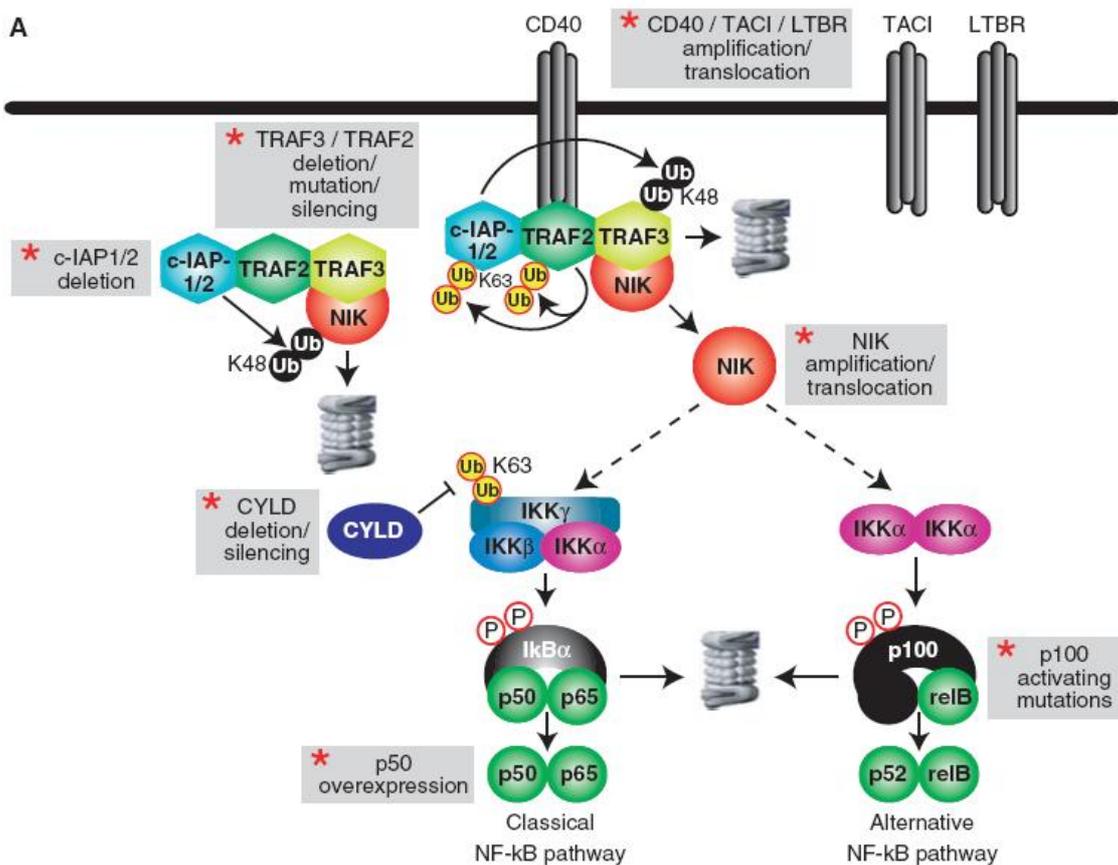


Imagen 1. Activación de la vía NFKB

Dada la importancia que puede tener la vía de señalización NFKB en la respuesta celular frente diferentes tipos de infecciones, uno de los objetivos secundarios de este estudio ha sido estudiar diferentes polimorfismos de un solo

nucleótido que afectan a genes implicados en esta vía y que pudieran aumentar o disminuir el riesgo de desarrollar una aspergilosis invasora.

LA IMPORTANCIA DEL TIEMPO

El paciente hematológico tiene diferente riesgo de infección fúngica por *Aspergillus* según el momento de la enfermedad. El riesgo difiere según el paciente esté en el momento del diagnóstico de la enfermedad o cuando ya ha sido tratado.

Tal y como podemos observar en la imagen 2, en el caso del trasplante de progenitores hematopoyéticos pueden verse dos momentos de mayor riesgo de desarrollo de una aspergilosis invasora.

Existe un primer momento de riesgo durante el ingreso para la realización del trasplante de progenitores hematopoyéticos caracterizado por la neutropenia posterior a la terapia de acondicionamiento y previa al injerto de leucocitos. Existe otro momento de gran riesgo, posterior al injerto y caracterizado por la presencia de Enfermedad injerto contra huésped (EICH) y su tratamiento, basado en la terapia esteroidea.

En la imagen 3 se muestra la cinética de reconstitución inmune en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Podemos observar que algunas células comienzan a recuperarse unas semanas tras la infusión de las células progenitoras. En cambio, otros tipos celulares, como por ejemplo los linfocitos T CD4+ pueden tardar meses, e incluso años en alcanzar niveles normales (41).

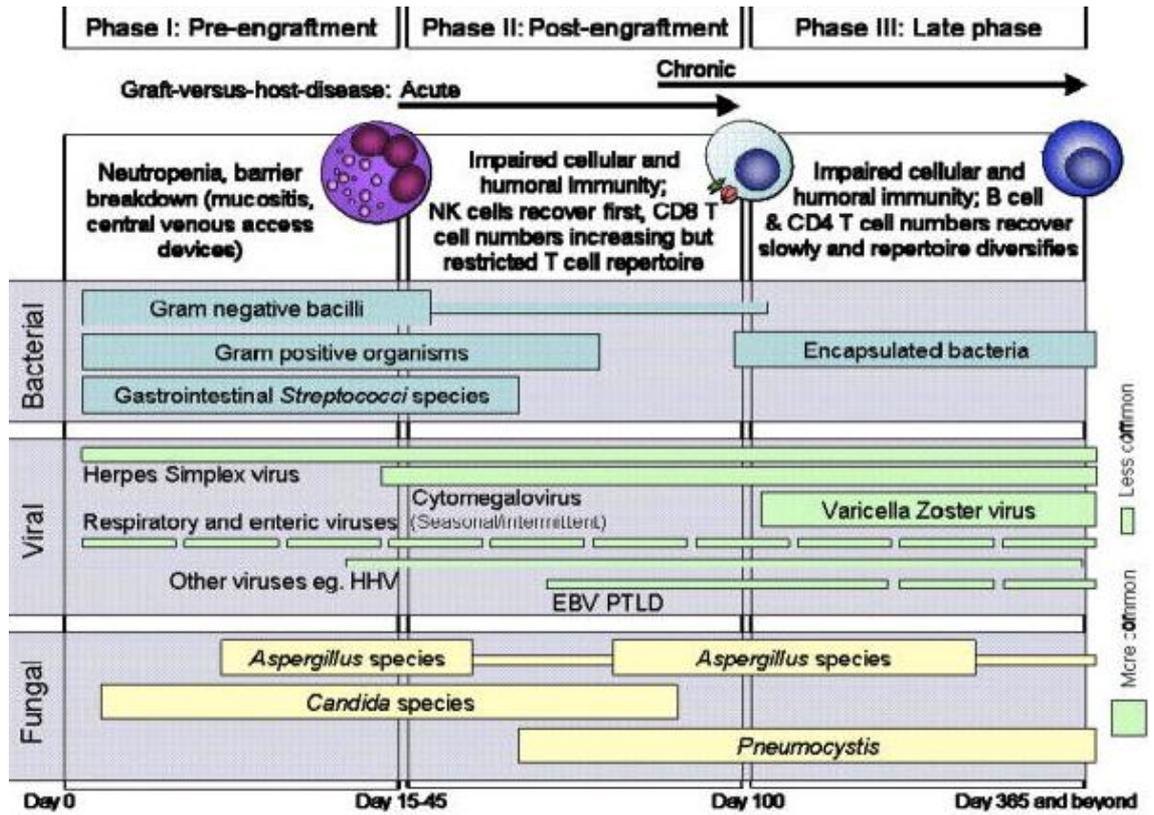


Imagen 2. Fases de las infecciones oportunistas en los pacientes receptores de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

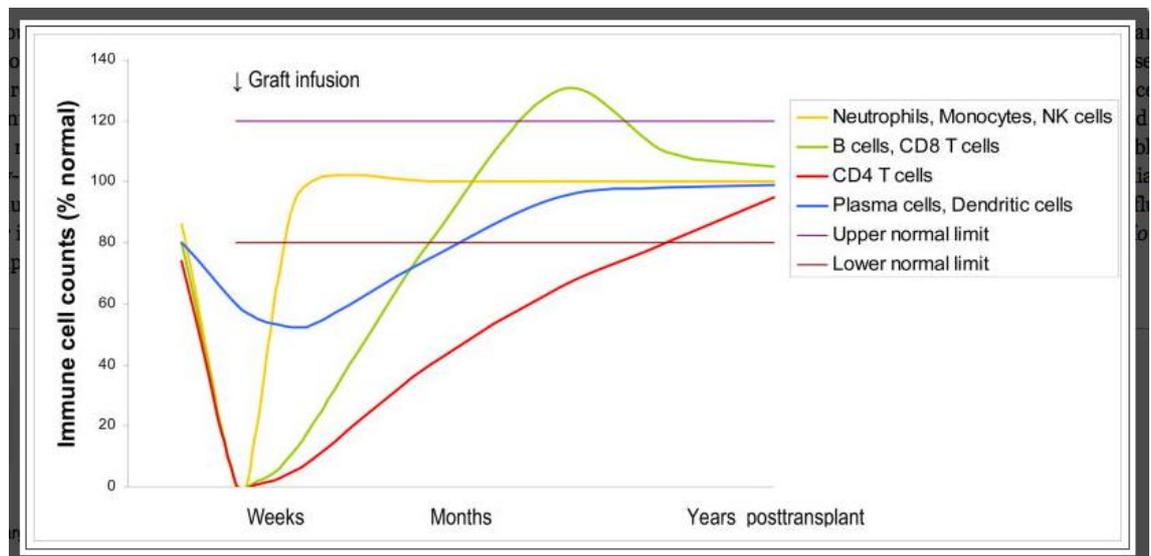


Imagen 3: Cinética de reconstitución inmune en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

NEUTROPENIA

La neutropenia es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de una infección fúngica. Los pacientes oncológicos reciben tratamiento con quimioterapia y radioterapia que impacta directamente sobre las células hematopoyéticas. Esto es aún más grave en aquellos pacientes con una neoplasia de origen hematológico, en los que el tratamiento irá dirigido directamente a este tipo de células. Otra cuestión importante es que estos tratamientos no sólo reducen el número absoluto de neutrófilos, sino también el funcionamiento de estos. Como ya se ha comentado previamente, tras las barreras cutáneo- mucosas del organismo, la primera defensa frente a la infección es la inmunidad celular, constituida principalmente por los macrófagos, los monocitos, y por supuesto, por los neutrófilos (24,25).

La neutropenia se define como un recuento de neutrófilos inferior a 500 células/mm³ o un recuento inferior a 1000 células/mm³ si es previsible que estos descendan por debajo de 500 células/mm³ en las siguientes 48 horas. Se considera neutropenia profunda la que está por debajo de 100 células/mm³ (42).

Pero no sólo tiene importancia la profundidad de la neutropenia, sino la rapidez de instauración de esta y su duración, lo que va directamente relacionado con la enfermedad de base y el tratamiento utilizado (43).

Por tanto, consideraríamos que el paciente de mayor riesgo es aquel diagnosticado de una leucemia aguda mieloblástica o un síndrome mielodisplásico de alto riesgo que recibe un tratamiento quimioterápico de inducción a la remisión, como son la mayor parte de los pacientes incluidos en este estudio.

NUEVOS TRATAMIENTOS PARA LA ENFERMEDAD DE BASE

Durante los últimos años hemos asistido a la aparición de nuevos tratamientos para las neoplasias de origen hematológico. Estos tratamientos pueden ser agentes quimioterápicos o nuevos anticuerpos monoclonales que

actúan de forma dirigida contra los antígenos de la célula neoplásica y la destruyen.

Los diferentes grupos que se han dedicado a estudiar los factores de riesgo para la infección fúngica han considerado que los pacientes tratados con análogos de purinas, fundamentalmente fludarabina, pero también pentostatina y cladribina, tienen un elevado riesgo de infección fúngica. En este caso, el uso de estos fármacos asocia, a la ya conocida neutropenia que puede durar 3-5 semanas, una supresión de la linfopoyesis, especialmente de los linfocitos T CD4+, que puede tener una duración de varios meses (17).

SOBRECARGA DE HIERRO

Un estudio de García-Vidal y colaboradores demostró que la sobrecarga férrica era un factor de riesgo para el desarrollo de infección fúngica en pacientes trasplantados independientemente de que el paciente se encontrara en el periodo precoz o tardío del trasplante (18).

Estudios posteriores, como el de Kontoyiannis y colaboradores, estudiaron de forma retrospectiva los depósitos de hierro en la médula ósea de pacientes hematológicos de alto riesgo. En este estudio pudieron demostrar que aquellos pacientes que habían desarrollado una infección fúngica tenían un aumento de los depósitos de hierro en la médula ósea (44).

Otro estudio retrospectivo de un grupo turco incluyó 22 pacientes sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos que habían desarrollado una infección fúngica. Una cifra de ferritina previa al trasplante por encima de 1000ng/ml demostró ser un factor de riesgo independiente para el desarrollo de dicha infección (45).

NUEVAS MODALIDADES DE TRASPLANTE

El trasplante de progenitores hematopoyéticos esta cada vez más extendido en la práctica clínica habitual. Existen numerosos tipos de trasplante en función de

la fuente de progenitores, el tipo de acondicionamiento y la manipulación del inóculo.

Según el tipo de donante podemos hablar de trasplante autólogo (usando progenitores propios de paciente), trasplante alogénico (usando progenitores de una persona distinta al paciente) y trasplante singénico (usando progenitores de una persona distinta pero genéticamente igual; este el caso de los gemelos univitelinos). En los últimos años se ha incorporado el trasplante haploidentico (usando progenitores de otra persona distinta al paciente con una compatibilidad del 50%). El trasplante haploidentico se relaciona con una mayor tasa de complicaciones infecciosas, probablemente por el retraso del injerto secundario a la intensa profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped, habitualmente usando ciclofosfamida post-trasplante.

En el caso de los trasplantes alogénicos podemos hacer una distinción en función de la relación de parentesco entre el donante y el receptor. Así tenemos donantes emparentados con el receptor (habitualmente hermanos HLA idénticos) y donantes no emparentados, altruistas, inscritos en un registro internacional. Los pacientes sometidos a un trasplante alogénico no emparentado tienen un manejo más complejo y una mayor tasa de complicaciones infecciosas.

Dependiendo de la similitud de los antígenos de histocompatibilidad (HLA) podemos hablar de trasplantes HLA idénticos y HLA no idénticos. Poseer diferencias HLA se relaciona con una mayor tasa de complicaciones infecciosas (46).

Tradicionalmente era la médula ósea la fuente de progenitores hematopoyéticos, pero en el momento actual disponemos de otras fuentes como son la sangre periférica, que es la mayoritaria, y el cordón umbilical. El uso de esta última fuente, probablemente por el retraso del injerto que conlleva, al disponer de una celularidad escasa en comparación con otras fuentes de progenitores, se relaciona con mayor número de complicaciones infecciosas (4, 47).

De forma previa al inóculo del injerto, se administra un tratamiento basado en quimioterapia y/o radioterapia cuyo fin es, por una parte, controlar la enfermedad de base, y por otra deplecionar la médula de forma que las nuevas células sean capaces de injertar en ella. Según el tipo de acondicionamiento, podemos hablar de trasplantes mieloablativos y trasplantes no mieloablativos, o más apropiadamente llamados, de intensidad reducida. Es cierto que a priori, las complicaciones infecciosas deberían ser más frecuentes en los trasplantes mieloablativos; sin embargo, la incorporación del trasplante de intensidad reducida ha permitido realizar este procedimiento a pacientes de mayor edad o con un mayor número de comorbilidades, que tienen por lo tanto un mayor riesgo de complicaciones de todo tipo, entre ellas las infecciosas. Además en estos pacientes la tasa de EICH es mayor, con el consiguiente uso de esteroides y altas tasas de infección fúngica con elevada mortalidad (48).

Por último debemos tener en cuenta si hay o no manipulación del inóculo, fundamentalmente con selección de células CD34+ o depleción de células T. Aquellos trasplante con manipulación se relacionan con una aumento de las complicaciones infecciosas (4, 49).

EL USO DE ESTEROIDES

El uso de esteroides está directamente relacionado con el riesgo de infección fúngica invasora. Son numerosos los estudios en diferentes grupos de pacientes que así lo demuestran.

En el caso de los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica o en pacientes asmáticos, el uso de esteroides por vía inhalada puede ser el único factor de riesgo para el desarrollo de la infección fúngica (50, 51). Además, estos pacientes suelen requerir con cierta frecuencia el uso de esteroides por vía sistémica en reagudizaciones de su enfermedad, que muchas veces están relacionadas con ingresos hospitalarios en unidades de cuidados intensivos lo que también se podría relacionar con el riesgo de desarrollo de una infección fúngica (52).

La razón por la que los esteroides aumentan el riesgo de una infección fúngica es que afectan al número y a la función de las diferentes células implicadas en la respuesta inflamatoria e inmune. Producen un descenso en los linfocitos y monocitos, alteran la inmunidad celular tipo T así como la actividad de los neutrófilos, y disminuyen la actividad de los monocitos y los macrófagos (53, 54).

Además, los esteroides favorecen el crecimiento de determinadas especies de aspergillus, fundamentalmente *Aspergillus Flavus* y *Aspergillus Fumigatus* (55).

En el caso del paciente hematológico de alto riesgo el uso de esteroides y su relación con la aspergilosis ha sido ampliamente estudiada en pacientes sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos que desarrollan enfermedad injerto contra huésped y son tratados con altas dosis de esteroides durante periodos de tiempo prolongados. Además, una vez desarrollada la infección fúngica, esta se comporta de manera más agresiva en pacientes bajo tratamiento esteroideo (9, 56, 57, 58).

Un estudio del grupo francés demostró que el uso de esteroides a dosis de más de 2mg/Kg de peso durante más de 2 semanas aumentaba de forma significativa el riesgo de muerte por una aspergilosis invasora (12).

Otro estudio valoró los factores de riesgo para el desarrollo de aspergilosis en pacientes sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en la fase post-injerto. En este estudio se demostró que la presencia de enfermedad injerto contra huésped aguda grado 3-4 fue el factor de riesgo más potente para el desarrollo de esta patología, y es probable que esto se deba al uso de esteroides en su tratamiento. De hecho, realizaron un análisis independiente de las dosis usadas de esteroides, demostrando que dosis entre 0,25 y 1 mg/Kg de prednisolona durante más de 10 semanas aumentaban el riesgo de aspergilosis, siendo este especialmente alto en los pacientes que recibían dosis mayores de 1mg/Kg de prednisolona (11).

Además la mortalidad relacionada con la aspergilosis invasora es mayor en la fase tardía del trasplante que en la fase precoz. Esto se puede explicar porque en la fase temprana el factor predisponente más importante suele ser la neutropenia, que tiene una duración de unos días; sin embargo, en la fase tardía la aspergilosis se relaciona fundamentalmente con la aparición de la enfermedad injerto contra huésped y su tratamiento con las altas dosis de esteroides cuya duración puede ser de semanas o meses (14).

1.3.- ASPERGILLUS

En 1729 el aspergillus fue catalogado por primera vez por el biólogo italiano Pier Antonio Micheli. Micheli usó el nombre "Aspergillum" por parecerse la cabeza esporulante del hongo al instrumento religioso usado para dispersar o asperjar el agua bendita. Esta descripción figura en su obra "Nova Plantarum Genera" y tiene una gran importancia histórica, al ser reconocido como el punto inicial de la ciencia de la micología.

Es Virchow quien en 1856 publica las primeras descripciones microscópicas completas del microorganismo (59).

En cuanto a las distintas especies de aspergillus, Link fue el primero en describir el *Aspergillus flavus* en 1809. En 1926 Thom y Chuch clasificaron el género y aceptaron 69 especies. Ya en el siglo XX, en 1945, Thom y Raper habían aceptado 80 especies.

En 1965 esta clasificación se amplió, quedando aproximadamente unas 150 especies del género *Aspergillus* de las cuales, solamente unas 20 especies son patógenas para el hombre.

Este género está estrechamente relacionado con las especies de *Penicilium*, aunque conformen un género aparte.

Tradicionalmente se ha incluido al género *Aspergillus* dentro de los hongos

Deuteromicetos (hongos imperfectos) porque sólo se conocía su forma asexual (anamorfa) y al carecer de forma sexual (teleomorfa), no podían ser clasificados como Ascomicetos, Basidiomicetos o Zigomicetos (60). En la actualidad se conoce su forma sexual por lo que se incluyen en los Ascomicetos.

Aspergillus, es un hongo filamentoso formado por hifas tabicadas (septos) que se suelen ramificar dicotómicamente (por lo general en ángulo agudo).

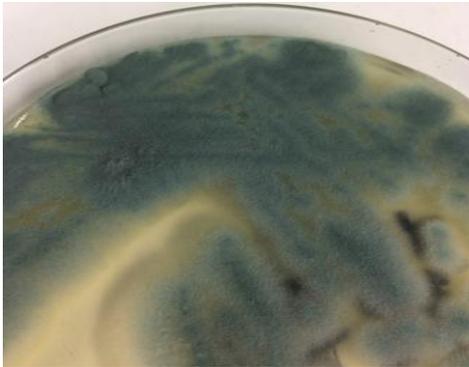


Imagen 4. *Aspergillus fumigatus*.



Imagen 5. *Aspergillus terreus*.



Imagen 6. *Aspergillus fumigatus* en azul de algodón.

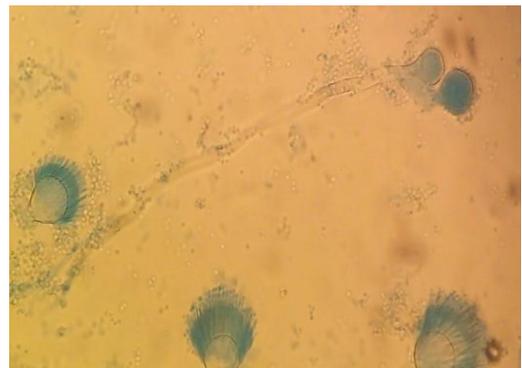


Imagen 7. *Aspergillus terreus* en azul de algodón.

Las enfermedades causadas por este hongo se presentan cuando el hongo se reproduce asexualmente, siendo esta forma de reproducción la más frecuente en *Aspergillus*.

La reproducción asexual se lleva a cabo por conidios, que son esporas asexuales no flageladas producidas en hifas especializadas llamadas conidióforos. Los conidióforos terminan en un ensanchamiento llamado vesícula, rodeada por una corona de fiálides en forma de botella insertada sobre la vesícula. De las fiálides se desprenden los conidios o conidiosporas.

Aspergillus fumigatus es la especie que con más frecuencia causa enfermedad hombre (90% de los casos), seguida de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus nidulans*, siendo el resto de las especies patógenas en casos excepcionales.

Aunque la mayoría de las especies de *Aspergillus* son incapaces de crecer a 37°C, existen diferencias entre estas especies. *Aspergillus fumigatus* es la especie que crece con mayor rapidez a esa temperatura, y esta velocidad puede aumentar ante la presencia de esteroides.

Aspergillus es un microorganismo ubicuo en cuanto a su distribución. Es bien conocida su predilección por las zonas en las que abunda la vegetación y el gran peligro de dispersión en los momentos en los que se producen movimientos de tierras, obras o talas de árboles. Desde estas localizaciones, las conidias son liberadas al aire en forma de aerosoles siendo el árbol traqueobronquial y los senos paranasales las puertas de entrada principales.

Parte de la patogenicidad de *Aspergillus fumigatus* se deriva del pequeño tamaño de sus esporas (3-5 μ m), lo que le permite entrar en el alveolo pulmonar. Estas esporas están recubiertas de una capa proteica hidrofóbica que les permite soportar condiciones atmosféricas extremas. Además, *Aspergillus fumigatus*, tiene una mayor capacidad de adherencia gracias a proteínas como el fibrinógeno o la laminina. Una vez adherido al epitelio produce una serie de proteasas, catalasas,

ribotoxina, fosfolipasas, hemolisinas, gliotoxina y aflatoxina. Concretamente la gliotoxina es capaz de reducir la fagocitosis de los macrófagos y neutrófilos.

Recientemente se ha publicado una de las claves que explican la virulencia de este hongo y es su capacidad para obtener zinc dentro del organismo hospedador. El zinc es necesario para una gran diversidad de procesos metabólicos y para la división celular, incluida la de los hongos patógenos como aspergillus. El zinc libre es muy escaso en los tejidos vivos, suele estar unido a proteínas, pero los patógenos deben obtener este zinc del hospedador. Este estudio ha demostrado la importancia de una serie de genes que codifican proteínas transportadoras de zinc, de modo que el hongo es incapaz de invadir los pulmones de ratones infectados cuando le faltan estos genes y los animales permanecen sanos.

Pero además es necesario que el hongo sea capaz de prosperar en el pulmón. Los neutrófilos producen una proteína llamada calprotectina que parece interferir en el crecimiento de aspergillus, al ser capaz de secuestrar el zinc dificultando de esta manera la obtención de este elemento por parte del hongo (61).

El periodo de incubación de la enfermedad no está claro, y depende, tanto de la cantidad del inóculo, como del estado de inmunosupresión del huésped. Además algunos pacientes pueden estar ya colonizados por Aspergillus a su llegada al hospital. Existe mucha variabilidad en el periodo de incubación de los casos descritos y puede ser desde 3 días a 3 meses (62).

1.4.- EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN FÚNGICA

Ante un paciente hematológico el clínico debe decidir cuál va a ser su estrategia a la hora de enfrentarse a la infección fúngica. Para ello ha de considerar los factores de riesgo de ese paciente concreto en ese momento de su enfermedad, pero también debe contar con la epidemiología local de ese centro y de los medios, tanto logísticos (ej. Filtros HEPA) como diagnósticos de los que se vale esa unidad

concreta y que puede ofrecer al paciente. Partiendo de estas premisas, existen 4 grandes tipos de tratamiento antifúngico.

- Tratamiento profiláctico: consiste en administrar un tratamiento antifúngico frente al patógeno que queremos cubrir, con la máxima eficacia y la mínima toxicidad. En este momento la probabilidad de tener una infección fúngica es muy remota, por lo que estaremos sobre-tratando a pacientes que nunca desarrollarán una infección fúngica. No obstante, es de uso habitual realizando una selección de pacientes, y administrándolo sólo a aquellos de alto riesgo de infección fúngica. Diferentes estudios apoyan que cuando la incidencia de la infección fúngica es menor de un 5% no es apropiado utilizar una profilaxis; si la incidencia es mayor, la profilaxis es coste- efectiva, pero hay que tener en cuenta una serie de consideraciones como la tolerabilidad, las interacciones medicamentosas, la reducción de la sensibilidad de los test biológicos, la posible necesidad de monitorización de fármacos y las resistencias que pueden crear (63).

- Tratamiento empírico: consiste en administrar un tratamiento antifúngico, en general con amplia cobertura fúngica, en pacientes con fiebre persistente de 3 a 7 días de duración sin documentación microbiológica. Esta estrategia es usualmente utilizada, sobre todo en aquellos centros que no disponen de herramientas diagnósticas de alta sensibilidad en la infección fúngica. Está apoyada por dos estudios de la década de los años 80 y revisada en múltiples estudios más actuales que demostraron la reducción en la incidencia y la mortalidad de la infección fúngica (64, 65).

En el momento actual el tratamiento empírico está recomendado en pacientes de riesgo de infección fúngica alto o intermedio, con fiebre persistente de más de 3 días a pesar de tratamiento antibiótico de amplio espectro. Sin embargo los grados de recomendación difieren según las diferentes guías, siendo de BII en las guías ECIL-3 (66) y variando en las guías IDSA desde AI si la neutropenia es mayor de 7 días, a AIII si el riesgo de infección fúngica es bajo (67).

La intención de esta estrategia es tratar la infección en un periodo temprano, cuando el único síntoma es la fiebre. Sin embargo, puede tener limitaciones importantes, como en los pacientes que no presentan fiebre, por ejemplo aquellos que están bajo tratamiento con altas dosis de esteroides. Además sobre-tratamos a pacientes sin que tengan una infección fúngica, con los costes tanto económicos como personales que ello conlleva (63).

En un estudio randomizado realizado en pacientes de alto riesgo de infección fúngica se intentó comparar el inicio precoz de Voriconazol frente al placebo en pacientes con fiebre persistente (más de 96 horas). La estrategia de tratamiento empírico no demostró reducir la tasa de infecciones de brecha. Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la incidencia de infecciones fúngicas ni en el tiempo de aparición de estas. Por todo ello no parece que la estrategia de tratamiento empírico mejorara la supervivencia de estos pacientes (68).

- Tratamiento precoz o dirigido por pruebas: consiste en realizar pruebas para un diagnóstico precoz de la infección y administrar un tratamiento en el caso de que estas pruebas tengan un resultado positivo. Algunas de estas pruebas son microbiológicas y otras son pruebas de imagen, siendo la combinación de ambas la estrategia más utilizada. Puede ser útil en aquellos pacientes de alto riesgo que no presenten fiebre, a diferencia de la estrategia de tratamiento empírico. Las pruebas realizadas para el inicio de un tratamiento precoz serán revisadas de forma independiente en otro capítulo.

El tratamiento empírico tiene como fin realizar un tratamiento muy temprano, pero ello no quiere decir que no se puedan realizar pruebas diagnósticas. Otra posible estrategia sería iniciar el tratamiento empírico mientras se realizan las pruebas diagnósticas y, en el caso de que estas sean negativas, suspender el fármaco (63).

- Tratamiento dirigido: es la administración de un tratamiento cuando la infección fúngica ya está diagnosticada, es decir, cuando tenemos una certeza de infección del 100%.

Los diferentes estudios apoyan la realización de una buena profilaxis a aquellos pacientes considerados de alto riesgo. Tampoco se pone en duda que una vez diagnosticada una infección fúngica debemos tratarla con un agente antifúngico efectivo. Sin embargo, entre las estrategias de tratamiento empírico y tratamiento precoz existe mucha controversia siendo fundamental la experiencia de centro y su disponibilidad de técnicas de diagnóstico precoz.

El inicio precoz del tratamiento es esencial (69). Un estudio demostró que un retraso de 8 horas en el tratamiento aumentaba la mortalidad por aspergilosis invasora un 200% (70). Sin embargo existen diferentes opiniones sobre la estrategia terapéutica ideal, si precoz o empírica.

Un estudio randomizado intentó comparar ambas estrategias, no encontrando diferencias significativas entre ambas excepto para los pacientes con leucemia aguda mieloblástica en inducción, en los que la estrategia de tratamiento empírico demostró una mejor supervivencia. Pero también debemos tener en cuenta que la estrategia de tratamiento empírico somete a más pacientes a la posible toxicidad inducida por fármacos que es probable que no precisen. Así, en este estudio un 61% de los pacientes del brazo de tratamiento empírico recibieron antifúngicos, comparado con un 39% en el brazo de tratamiento precoz (71). Tampoco Hebart y colaboradores consiguieron demostrar diferencias significativas entre el tratamiento empírico y el tratamiento precoz basado en la PCR fúngica en cuanto a incidencia de IFI y mortalidad, aunque el grupo de tratamiento precoz tenía una supervivencia a los 30 días ligeramente mayor (72).

La estrategia de tratamiento precoz también ha sido defendida mostrando ser eficaz y segura, con unas tasas de infección fúngica invasora y mortalidad relacionada con esta asumibles (73). Además esta estrategia supone una reducción de gastos innecesarios en antifúngicos empíricos, sin que esto tenga una clara

desventaja en la supervivencia de los pacientes, por lo que podría ser la estrategia de elección en pacientes hematológicos de alto riesgo siempre y cuando se disponga de los medios diagnósticos necesarios (68, 74).

No obstante la estrategia de tratamiento precoz tiene múltiples limitaciones. Un gran problema es el tiempo que el clínico tarda en recibir el resultados de las pruebas diagnósticas y los conocidos problemas de la sensibilidad de la determinación del antígeno de galactomanano en determinadas situaciones que serán explicadas posteriormente. Otro problema es la escasa especificidad de los estudios radiológicos, que no detectan el agente causal, por lo que no siempre nos ayudan a discernir entre las infecciones de origen fúngico, otras infecciones o incluso toxicidad medicamentosa.

1.5.- TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS DE LA INFECCIÓN FÚNGICA POR ASPERGILLUS

La infección en el paciente hematológico de alto riesgo es una urgencia médica. Estos pacientes tienen diferentes tipos de inmunosupresión que los hacen susceptibles a diferentes tipos de infecciones.

Habitualmente la fiebre puede ser el único síntoma, dado que no tienen capacidad de realizar una respuesta inflamatoria adecuada que nos informe sobre una determinada focalidad infecciosa.

También existe la posibilidad de que la fiebre no sea de origen infeccioso. Es bien conocida la fiebre de origen tumoral en las neoplasias hematológicas, pero también diferentes fármacos, como por ejemplo la citarabina, o la transfusión de componentes sanguíneos puede ser origen de la fiebre. No obstante, la fiebre en un paciente inmunodeprimido debe ser considerada y tratada como si fuera de origen infeccioso. De este modo, en las unidades de Hematología, ante la presencia de un paciente con fiebre habitualmente se realizan cultivos microbiológicos y se inicia una cobertura antibiótica de amplio espectro adecuada a la epidemiología, las resistencias bacterianas locales y al tipo de paciente.

En el caso de las infecciones de origen fúngico los medios habituales de cultivo no son adecuados y el crecimiento del hongo suele ser más lento.

Las técnicas usadas para el diagnóstico de la infección fúngica por *aspergillus* son:

EXAMEN MICROSCÓPICO

El examen microscópico tiene importantes limitaciones, entre ellas su baja sensibilidad. La visión de estructuras fúngicas es mayor cuando son muy abundantes en el tejido, lo cual suele ocurrir en estados avanzados de la infección. Además no siempre es posible identificar la especie causante de la infección, lo que puede tener importantes consecuencias a la hora de iniciar un tratamiento antifúngico específico. En todo caso no es una técnica de diagnóstico precoz, pero no es infrecuente que sea la única técnica que nos permite detectar la infección (75).

En una visión del microscopio pueden ser observados filamentos tabicados, largos, con ramificaciones dicotómicas en ángulo agudo. Estos hallazgos pueden corresponder también a otros hongos como *Fusarium* y *Scedosporium* por lo que se requiere del cultivo para la confirmación.

CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS

Habitualmente cuando obtenemos un crecimiento fúngico el paciente ya suele estar diagnosticado por otros medios y se ha iniciado un tratamiento dirigido. Las guías recomiendan la extracción de muestras mediante biopsias, pero esto no es tan sencillo en los pacientes inmunodeprimidos, que habitualmente tienen trombopenia severa, pueden asociar coagulopatía o presentan insuficiencia respiratoria (76). Una opción más sencilla y utilizada con relativa frecuencia es la punción aspiración con aguja fina de las lesiones, que tiene una tasa de complicaciones menores que la biopsia, pero aún así requiere una localización adecuada de la lesión, de modo que sea accesible con control radiológico. En este caso el rendimiento diagnóstico suele ser mayor que con otros métodos (77).

El cultivo de esputo es una de las herramientas más utilizadas, pero de escaso valor diagnóstico. *Aspergillus* es un contaminante habitual de los laboratorios, por lo que puede ser difícil diferenciar entre el crecimiento por la infección o por la contaminación ambiental.

Una alternativa al cultivo de esputo es el cultivo del líquido extraído en lavado bronco-alveolar. El lavado es una técnica sencilla y rápida que no exige cifras de plaquetas tan elevadas como en el caso de la biopsia, y tiene una mayor sensibilidad que el cultivo de esputo para el diagnóstico de la infección fúngica por *aspergillus*. Sin embargo, su realización suele ser bastante tardía y está limitada por una función respiratoria adecuada que no suele ser lo habitual en pacientes con neumonías de origen fúngico (78, 79, 80, 81).

El cultivo de sangre o hemocultivo es excepcionalmente diagnóstico de la infección fúngica por *aspergillus*. Habitualmente está producido por una contaminación, y en aquellas aspergilemias verdaderas, su aparición es muy tardía en el desarrollo de la infección y por lo tanto de escaso valor diagnóstico.

Dado que los medios habituales de diagnóstico no parecen permitir el diagnóstico precoz de la infección fúngica, se han desarrollado diferentes técnicas que pretenden diagnosticarla en estadios tempranos, permitiendo así un inicio precoz del tratamiento antifúngico, con la intención de obtener mejores tasas de supervivencia.

Estas técnicas surgen en un intento de diagnosticar la infección en un estado silente, a imagen del diagnóstico precoz de la infección por citomegalovirus mediante la antigenemia, y posteriormente mediante la monitorización de la PCR de dicho virus.

El diagnóstico precoz de la infección fúngica por *aspergillus* habitualmente se basa en la combinación de una técnica radiológica, como es la Tomografía axial computarizada de alta resolución (TACAR) y la determinación de diferentes

antígenos de origen fúngico, como son el 1-3 β - glucano o el galactomanano. La combinación de estas pruebas está ampliamente extendida en la práctica habitual de las unidades de Hematología, y han sido incluidas como criterios diagnósticos de la infección fúngica por aspergillus por el grupo EORTC/MSG (82).

TACAR

La radiografía de tórax convencional es una técnica insuficiente para realizar un diagnóstico precoz de la infección fúngica por aspergillus en la mayor parte de los pacientes hematológicos de alto riesgo, dada la escasa capacidad que estos tienen de hacer una respuesta inflamatoria adecuada que pueda ser visible en una radiología convencional.

La tomografía axial computarizada de tórax de alta resolución permite mejorar el diagnóstico en estos pacientes. Es una técnica basada en la realización de cortes con una distancia menor, aproximadamente de 1mm, a diferencia de los 8 mm habituales, lo que permite localizar lesiones de menor tamaño.

Dado que la mayor parte de las infecciones por aspergillus se localizan en el pulmón parece evidente que es necesario disponer de una buena técnica de imagen para esa zona, especialmente en el caso de que radiografía de tórax convencional no muestre alteraciones.

Un estudio prospectivo llevado a cabo en pacientes con neutropenia febril demostró que hasta un 60% de los pacientes con radiografía de tórax normal, presentaban infiltrados pulmonares cuando se les realizaba un TACAR y esto permitió adelantar el diagnóstico unos 5 días. Además se pudieron realizar diferentes procedimientos diagnósticos como biopsias, lavados bronco-alveolares y punciones aspiraciones con aguja fina, lo cual hizo posible un diagnóstico microbiológico en el 54% de los pacientes. En los pacientes neutropénicos la sensibilidad fue del 87%, la especificidad del 57%, el valor predictivo positivo del 54% y el valor predictivo negativo del 88%. Es de destacar, que en el grupo de pacientes sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos la sensibilidad se mantuvo en un 88% siendo el valor predictivo negativo del 97%

(83). Es decir, posee una alta sensibilidad y un elevado valor predictivo negativo, que son las características esenciales de una técnica de diagnóstico precoz. Esta es una técnica que además puede tener especial importancia en pacientes a los que no es sencillo realizar procedimientos invasivos (84).

Existen determinados hallazgos en el TACAR que son muy sensibles y específicos de la infección fúngica. Uno de ellos es el signo del halo, con una sensibilidad del 72,7% y una especificidad del 100%. Además es un signo precoz, a diferencia de los que podemos hallar en otras técnicas como la resonancia magnética nuclear (85). Sin embargo, el signo del halo es transitorio a lo largo de la evolución de la aspergilosis invasora. Un estudio demostró que estaba presente en el 92% de las aspergilosis probables o probadas antes de su diagnóstico y que permitía adelantar este una media de 5,1 días (86). Pero, ¿en qué momento aparece y en qué momento desaparece? Para ello, el mismo autor realizó TACAR seriados a lo largo de la evolución de la infección fúngica demostrando que el signo del halo estaba presente en 95% de los pacientes en el día 0, descendiendo progresivamente al 68% en el día 3, al 22% en el día 7 y al 19% en el día 14. Dado que el signo del halo ha demostrado ser tan sensible y con un valor predictivo negativo tan elevado, y una vez demostrado que pierde su validez a lo largo de la evolución de la infección, parece razonable que el TACAR sea una técnica que debe realizarse de forma precoz ante la sospecha de una aspergilosis invasora (87).

Además del signo del halo existen otros hallazgos radiológicos que también han sido considerados como criterios radiológicos de infección fúngica probable por la EORTC/MSG. Estos son las lesiones densas, bien circunscritas con o sin el signo del halo, el signo del aire-creciente y la cavitación (82).

1-3 β - D-GLUCANO

El 1-3 β -D glucano (BG) es un polisacárido presente en la pared celular de una gran variedad de hongos excepto en los zigomicetos (*Mucor spp.* y *Rhizopus spp.*) y *Cryptococcus spp.* (88). La presencia de BG en la pared *Cryptococcus spp.* se ha discutido en diferentes estudios y parece que está presente, pero en menores concentraciones que en el caso de *Candida spp.* y *Aspergillus spp.* (89).

El BG puede ser detectado, ya que es capaz de activar la cascada de la coagulación del cangrejo mediante su unión a la subunidad α del factor G. Si esta reacción se asocia a un sustrato cromogénico, puede ser visible por espectrofotometría, de modo que se puede detectar y medir su valor (90).

Se trata de un test diagnóstico panfúngico, que ha sido considerado como criterio diagnóstico de la infección fúngica invasora por los criterios de la EORTC/MSG de 2008 para todo tipo de pacientes (82). Aunque ha sido menos utilizado que el galactomamano, su inclusión en estos criterios puede incrementar su uso (75).

Existen diferentes test que se han comercializado para la detección del BG basados en diferentes sustratos. Los dos más conocidos son el Fungitec-G, de Seikagaku, que usa enzimas del *Tachipleus tridentatus* y el GlucateLL o FungiteLL, de Associates of Cape Cod, Inc. que utiliza como sustrato las enzimas del *Limulus polyphemus*. Estudios comparativos entre estos dos test sugieren el GlucateLL es menos reactivo (unas 2,5 veces menos) que el Fungitec-G.

Con respecto al punto de corte, los primeros estudios habían sugerido un punto de corte de 20pg/ml para ser considerado positivo (91). Sin embargo, estudios más recientes del mismo grupo sugieren que se puede aumentar el punto de corte a 30 pg/ml, por debajo del cual se podría descartar la presencia de una infección fúngica por un hongo que produzca BG, mientras por encima de 80 pg/ml la probabilidad de una infección fúngica superaría el 90% (92). Aunque el punto de corte recomendado en el caso de la infección por *Candida spp.* es de 60 pg/ml, en el caso del resto de las infecciones fúngicas, entre ellas la aspergilosis invasora, el punto de corte no está tan bien establecido (90).

Los valores de Sensibilidad (S), Especificidad (E), Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) varían en función del hongo causante de la infección y del punto de corte seleccionado.

En el caso de la aspergilosis invasora existen varios estudios que nos informan sobre la validez de esta prueba diagnóstica. El primero refiere una sensibilidad del 80% para un valor de corte de 60 pg/ml (93). En un segundo estudio los valores son Sensibilidad: 87,5%, Especificidad: 89,6%, Valor Predictivo Positivo: 70%, Valor Predictivo Negativo: 96,3%, todo ello para un punto de corte de 120 pg/ml (94). Un estudio algo más reciente de 871 pacientes, 228 de ellos con infección fúngica probable o probada, mostraba una sensibilidad algo menor, de un 64%, y una especificidad del 84% para un valor de corte de 80pg/ml (95).

En 2008 surge un nuevo test, el test β -glucano, de Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japón, que es una técnica colorimétrica con un límite de detección más bajo que el Fungitell. Con un valor de corte de 7pg/ml obtiene una sensibilidad del 63%, una especificidad del 96%, un Valor Predictivo Positivo del 79% y un Valor Predictivo Negativo del 91%.

Esta técnica tiene mayor utilidad en pacientes no hematológicos. El uso de tratamiento antifúngico profiláctico o empírico no parece disminuir su sensibilidad, pero el uso de albúmina, inmunoglobulinas o la hemodiálisis se asocia a la aparición de resultados falsos positivos (75).

GALACTOMANANO

El Galactomanano es un componente de la pared celular de *Aspergillus spp.* Otros hongos filamentosos como *Paecilomyces spp.* y *Penicilium spp.* pueden tener galactomanano en su pared celular, pero en menores cantidades que *Aspergillus spp.*, por lo que la cuantificación de este componente fúngico puede ser considerado como un método específico de diagnóstico de la aspergilosis (75).

Se trata de un test ELISA en sándwich (Platelia *Aspergillus* EIA; Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK). Esta técnica utiliza el anticuerpo monoclonal EB-A2, que reconoce las cadenas laterales de galactofuranosina de la molécula de galactomanano (96). Aunque tiene sus limitaciones, ha sido uno de los mayores

avances en el diagnóstico precoz de la infección fúngica por *Aspergillus* de los últimos años.

El galactomanano puede anticipar un diagnóstico basado en el examen radiológico o el aislamiento microbiológico de *aspergillus* aproximadamente 8-9 días. Además precede el inicio del tratamiento en un 83% de los pacientes. Puede ser especialmente útil en pacientes que presentan condiciones que podrían enmascarar el diagnóstico, como por ejemplo en pacientes bajo tratamiento esteroideo en los que la fiebre puede estar ausente (97).

En la tabla 2 podemos observar una selección de algunos estudios incluidos en un meta-análisis llevado a cabo en 2006 por Pfeiffer, que estimó una media de sensibilidad del 71% y una media de especificidad del 89%. La sensibilidad aumentó a un 82% y la especificidad se mantuvo en un 86% en aquellos pacientes sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (98).

AUTOR	AÑO	TIPO PACIENTE Y DISEÑO DEL ESTUDIO	CORTE AGA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
Becker y col. (99)	2003	Onco-hematológicos adultos Prospectivo	≥ 1 2 AGA	46%	84%
Hercules C y col. (100)	2003	Onco-hematológicos Edad desconocida Prospectivo	$\geq 0,5$ 2 AGA	81%	89%
Bretagne y col. (101)	1997	Onco-hematológicos Todas la edades Prospectivo	≥ 1 2 AGA	100%	77%
Bretagne y col. (102)	1998	Trasplantados Todas las edades Retrospectivo	≥ 1 2 AGA	78%	78%

Buchheidt y col. (103)	2004	Onco- hematológicos Adultos Prospectivo	≥1,5 2 AGA	33%	99%
Costa y col. (104)	2002	Onco- hematológicos Adultos Prospectivo	≥1,5 1 AGA	100%	100%
Herbrecht y col. (105)	2002	Onco- hematológicos Todas las edades Prospectivo	≥1,5 1 AGA	32%	93%
Jarque y col. (106)	2003	Onco- hematológicos Adultos Prospectivo	≥1,5 2 AGA	67%	97%
Kami y col. (107)	2001	Onco- hematológicos Adultos Prospectivo	≥1,5 2 AGA	58%	97%
Machetti y col. (108)	1998	Trasplantados Edad desconocida Prospectivo	≥1,5 2 AGA	75%	83%
Martens y col. (109)	1999	Onco- hematológicos Todas las edades Prospectivo	≥1 2 AGA	93%	95%
Maertens y col. (97)	2002	Trasplantados Adultos Porspectivo	≥1 2 AGA	85%	92%
Maertens y col. (110)	2004	Onco- hematológicos Todas las edades Prospectivo	≥0,5 2 AGA	97%	98%
Marr y col. (111)	2004	Onco- hematológicos Todas las edades Prospectivo	≥1 1AGA	54%	74%
Moragues y col. (112)	2003	Onco- hematológicos Adultos Retrospectivo	≥1,5 2 AGA	50%	98%

Pazos y col. (113)	2003	Oncohematológicos Edad no conocida Prospectivo	≥1,5 2 AGA	88%	98%
Pinel y col. (114)	2003	Onco-hematológicos Todas las edades Prospectivo	≥1 2 AGA	50%	98%
Rovira y col. (115)	2004	Trasplantados Adultos Prospectivo	≥1,5 1 AGA	67%	97%
Suhalian y col. (116)	2001	Trasplantados Adultos Prospectivo	≥1,5 1 AGA	77%	93% (AI probada)
Suhalian y col. (117)	1996	Trasplantados Edad desconocida Prospectivo	≥1 1 AGA	76%	72% (AI probada)
Ulusakayra y col. (118)	2000	Onco-hematológicos Todas las edades Retrospectivo	≥1 1 AGA	69%	95%
Verweij y col. (119)	1995	Onco-hematológicos Adultos Retrospectivo	≥1 2 AGA	83%	65%
Yoo y col. (120)	2005	Onco-hematológicos y Trasplantados Adultos Prospectivo	≥0,5 2 AGA	86%	78%

Tabla 2. Meta-análisis de estudios del uso del galactomanano

Diferentes estudios han pretendido comparar el galactomanano con el 1-3 β -glucano. Aunque existen estudios que no muestran diferencias importantes entre ambas técnicas, sí señalan que la positivización del BG es más temprana que el galactomanano (94).

La sensibilidad del galactomanano ha sido comparada con la del (1,3) β -D-glucano, siendo más elevada en este último (38% versus 67%). Además parece que

el galactomanano es más sensible para otras especies de *Aspergillus* que para *Aspergillus fumigatus*, que es causante de la mayor parte de las aspergilosis en pacientes hematológicos de alto riesgo. En cuanto a la especificidad es mayor para el galactomanano que para el (1,3) β -D- glucano (100% versus 90%) así como su valor predictivo positivo (100% versus 88%) (121).

Los estudios sugieren diferentes puntos de corte para considerar un galactomanano como positivo. Existe un meta-análisis que no muestra diferencias entre los valores de corte usados con mayor frecuencia; es decir, 0,5, 1 y 1,5 (122). Maertens y colaboradores definen en 2004 los valores de galactomanano que se utilizan en el momento actual y son, bien un valor estático $>0,8$ o valores correspondientes a dos muestras consecutivas $>0,5$ (110). Marr y colaboradores, unos meses después, confirman que un valor de galactomanano $>0,5$ puede ayudar a realizar un diagnóstico más precoz de la infección fúngica por *aspergillus*, incrementando la sensibilidad del test con una mínima pérdida de la especificidad (111).

Pero la determinación del galactomanano puede ser útil, además de para el diagnóstico, para el seguimiento de la infección fúngica por *aspergillus*. Algunos estudios sugieren que los pacientes con leucemia aguda mieloblástica diagnosticados de una aspergilosis invasora y tratados, que presentan una elevación del galactomanano >1 pueden ser considerados como un fracaso terapéutico y por ello recomiendan realizar un cambio de tratamiento. Otros estudios sugieren que el valor >2 o la falta de descenso del galactomanano en el plazo de una semana empeora el pronóstico (123). Un estudio de Maertens y colaboradores demostró la excelente correlación entre la evolución de los valores del galactomanano y la respuesta al tratamiento antifúngico, la supervivencia de los pacientes y los hallazgos en la autopsia de aquellos que fallecieron (124).

Sin embargo, la determinación del galactomanano no es útil en todo tipo de pacientes. En los pacientes no neutropénicos, su sensibilidad puede descender hasta el 50% (125), lo que puede ser un problema en el diagnóstico precoz de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica o en pacientes ingresados

en unidades de cuidados intensivos, que son pacientes en los que la infección fúngica por *Aspergillus* es un problema emergente.

Además puede dar lugar a resultados falsos positivos en determinadas situaciones, la más conocida es en pacientes que están siendo tratados con beta-lactámicos, especialmente con Piperacilina-Tazobactam (126). Dado que la positivización del galactomanano en estos pacientes depende de la relación entre el tiempo de la administración del fármaco y la extracción de la muestra para la determinación del galactomanano, recomiendan la extracción de la muestra justo antes de la administración de este antibiótico (127). También puede haber resultados falsos positivos en niños colonizados por *Bifidobacterium spp.* y en neonatos (128). Otras posibles causas de falsos positivos serían reacciones cruzadas con otros hongos, el uso de inmunoglobulinas, hemoderivados, el plasma-Lyte (fluido usado para hidratar) o drogas inmunosupresoras como la ciclofosfamida (129, 130).

Un problema adicional del AGA son los falsos negativos, que se sitúan entre el 8 y el 10% según Maertens y colaboradores en pacientes con aspergilosis invasora. La causa se desconoce, pero se apuntan varias hipótesis, como la encapsulación del proceso infeccioso que impediría la liberación de galactomanano en los líquidos orgánicos, el grado de angioinvasión, que podría ser menor en pacientes no neutropénicos, inmunocomplejos que impidan la detección de galactomanano en pacientes con anticuerpos frente a *Aspergillus spp.* o que el tratamiento antifúngico podría suprimir la producción de galactomanano por el hongo (109).

Dadas las limitaciones de la determinación del galactomanano en suero se ha propuesto la determinación de dicho antígeno en otras muestras biológicas. La aspergilosis invasora afecta frecuentemente al pulmón, por lo que su determinación en el líquido del aspirado tras un lavado bronco-alveolar podría ser una alternativa. El grupo de Maertens realizó un estudio prospectivo con 110 pacientes a los que les realizó determinación de galactomanano en el líquido del lavado, además de los estudios habituales (cultivos microbiológicos, galactomanano en suero y TACAR). El galactomanano en lavado mostró una alta

sensibilidad (88%) y especificidad (87%). De los 26 casos de aspergilosis probada, 11 se diagnosticaron gracias al galactomanano en el lavado, ya que el resto de las pruebas microbiológicas fueron negativas (131).

Sin embargo, la determinación del galactomanano en otras muestras biológicas no ha sido validada en la práctica clínica por falta de estudios prospectivos que incluyan un número suficiente de pacientes con AI probada (132).

La aspergilosis cerebral es una entidad de difícil diagnóstico clínico. A menudo es consecuencia de la diseminación de una aspergilosis pulmonar y rara vez el cultivo del líquido cefalorraquídeo es positivo. La detección de galactomanano en este líquido también podría ayudar al diagnóstico de esta entidad. Se han publicado casos exitosos de diagnóstico y seguimiento con esta técnica (133). Un estudio reciente de 92 pacientes con aspergilosis con afectación del sistema nervioso central demostró que el galactomanano fue positivo en el 87% de los pacientes, a diferencia del cultivo microbiológico estándar, que sólo se positivizó en el 31% (134).

Las guías ECIL3 recomiendan el uso del galactomanano en suero en pacientes con neoplasias hematológicas y pacientes sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos como técnica de diagnóstico precoz, siempre en combinación con el TACAR. Debe realizarse una extracción para la determinación del galactomanano cada 3 ó 4 días (135).

El uso combinado del galactomanano y el TACAR como técnicas de diagnóstico precoz de la infección fúngica por *aspergillus* fue analizada por el grupo de Salamanca. Se llevó a cabo un estudio retrospectivo de todas las muestras de AGA obtenidas en dicho centro en el periodo comprendido entre el 1 de Enero de 2005, y el 30 de Septiembre de 2009. Se seleccionó aquellos pacientes que tenían al menos 5 determinaciones consecutivas de AGA y se obtuvieron 8873 muestras de AGA correspondientes a 288 pacientes hematológicos.

Se determinaron dos muestras de AGA semanales en aquellos pacientes considerados de alto riesgo y se consideró positivo un índice mayor de 0,8 o dos consecutivos mayores de 0,5 (110), en cuyo caso se procedía a realizar un TACAR. Esta prueba también podía ser solicitada a pesar de AGA negativo, ante una alta sospecha clínica. En las siguientes tablas se muestran la Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo positivo y Valor Predictivo Negativo del Galactomanano (tabla 3), el TACAR (tabla 4) y la combinación de ambas pruebas en serie (tabla 5)

SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VPP	VPN
75,80%	56,98%	28,14%	87,60%

Tabla 3. Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo del AGA.

SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VPP	VPN
95%	98,46%	96,61%	97,71

Tabla 4. Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo del TACAR.

SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VPP	VPN
71,6%	98,5%	95,5%	88,26%

Tabla 5. Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo de AGA y TACAR como pruebas diagnósticas utilizadas en serie.

Las principales conclusiones de este trabajo fueron:

- El alto valor predictivo negativo del AGA nos permite descartar una infección fúngica en la mayor parte de los pacientes.
- Dado al bajo Valor Predictivo Positivo del AGA, si obtenemos un AGA positivo, precisamos de una segunda técnica diagnóstica con alto Valor Predictivo Positivo como es el TACAR para diagnosticar una infección fúngica por aspergillus.
- En este estudio un 69,4% de la infecciones fúngicas se diagnosticaron mediante el uso combinado del AGA y el TACAR en serie.
- Si seleccionamos aquellos pacientes que se diagnosticaron mediante el uso combinado de AGA y TACAR en serie, el AGA se anticipó al TACAR una media de 5,49 días.

- Los valores de Sensibilidad (71,6%), Especificidad (98,5%), Valor Predictivo positivo (95,5%) y Valor Predictivo Negativo (88,26%) de las dos pruebas utilizadas en serie fue elevado (136).

Sin embargo, como ya se ha explicado anteriormente, estas técnicas tienen sus limitaciones:

- El TACAR somete al paciente a gran cantidad de radiación, lo cual limita su uso a pacientes previamente seleccionados por una técnica más apropiada para el screening de la infección fúngica, como es el AGA. Además no es una técnica que nos informe sobre el agente causal de la infección.

- El AGA tiene falsos positivos y falsos negativos.

Todo ello ha condicionado la aparición de nuevas técnicas que pretenden implementar el diagnóstico precoz de esta infección.

PCR DE ASPERGILLUS

Debido a las limitaciones de las técnicas anteriores, la detección de ácido nucleídos ha sido considerada una técnica con gran potencial, especialmente las técnicas basadas en la PCR, que permiten amplificar pequeñas secuencias de DNA.

Una ventaja de las técnicas moleculares es que pueden diseñarse modelos que sirvan para el diagnóstico de infecciones por otras especies, tanto de aspergillus como de otros hongos patógenos emergentes (137).

La mayoría de los métodos basados en la PCR han demostrado ser útiles para el diagnóstico precoz de la infección fúngica por aspergillus; sin embargo, cada estudio usa una metodología diferente por lo que la comparación de los diferentes estudios para llegar a conclusiones resulta compleja (138).

Un meta-análisis llevado a cabo con 1618 pacientes procedentes de 16 estudios, usando diferentes técnicas de detección de ADN de aspergillus en sangre, demostró una sensibilidad de la técnica de un 75% (95% CI 0.54-0.88) y una especificidad del 87% (95% CI 0.78-0.93) para el diagnóstico de la aspergilosis invasiva con 2 muestras consecutivas positivas. En cambio, para aquellos estudios

en los que se admitió un sólo resultado de PCR positiva como criterio de aspergilosis invasora, la sensibilidad fue del 88% (95% CI 0.75-0.94) y la especificidad del 75% (95% CI 0.63-0.84). Por tanto, dada su elevada sensibilidad, una PCR negativa podría excluir el diagnóstico de aspergilosis probada o probable. No obstante, la especificidad se eleva considerablemente cuando disponemos de dos resultados consecutivos positivos, por lo que se requerirían 2 PCR positivas para confirmar el diagnóstico de aspergilosis invasora (139).

La determinación de la PCR es un método sensible, pero su especificidad está alrededor del 70-75%, lo cual parece ser su mayor limitación (140). Por ello aparecen las técnicas moleculares cuantitativas como la PCR en tiempo real (PCR-TR), que pueden ser de mayor utilidad para el diagnóstico precoz de estas infecciones.

En el caso de la aspergilosis, no existe una técnica estandarizada para la detección de *Aspergillus spp.*, lo cual es la principal barrera para la aplicación de esta técnica en la práctica clínica diaria. Los estudios están realizados con diferentes muestras biológicas, se aplican diferentes métodos de extracción y/o amplificación y detección.

En pacientes hematológicos de alto riesgo se desarrolló un estudio que comparó dos volúmenes diferentes de suero para la realización de la PCR, demostrando que volúmenes de 1ml eran superiores en términos de sensibilidad y especificidad que volúmenes de 100 µl (100% y 96,7% versus 88,2% y 95,8% respectivamente), por lo que parece que un aumento del volumen de extracción podría mejorar el diagnóstico precoz de estos pacientes (141).

Se puede realizar el estudio de PCR en diferentes muestras biológicas como en el líquido del lavado bronco-alveolar o tejidos frescos o en parafina. No obstante, la muestra ideal para la realización de técnicas seriadas de diagnóstico precoz probablemente sea la sangre, por su facilidad de extracción coincidiendo con las analíticas rutinarias. Sin embargo, no está claro si la determinación debe realizarse en sangre total o en el suero extraído tras la centrifugación de la sangre

total. Por una parte hay estudios que sugieren que la detección de ADN en sangre completa es superior a la detección en plasma; sin embargo, el suero tiene otras ventajas, como su utilidad para estudiar a la vez antígenos fúngicos como el galactomanano, o no requerir la adición de determinados anticoagulantes que podrían inhibir la amplificación por PCR (104, 142, 143, 144). Un estudio comparativo entre ambas muestras demostró la superioridad del suero (145). Otro estudio posterior del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), analizó la muestra ideal para la realización de la PCR-TR y no encontró diferencias significativas entre la sangre y el suero, pero recomendó la cuantificación en suero cuando se realizan determinaciones seriadas por la ya comentada validez para la realización del galactomanano, la posibilidad de congelar las muestras y el hecho de que el futuro de la estandarización de la extracción de ADN va dirigida hacia kits comerciales automáticos (146). Un estudio más reciente también comparó los dos tipos de muestras, siendo la sangre ligeramente más sensible que el suero (85% versus 79%) y de positivización más precoz (36 días versus 15 días). En contraposición, la extracción de ADN en suero es más sencilla y rápida, por lo que el estudio recomienda seleccionar el tipo de muestra en función de la infraestructura disponible en el centro (147).

En diferentes estudios se observa que la PCR suele anteceder a los síntomas de la infección. Estos casos podrían considerarse como falsos positivos de la técnica, pero el seguimiento de estos pacientes ha demostrado que gran parte de los mismos, a lo largo del tiempo, desarrollaron una aspergilosis invasora y, por lo tanto, puede considerarse que la positivización de la PCR fue el primer marcador de la infección.

Un estudio prospectivo comparó el tratamiento empírico versus el tratamiento guiado por la PCR en 112 pacientes receptores de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos demostrando que el grupo de tratamiento guiado por PCR había recibido menos tratamiento antifúngico empírico (36,7% versus 57,1%, $p < 0,0001$). No hubo grandes diferencias entre los dos grupos en cuanto a la incidencia de aspergilosis probadas o probables ni mortalidad en el día +100, pero llama la atención dos aspectos de este estudio: por

una parte la mortalidad en el día +30 fue significativamente menor en el grupo de la PCR (1,5% versus 6,3%) y por otra parte la PCR se anticipaba a la evidencia clínica una media de 5,75 días (72).

En cuanto a la comparación del galactomanano y la PCR existe un estudio prospectivo en el que se realizaron extracciones seriadas para PCR y AGA. La PCR fue superior al galactomanano en cuanto a sensibilidad se refiere (63,6% versus 33,3%) aunque como es habitual, fue menos específica (63,5% versus 98,9%). El estudio concluye que las muestras de PCR positivas son muy sugerentes de aspergilosis invasora y contribuyen al diagnóstico de esta (103).

Otro estudio prospectivo de pacientes hematológicos demostró que el uso combinado de la PCR y el galactomanano conseguía aumentar la sensibilidad a un 83,3%, aumentando también el valor predictivo negativo a un 97,6%. La PCR precedió a cualquier otro dato de aspergilosis (sospecha clínica, tratamiento empírico, galactomanano positivo, TACAR compatible o diagnóstico microbiológico o histológico) en el 21,4% de los casos de Aspergilosis invasora. La PCR se anticipó al diagnóstico micológico o histológico una media de 16 días en el 67% de los pacientes en los que se realizó diagnóstico micológico o histológico. Así mismo se demostró que se anticipaba una media de 8 días al TACAR en el 61% de los pacientes con esta prueba de imagen positiva (148). En otro estudio se demostró que la PCR se anticipaba a cualquier otro dato clínico una media de 12,6 días. Además, en caso de buena respuesta al tratamiento antifúngico la PCR se negativizaba en unos 14 días, persistiendo positiva en el caso de fallo del tratamiento (149). Esto mismo ya había sido publicado unos años antes por Lass-Flörl y colaboradores, demostrando que la negativización de la PCR se relacionaba con la resolución de los síntomas, y la persistencia de la PCR positiva auguraba una mala evolución de la infección, con un 50% de éxitus en su serie (150).

El grupo de Badiée y colaboradores demostró posteriormente su utilidad junto con el galactomanano para el diagnóstico de la aspergilosis invasora en pacientes pediátricos (151). Un estudio del grupo francés intentó valorar el significado de la PCR en tiempo real en el momento de la positivización del primer

galactomanano. Si la PCR era también positiva podría indicar un estado más avanzado de la infección, por lo tanto, podría estar justificado el inicio de un tratamiento antifúngico. En cambio, una PCR negativa permitía retrasar el inicio del tratamiento hasta tener mayores evidencias de la infección (152).

Otros estudios no son tan optimistas en cuanto a los beneficios de la PCR. Un ejemplo es un estudio prospectivo en pacientes sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos de intensidad reducida, en los que la PCR no demostró ser un buen indicador de Aspergilosis invasora tanto en el periodo por debajo del día +100 como en el periodo a partir de este día. Hay que tener en cuenta que en estos estudios la PCR es tan sólo una parte de la estrategia de diagnóstico de la infección fúngica y tanto la profilaxis antifúngica como el tratamiento empírico están también incluidos, lo cual podría tener un efecto directo sobre los resultados de la PCR (153).

La PCR aún no ha sido considerada como criterio diagnóstico de aspergilosis invasora según los criterios EORTC/MSG y las guías ECIL3, pero es una herramienta adicional que se puede utilizar para el diagnóstico en ciertos laboratorios micológicos de referencia (75). La razón de que no se haya incorporado a estos criterios es la falta de estandarización de la técnica. Por ello, en 2006 se forma la EAPCRI (European Aspergillus PCR Initiative), formada por expertos de más de 60 centros que realizan una serie de recomendaciones como el uso de sangre entera y volúmenes mayores o iguales a 3ml (154). Estudios posteriores demostraron la utilidad del suero para realizar la PCR, por lo que este mismo grupo concluyó que el suero requiere menor estandarización en la técnica que la sangre entera, dado que no requiere lisis de hematíes ni leucocitos, lo cual se relaciona con un menor tiempo para obtener el resultado. Se pueden usar test comerciales de extracción de DNA, lo que facilitaría la estandarización y el control de calidad. Además permitiría que con una sola muestra se pudieran realizar determinaciones de PCR, Galactomanano, y β -D- Glucano, minimizando los costes de las extracciones (155).

Cuenca-Estrella y colaboradores llevaron a cabo uno de los estudios más interesantes sobre el uso de la PCR-TR en el diagnóstico de la aspergilosis invasora en 83 pacientes con neutropenia febril. Para ello se extrajeron 2 muestras semanales, obteniendo un total de 2244 muestras. Consideraron 2 muestras consecutivas positivas como criterio diagnóstico. La sensibilidad de la PCR-TR fue del 91,6%, la especificidad de 94,4%, el valor predictivo positivo del 73,3% y el valor predictivo negativo del 98,5%. Asociando la PCR a otros métodos diagnósticos, como el galactomanano y el TACAR se detectó el 100% de los casos de aspergilosis invasora, permitiendo aumentar el valor predictivo positivo a un 75,1%. Además la positivización de la PCR se anticipó al TACAR 21 días y al galactomanano 68 días (156). Sin embargo, este estudio se realiza en pacientes que desarrollan una neutropenia febril, no todos los pacientes son hematológicos de alto riesgo, y no consideran otros factores de riesgo para la aspergilosis invasora aparte del desarrollo de neutropenia. Por ello se planteó la necesidad de realizar un estudio prospectivo de la utilidad de la técnica de la PCR-TR en pacientes hematológicos más seleccionados, que son los que han sido incluidos en este estudio.

LATERAL FLOW DEVICE

En los últimos años ha surgido una nueva técnica inmunocromatográfica llamada Lateral Flow Device que permite realizar un diagnóstico rápido y sencillo de la infección fúngica por *Aspergillus*.

Esta técnica incorpora un anticuerpo monoclonal murino, el MAb JF5 , que reacciona contra un epítipo, que es una N-glicoproteína presente en la pared celular de las hifas de *Aspergillus fumigatus*, que es secretada de forma constitutiva por las hifas durante su fase de crecimiento.

Uno de los aspectos más importantes de esta técnica es que no reacciona frente a otros patógenos frecuentes como con *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhizopus* y otras especies emergentes como *Fusarium solani*. (157). Ofrece ventajas como la rapidez y la accesibilidad a la prueba ya que no requiere el envío de las muestras a laboratorios de referencia.

Ha sido comparada en numerosos estudios con el galactomamano y el (1,3) β -D- glucano. En un estudio realizado a cerdos, la positivización de la técnica lateral flow ocurrió en el día 3 post-inoculación, mostrando ser más precoz que la positivización del galactomanano (día 5; $P=0,03$) y el (1,3) β -D- glucano (día 7, $P<0,001$). En cuanto a la sensibilidad, fue mayor para el lateral flow device en el día 3 post-inoculación (48%) que el galactomanano (4%, $P<0,001$) y el (1,3) β -D- glucano (0%, $P<0,001$). Con respecto a la sensibilidad en el día 5 post-inoculación, fue mayor que el (1,3) β -D- glucano (82% versus 23%, $P<0,001$), sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el galactomanano. En este trabajo la especificidad de las tres técnicas fue excelente (100% en el caso del lateral flow device y galactomanano, y 80% en el caso del (1,3) β -D- glucano) (158).

Un estudio más reciente ha comparado de forma retrospectiva en pacientes hematológicos de alto riesgo, la técnica de lateral flow device con el galactomanano y la RT-PCR, demostrando una especificidad similar a la PCR (98,0% versus 96,6%) y algo superior al galactomanano (91,5%). No obstante su sensibilidad (81,5%) fue menor que la PCR (95,5%) aunque superior al galactomanano (77,3%). La combinación de lateral flow device y RT-PCR obtuvo una sensibilidad y una especificidad del 100%. Todo ello apoya su uso como un test rápido previo a la confirmación mediante otras técnicas (159).

La técnica de lateral flow device también ha sido comparada con el galactomanano, el (1,3) β -D- glucano) y la PCR en otros líquidos biológicos como es el líquido del lavado broncoalveolar. En este caso, la sensibilidad de las cuatro técnicas varió entre un 70% y un 88%. En este trabajo también puede observarse que la sensibilidad se incrementa hasta un 94% usando la combinación del galactomanano (punto de corte >1) y el lateral flow device, siendo de un 100% tras combinar esta última con la PCR (160).

En el contexto del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos se desarrolló un estudio comparando los resultados de galactomanano recogidos de

forma prospectiva durante un periodo de tiempo de un año con los resultados realizados de forma retrospectiva en esas mismas muestras de la técnica de lateral flow device, demostrando que la positivización de la técnica de lateral flow device es similar al galactomanano (sensibilidad de 40% en ambas y especificidad de 86,8% en lateral flow device y de 89% en el galactomanano). Sin embargo, cuando se requieren dos muestras consecutivas positivas, el galactomanano parece ser superior al lateral flow-device en cuanto a sensibilidad (20% versus 30%), manteniendo ambos especificidades elevadas (97,8% versus 98,9%). No obstante la técnica del lateral flow device ofrece una ventaja indiscutible, que es la rapidez de su realización, que está estimada en unos 15 minutos (161).

2.- OBJETIVOS DEL ESTUDIO

HIPÓTESIS

La Aspergilosis invasora continúa siendo un problema fundamental en el manejo de muchos pacientes hematológicos por lo que es fundamental un diagnóstico precoz que permita instaurar un tratamiento adecuado lo antes posible con el fin de disminuir la morbimortalidad de esta complicación. Nuestra hipótesis es que la asociación del galactomanano con una técnica de detección del ADN de *Aspergillus*, como es la PCR de *Aspergillus*, podría reducir la incidencia de AI probable o probada según los criterios de la EORT/MSG 2008.

OBJETIVO PRINCIPAL

Estudiar si el uso de la técnica de detección de ADN de *Aspergillus* en tiempo real (qRt-PCR) es más sensible, específica y precoz que el galactomanano para el diagnóstico precoz de la infección fúngica por *aspergillus* .

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Valorar la mortalidad global y la mortalidad atribuible a AI en dos grupos de pacientes de alto riesgo de infección fúngica, uno mediante el uso combinado de (q-RT-PCR) y galactomanano, y otro sólo con galactomanano.
2. Evaluar el desarrollo o no de aspergilosis invasora según los criterios de la EORTC/MSG (probable, probada o posible).
3. Evaluar la incidencia de neutropenia febril y los días de neutropenia febril en ambos grupos, así como evaluar el intervalo de tiempo entre la aparición de la neutropenia y el diagnóstico de la aspergilosis invasora.
4. Evaluar el número de días de diferencia entre la positivización del Galactomanano y la PCR de *Aspergillus*.
5. Comparar la utilización de tratamiento antifúngico en ambos grupos.
6. Evaluar si la presencia de ciertos polimorfismos genéticos de la vía de señalización NF κ B pueden aumentar o disminuir el riesgo de desarrollar una aspergilosis invasora.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

Para facilitar la comprensión de este apartado, se ha dividido en dos partes:

A.- ESTUDIO PCR-AGA

Entre Febrero de 2011 y Julio de 2012 se llevó a cabo un estudio multicéntrico, randomizado y prospectivo en 13 Servicios de Hematología y Hemoterapia en España. La población en estudio estaba constituida por pacientes hematológicos de alto riesgo.

A continuación se especifican los criterios de inclusión y exclusión del estudio:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Firma del consentimiento informado para participar en el estudio.
- Pacientes adultos (>18 años) diagnosticados de leucemia aguda mieloblástica o síndrome mielodisplásico con quimioterapia intensiva, tanto en el tratamiento de inducción a la remisión como en los posteriores ciclos de consolidación.
- Pacientes ingresados para someterse a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos tanto con acondicionamiento estándar como régimen de intensidad reducida.
- Pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos con enfermedad injerto contra huésped.

El paciente debía ser incluido en el protocolo desde el inicio de la quimioterapia o terapia de acondicionamiento del trasplante.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Empleo de profilaxis antifúngica en los 30 días previos a la inclusión en el estudio con triazoles o polienos con actividad frente a aspergillus (itraconazol, voriconazol, posaconazol, anfotericina B inhalada), o empleo de otros antifúngicos sistémicos con actividad frente a aspergillus (anfotericina, terbinafina, flucitosina, equinocandinas, etc.). Por lo tanto, únicamente fue permitida la profilaxis con fluconazol.

- Antecedentes de IFI probable/probada.
- IFI probable/probada en el momento de la inclusión en el estudio.
- Falta de cumplimiento de los criterios de inclusión.

Para la realización del análisis específicamente fueron excluidos:

- Pacientes que tuvieron falta de seguimiento bisemanal con galactomanano o con PCR.
- Pacientes con infección bacteriana no adecuadamente tratada y controlada antes de poder empezar el tratamiento antifúngico empírico.
- Pacientes que finalmente tuviesen una neutropenia de corta duración, es decir, aquella de menos de 5 días, asumiendo que esta no debe suponer un riesgo significativo de IFI. Este dato debía ser desconocido al incluir al paciente en el estudio.

En el caso del que el paciente desarrollara fiebre, y tras 48-72 horas de tratamiento antibiótico empírico se iniciara antifúngico empírico por decisión de su médico responsable, con independencia del resultado del galactomanano o la PCR, salía del estudio.

El uso de profilaxis antibacteriana vía oral con quinolonas, macrólidos, etc., o factores de crecimiento de colonias granulocíticas no eran considerados criterios de exclusión.

ASPECTOS ÉTICOS DEL PROTOCOLO

El estudio se desarrolló de acuerdo con el protocolo y con las normas de Buena Práctica Clínica (GCP), tal como se describe en los siguientes documentos:

1. Normas Tripartitas Armonizadas de la ICH para Buena Práctica Clínica 1996.
2. Directiva 91/507/EEC: Normas que rigen los productos médicos en la Comunidad Europea.
3. Declaración de Helsinki referente a la investigación médica en seres humanos ("Recomendaciones para los médicos que participan en investigación biomédica con seres humanos", Helsinki 1964, incorporando las enmiendas de Tokio 1975, Venecia 1983, Hong-Kong 1989 y República de Sudáfrica 1996).

El investigador accedía, con la firma de este protocolo, a seguir las instrucciones y procedimiento descritos en el mismo y por lo tanto a cumplir los principios de Buena Práctica Clínica en los cuales se basa.

Antes del inicio de este estudio, el protocolo, el formulario de consentimiento informado propuesto y otra información para los pacientes, fueron revisados por un Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC de referencia) debidamente constituido, así como, por los demás CEICs participantes.

El investigador debía informar a cada paciente (o representante legalmente autorizado) de la naturaleza del estudio, sus propósitos, procedimientos, duración estimada y los potenciales riesgos y beneficios relacionados con la participación en el estudio, así como cualquier inconveniente que este le pueda suponer. Cada uno de los participantes debía ser advertido de que su participación en el estudio era voluntaria y de que podía abandonar el estudio en cualquier momento, sin que esto afectara a su tratamiento médico posterior, ni a su relación con el médico que le trataba.

El consentimiento informado fue suministrado mediante un escrito estándar, en lenguaje fácilmente comprensible para el participante. El paciente disponía del tiempo suficiente para leer y entender las explicaciones antes de fechar y firmar el consentimiento informado y recibió una copia del documento firmado. Si no era posible la firma del consentimiento, entonces también era posible obtenerlo verbalmente, en cuyo caso el acto de consentimiento informado debía ser establecido por una declaración adicional firmada por uno o más testigos independientes y el investigador debía explicar el motivo por el que el paciente no pudo firmar el consentimiento informado.

Ningún paciente pudo ser incluido en el estudio sin haber dado su consentimiento informado.

En el anexo 1 se puede observar el consentimiento informado entregado a los participantes en el estudio.

PROCESO DE ASIGNACIÓN A CADA GRUPO

Una vez considerado un paciente candidato y tras la firma del consentimiento informado era randomizado a unos de los dos grupos del estudio por un estadístico independiente, según un esquema ciego para el investigador, generado por ordenador en una proporción 1:1 y por bloques de 4.

Los dos grupos del estudio fueron:

- Grupo A (Grupo AGA-PCR): grupo experimental. Se realizó seguimiento con PCR de aspergillus y antígeno de galactomanano. Se inició tratamiento anticipado con un antifúngico con actividad frente a *Aspergillus* cuando se detectaban dos determinaciones de PCR consecutivas positivas o bien cuando se detectaban dos determinaciones consecutivas de Galactomanano de $>0,5$ o una sola $>0,8$.
- Grupo B (Grupo AGA): es el grupo control. Se realizó seguimiento sólo con galactomanano. Se inició tratamiento antifúngico anticipado con un antifúngico con actividad frente a *Aspergillus* cuando se detectaban dos determinaciones consecutivas de galactomanano de $>0,5$ o una sola $>0,8$. En este grupo también se determinaba la PCR pero los resultados eran ciegos para el investigador hasta el final del estudio.

El esquema del protocolo puede observarse en el anexo 2.

EXTRACCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

La extracción de muestras se realizó dos veces por semana (los lunes y los miércoles) de forma prospectiva y durante el periodo de observación del estudio. El periodo de observación se definió según el diagnóstico del paciente, el tipo de tratamiento y la presencia de enfermedad injerto contra huésped (EICH):

- En el caso de pacientes diagnosticados de leucemia aguda mieloblástica o síndromes mielodisplásicos en tratamiento quimioterápico: desde el día posterior al fin de la quimioterapia hasta 7 días después de la recuperación de la neutropenia (tres días consecutivos con más de 500 granulocitos) y 6 semanas

después de la inclusión en el estudio en el caso de neutropenia persistente o complicación severa.

- En el caso de trasplantes alogénicos de progenitores hematopoyéticos: Desde el día +1 hasta el día +100, prolongándose hasta el día +180 en el caso de presentar EICH.

En aquellos pacientes bajo tratamiento concomitante con Piperacilina-Tazobactam, las muestras se extrajeron cuando los niveles del fármaco eran más bajos; es decir, justo antes de una de las dosis.

Las muestras para la determinación del antígeno de galactomanano se enviaron a los laboratorios de Microbiología de cada uno de los centros participantes. Además se realizaron extracciones de 3-5 ml de sangre con EDTA y 3ml de suero que eran enviadas al Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) de Majadahonda en contenedores refrigerados para la realización análisis de PCR de forma centralizada.

RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

Los resultados, tanto del galactomanano como la PCR en el grupo A, como del galactomanano en el grupo B, estaban disponibles en las 24-48 horas tras la extracción.

En el caso de que obtuviéramos un resultado positivo según las definiciones anteriores se realizaba un TAC de tórax de alta resolución (TACAR) y se iniciaba tratamiento antifúngico con actividad frente *Aspergillus* (Voriconazol) de forma independiente al resultado del TACAR.

- La determinación del antígeno galactomanano en suero se realizó en los laboratorios de microbiología de cada uno de los centros participantes usando el kit Platelia *Aspergillus*® (BioRad, Madrid, España). Este método es un enzimo-inmunoanálisis en sándwich que utiliza anticuerpos murinos contra *aspergillus*. Para considerar un test como positivo se utilizaron los valores europeos de corte modificados de Maertens, es decir, un índice mayor de 0.8 o dos índices consecutivos mayores de 0.5 (110).

- PCR cuantitativa en tiempo real de *Aspergillus fumigatus* (qRT-PCR): Se realizó en ISCIII de Majadahonda. La técnica de PCR usada es una técnica de PCR en tiempo real con sondas que tienen forma de horquilla o bucle y un fluorocromo emisor y un apagador, que inhibe la emisión de fluorescencia mientras la sonda no hibride. Cuando la sonda se une al ADN, se forma una doble hélice rígida, por lo que la sonda pierde su forma de horquilla, separándose el emisor del apagador, lo que hace que la fluorescencia sea detectable (146, 156, 162).

De acuerdo con estudios previos, la PCR fue considerada como positiva cuando se positivizaban dos muestras consecutivas (139). El test era informado por el Instituto Nacional de microbiología Carlos III como positivo o negativo.

MANEJO DE LA NEUTROPENIA FEBRIL

En el caso de que un paciente neutropénico presentara fiebre se extraían cultivos microbiológicos de sangre, orina y esputo, y se iniciaba tratamiento antibiótico empírico según los protocolos de cada uno de los centros participantes. Así mismo era recomendable la realización de un lavado bronco-alveolar o una punción guiada por TAC con la intención de obtener documentación microbiológica de la infección.

En el caso de persistencia de la fiebre tras 48-72 horas se podía iniciar tratamiento antifúngico empírico a criterio del facultativo responsable del paciente, aún a pesar de no existir evidencia de infección fúngica. En ese caso el paciente salía del estudio.

DEFINICIONES DEL ESTUDIO

- Aspergilosis invasora : definida y clasificada según los criterios de la EORTC/MSG publicados por Ben De Pauw y colaboradores que establece 3 grados de certeza: probada, probable o posible como puede observarse en la tabla 6 (82).

CRITERIOS EORTC/MSG 2008 PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ASPERGILOSIS INVASORA (AI)	
AI PROBADA	Pacientes con evidencia histológica, cito-patológica o visión microscópica directa de hifas en el tejido obtenido por biopsia o por punción aspiración con daño tisular asociado o cultivo positivo para <i>Aspergillus spp.</i> De una muestra de un lugar habitualmente estéril, de un órgano afectado clínica o radiológicamente excluyendo mucosas, orina, cavidad sinusal, LBA o sangre (se asume contaminación)
AI PROBABLE	Pacientes con factores de riesgo de AI (1) además de evidencia clínica de AI (2) y con documentación microbiológica (3) de infección por <i>Aspergillus spp.</i>
AI POSIBLE	Pacientes con factores de riesgo de AI (1) y evidencia clínica de AI (2) sin documentación microbiológica.

<p>(1) Factores de riesgo de AI (Factor huésped)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Historia reciente de neutropenia $<500/\text{mm}^3$ durante >10 días relacionada en el tiempo con la aparición de AI - Receptor de Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos - Uso prolongado de esteroides con una dosis media de prednisona de $0,3\text{mg}/\text{Kg}/\text{día}$ durante >3 semanas. (Se excluyen los pacientes con aspergilosis broncopulmonar alérgica). - Tratamiento con drogas inmunosupresoras de linfocitos T (ciclosporina, bloqueantes TNF-α, anticuerpos monoclonales como el alentuzumab, o análogos de nucleósido en los últimos 90 días. - Inmunodeficiencia severa congénita (como enfermedad granulomatosa crónica o inmunodeficiencia combinada severa)
--

(2) Criterios clínicos de AI

- Enfermedad fúngica a nivel respiratorio
 - Presencia de uno de los siguientes signos radiológicos en el TAC:
 - Condensación, lesión bien circunscrita con o sin el signo del halo
 - Signo de la media luna
 - Cavitación de lesión
- Traqueobronquitis
Ulceraciones, presencia de nódulos, pseudomembranas o placas necróticas visibles por broncoscopia
- Infección sinusal
 - Imagen radiológica sugerente de sinusitis asociada al menos a 1 de los siguientes signos
 - Dolor agudo localizado (incluido el dolor irradiado al ojo)
 - Ulceración nasal con placa necrótica
 - Extensión del seno paranasal a través del hueso, incluyendo afectación de la órbita
- Infección del sistema nervioso central (uno de los siguientes signos)
 - Lesión focal en una prueba de imagen
 - Engrosamiento meníngeo visible por TAC o RMN

Tabla 6. Criterios EORTC-MSG para el diagnóstico de la AI. Adaptación de De Pawn y colaboradores.

La detección del ADN de *Aspergillus* usando la técnica de la PCR no está reconocida en el momento actual como un criterio microbiológico de Aspergilosis por la EORTC/MSG. No obstante, en este estudio se consideró su positividad como criterio para el inicio de tratamiento antifúngico anticipado.

- Neutropenia: recuento absoluto de neutrófilos por debajo de $0,5 \times 10^3$ células/mm³.
- Resolución de la neutropenia presencia de una cifra de neutrófilos $>500/\text{mm}^3$ durante 3 días consecutivos.
- Neutropenia febril refractaria: neutropenia asociada a fiebre persistente de más de 72 horas a pesar del uso de tratamiento antibiótico empírico adecuado (163).

- Tratamiento precoz o anticipado: inicio de cualquier tratamiento antifúngico con cobertura de *Aspergillus spp.* en base a los siguientes supuestos:
 - Galactomanano positivo sin hallazgos sugerentes de AI en el TACAR.
 - qRT-PCR positiva con galactomanano negativo independientemente de los hallazgos del TACAR.
- Tratamiento dirigido: inicio de cualquier tratamiento antifúngico con cobertura frente a *Aspergillus spp.* en el caso de TACAR con hallazgos sugerentes de AI, exceptuando los casos en los que este se haya realizado únicamente ante la positivización de la qRT-PCR en el grupo A del estudio (grupo AGA-PCR). En este caso se considera que la prueba de imagen no habría sido realizada en la práctica clínica habitual.
- Tratamiento empírico: inicio de cualquier tratamiento antifúngico en el caso de neutropenia febril refractaria en ausencia de evidencia microbiológica o radiológica.

DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO

- Si el paciente desarrollaba positividad para el AGA o la PCR de *Aspergillus*, se iniciaba tratamiento con un fármaco antifúngico con actividad anti-filamentosa.
- La duración del tratamiento era de al menos 2 semanas, con al menos una semana de tratamiento tras la negativización del AGA o la PCR. En el caso de negativización de la prueba microbiológica en un paciente neutropénico, se mantenía en tratamiento hasta que el paciente tenía una cifra de neutrófilos $>500/\text{mm}^3$.

PERIODOS DEL ESTUDIO

Se establecieron dos periodos diferentes dentro del estudio:

- Periodo de observación: periodo caracterizado por la extracción de las muestras del estudio. En el caso de pacientes diagnosticados de leucemia

aguda mieloblástica o síndromes mielodisplásicos en tratamiento quimioterápico intensivo comprende desde el día posterior al fin de la quimioterapia hasta 7 días después de la resolución de la neutropenia y 6 semanas después de la inclusión en el estudio en el caso de neutropenia febril o complicación severa. En el caso de pacientes sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos comprende desde el día +1 hasta el día +100, prolongándose hasta el día +180 en el caso de presencia de EICH.

- Periodo de seguimiento: comprende los 30 días posteriores a la finalización del periodo de observación.

CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Para el cálculo se utilizó el programa Power and Sample Size Calculations versión 2.1.31 y el Granmo versión 7.04 Noviembre 2009.

El tamaño requerido de la muestra se estimó bajo la hipótesis de que la aplicación de la estrategia basada en la monitorización simultánea de QRT-PCR y AGA en el suero reduciría la incidencia de AI probables o probadas (objetivo primario del estudio) en comparación con la estrategia estándar basado únicamente en la monitorización de AGA.

Estudios previos en pacientes hematológicos de alto riesgo han demostrado una incidencia de AI probables/probadas en torno a un 15% en el grupo control con monitorización única con AGA (156, 164). Mediante el test χ^2 , y asumiendo un error tipo I (α) de 5%, se calculó un tamaño de muestra de 216 pacientes (108 por brazo) asegurando un poder estadístico ($1 - \beta$) del 80% para detectar una reducción absoluta del riesgo de un 11% entre los dos grupos del estudio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se diseñaron unos cuadernos de recogida de datos en formato papel que fueron enviados a cada uno de los centros participantes donde se rellenaron.

Una vez recogidos los datos se procedió a elaborar una base de datos en el programa SPSS versión 15.0 (Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, IL.).

El análisis se realizó según el principio de intención de tratar, siendo incluidos en el análisis todos los pacientes randomizados.

Las variables cualitativas se muestran en valores absolutos y frecuencias relativas. Las variables cuantitativas se muestran como media +/- desviación típica o la media con el rango o rangos intercuartílicos (Q1-Q3).

Las variables categóricas se compararon usando el test χ^2 (o el test de Fisher's en el caso de un pequeño número de muestras). Las variables continuas se compararon mediante el test de T Student's o la U de Mann-Whitney.

Los resultados se expresaron como odds ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95%, siendo la $p < 0,05$ aceptada como significativa.

B.- ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LA VÍA NFKB

POBLACIÓN DE ESTUDIO

El estudio de los polimorfismos genéticos fue realizado en el Departamento de genómica Oncológica del Centro Pfizer- Universidad de Granada- Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO).

La población de estudio la componían pacientes hematológicos de alto riesgo de desarrollar una infección fúngica procedentes de cinco poblaciones diferentes:

- Población del consorcio internacional aspBIOmics
- Población procedente del Hospital Universitario de Salamanca
- Población del Hospital General de Valencia
- Población de la Universidad de Perugia (Italia)
- Población del estudio PCR-AGA

En el consorcio internacional (aspBIOmics) participaron varias instituciones europeas. Ha estado financiado por un proyecto europeo de la ERA-NET Pathogenomics y la participación de cada institución está aprobada por el comité ético de cada centro. Esto incluye las muestras de Perugia (Italia), Wurzburg (Alemania) e Innsbruck (Austria).

Con respecto a las muestras de Salamanca (no las incluidas en el PCR-AGA sino las reclutadas para estos estudios) y del Hospital General de Valencia se aceptó el consentimiento firmado en cada uno de los hospitales para análisis genéticos.

En el caso concreto de las muestras procedentes del estudio PCR-AGA, fue aceptado por el comité de Ética de la Investigación y de Bienestar Animal del Instituto de Salud Carlos III de Majadahonda. En el anexo 3 se muestra una copia de la aceptación por dicho comité.

Cabe destacar que todas las muestras fueron anonimizadas de forma irreversible. Únicamente se tenía conocimiento del desarrollo o no de una infección fúngica.

METODOLOGIA DEL GENOTIPADO

El genotipado de los SNPs seleccionados se realizó mediante técnicas basadas en PCR, Taqman® assays (Applied Biosystems) o KASPar® assays (KBiosciences, Hoddesdon, Hertfordshire, UK) en placas de 384 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y de acuerdo a los protocolos establecidos por las respectivas casas comerciales. Los ensayos KASPar® están constituidos por la

KASPar® Master assay mix (que contiene las sondas marcadas con FAM y VIC) y el KASPar® Kit que contiene la mezcla de reacción con el MgCl₂ (50 mM).

El protocolo de PCR para las sondas KASPar® está basado en “Touch-down PCRs” cuyo protocolo se detalla a continuación: Desnaturalización a 94°C durante 15 min, y 10 ciclos de desnaturalización 94°C durante 10 segundos, annealing a 61°C durante 5 segundos y una elongación a 72°C durante 10 segundos. Estos primeros ciclos comienzan con una temperatura elevada que cae 0.6°C por ciclo lo que aumenta la especificidad de la reacción y dejan finalmente la temperatura de annealing en 55°C. Después de estos primeros ciclos se continúa con 20 ciclos adicionales de desnaturalización a 94°C durante 10 segundos, annealing a 55°C durante 5 segundos y una elongación a 72°C durante 10 segundos, que permite terminar el amplificado de la región de interés.

Si la reacción de amplificación no hubiera concluido exitosamente se puede ampliar el protocolo con ciclos adicionales a 60°C durante 1 minuto. Los productos de PCR se analizan entonces en el ABI Prism 7900HT detection system y con el programa SDS 2.4 (Applied Biosystems).

Para garantizar la calidad del genotipado se incluyeron un 5% de las muestras por duplicado. La concordancia entre los duplicados fue >99.5%. El porcentaje de genotipos obtenidos para cada polimorfismo fue siempre superior al 90%.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar se realizó un análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) en el grupo control mediante un análisis de χ^2 (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Consideramos grupo control a los pacientes diagnosticados de Leucemia aguda o sometidos a trasplante alogénico que no han tenido síntoma alguno de Aspergilosis Invasora.

Para evaluar el efecto de los polimorfismos sobre el riesgo a desarrollar Aspergilosis Invasora, se realizó un análisis de regresión logística que se ajustó por

edad, sexo, país de origen y profilaxis. Para cada SNP se utilizó el alelo más común como alelo de referencia.

Los análisis se han realizado con el paquete estadístico SSPS (version 20.0, SPSS Inc., Chicago, USA).

Todos los valores de P inferiores a 0.05 se han considerado estadísticamente significativos.

Los resultados han sido analizados en paralelo con el paquete estadístico R (<http://www.r-project.org>).

Además, realizamos la corrección de Bonferroni, un análisis de múltiples comparaciones que nos permite confirmar las asociaciones obtenidas.

4. - RESULTADOS

Para facilitar la comprensión de este apartado, se ha dividido en dos partes:

A. ESTUDIO PCR-AGA

POBLACIÓN DEL ESTUDIO

Tal y como podemos observar en el anexo 4, a lo largo del periodo de reclutamiento del estudio fueron incluidos 224 pacientes. De estos, 5 fueron excluidos al no cumplir los criterios de inclusión del estudio, concretamente por:

- Falta de confirmación del diagnóstico de leucemia aguda mieloblástica:
1 paciente
- Antecedentes de infección fúngica: 1 paciente
- Tratamiento en los 30 días previos con Voriconazol y con Posaconazol.:
2 pacientes

Por lo tanto, 219 pacientes (97,8%) fueron finalmente incluidos y aleatorizados a unos de los dos grupos del estudio:

- Grupo A (PCR-AGA): 105 pacientes. De estos, 9 pacientes fueron excluidos del análisis por violaciones del protocolo, que específicamente fueron:
 - 2 pacientes no recibieron tratamiento antifúngico a pesar de resultados microbiológicos (AGA ó PCR) positivos.
 - 5 pacientes no se realizaron un TACAR tras la positivización de los estudios microbiológicos (AGA o PCR).
 - 2 pacientes a los que se les prescribió profilaxis con Equinocandinas.
- Grupo B (AGA): 114 pacientes. De estos, 7 pacientes fueron excluidos por violaciones del protocolo, que específicamente fueron:
 - 3 pacientes no recibieron tratamiento antifúngico a pesar de resultados microbiológicos (AGA ó PCR) positivos.
 - 2 pacientes a los que no se les realizaron extracciones para la determinación de AGA.
 - 2 pacientes a los que se les prescribió profilaxis con Equinocandinas.

Finalmente 96 pacientes en el grupo A y 107 pacientes en el grupo B fueron aptos para el análisis y sus características se muestran en la tabla 7.

	GRUPO A (PCR-AGA) n= 96	GRUPO B (AGA) n= 107	P-valor
Edad, años [media+/- DE]	51 +/- 14.6	50 +/- 15.3	0.458
Género (varón) [n (%)]	48 (50.0)	49 (45.8)	0.549
Enfermedad de base [n (%)]			
LMA	51 (53.1)	55 (51.4)	0.806
SMD	4 (4.2)	0 (0.0)	0.033
Receptor Allo-TPH	30 (31.3)	35 (32.7)	0.824
EICH	11 (11.5)	17 (15.9)	0.361
Profilaxis con Fluconazol [n(%)]	83 (86.5)	89 (83.2)	0.732
Días de neutropenia [media (Q1-Q3)]	29 (19-30)	29 (14-30)	0.253
Incidencia de neutropenia febril (%)	83.4%	85%	0.859
Días de neutropenia febril [media (Q1-Q3)]	7 (3-16)	9 (3-17)	0.535

Tabla 7. Características basales de los pacientes. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; AGA: Galactomanano; DE: desviación estándar; LMA: Leucemia Aguda Mieloblástica; SMD: Síndrome Mielodisplásico; Allo-TPH: Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; EICH: Enfermedad Injerto contra Huésped.

Como puede observarse en la tabla 7 no existen diferencias estadísticamente significativas en las características basales entre ambos grupos excepto en el número de pacientes diagnosticados de Síndrome Mielodisplásico, que fue significativamente mayor en el grupo A que en el grupo B [4 versus 0, (p= 0.033)]. Tampoco hay diferencias estadísticamente significativas entre la duración de la neutropenia [29 versus 29 (p= 0.253)], la incidencia de neutropenia febril [83.4% versus 85% (p= 0.859)], y la duración de la neutropenia febril [7 versus 9 (p=0.535)]. Sin embargo, cuando se realiza un análisis estratificando por patologías, en los pacientes con una leucemia aguda mieloblástica como enfermedad de base, llama la atención que existen diferencias estadísticamente

significativas en la duración de la neutropenia, siendo mayor en el grupo A que en el grupo B [(media Q1-Q3) 30 (22-30) versus 22 (14-30) p-valor= 0.006)].

REALIZACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

El número de pruebas diagnósticas realizadas y sus resultados se muestran en la tabla 8.

	GRUPO A (PCR-AGA) n= 96	GRUPO B (AGA) n= 107	P-valor
Número de muestras de PCR y AGA realizadas por paciente [media (intervalo)]	7 (5-9)	7 (5-8)	0.447
Muestras de PCR positivas [n (%)]	23 (23.9)	15 (14.0)	0.070
Días desde la primera PCR positiva al diagnóstico de IFI [media (Q1-Q3)]	12 (9-20)	18 (9-30)	0.425
Muestras de AGA positivas [n (%)]	8 (8.3)	17 (15.9)	0.102
Días desde el primer AGA positivo al diagnóstico de IFI [media (Q1-Q3)]	16 (13-33)	18 (10-41)	0.807
TACAR realizados [n (%)]	42 (43.8)	36 (33.6)	0.139

Tabla 8. Estrategias diagnósticas y tasas de positividad. AGA: Galactomanano; PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa; IFI; Infección Fúngica Invasora; TACAR: Tac de Tórax de Alta Resolución

Tal y como muestra la tabla 8 , la media de muestras extraídas para galactomanano y PCR fue similar en ambos grupos. El número de muestras positivas de PCR fue significativamente mayor en el grupo A que en el grupo B (p=0.070). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en el número de muestras positivas de AGA. A los pacientes del

grupo A se les realizó con mayor frecuencia un TACAR que a los pacientes del grupo B, aunque las diferencias no alcanzaron la significación (p=0.139).

INCIDENCIA DE ASPERGILOSIS INVASORA AL FINAL DEL PERIODO DE SEGUIMIENTO

En la tabla 9 se muestran los datos de incidencia de aspergilosis invasora según los criterios de la EORTC. También se observan los intervalos entre la aparición de neutropenia y el diagnóstico de la aspergilosis.

	GRUPO A (PCR-AGA) n= 96	GRUPO B (AGA) n= 107	P-valor
AI GLOBAL [n (%)]	13 (13.5)	17 (15.9)	0.638
AI POSIBLE	9(9.4)	3 (2.8)	-
AI PROBABLE	4 (4.2)	12 (11.2)	-
AI PROBADA	0 (0.0)	2 (1.9)	-
(AI probables o probadas) [n (%)]	4 (4.2)	14 (13.1)	0.028
INTERVALO ENTRE APARICIÓN DE NEUTROPENIA Y DIAGNÓSTICO, DÍAS [media (Q1-Q3)]	13 (10-26)	20 (14-43)	0.022

Tabla 9. Incidencia de aspergilosis invasora. AGA: Galactomanano; PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa; AI: Aspergilosis invasora

Durante el periodo del estudio se diagnosticaron 30 infecciones fúngicas invasoras (12 posibles, 16 probables y 2 probadas). La incidencia de IFI fue de 13.5% en el grupo A y 15.9% en el grupo B. Como puede observarse en la tabla 9, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la incidencia de IFI entre ambos grupos (p-valor= 0.638).

Recordemos que el objetivo principal del estudio era valorar la incidencia de aspergilosis probable y probada. Si nos centramos en este punto, se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, siendo menor la incidencia en el grupo A (4.2%) que en el grupo B (13.1%), p-valor=0.028. La reducción absoluta del riesgo gracias al uso combinado de la dos técnicas se sitúa en un 8,9% [13.1%-4.2%].

Además el intervalo de tiempo entre la aparición de la neutropenia y el diagnóstico de AI fue significativamente menor en el grupo A que en el B [p=0.0022].

La incidencia de AI posible en el grupo A fue significativamente mayor que en el grupo B (9.4% [9/96] versus 2.8% [3/107]; OR=3.58; IC=95% (0.94-13.66), p-valor: 0.00947)

ANTICIPACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

En la tabla 11 se muestran los resultados de anticipación de pruebas diagnósticas.

GRUPO DIAGNÓSTICO	GRUPO A (PCR-AGA) n= 4 (4+0)	GRUPO B (AGA) n= 14 (12+2)
PCR positiva precede a AGA positivo	3	2
PCR y AGA simultáneamente positivos	0	5
AGA positivo precede a PCR positiva	1	3
AGA positivo y PCR siempre negativa	0	4

Tabla 11. Resultados de AGA y PCR en pacientes diagnosticados de OFO probable o probada según los criterios de la EORTC/MSG EORTC/MSG: European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group; AGA: Galactomanano; PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

Como puede observarse en la tabla 11 no existe una clara dinámica de positivización de las pruebas diagnósticas de modo que PCR no se anticipa al AGA a diferencia de lo publicado en estudios previos.

USO DE TRATAMIENTOS ANTIFÚNGICOS A EXCEPCIÓN DE FLUCONAZOL PROFILÁCTICO

En la tabla 12 se muestra el uso de antifúngicos durante el estudio.

	GRUPO A (PCR-AGA) n= 96	GRUPO B (AGA) n= 107	P-valor
USO GLOBAL DE TRATAMIENTO ANTIFÚNGICO [n(%)]	46 (47.9)	57 (53.3)	0.446
- TRATAMIENTO EMPIRICO	16 (16.7)	31 (29.0)	0.038
- TRATAMIENTO PRECOZ	19 (19.8) ^a	3 (2.8)	0.000
- TRATAMIENTO DIRIGIDO	5 (5.2) ^b	17 (15.9)	0.015
- OTRAS INDICACIONES ^c	6 (6.2)	6 (5.6)	0.846
DURACIÓN DEL TRATAMIENTO ANTIFÚNGICO, DÍAS [media+/-DE]	12.7 +/-24.2	11.8 +/-24.5	0.730
- TRATAMIENTO EMPIRICO	2.8 +/- 9	3.5 +/- 8.1	0.114
- TRATAMIENTO PRECOZ	5.3 +/- 17	0.6 +/- 4.6	0.000
- TRATAMIENTO DIRIGIDO	3.5 +/- 15.8	6.5 +/- 23.7	0.019

Tabla 12. Uso de tratamiento antifúngico diferente a profilaxis con Fluconazol. (PP). PP: por protocolo; AGA: Galactomanano; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; DE: desviación estándar.^a Incluye 8 pacientes con PCR positiva y TACAR anormal, pero AGA negativo, 10 pacientes con PCR positiva, TACAR normal y AGA negativo, y 1 paciente con AGA positivo y TACAR normal.

^b Incluye 4 pacientes con AI probable y 1 paciente con TACAR compatible con AI pero AGA y PCR negativas.^c Incluye 8 pacientes que recibieron tratamiento para una IFI distinta a AI, y 4 pacientes en los que la profilaxis con fluconazol fue sustituida por otro agente antifúngico tras la inclusión.

Como podemos observar en la tabla 12, 47 pacientes del estudio precisaron tratamiento antifúngico empírico. Si diferenciamos los tipos de tratamiento antifúngico entre los grupos A y B podemos ver que los pacientes del grupo A recibieron menos tratamiento empírico (16.7% versus 29.0% p= 0.038) o tratamiento dirigido (5.2% versus 15.9% p= 0.015) en comparación con el grupo B, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte, los pacientes del grupo A recibieron más tratamiento precoz que los pacientes del

grupo B(19.8% versus 2.8% p <0.0001). Esto se debe a que la positivización de la PCR fue la razón de inicio de tratamiento en la mayoría de los casos (18/19 [94.7%]). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la duración del tratamiento antifúngico entre ambos grupos.

MORTALIDAD

En la tabla 13 se muestran los resultados de mortalidad de los pacientes del estudio.

RESULTADO [n (%)]	GRUPO A (PCR-AGA) n= 96	GRUPO B (AGA) n= 107	P-valor
MORTALIDAD GLOBAL AL FINAL DEL SEGUIMIENTO	13 (13.5)	17 (15.9)	0.695
- MORTALIDAD A LOS 30 DÍAS	6 (6.3)	5 (4.7)	0.759
- MORTALIDAD A LOS 180 DÍAS	13 (13.5)	14 (13.1)	1.000
MORTALIDAD ATRIBUIBLE A AI PROBABLE O PROBADA	1 (1.0) ^a	4 (3.7)	0.247
- MORTALIDAD ATRIBUIBLE A AI PROBADA	0 (0.0)	1 (0.9)	-
- MORTALIDAD ATRIBUIBLE A AI PROBABLE	1 (1.0)	3 (2.8)	-

Tabla 13. Mortalidad (PP). PP: por protocolo; AGA: Galactomanano; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; AI: Aspergilosis invasiva.^a Un paciente falleció a los 12 días de ser diagnosticado de una Infección fúngica “posible” en base a una PCR positiva asociada a un TACAR compatible.

Tal y como se aprecia en la tabla 13 no hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la mortalidad global entre ambos grupos (13.5% en el grupo A versus 15.9% en el grupo B; OR=0.83; 95% IC:0.38-1.81; p =0.695). La mortalidad a los 30 y a los 180 días también fue similar en ambos grupos .

Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la mortalidad atribuible a Aspergilosis invasora probable o probada (1.0% en el grupo A versus 3.7% en el grupo B; OR=0.27; 95% IC: 0.03-2.47; p-valor=0.247).

B. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LA VÍA NFKB

POBLACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio de los polimorfismos genéticos se desarrolló en tres fases según la población estudiada:

- Primera Fase: Población del consorcio aspBIOmics (N=339).
- Segunda Fase: Población de estudio PCR-AGA junto con muestras de población del Hospital Universitario de Salamanca y del Hospital General de Valencia (N=334).
- Tercera Fase: Extensión en una población sin trasplante del grupo de Luigina Romani de la Universidad de Perugia, Italia (N=149).

En la tabla 14 se resumen las características basales y clínicas de la población estudiada en cada una de las tres fases y tal y como se puede observar, y sobre el total de pacientes del estudio (n=809) se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al ratio varón/mujer, mayor en los pacientes con aspergilosis invasora que en aquellos que no la presentaron (1,89 versus 1,25; p=0,021).

Un 44.25% de la población recibió tratamiento antifúngico profiláctico. En este grupo, el número de pacientes con aspergilosis invasora fue significativamente menor que el de los pacientes que no desarrollaron dicha infección (29,5% versus 47,47%; p=0,0001). En cambio, en el grupo de pacientes que no recibió tratamiento antifúngico profiláctico, el porcentaje de pacientes con aspergilosis invasora fue significativamente mayor que el de los pacientes que no desarrollaron la infección (53,8% versus 36,6%, p=0,0001).

FASE 1+2		Población del consorcio aspBIOmics + HUS-HGV-PCR-AGA			
	Total (n=660)	Pacientes AI (n=125)	Pacientes no AI (n=535)	P valor	
Variables Demográficas					
Edad	51.38 ± 15.26	52.74 ± 13.47	51.06 ± 15.64	NS	
Ratio sexo (varón/mujer)	1.34 (377/282)	1.98 (83/42)	1.15 (294/240)	0.026	
Enfermedad Hematológica					
LMA	399 (60.45)	80 (64.00)	319 (59.63)	NS	
LLA	73 (11.06)	18 (14.40)	55 (10.28)	NS	
Otra	188 (28.48)	27 (21.60)	161 (30.09)	NS	
TPH	173 (26.21)	44 (35.20)	129 (24.11)	0.015	
Profilaxis antifúngica					
Uso de profilaxis	317 (48.03)	38 (30.40)	279 (52.15)	0.00001	
No uso de profilaxis	314 (47.58)	82 (65.60)	232 (43.36)	0.00001	
Desconocido	29 (4.39)	5 (4.00)	24 (4.49)	NS	
FASE 3		Población de la UP			
	Total (n=149)	Pacientes AI (n=33)	Pacientes no AI (n=116)	P valor	
Variables Demográficas					
Edad	58.89 ± 17.80	56.45 ± 19.44	59.59 ± 17.34	NS	
Ratio sexo (varón/mujer)	1.22 (82/67)	1.54 (20/13)	1.15 (62/54)	NS	
Enfermedad Hematológica					
LMA	149 (100.0)	33 (100.0)	116 (100.0)	NS	
LLA	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	-	
Otra	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	-	
TPH	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	-	
Profilaxis antifúngica[†]					
Uso de profilaxis	39 (26.17)	9 (27.27)	30 (25.86)	NS	
No uso de profilaxis	9 (6.04)	3 (9.09)	6 (5.17)	NS	
Desconocido	101 (67.79)	21 (63.64)	80 (68.97)	NS	
FASE 1+2+3		Población del consorcio aspBIOmics + HUS-HGV-PCR-AGA + UP			
	Total (n=809)	Pacientes AI (n=158)	Pacientes no AI (n=651)	P valor	
Variables Demográficas					
Edad	52.77 ± 16.02	53.52 ± 14.92	52.59 ± 16.28	NS	
Ratio Sexo (varón/mujer)	1.32 (459/349)	1.87 (103/55)	1.15 (356/294)	0.021	
Enfermedad Hematológica					
LMA	548 (67.74)	113 (71.52)	435 (66.82)	NS	
LLA	73 (09.02)	18 (11.39)	55 (08.45)	NS	
Otra	188 (23.24)	27 (17.09)	161 (24.73)	NS	
TPH	173 (21.38)	44 (27.85)	129 (19.82)	0.036	
Profilaxis					
Uso de profilaxis	358 (44.25)	47 (29.75)	309 (47.47)	0.0001	
No uso de profilaxis	321 (39.68)	85 (53.80)	238 (36.56)	0.0001	
Desconocido	130 (16.07)	26 (16.46)	104 (15.98)	NS	

Tabla 14. Características basales y clínicas de los pacientes

P≤0.05 se consideraba significativa. [†]El estatus de profilaxis sólo estaba disponible en 48 pacientes (12 en el grupo AI and 36 en el grupo no AI).

POLIMORFISMOS ESTUDIADOS

En la tabla 15 se muestran los polimorfismos relacionados con la vía NFκB que se estudiaron.

Gen	dbSNP rs	Crom	Localización /Aa cambio	Sustitución de Nucleótido	MAF
<i>NFKB1</i>	rs4648110	4	Intron	A/T	0.1659
<i>NFKB2</i>	rs1056890	10	Near Gen	C/T	0.2655
	rs11574851	10	N698N	C/T	0.039
<i>REL</i>	rs13031237	2	Intron	G/T	0.1741
	rs842647	2	Intron	A/G	0.4813
<i>RELA</i>	rs7119750	11	Intron	C/T	0.2518
<i>RELB</i>	rs2288918	19	Intron	C/T	0.4196
<i>IRF4</i>	rs12203592	6	Intron	C/T	0.0535
	rs1877175	6	3'-UTR	A/G	0.2218
	rs1050975	6	3'-UTR	A/G	0.2635
	rs7768807	6	3'-UTR	C/T	0.2938

Tabla 15. Polimorfismos relacionados con *NFKB*

Abreviaturas: SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido; Crom: Cromosoma; MAF: Alelo de menor frecuencia; Aa, Aminoácido.

ASOCIACION ENTRE LOS POLIMORFISMOS DE LA VIA NFκB Y LA ASPERGILOSIS INVASORA

En la tabla 16 se puede observar la asociación global entre los polimorfismos de la vía NFκB y la aspergilosis invasora en cada una de las 3 fases del estudio.

Variante_dbSNP	Gen	OR (95% CI) ^a	P _{valor}	OR (95% CI) ^b	P _{valor}	OR (95% CI) ^c	P _{valor}
rs4648110	<i>NFKB1</i>	0.72 (0.40-1.31)	0.28	0.79 (0.49-1.25)	0.30	0.77 (0.50-1.21)	0.25
rs1056890	<i>NFKB2</i>	1.06 (0.60-1.85)	0.85	1.16 (0.74-1.80)	0.51	1.28 (0.84-1.97)	0.25
rs11574851	<i>NFKB2</i>	1.78 (0.87-3.65)	0.12	1.94 (1.08-3.48)[†]	0.031	2.01 (1.15-3.53)[‡]	0.018
rs842647	<i>REL</i>	0.94 (0.55-1.61)	0.82	0.90 (0.58-1.38)	0.62	0.85 (0.56-1.28)	0.43
rs13017599	<i>REL</i>	0.98 (0.57-1.67)	0.94	0.97 (0.63-1.49)	0.91	0.95 (0.63-1.43)	0.80
rs7119750	<i>RELA</i>	1.35 (0.73-2.49)	0.34	1.06 (0.65-1.73)	0.82	1.01 (0.63-1.62)	0.97
rs2288918	<i>RELB</i>	0.39 (0.15-1.00) [‡]	0.035	0.45 (0.21-0.94)[‡]	0.022	0.42 (0.20-0.88)[‡]	0.013
rs12203592	<i>IRF4</i>	2.25 (0.41-12.2) [‡]	0.35	3.83 (1.21-12.1)[‡]	0.028	3.85 (1.22-12.1)[‡]	0.027
rs1877175	<i>IRF4</i>	1.11 (0.64-1.94)	0.71	0.99 (0.63-1.56)	0.97	0.93 (0.61-1.43)	0.75
rs1050975	<i>IRF4</i>	1.07 (0.51-2.25)	0.86	1.13 (0.63-2.00)	0.69	1.04 (0.59-1.81)	0.90
rs7768807	<i>IRF4</i>	1.47 (0.85-2.56)	0.17	1.25 (0.81-1.93)	0.32	1.26 (0.83-1.90)	0.28

Tabla 16. Asociación global de los polimorfismos de la vía *NFKB* y aspergilosis invasora. Ajustado por edad, sexo, país de origen y estatus de profilaxis. $P < 0.05$ fue considerado como significativo.

^aFase 1 (población aspBIOmics; N=327).

Ajustado por edad, sexo, país de origen y trasplante.

^bFase 1+2 (población aspBIOmics + PCRAGA- HUS-HGV; N=660 pacientes de alto riesgo).

Ajustado por edad, sexo y trasplante

^cTotal (tras extensión con 149 pacientes no trasplantados; N=809 pacientes de alto riesgo).

[‡]Estimado según un modelo de herencia recesivo.

*Profilaxis estaba sólo disponible en 657 pacientes.

[†]*NFKB2*_{rs11574851} (por-alelo OR= 1.80, 95%CI 1.05-3.08; $P_{\text{trend}}=0.037$).

[‡]*NFKB2*_{rs11574851} (por-alelo OR= 1.80, 95%CI 1.08-3.00; $P_{\text{trend}}=0.028$).

Por último, la tabla 17 muestra la asociación entre los polimorfismos de la vía *NFKB* y la aspergilosis invasora en una población seleccionada de pacientes sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Variante_dbSNP	Gen	OR (95% CI) ^a	P _{valor}
rs4648110	<i>NFKB1</i>	1.25 (0.53-2.97)	0.61
rs1056890	<i>NFKB2</i>	0.89 (0.38-2.06)	0.78
rs11574851	<i>NFKB2</i>	1.38 (0.44-4.30)	0.58
rs842647	<i>REL</i>	0.49 (0.21-1.14)	0.095
rs13017599	<i>REL</i>	0.95 (0.43-2.09)	0.89
rs7119750	<i>RELA</i>	0.84 (0.33-2.16)	0.72
rs2288918	<i>RELB</i>	1.65 (0.67-4.03)	0.27
rs12203592	<i>IRF4</i>	5.87 (1.00-34.4) [‡]	0.045
rs1877175	<i>IRF4</i>	0.58 (0.23-1.46)	0.24
rs1050975	<i>IRF4</i>	0.84 (0.28-2.50)	0.75
rs7768807	<i>IRF4</i>	0.61 (0.26-1.42)	0.24

Tabla 17. Asociación de los polimorfismos de la vía *NFKB* y la aspergilosis invasora en pacientes sometidos a trasplante (N=173).

Tras observar los resultados de las tablas 16 y 17 podemos concluir que existen tres polimorfismos de especial interés:

- El polimorfismo rs11574851, situado en el gen *NFKB2*, parece aumentar el riesgo de desarrollar una aspergilosis invasora. Aunque en la población de la fase 1 del estudio, estas diferencias no son significativas, tras aumentar el número de sujetos con la población de pacientes españoles y la población de pacientes trasplantados de la Universidad de Perugia se observa un aumento significativo del riesgo (OR=2,01; p=0,018).
- En el caso del polimorfismo rs12203592, situado en el gen *IRF4*, ocurre algo similar, observando un aumento significativo del riesgo de desarrollar una aspergilosis invasora (OR=3,85; p=0,027). Cuando seleccionamos una población de pacientes sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos, el riesgo es aún mayor (OR=5,87; p=0,045).
- Por el contrario, la presencia del polimorfismo rs2288918, situado en el gen *RELB*, parece tener un efecto protector sobre el desarrollo de una aspergilosis invasora (OR=0,42; p=0,013).

5.- DISCUSIÓN

La infección fúngica por *aspergillus* en pacientes hematológicos de alto riesgo continúa teniendo hoy en día una elevada morbi-mortalidad (3). El inicio precoz de un tratamiento antifúngico adecuado es imprescindible (69). Dado que las técnicas clásicas de diagnóstico, como los cultivos microbiológicos o la histopatología no permiten un diagnóstico precoz, son muchos los grupos que han intentado encontrar algún tipo de biomarcador o combinación de biomarcadores que permitan realizar un diagnóstico más precoz de este tipo de infección.

El presente estudio pretende comparar dos estrategias diferentes de diagnóstico precoz de la infección fúngica por *aspergillus* en pacientes hematológicos de alto riesgo. Por una parte, existe un grupo basado en la combinación de dos pruebas microbiológicas, como son la PCR en tiempo real de *aspergillus* y la determinación del antígeno de galactomanano; por otra parte, existe un grupo control basado únicamente en la determinación del antígeno de galactomanano. Esta última es una técnica de uso en la práctica clínica habitual, reconocida por la EORTC /MSG 2008 como criterio diagnóstico de la infección fúngica por *Aspergillus* (82).

Existen muchos estudios que han intentado evaluar el uso del galactomanano y la PCR de *aspergillus* para el diagnóstico precoz de la infección fúngica por *aspergillus*; sin embargo, este es el primer estudio prospectivo, randomizado, llevado a cabo en pacientes hematológicos muy seleccionados, con un alto riesgo de desarrollar una infección fúngica por *aspergillus*, y en el que el tratamiento se establece según los resultados de estas pruebas.

Recientemente se ha publicado un estudio que compara el uso combinado de la PCR y el galactomanano con la estrategia estándar de diagnóstico basado en el cultivo y la histología. Este estudio randomizado, llevado a cabo en pacientes de alto riesgo demostró que el uso de tratamiento antifúngico empírico se reducía de forma significativa en el grupo del uso combinado de la PCR y el galactomanano con respecto al grupo control (15% versus 32%, $p=0,002$). Aunque en este trabajo el número de infecciones fúngicas probadas fue el mismo en ambos grupos, el número de infecciones fúngicas posibles o probables fue mayor en el grupo de la

PCR y el galactomanano, lo que los autores explican por la diferencia en la sensibilidad de las diferentes técnicas (165).

Estudios previos también han comparado la PCR frente al galactomanano; sin embargo, el análisis de estos resultados al ser retrospectivo, no permitió cambiar la actitud frente al paciente según los resultados de los test diagnósticos realizados (166).

Por otra parte algunos de estos estudios pueden estar limitados por el uso de profilaxis antifúngica con cobertura frente a hongo filamentoso, como por ejemplo el estudio de Armenian y colaboradores, que analizaba de forma prospectiva la PCR de aspergillus y el galactomanano en población pediátrica de alto riesgo, y en la que el 56% de las muestras pertenecían a pacientes bajo profilaxis (167).

En el presente trabajo por primera vez se compara directamente el uso de la combinación de estos dos biomarcadores frente al uso único del galactomanano, de forma prospectiva, en una población de alto riesgo sin profilaxis antifúngica frente a hongo filamentoso y con resultados obtenidos de forma prospectiva de manera que permitan modificar la actitud clínica.

En nuestro trabajo, como puede comprobarse en la tabla 7, los pacientes de ambos grupos eran comparables, sin que hubiera diferencias estadísticamente significativas entre los grupos a excepción de los pacientes diagnosticados de síndrome mielodisplásico que fueron 4 en el grupo A y 0 en el grupo B. No obstante el peso de estos pacientes dentro del grupo A fue pequeño, ya que supuso únicamente un 4,2% del mismo. Tampoco hubo diferencias significativas entre los dos grupos en relación a la realización de pruebas diagnósticas, tal y como podemos ver en la tabla 8.

Ningún paciente incluido en este estudio recibió profilaxis frente a hongo filamentoso, lo que podría haber reducido la sensibilidad de los diferentes tests microbiológicos como hemos visto en estudios previos.

La hipótesis que dio lugar a este estudio fue que la asociación del galactomanano con una técnica de detección del ADN de *Aspergillus*, como es la PCR, podría reducir la incidencia de aspergilosis invasora probable o probada según los criterios de la EORTC/MSG 2008. Además podría reducir, tanto el tiempo hasta el diagnóstico evitando el uso de tratamientos antifúngicos empíricos innecesarios, como la mortalidad debida a la aspergilosis invasora.

Con respecto a la incidencia de aspergilosis invasora, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (13.5% en el grupo A y 15.9% en el grupo B, p-valor= 0.638). Sin embargo, llama la atención que el número de aspergilosis invasoras en el grupo A se debió mayoritariamente a las aspergilosis posibles y en el grupo B a las probables o probadas. La PCR de *Aspergillus* no se considera como un criterio microbiológico de aspergilosis invasora por la EORTC/MSG 2008, por lo que los pacientes del grupo A que positivizaron únicamente la PCR no pudieron considerarse como infecciones fúngicas probables o probadas, y esta puede ser la razón de que exista un mayor número de infecciones fúngicas posibles en el grupo A, que no obstante no alcanza la significación estadística (9,4% en grupo A versus 2,8% en grupo B). También parece interesante que el 69,2% (9/13) de las aspergilosis del grupo A fueron posibles. Es decir, se observa una tendencia a un mayor de aspergilosis invasoras posibles en el grupo A con respecto al grupo B, pero centrándonos sólo en los pacientes del grupo A, la mayoría de las infecciones fúngicas no llegaron a ser probables o probadas, lo que podría apuntar a un diagnóstico más precoz en el grupo experimental respecto al grupo control, tal y como ha sido publicado previamente por otros grupos (156, 165). Recordemos que en el grupo A la positivización de la PCR era criterio de inicio de tratamiento dirigido frente a *Aspergillus*, por lo que en el caso de que la PCR se anticipe al galactomanano es muy probable que este último nunca llegue a ser positivo, ya que el paciente estará ya recibiendo tratamiento.

La positivización de la PCR fue en muchos casos la única razón por la que a los pacientes se les realizó una prueba de imagen como el TACAR. La posibilidad de

que ante hallazgos inespecíficos en estas pruebas de imagen, pudieran ser atribuidos a una aspergilosis posible también se valoró como una posibilidad del aumento de las aspergilosis posibles, y por ello, sólo las aspergilosis probables o probadas fueron consideradas como evaluables en los resultados del estudio de forma similar a otros estudios que evalúan la infección fúngica en pacientes hematológicos de alto riesgo (168, 169, 170). El TACAR es una herramienta diagnóstica indispensable para el diagnóstico de la infección pulmonar por *aspergillus*. Permite realizar un diagnóstico radiológico en pacientes con radiografía de tórax normal, además de localizar lesiones para poder realizar una prueba de diagnóstico microbiológico definitivo. Existen hallazgos radiológicos con una especificidad que puede llegar al 100%, como el signo del halo, pero este es un signo transitorio por lo que esta prueba de imagen debe realizarse de forma precoz ante la sospecha de una aspergilosis invasora (87). En este contexto, la positivización de la PCR de *aspergillus* indujo a realizar esta prueba a más pacientes, y esta es otra razón de que el número de aspergilosis posibles sea mayor en el grupo A que en el grupo B.

El objetivo principal del estudio era comparar la incidencia de aspergilosis invasora probable o probada en los dos grupos de estudio, mediante la demostración de una menor incidencia en el grupo experimental que en el control. Con los resultados de este estudio demostramos que la incidencia en el grupo A, fue significativamente menor que en el grupo B (4,2% versus 13,1% respectivamente). Visto de otro modo, la estrategia de la combinación de la PCR y el Galactomanano consiguió una reducción global de la incidencia de aspergilosis probable o probada de un 8,9% (95% CI: 0,9%-17%).

En términos relativos, la estrategia del uso combinado de PCR y Galactomanano consiguió una reducción del riesgo relativo de infección fúngica probable o probada (objetivo primario del estudio) del 68,1%, siendo 11 el número de pacientes de alto riesgo que deberían ser monitorizados con ambas técnicas para prevenir un caso de aspergilosis probable o probada.

La estrategia de la combinación de ambas técnicas demostró además reducir 7 días el tiempo entre la aparición de la neutropenia y el diagnóstico de la infección fúngica (13 días en el grupo A versus 20 días en el grupo B, $p=0,022$). Tal y como fue publicado hace algunos años, la PCR podría ser un marcador de aspergilosis silente en algunos pacientes que están bajo profilaxis antifúngica (171). Además, la PCR y el galactomanano son dos marcadores con una cinética completamente diferente. El galactomanano es producido durante la fase de crecimiento logarítmico del hongo; sin embargo el DNA es liberado cuando las hifas son destruidas, lo cual puede suceder ante la escasez de nutrientes o incluso ante la presencia de antifúngicos (172).

Estudios previos han mostrado una mayor anticipación con la combinación de ambas técnicas, en torno a las 2 ó 3 semanas, pero estos resultados no han podido ser corroborados en nuestro estudio (148, 166). No obstante, recordemos que la estrategia de combinación de ambas técnicas permitió adelantar 7 días el tiempo desde la aparición de la neutropenia, que es el momento en el que se inicia la monitorización hasta el diagnóstico.

Por otra parte, llama la atención la presencia de 4 pacientes que nunca positivizaron la PCR a pesar de ser posteriormente diagnosticados de una infección fúngica probable, basándose en la positivización del galactomanano. Aunque no existe una explicación clara para este fenómeno, es posible que dos hechos se solapen con respecto a este tema y puedan explicar estas discrepancias. Por una parte es bien conocida la alta tasa de falsos positivos del Galactomanano (127, 128, 129, 130), por lo que es posible que estos pacientes no tuvieran finalmente una aspergilosis invasora. Recordemos que en ninguno de estos 4 pacientes la aspergilosis fue probada y que la sensibilidad y el valor predictivo negativo de la PCR utilizada, publicada en estudios previos del grupo del ISCIII de Majadahonda, fueron muy elevadas, del 91.6% y del 98.5% respectivamente (156). Por otra parte, la sensibilidad de la técnica de la PCR en especies de *Aspergillus no fumigatus* podría ser menor (173). Sin embargo, este hecho parece no tener demasiada relevancia en la práctica clínica habitual ya que es el *Aspergillus*

fumigatus la especie que con mayor frecuencia afecta a nuestros pacientes. Además, en aquellos pocos pacientes con falsos positivos de la PCR, la determinación del galactomanano debería confirmar el diagnóstico.

Con respecto al uso de tratamientos antifúngicos, la estrategia de la combinación de la PCR con el galactomanano redujo la necesidad de tratamiento antifúngico empírico y dirigido de forma significativa, como podemos observar en la tabla 12. Como era de esperar, el uso de tratamiento precoz, dirigido por la positivización de pruebas microbiológicas fue mayor en el grupo PCR-AGA probablemente porque la PCR permitió un diagnóstico más precoz. De hecho, sólo un paciente de los 19 de este grupo inició el tratamiento tras la positivización del galactomanano. Todo esto sugiere que los 18 pacientes restantes (18,8% del total del grupo PCR-AGA) pudieron beneficiarse claramente de la estrategia de la combinación de ambas técnicas y así evitar el desarrollo de formas de aspergilosis invasora con un mayor grado de angioinvasión. También es de destacar que a pesar de la administración de tratamiento antifúngico anticipado en ambos grupos, sólo un 17,4% (4/23) de los pacientes del grupo PCR-AGA que tuvieron una PCR positiva fueron diagnosticados posteriormente de una aspergilosis invasora probable o probada, a diferencia del 82,3% (14/17) en el grupo control, basado en la positivización del galactomanano. Todo ello apunta a que la estrategia combinada permite identificar un grupo de pacientes con estadios subclínicos de aspergilosis invasora en los que la administración de tratamiento antifúngico de forma precoz podría ser esencial, ya que la demora en el inicio del tratamiento antifúngico repercute de manera muy negativa en la mortalidad por esta infección (69, 70).

Dado que el grupo PCR-AGA precisó menos tratamiento antifúngico empírico, nos preguntamos qué habría ocurrido si los facultativos responsables de los 31 pacientes del grupo control a los que se les administró tratamiento antifúngico empírico hubieran tenido el resultado de la PCR. Los resultados demuestran que 4 de los 31 pacientes (12,9%) se podrían haber beneficiado del resultado de la PCR. En 2 casos, el resultado fue negativo y se podría haber evitado un tratamiento innecesario. En los 2 casos restantes, el resultado fue positivo con

una anticipación de la PCR de 8 y 22 días, por lo que el tratamiento se podría haber iniciado con una mayor precocidad.

La mortalidad global del estudio al final del seguimiento fue del 14,8% (13+17/203). Sólo 5 de las 30 muertes (16,67%) estuvieron relacionadas directamente con una aspergilosis invasora probable o probada (1 en el grupo PCR-AGA y 5 en el grupo control). Las tasas de mortalidad son similares a las publicadas en otros estudios con pacientes de alto riesgo (174, 175, 176). Podemos observar una tendencia a una menor mortalidad atribuible a la infección fúngica en el grupo PCR-AGA en comparación con el grupo control (1 versus 4), en probable relación con el diagnóstico más precoz de la infección; sin embargo el tamaño de la muestra no permite establecer diferencias estadísticamente significativas con respecto a este objetivo secundario del estudio.

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, este es el primer estudio randomizado, realizado en pacientes de alto riesgo de infección fúngica por aspergillus que compara la utilidad del uso combinado de la PCR y el galactomanano con el estándar de diagnóstico precoz basado en el galactomanano únicamente. Sin embargo debemos realizar algunas consideraciones con relación al estudio:

Por una parte la tasa de positivización de la PCR en el grupo PCR-AGA es mayor que en el grupo control (23,9% versus 14%, $p=0,07$), por lo que se plantea la posibilidad de que los dos grupos no fueran totalmente comparables en base a su riesgo de desarrollo de una aspergilosis invasora. Por otra parte la duración de la neutropenia en pacientes con diagnóstico de leucemia aguda mieloblástica fue mayor en el grupo PCR-AGA que en el grupo control (30 versus 22, $p = 0.006$) lo que podría haber perjudicado al grupo PCR-AGA, infraestimando el beneficio de la estrategia combinada. Recordemos que la neutropenia es uno de los factores de riesgo clásicos de la infección fúngica por aspergillus (17, 20, 21, 22) .

Por el contrario, el número de pacientes con un galactomanano positivo fue menor en el grupo PCR-AGA que en el grupo control (8 versus 17, $p=0,102$),

aunque no se alcanzara la significación. Este hallazgo puede explicarse por el inicio precoz de tratamiento antifúngico una vez positivizada la PCR, que impediría la detección posterior del galactomanano. Como ya se ha mencionado anteriormente, el poder estadístico de este estudio fue insuficiente para demostrar diferencias estadísticamente significativas con respecto a la mortalidad. Las pruebas de imagen no fueron evaluadas por un radiólogo independiente, ciego para el estudio. Tampoco ha sido evaluada la cinética del galactomanano y la PCR tras el diagnóstico, intentando correlacionarlo con los resultados clínicos y las respuestas al tratamiento antifúngico, lo cual podría ser interesante realizar en estudios futuros. Es bien conocido que valores elevados del galactomanano, o la falta de descenso de este se puede considerar como un fallo del tratamiento (123). Además existe correlación entre la evolución de los valores del galactomanano y la respuesta al tratamiento antifúngico y la supervivencia de los pacientes (124).

En nuestro estudio no se ha evaluado el coste-efectividad de la estrategia combinada. Sin embargo, parece razonable que un diagnóstico más temprano de la aspergilosis invasora, en estadios más precoces de la infección, podría reducir la morbi-mortalidad y probablemente los costes derivados de esta, incluyendo el uso de tratamiento antifúngico empírico innecesario (166, 177). Tampoco se ha valorado si la estrategia combinada ofrece ventajas respecto al uso de profilaxis antifúngica con azoles de espectro extendido en pacientes de alto riesgo. Un estudio reciente ha demostrado que pacientes bajo profilaxis frente al hongo filamentoso con Posaconazol no se benefician del seguimiento con el galactomanano, y recomiendan el uso de esta técnica como herramienta diagnóstica ante la sospecha clínica de infección fúngica (178). Sería interesante realizar estudios en los que se estudiase si la asociación de la PCR al galactomanano en el seguimiento podría beneficiar a pacientes bajo profilaxis frente a hongo filamentoso.

En conclusión, este es el primer estudio que compara la eficacia de la estrategia de la combinación del galactomanano y la PCR-TR con la determinación habitual única del galactomanano. A través de un diagnóstico más precoz y un inicio más temprano del tratamiento antifúngico, esta estrategia fue capaz de

reducir la incidencia de aspergilosis invasora probable o probada, que era el objetivo principal del estudio.

Con respecto a la segunda parte de este trabajo, una de las grandes incógnitas respecto a la aspergilosis invasora es si existe un componente genético que predisponga o proteja de su desarrollo. Siempre ha existido la duda de por qué unos pacientes desarrollan una aspergilosis y otros no, aunque tengan el mismo tipo de enfermedad y otros factores de riesgo similares. Al igual que en otras enfermedades, la posibilidad de que ciertos polimorfismos genéticos pudieran modificar el riesgo ha sido estudiada ampliamente. Existen muchos sistemas y vías de señalización que pueden modificar la respuesta inmune ante cualquier tipo de infección, incluyendo las de origen fúngico.

Son muchos los polimorfismos que han demostrado ser un factor de riesgo genético para el desarrollo de una AI. Entre estos polimorfismos destacan los del toll-like receptor 4, los polimorfismos que afectan a genes de la familia de las lectinas tipo C, a los genes de los receptores del factor de necrosis tumoral 1 y 2, o a los genes de las interleukinas 10 y 1. Así mismo, existen ciertas variables genéticas con efecto protector frente al desarrollo de una AI como son otros polimorfismos que también afectan a genes de la familia de las lectinas C, a la IL-10 y a la IL-1 (29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38).

La vía NF κ B es una vía de respuesta celular inmediata, de gran importancia en la respuesta rápida del sistema inmune frente a diferentes patógenos. La respuesta inmune innata es fundamental durante la etapa inicial de la defensa del huésped contra la infección por diferentes patógenos, antes de que se desarrolle la inmunidad adquirida antígeno-específica. Para sobrevivir dentro del ambiente hostil del huésped, los patógenos utilizan un conjunto de proteínas capaces de interferir con las rutas de transducción de señales, cuyo objetivo final es eliminar a los microorganismos. Una de las rutas de transducción de señales más importantes en las respuestas inmunes innata y adquirida es la mediada por la activación de NF- κ B. La actividad de NF- κ B da como resultado la transcripción de genes que

codifican citocinas, factores de crecimiento, proteínas de fase aguda, inmunoreceptores, otros factores de transcripción, moléculas de adhesión celular, o proteínas reguladores de la apoptosis. Durante el curso de una infección la inhibición o activación de NF- κ B bloquea o induce, respectivamente, la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas, las cuales tienen como función principal reclutar macrófagos y polimorfonucleares hacia el sitio del daño tisular, para eliminar al invasor por fagocitosis (179).

Algunos polimorfismos de la vía NF κ B han sido estudiados previamente y se han relacionado con patologías como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la artritis psoriásica, la arteritis de células gigantes, la diabetes mellitus tipo 1, la enfermedad celiaca o la enfermedad de Parkinson, así como con la susceptibilidad a desarrollar diferentes neoplasias como el carcinoma escamoso, el cáncer colo-rectal, el carcinoma hepatocelular, el cáncer de mama o el mieloma múltiple (180).

Dada la importancia de esta vía de señalización en múltiples patologías relacionadas con la respuesta inmune, se planteó un estudio que permitiera evaluar ciertos polimorfismos que afectan a genes implicados en esta vía y su repercusión en el desarrollo de la AI.

Los resultados indicaban que los portadores del alelo NF κ B2rs11574851T y el genotipo IRF4rs12203592T/T tenían un riesgo significativamente mayor de desarrollar AI cuando se comparaban con los portadores del alelo o genotipo wild-type (OR=2.01 95%IC 1.15-3.53, P=0.018 y OR=3.85 95%IC 1.22-12.1, P=0.027, respectivamente).

Por otra parte los portadores del genotipo RELBrs2288918C/C mostraban un riesgo significativamente menor de desarrollar la infección (OR=0.42 95%IC 0.20-0.88, P=0.013).

La asociación de la variante NF κ B2rs11574851 además estaba significativamente asociada con un mayor riesgo a desarrollar AI cuando se asumía

un modelo de herencia aditivo (OR=1.80 95%IC 1.08-3.00, P=0.028) lo que sugiere un efecto dependiente de la dosis alélica (los homocigotos mutados presentan más riesgo que los heterocigotos).

Un análisis estratificado por trasplante considerando sólo las muestras de los donantes y los casos de AI post-trasplante mostró que los pacientes portadores del genotipo IRF4rs12203592T/T mostraban una tendencia a presentar un mayor riesgo a desarrollar AI (OR=5.87 95%IC 1.00-34.3, P=0.045).

Aunque ninguna de las asociaciones descritas se mantenía significativa tras corregir por múltiples comparaciones, nuestros datos sugieren que variantes genéticas en la vía de NFκB puedan influir en el riesgo de desarrollar aspergilosis invasora.

Nuestros resultados sugieren que polimorfismos en los genes NFκB2, IRF4 y RELB pueden tener un efecto sobre la susceptibilidad a desarrollar AI pero estudios adicionales son necesarios para validar nuestros resultados (tanto en la población global como en la población de trasplante).

El polimorfismo en NFκB2 es sinónimo y se encuentra en región codificante. Sugiere que el polimorfismo puede alterar la función de la proteína aunque no cambie la estructura del aminoácido. Podría además influir en la estabilidad del mRNA.

Los polimorfismos en RELB y IRF4 están en regiones intrónicas lo que sugiere que puedan actuar modulando el corte y empalme así como la generación de isoformas alternativas, o incluso regulando la expresión génica ya que el polimorfismo crea un sitio de unión para un factor de transcripción en el intrón (28).

Con respecto a estos resultados es de destacar que hasta el momento actual este tipo de polimorfismos no había sido estudiado previamente como factor de riesgo para el desarrollo de la infección fúngica por aspergillus. El principal

problema para realizar un estudio de este tipo es que es necesaria una población muy seleccionada, de pacientes de alto riesgo de desarrollar una infección fúngica por aspergillus, y además de gran tamaño, por ello ha sido necesaria la unión de 5 poblaciones a nivel internacional obteniendo la mayor población de estudio de aspergilosis invasiva hasta la fecha.

Es de destacar, que se están analizando polimorfismos genéticos que afectan no sólo a NFκB, sino a otras vías con especial importancia en la respuesta inmune frente a la infección.

Este estudio tiene fortalezas, pero también importantes limitaciones. Como fortalezas destaca el origen multicéntrico de la población que evitaría parte de los sesgos de selección. Además, la población es grande, así como el número de polimorfismos estudiados, lo cual permitió evaluar la utilidad potencial de las variantes genéticas para predecir el riesgo de desarrollar una infección fúngica por aspergillus. Con respecto a las limitaciones del estudio, incluyen la dificultad del diagnóstico de la infección fúngica por aspergillus, un número bajo de casos de infecciones fúngicas probables o probadas y la falta de información sobre la profilaxis antifúngica en algunos pacientes.

Tras analizar los resultados de este estudio, se plantean múltiples consideraciones. Por una parte, se podría plantear la posibilidad de individualizar y ajustar el tipo de tratamiento antifúngico profiláctico en función de la presencia o no de estos polimorfismos. Por otra parte, se podrían estudiar este tipo de polimorfismos en los donantes de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, y ver qué importancia tienen en el desarrollo posterior de una infección fúngica por aspergillus en el receptor. La demostración de que existen polimorfismos genéticos en el donante que predisponen a una IFI en el receptor podría tener especial relevancia en la selección de donantes. No obstante se requieren más estudios y muestras tanto de donantes como de receptores para poder confirmar estas hipótesis.

El estudio de polimorfismos genéticos no está actualmente incorporado a la práctica clínica diaria, y son necesarios más estudios para evaluar su valor real y las implicaciones que puede tener sobre el paciente. No obstante dicho estudio podría ayudarnos a disminuir la morbi-mortalidad de los pacientes hematológicos de alto riesgo, que con frecuencia van asociadas a la infección fúngica por aspergillus.

6. CONCLUSIONES

En relación al objetivo principal y al objetivo 1:

1a- El uso combinado de la técnica de detección de galactomanano y la PCR en tiempo real es una estrategia capaz de reducir la incidencia de aspergilosis probable o probada en comparación con el uso único del galactomanano en pacientes hematológicos de alto riesgo.

1b- La mortalidad global, así como la mortalidad a los 30 días y a los 180 días fue similar entre ambos grupos con el uso combinado de (q-RT-PCR) y galactomanano o sólo con galactomanano. No hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la mortalidad atribuible a aspergilosis invasora probable o probada.

En relación con el objetivo 2:

Según los criterios de la EORTC/MSG:

No se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la incidencia global de IFI entre ambos grupos, pero se observa una tendencia a un diagnóstico más temprano de IFI en el grupo de la combinación de las dos técnicas.

En relación con el objetivo 3:

3a- No hubo diferencias significativas entre la incidencia de neutropenia febril ni los días de neutropenia febril entre ambos grupos.

3b- La estrategia de la combinación de ambas técnicas permitió reducir el tiempo entre la aparición de la neutropenia y el diagnóstico de la infección fúngica.

En relación con el objetivo 4:

No se ha podido establecer una clara dinámica de positividad de ambas técnicas (PCR y Galactomanano) en la población de estudio.

En relación con el objetivo 5:

La estrategia de diagnóstico mediante la combinación de la PCR y el galactomanano permitió reducir el uso de tratamiento antifúngico empírico y dirigido y aumentar el uso de tratamiento precoz. La duración del tratamiento antifúngico fue similar en ambos grupos.

En relación con el objetivo 6

6a- Los portadores del alelo NFkB2rs11574851T y el genotipo IRF4rs12203592T/T tienen un riesgo significativamente mayor de desarrollar una aspergilosis invasora.

6b- Los portadores del genotipo RELBrs2288918C/C tienen un riesgo significativamente menor de desarrollar una aspergilosis invasora que los otros genotipos analizados.

7. MATERIAL DERIVADO DE LOS TRABAJOS

Parte de los resultados de este trabajo han sido recientemente publicados en un artículo científico en una revista de prestigio internacional. Además existe un segundo trabajo pendiente de aceptación para su publicación y un tercer trabajo en fase de elaboración.

Tras la creación del grupo PCRAGA, los integrantes de dicho grupo aparecen como autores en todas las publicaciones derivadas de las muestras de este estudio.

ARTICULO 1

Título: 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.

Autores: Aguado JM, Vázquez L, Fernández-Ruiz M, **Villaescusa T**, Ruiz-Camps I, Barba P, Silva JT, Batlle M, Solano C, Gallardo D, Heras I, Polo M, Varela R, Vallejo C, Olave T, López-Jiménez J, Rovira M, Parody R, Cuenca-Estrella M; PCRAGA Study Group; Spanish Stem Cell Transplantation Group; Study Group of Medical Mycology of the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; Spanish Network for Research in Infectious Diseases.

Referencia: Clin Infect Dis. 2015 Feb 1;60(3):405-14.

DOI: 10.1093/cid/ciu833.

Premio: Premiado como el artículo relacionado con la infección fúngica más influyente del año. 25th Congress of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Copenhagen 25-28 de Abril de 2015.

ARTICULO 2

Título: "Polymorphisms in host immunity modulating genes and risk of invasive aspergillosis: Results from the aspBIOmics consortium".

Autores: Lupiañez CB, Canet LM, Alcazar-Fuoli L, Carvalho A, Springer J, Lackner M, Segura-Catena J, Comino A, Olmedo C, Ríos R, Fernández-Montoya A, Cuenca-Estrella M, Solano C, Miguel Ángel López-Nevot, Cunha C, **Villaescusa T**, Fianchi L, Aguado JM, Pagano L, López-Fernández E, Potenza L, Luppi M, Lass-Flörl C, Loeffler J, Einsele H, Vazquez L, PCRAGA group, Jurado M, Sainz J.

Referencia: pendiente de aceptación.

COMUNICACIÓN ORAL

Congreso: European Hematology Association Congress. Viena 11-14 de Junio de 2015

Título: "Polymorphisms in immunomodulating genes and risk of invasive aspergillosis: Results from the aspBIOmics consortium".

Autores: Juan Sainz, Carmen Belén Lupiañez, Luz Canet , Laura Alcazar-Fuoli , Agostinho Carvalho , Jan Springer ,Michaela Lackner , Juana Segura-Catena, Ana Comino , Carmen Olmedo , Rafael Ríos , Antonio Fernández-Montoya , Manuel Cuenca-Estrella , Carlos Solano , Miguel Ángel López-Nevot , Cristina Cunha , **Teresa Villaescusa** ,Luana Fianchi , José María Aguado , Livio Pagano , Elisa López-Fernández , Leonardo Potenza , Mario Luppi , Cornelia Lass-Flörl , Jurgen Loeffler , Hermann Einsele , Lourdes Vázquez , PCR-AGA Study Group , Manuel Jurado.

Código de abstract: S803

8. BIBLIOGRAFIA (por orden de aparición)

1. Horn, D.L., Fishman J.A., Steinbach, et al. Presentation of the PATH Alliance registry for prospective data collection and analysis of the epidemiology, therapy, and outcomes of invasive fungal infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007;59(4):407-414.
2. Martino R., Subirá M. Invasive fungal infections in hematology: new trends. *Ann Hematol.* 2002;81:233-243.
3. Donowitz G.R., Maki D.G., Crnich C.J., Pappas P.G., Rolston K.V. Infections in the neutropenic patient new views of an old problem. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2001:113-39.
4. Marr K.A., Carter R.A., Crippa F., Wald A., Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002 Apr 1;34(7):909-17.
5. Neofytos D., Horn D., Anaissie E., Steinbach W., Olyaei A., Fishman J., et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin. Infect. Dis.* 2009 Feb 1;48(3):265-73.
6. Pagano L., Caira M., Valentini C.G., Posteraro B., Fianchi L. Current Therapeutic approaches to fungal infections in immunocompromised hematological patients. *Bloods rev* 2010. Mar;24(2):51-61.
7. Leventakos K., Lewis R.E., Kontoyiannis D.P. Fungal infections in leukemia patients: how do we prevent and treat them? *Clin. Infect. Dis* 2010 Feb 1 50(3):405-15.
8. Pagano L., Caira M., Nosari A., Van Lint M.T., Candoni A., Offidani M., et al. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study-Sorveglianza Epidemiologica infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. *Clin Infect Dis* 2007;45:1161-70.
9. Marr K.A., Carter R.A., Boeckh M., Martin P., Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood.* 2002 Dec 15;100(13):4358-66.

10. Cornet M., Fleury L., Maslo C., Bernard J.F., Brücker G. Invasive Aspergillosis Surveillance Network of the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area. *J Hosp Infect.* 2002 Aug;51(4):288-96.
11. Thursky K., Byrnes G., Grigg A., Szer J., Slavin M. Risk factors for post-engraftment invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2004 Jul;34(2):115-21.
12. Cordonnier C., Ribaud P., Herbrecht R., Milpied N., Valteau-Couanet D., Morgan C., et al. Prognostic factors for death due to invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year retrospective study of consecutive patients at French transplantation centers. *Clin. Infect. Dis.* 2006 Apr 1;42(7):955-63.
13. Lin S.J., Schranz J., Teutsch S.M. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2001 Feb 1;32(3):358-66.
14. Upton A., Kirby K.A., Carpenter P., Boeckh M., Marr K.A. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis.* 2007 Feb 15;44(4):531-40.
15. Herbrecht R., Denning D.W., Patterson T.F., Bennett J.E., Greene R.E., Oestmann J.W., et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med.* 2002 Aug 8;347(6):408-15.
16. Chamilos G., Luna M., Lewis R.E., Bodey G.P., Tarrand J.J., Kontoyiannis D.P. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care center; an autopsy over a 15-year period (1989-2003). *Haematologica* 2006; 91 (7).
17. Prentice H.G., Kibbler C.C., Prentice A.G. Towards a targeted, risk-based, antifungal strategy in neutropenic patients. *Br J Haematol.* 2000 Aug;110(2):273-84.
18. Garcia-Vidal C., Upton A., Kirby K.A., Marr K.A. Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clin Infect Dis.* 2008 Oct 15;47(8):1041-50.

19. Jantunen E., Nihtinen A., Anttila V.J. Changing landscape of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2008 Jun;10(3):156-61.
20. Vallejo C. Vázquez L., Cabrera Martín J.R., Treatment of invasive fungal infections in high-risk haematological patients: What have we learnt in the past 10 years? *Rev Esp Quimioter.* 2013 Dec;26(4):378-386.
21. Caira M., Candoni A., Verga L., Busca A., et al. SEIFEM Group (Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine in Emopatie Maligne). Pre-chemotherapy risk factors for invasive fungal diseases: prospective analysis of 1,192 patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia (SEIFEM 2010-a multicenter study). *Haematologica* 2015 Feb;100(2):284-92.
22. Stanzani M., Lewis R.E. , Fiacchini M., Ricci P., et al. A Risk Prediction Score for Invasive Mold Disease in Patients with Hematological Malignancies. *PLOS ONE* September 2013 | Volume 8 | Issue 9 | e75531
23. Lizasoain M., Ortiz M.C., Lumbreras C. Inmunodepresión, Infección y Cáncer. En: Valentín Maganto V dir. *Oncología en atención primaria.* Madrid: Novartis; 2003. p. 209-224.
24. Schaffner A. Therapeutic concentrations of glucocorticoids suppress the antimicrobial activity of human macrophages without impairing their responsiveness to gamma interferon. *J Clin Invest.* 1985 Nov;76(5):1755-64.
25. Schneemann M., Schaffner A. Host defense mechanism in *Aspergillus fumigatus* infections. *Contrib Microbiol.* 1999;2:57-68.
26. Cenci E., Mencacci A., Del Sero G., Bacci A., Montagnoli C., d'Ostiani C.F., et al. Interleukin-4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis through suppression of protective type I responses. *J Infect Dis.* 1999 Dec;180(6):1957-68 .
27. Nagai H., Guo J., Choi H., Kurup V. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha protect mice from invasive aspergillosis. *J Infect Dis.* 1995 Dec;172(6):1554-60
28. Vargas-alarc G., Tovilla-Z C., Fragoso M. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta médica de México* 2013; 149:220-8.

29. Bochud P.Y., Chien J.W., Marr K.A., Leisenring W.M., Upton A., Janer M., et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2008 Oct 23;359(17):1766–77.
30. de Boer M.G.J., Jolink H., Halkes C.J.M., van der Heiden P.L.J., Kremer D., Falkenburg J.H.F., et al. Influence of polymorphisms in innate immunity genes on susceptibility to invasive aspergillosis after stem cell transplantation. *PLoS One.* 2011 Jan ;6(4):e18403.
31. Geijtenbeek T.B., Gringhuis S.I. Signalling through Ctype lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:465-479.
32. Steele C., Rapaka R.R., Metz A., Pop S.M., Williams D.L., et al. The beta-glucan receptor dectin-1 recognises specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathol* 2005; 1:e42.
33. Sainz J., Lupiáñez C.B., Segura-Catena J., Vazquez L., Ríos R., Oyonarte S., et al. Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary Aspergillosis infection. *PLoS One.* 2012 Jan;7(2):e32273
34. Sainz J., Pérez E., Hassan L., Moratalla A., Romero A., Collado M.D., et al. Variable number of tandem repeats of TNF receptor type 2 promoter as genetic biomarker of susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Hum. Immunol.* 2007 Jan;68(1):41–50.
35. Sainz J., Salas-Alvarado I., López-Fernández E., Olmedo C., Comino A., García F., Blanco A., Gómez-Lopera S., Oyonarte S., Bueno P., Jurado M. TNFR1 mRNA expression level and TNFR1 gene polymorphisms are predictive markers for susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Nt J Immunopathol Pharmacol.* 2010 Apr-Jun;23(2):423-36.
36. Sainz J., Hassan L., Perez E., Romero A., Moratalla A., López-Fernández E., Oyonarte S., Jurado M. Interleukin-10 promoter polymorphism as risk factor to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Immunol Lett.* 2007 Mar 15;109(1):76-82.
37. Sainz J., Pérez E., Gómez-Lopera S., Jurado M. IL1 gene cluster polymorphisms and its haplotypes may predict the risk to develop invasive pulmonary aspergillosis and modulate c-reactive protein level. *J Clin Immunol* 2008; 28:473-485

38. Sainz J., Pérez E., Gómez-Lopera S., López-Fernández E., Moratalla L., Oyonarte S., Jurado M. Genetic variants of IL6 gene promoter influence on C-reactive protein levels but are not associated with susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis in haematological patients. *Cytokine*. 2008 Mar;41(3):268-78
39. Mohamed M.R., McFadden G. NFκB inhibitors: Strategies from poxviruses. *Cell Cycle* 2014 Oct 28 ; 8(19):3125–32.
40. Staudt L.M. Oncogenic Activation of NF- k B. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Jun;2(6): 2010;1–30
41. Tomblyn M., Chiller T., Einsele H., Gress R., Sepkowitz K., Storek J., Wingard J.R., Young J.A., Boeckh M.J. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Oct;15(10):1143-238.
42. Hughes W.T., Armstrong D., Bodey G.P., Bow E.J., Brown A.E., Calandra T., et al. 2002. Guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis*. 2002 Mar 15;34(6):730-51.
43. Bodey G.P., Buckley M., Sathe Y.S., Freireich E.J. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med*. 1966 Feb;64(2):328-40.
44. Kontoyiannis D.P., Chamilos G., Lewis R.E., Giralt S., Cortes J., Raad I.I., et al. Increased bone marrow iron stores is an independent risk factor for invasive aspergillosis in patients with high-risk hematologic malignancies and recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer* 2007 Sep 15;110(6):1303–6.
45. Ozyilmaz E., Aydogdu M., Sucak G., Aki S.Z., Ozkurt Z.N., Yegin Z.A., Kokturk N. Risk factors for fungal pulmonary infections in hematopoietic stem cell transplantation recipients: the role of iron overload. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Oct;45(10):1528-33.
46. Ochs L., Shu X.O., Miller J., Enright H., Wagner J., Filipovich A., et al. Late infections after allogeneic bone marrow transplantations: comparison of incidence in related and unrelated donor transplant recipients. *Blood*. 1995 Nov 15;86(10):3979-86.

47. Saavedra S., Sanz G.F., Jarque I., Moscardo F., Jimenez C., Lorenzo I., et al. Early infections in adult patients undergoing unrelated donor cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002 Dec;30(12):937-43.
48. Hagen E.A., Stern H., Porter D., Duffy K., Foley K., Luger S., et al. High rate of invasive fungal infections following non myeloablative allogeneic transplantation. *Clin Infect Dis.* 2003 Jan1;36(1):9-15.
49. Crippa F., Holmberg L., Carter R.A., Hooper H., Marr K.A., Bensinger W., et al. Infectious complications after autologous CD34-selected peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8(5):281-9.
50. Peter E., Bakri F., Ball D.M., Cheney R.T., Segal B.H. Invasive pulmonary filamentous fungal infection in a patient receiving inhaled corticosteroid therapy. *Clin Infect Dis.* 2002 Sep1;35(5):e54-6.
51. Leav B.A., Fanburg B., Hadley S. Invasive pulmonary aspergillosis associated with high dose inhaled fluticasone. *N Engl J Med.* 2000 Aug 24;343(8):586.
52. Rello J., Esandi M.E., Mariscal D., Gallego M., Domingo C., Valles J. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: report of eight cases and review. *Clin Infect Dis.* 1998 Jun;26(6):1473-5.
53. Lionakis M.S., Kontoyiannis D.P. Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet.* 2003 Nov 29;362(9398):1828-38.
54. Rinehart J.J., Balcerzak S.P., Sagone A.L., Lo Buglio A.F. Effects of corticosteroids on human monocyte function. *J Clin Invest.* 1974 Dec;54(6):1337-43.
55. Ng T.T., Robson G.D., Denning D.W. Hydrocortisone-enhanced growth of *Aspergillus* spp.: implications for pathogenesis. *Microbiology.* 1994 Sep;140 (Pt 9):2475-9.
56. Ribaud P., Chastang C., Latge J.P., Baffroy-Lafitte L., Parquet N., Devergie A., et al. Survival and prognostic factors of invasive aspergillosis after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis.* 1999 Feb;28(2):322-30.
57. O'Donnell M.R., Schmidt G.M., Tegtmeier B.R., Faucett C., Fahey J.L., Ito J., et al. Prediction of systemic fungal infection in allogeneic marrow recipients: impact of amphotericin prophylaxis in high-risk patients. *J Clin Oncol.* 1994 Apr;12(4):827-34.

58. Morrison V.A., Haake R.J., Weisdorf D.J. Non-Candida fungal infections after bone marrow transplantation: risk factors and outcome. *Am J Med.* 1994 Jun;96(6):497-503.
59. Patterson T.F. Género *Aspergillus*. En: Mandell, Douglas, Bennett dir. *Enfermedades Infecciosas Principios y Práctica*. Madrid: Elsevier; 2006. p. 2958-2973.
60. Carlile M.J., Watkinson S.C. y Gooday G. (2001). *The Fungi*. Academic Press, Londres, Reino Unido.
61. Amich J., Vicentefranqueira R., Mellado E., Ruiz-Carmuega A., Leal F. et Calera J.A. The ZrfC alkaline zinc transporter is required for *Aspergillus fumigatus* virulence and its growth in the presence of the Zn/Mn-chelating protein calprotectin. *Cellular Microbiology*, 2013 Nov 18.
62. Denning D.W. STATE-OF-THE-ART CLINICAL ARTICLE Invasive Aspergillosis. 1998;781–803.
63. Agrawal S., Hope W., Sinkó J., Kibbler C. Optimizing management of invasive mould diseases. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011 Jan ;66 Suppl 1:i45–53.
64. Pizzo P.A., Robichaud K.J., Gill F.A., Witebsky F.G. Empiric antibiotics and antifungal therapy for cancer patients with prolonged fever and granulocytopenia. *Am J Med* 1982; 72:101-11.
65. Empiric antifungal therapy in febrile granulocytopenic patients. EORTC International Antimicrobial Therapy Cooperative Group. *Am J Med* 1989,86:668-72
66. Maertens J., Marchetti O., Herbrecht R., Cornely O.A., Fluckiger U., Frere P. et al. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3-2009 Update. *Bone Marrow Transplant.*2011;46:709-18.
67. Friefield A.G., Bow E.J., Sepkowitz K.A., Boeckh M.J., Ito J.I., Mullen C.A. et al. Clinical Practice Guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cáncer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2011;52:e56-e93.
68. Maschmeyer G., Heinz W.J., Hertenstein B., Horst H., Requadt C., Wagner T., et al. Immediate versus deferred empirical antifungal (IDEA) therapy in high-risk patients with febrile neutropenia: a randomized, double-blind,

- placebo-controlled, multicenter study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2013 May ;32(5):679–89.
69. Sipsas N.V., Bodey G.P., Kontoyiannis D.P. Perspectives for the management of febrile neutropenic patients with cancer in the 21st century. *Cancer* 2005;103(6):1103-1113.
 70. Becker M.J. Enhanced antifungal efficacy in experimental invasive pulmonary aspergillosis by combination of AmBisome with Fungizone as assessed by several parameters of antifungal response. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002 May 1;49(5):813–20.
 71. Cordonnier C., Pautas C., Maury S., et al. Empirical versus preemptive antifungal therapy for high-risk, febrile, neutropenic patients: a randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis* 2009; 48(8):1042-1051.
 72. 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. Nature Publishing Group*; 2009 Apr;43(7):553–61.
 73. Schneider T., Halter J., Heim D., Passweg J., Stern M., Tichelli A., et al. Pre-emptive diagnosis and treatment of fungal infections. Evaluation of a single-centre policy. *Clin. Microbiol. Infect.* [Internet]. 2012 Feb;18(2):189–94.
 74. Tan B.H., Low J.G.H., Chlebicka N.L., Kurup A., Cheah F.K., Lin R.T.P., et al. Galactomannan-guided preemptive vs. empirical antifungals in the persistently febrile neutropenic patient: a prospective randomized study. *Int. J. Infect. Dis. International Society for Infectious Diseases*; 2011 May;15(5):e350–6.
 75. Cuenca-Estrella M., Bassetti M., Lass-Flörl C., Ráčil Z., Richardson M., Rogers T.R. Detection and investigation of invasive mould disease. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011 Jan ; 66 Suppl 1:i15–24.
 76. Rinaldi M.G. Problems in the diagnosis of invasive fungal diseases. *Rev Infect Dis.* 1991 May-Jun;13(3):493-5.
 77. Jantunen E., Piilonen A., Volin L., Parkkali T., Koukila-Kahkola P., Ruutu T., et al. Diagnostic aspects of invasive *Aspergillus* infections in allogeneic BMT recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Apr;25(8):867-71.

78. Jones B.L., McLintock L.A. Impact of diagnostic markers on early antifungal therapy. *Curr Opin Infect Dis.* 2003 Dec;16(6):521-6.
79. Levy H., Horak D.A., Tegtmeier B.R., Yokota S.B., Forman S.J. The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Respir Med.* 1992 May;86(3):243-8.
80. Kahn F.W., Jones J.M., England D.M. The role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Clin Pathol.* 1986 Oct;86(4):518-23.
81. Huaranga A.J., Leyva F.J., Signes-Costa J., Morice R.C., Raad I., Darwish A.A., et al. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of pulmonary complications of bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant.* 2000 May;25(9):975-9.
82. Pauw B.D. 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. *Clinical Infectious Diseases* 2008;46:1813–21.
83. Heussel C.P., Kauczor H.U., Heussel G.E., Fischer B., Begrich M., Mildenerger P., et al. Pneumonia in febrile neutropenic patients and in bone marrow and blood stem-cell transplant recipients: use of high-resolution computed tomography. *J Clin Oncol.* 1999 Mar;17(3):796-805.
84. Mori M., Galvin J.R., Barloon T.J., Gingrich R.D., Stanford W. Fungal pulmonary infections after bone marrow transplantation: evaluation with radiography and CT. *Radiology.* 1991 Mar;178(3):721-6.
85. Blum U., Windfuhr M., Buitrago-Tellez C., Sigmund G., Herbst E.W., Langer M. Invasive pulmonary aspergillosis. MRI, CT, and plain radiographic findings and their contribution for early diagnosis. *Chest.* 1994 Oct;106(4):1156-61.
86. Caillot D., Casasnovas O., Bernard A., Couaillier J.F., 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 Jan;15(1):139-47.
87. Caillot D., Couaillier J.F., Bernard A., Casasnovas O., Denning D.W., Mannone L, et al. Increasing volume and changing characteristics of invasive

- pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J Clin Oncol*. 2001 Jan 1;19(1):253-9
88. Miyazaki T., Kohno S., Mitsutake K., Maesaki S., Tanaka K., Ishikawa N., et al. Plasma (1->3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *J Clin Microbiol*. 1995 Dec;33(12):3115-8.
 89. Obayashi T. (1->3)-beta-D-glucanemia in deep mycosis. *Mediators Inflamm*. 1997;6(4):271-3.
 90. Odabasi Z., Mattiuzzi G., Estey E., Kantarjian H., Saeki F., Ridge R.J., 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 Jul 15;39(2):199-205
 91. Obayashi T., Yoshida M., Mori T., Goto H., Yasuoka A., Iwasaki H., et al. Plasma (1->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet*. 1995 Jan 7;345(8941):17-20.
 92. Obayashi T., Negishi K., Suzuki T., Funata N. Reappraisal of the serum (1->3)-beta-D glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections--a study based on autopsy cases from 6 years. *Clin Infect Dis*. 2008 Jun 15;46(12):1864-70.
 93. Ostrosky-Zeichner L., Alexander B.D., Kett D.H., Vazquez J., Pappas P.G., Saeki F., et al. Multicenter clinical evaluation of the (1->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis*. 2005 Sep 1;41(5):654-9.
 94. Pazos C., Ponton J., Del Palacio A. Contribution of (1->3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol*. 2005 Jan;43(1):299-305.
 95. Koo S., Bryar J.M., Page J.H. et al. Diagnostic permormance of the (1->3)-Beta-D-glucan assay for invasive fungal disease. *Clin Infect Dis* 2009; 49:1650-9.
 96. Stynen D., Goris A., Sarfati J., Latge J.P.. A new sensitive sandwich enzyme-

- linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 1995 Feb;33(2):497-500.
97. 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 Nov 1;186(9):1297–306.
98. Pfeiffer C.D., Fine J.P., Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 2006 May 15;42(10):1417–27.
99. Becker M.J., de Marie S., Willemse D., Verbrugh H.A., Bakker-Woudenberg I.A. Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. *J Clin Microbiol.* 2000 Apr;38(4):1434-8.
100. Hercules C. Platelia [package insert] Bio-rad. 2003.
101. Bretagne S., Marmorat-Khuong A., Kuentz M., Latge J.P., Bart-Delabesse E., Cordonnier C. Serum *Aspergillus* galactomannan antigen testing by sandwich ELISA: practical use in neutropenic patients. *J Infect.* 1997 Jul;35(1):7-15.
102. Bretagne S., Costa J.M., Bart-Delabesse E., Dhedin N., Rieux C., Cordonnier C. Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 1998 Jun;26(6):1407-12.
103. Buchheidt D., Hummel M., Schleiermacher D., Spiess B., Schwerdtfeger R., Cornely O.A., et al. Prospective clinical evaluation of a LightCycler-mediated polymerase chain reaction assay, a nested-PCR assay and a galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay for detection of invasive aspergillosis in neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol.* 2004 Apr;125(2):196-202.
104. Costa C., Costa J.M., Desterke C., Botterel F., Cordonnier C., Bretagne S. Real-time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2002 Jun; 40(6):2224-7.

105. Herbrecht R., Letscher-Bru V., Oprea C., Lioure B., Waller J., Campos F., et al. Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2002 Apr 1;20(7):1898–906.
106. Jarque I., Andreu R., Salavert M., Gomez D., Peman J., Gobernado M., et al. Value of Aspergillus galactomannan antigen detection in the diagnosis and follow-up of invasive aspergillosis in hematological patients. *Rev Iberoam Micol*. 2003 Sep;20(3):116-8.
107. Kami M., Fukui T., Ogawa S., Kazuyama Y., Machida U., Tanaka Y., et al. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2001 Nov 1;33(9):1504-12.
108. Machetti M., Feasi M., Mordini N., Van Lint M.T., Bacigalupo A., Latge J.P., et al. Comparison of an enzyme immunoassay and a latex agglutination system for the diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 1998 May;21(9):917-21.
109. 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 Oct;37(10):3223–8.
110. Maertens J., Theunissen K., Verbeken E., Lagrou K., Verhaegen J., Boogaerts M., et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2004 Sep;126(6):852–60.
111. Marr K.A., Balajee S.A., McLaughlin L., Tabouret M., Bentsen C., Walsh T.J. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis*. 2004 Aug 1;190(3):641-9.
112. Moragues M.D., Amutio E., Garcia-Ruiz J.C., Ponton J. Usefulness of galactomannan detection in the diagnosis and follow-up of hematological patients with invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol*. 2003 Sep;20(3):103-10.
113. Pazos C., del Palacio A. Early diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients with bi-weekly serial screening of circulating

- galactomannan by Platelia Aspergillus. *Rev Iberoam Micol.* 2003 Sep;20(3):99-102.
114. Pinel C., Fricker-Hidalgo H., Lebeau B., Garban F., Hamidfar R., Ambroise-Thomas P., et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2003 May;41(5):2184-6.
115. Rovira M., Jimenez M., De La Bellacasa J.P., Mensa J., Rafel M., Ortega M., et al. Detection of *Aspergillus* galactomannan by enzyme immunoabsorbent assay in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective study. *Transplantation.* 2004 Apr 27;77(8):1260-4.
116. Sulahian A., Boutboul F., Ribaud P., Leblanc T., Lacroix C., Derouin F. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer.* 2001 Jan 15;91(2):311-8.
117. Sulahian A., Tabouret M., Ribaud P., Sarfati J., Gluckman E., Latge J.P., et al. Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for detection of galactomannan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996 Feb;15(2):139-45).
118. Ulusakarya A., Chachaty E., Vantelon J.M., Youssef A., Tancrede C., Pico J.L., et al. Surveillance of *Aspergillus* galactomannan antigenemia for invasive aspergillosis by enzymelinked immunosorbent assay in neutropenic patients treated for hematological malignancies. *Hematol J.* 2000;1(2):111-6. 2004 Sep;126(6):852-60.
119. Verweij P.E., Stynen D., Rijs A.J., de Pauw B.E., Hoogkamp-Korstanje J.A., Meis J.F.. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol.* 1995 Jul;33(7):1912-4.
120. Yoo J.H., Choi J.H., Choi S.M., Lee D.G., Shin W.S., Min WS, et al. Application of nucleic acid sequence-based amplification for diagnosis of and monitoring the clinical course of invasive aspergillosis in patients with hematologic diseases. *Clin Infect Dis.* 2005 Feb 1;40(3):392-8.
121. Hachem R.Y., Kontoyiannis D.P., Chemaly R.F., Jiang Y., Reitzel R., Raad I. Utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1,3) beta-D-glucan in

- diagnosis of invasive fungal infections: low sensitivity for *Aspergillus fumigatus* infection in hematologic malignancy patients. *J. Clin. Microbiol.* 2009 Jan;47(1):129–33.
122. Leeglang M.M., Debets-Ossenkopp Y.J., Visser C.E. et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 8: CD007394.
123. Koo S., Bryar J.M., Baden L.R., Marty F.M. Prognostic features of galactomannan antigenemia in galactomannan-positive invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 2010 Apr;48(4):1255–60.
124. 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 Jan 15;115(2):355–62.
125. Cordonnier C., Botterel F., Ben Amor R. et al. Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:81-6.
126. Viscoli C., Machetti M., Cappellano P. et al. False-positive galactomannan platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis* 2004;38:129-33.
127. Singh N., Obman A., Husain S., Aspinall S., Mietzner S., Stout J.E. Reactivity of Platelia *Aspergillus* Galactomannan Antigen with Piperacillin-Tazobactam: Clinical Implications Based on Achievable Concentrations in Serum Reactivity of Platelia *Aspergillus* Galactomannan Antigen with Piperacillin-Tazobactam. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 2004;48(6):1989-1992.
128. Mennink-Kersten M.A., Klont R.R., Warris A. et al. Bifidobacterium lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in aspergillus antigen detection. *Lancet* 2004;363:325-7.
129. Aquino V.R., Goldani L.Z., Pasqualotto A.C. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathología* 2007; 163:191-2.
130. Racil Z., Kocmanova I., Legerova M. et al. Intravenous Plasma.Lyte as a

- major cause of false positive results of platelia Aspergillus test for galactomannan detection in serum. *J Microbiol* 2007; 45:3141-2.
131. Meersseman W., Lagrou K., Maertens J., Wilmer A., Hermans G., Vanderschueren S., Spriet I., Verbeken E., Van Wijngaerden E. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Jan 1;177(1):27-34.
 132. Klont R.R., Mennink-Kersten M.A., Verweij P.E. Utility of Aspergillus antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis*. 2004 Nov 15;39(10):1467-74.
 133. Soeffker G., Wichmann D., Loderstaedt U., Sobottka I., Deuse T., Kluge S.. Aspergillus galactomannan antigen for diagnosis and treatment monitoring in cerebral aspergillosis. *Prog Transplant*. 2013 Mar;23(1):71-4.
 134. Antinori S., Corbellino M, Meroni L., Resta F., Sollima S., Tonolini M., Tortorano A.M., Milazzo L., Bello L., Furfaro E., Galli M., Viscoli C. Aspergillus meningitis: a rare clinical manifestation of central nervous system aspergillosis. Case report and review of 92 cases. *J Infect*. 2013 Mar;66(3):218-38.
 135. Maertens J, Marchetti O, Herbrecht R, Cornely O.A, Flückiger U, Frère P, Gachot B, Heinz W.J, Lass-Flörl C, Ribaud P, Thiebaut A, Cordonnier C.; Third European Conference on Infections in Leukemia. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3--2009 update. *Bone Marrow Transplant*. 2011 May;46(5):709-18.
 136. Villaescusa M.T., Cores O., Vázquez L. et al. Utilidad de la combinación de la técnica del antígeno del galactomanano (AGA) con la TAC de alta resolución (TACAR) para el diagnóstico de la infección fúngica invasora (IFI). 2010. LII reunión nacional de la asociación española de hematología y hemoterapia y el XXVI congreso nacional de la sociedad española de trombosis y hemostasia. CO-119
 137. Yeo S.F., Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Jul;15(3):465-84.
 138. Donnelly J.P. Polymerase chain reaction for invasive aspergillosis: getting

- closer but still a ways to go. *Clin Infect Dis* 2006;42:487-9.
139. Mengoli C., Cruciani M., Barnes R.A. et al. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect dis* 2009;9:89-96.
140. Hebart H., Loeffler J., Meisner C., Serey F., Schmidt D., Bohme A., et al. Early detection of aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. *J Infect Dis.* 2000 May; 181(5):1713-9.
141. Suarez F., Lortholary O., Buland S., Rubio M.T., Ghez D., Mahé V., et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. *J. Clin. Microbiol.* 2008 Nov ;46(11):3772-7.
142. Hope W.W., Walsh T.J., Denning D.W. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 2005 Oct;5(10):609-22.
143. Garcia M.E., Blanco J.L., Caballero J., Gargallo-Viola D. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2002 Apr;40(4):1567-8.
144. Loeffler J., Hebart H., Brauchle U., Schumacher U., Einsele H. Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. *J Clin Microbiol.* 2000 Oct;38(10):3830-3.
145. Costa C., Vidaud D., Olivi M., Bart-Delabesse E., Vidaud M., Bretagne S. Development of two real-time quantitative TaqMan PCR assays to detect circulating *Aspergillus fumigatus* DNA in serum. *J Microbiol Methods.* 2001 Apr;44(3):263-9.
146. Bernal-Martínez L., Gago S., Buitrago M.J., Gomez-Lopez A., Rodríguez-Tudela J.L., Cuenca-Estrella M. Analysis of performance of a PCR-based assay to detect DNA of *Aspergillus fumigatus* in whole blood and serum: a comparative study with clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2011 Oct;49(10):3596-9.
147. Springer J., Morton C.O., Perry M., Heinz W.J., Paholcsek M., Alzheimer M., et al. Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA in high-risk hematological patients. *J. Clin.*

- Microbiol. 2013 May;51(5):1445–50.
148. Florent M., Katsahian S., Vekhoff A., Levy V., Rio B., Marie J.P., et al. Prospective evaluation of a polymerase chain reaction-ELISA targeted to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* for the early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *J. Infect. Dis.* 2006 Mar 1;193(5):741–7.
149. Badiie P., Kordbacheh P., Alborzi A., Ramzi M., Shakiba E. Molecular detection of invasive aspergillosis in hematologic malignancies. *Infection.* 2008 Dec;36(6):580-4.
150. Lass-flörl C., Gunsilius E., Gastl G., Bonatti H., Freund M.C., Gschwendtner A., et al. Diagnosing Invasive Aspergillosis during Antifungal Therapy by PCR Analysis of Blood Samples Diagnosing Invasive Aspergillosis during Antifungal Therapy by PCR Analysis of Blood Samples. 2004;Sep. P.4154-4157.
151. Badiie P., Alborzi A., Karimi M., Pourabbas B., Haddadi P., Mardaneh J., Moieni M. Diagnostic potential of nested PCR, galactomannan EIA and Beta-D-glucan for invasive aspergillosis in pediatric patients. *J Infect Ctries* 2012;6(4):352-357.
152. Millon L., Piarroux R., Deconinck E., Bulabois C., Rohrlich P., Costa J. Use of Real-Time PCR To Process the First Galactomannan-Positive Serum Sample in Diagnosing Invasive Aspergillosis. 2005;43(10):5097–101.
153. Blennow O., Remberger M., Klingspor L., Omazic B., Fransson K., Ljungman P., et al. Randomized PCR-based therapy and risk factors for invasive fungal infection following reduced-intensity conditioning and hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2010 Dec;45(12):1710–8.
154. White P.L., Bretagne S., Klingspor L., Melchers W.J.G., McCulloch E., Schulz B., et al. *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. *J. Clin. Microbiol.* 2010 Apr;48(4):1231–40 .
155. White P.L., Mengoli C., Bretagne S., Cuenca-Estrella M., Finnstrom N., Klingspor L., et al. Evaluation of *Aspergillus* PCR protocols for testing serum specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2011 Nov;49(11):3842–8.
156. Cuenca-Estrella M., Meije Y., Diaz-Pedroche C., Gomez-Lopez A., Buitrago M.J., Bernal-Martinez L., et al. Value of serial quantification of fungal DNA by

- a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive Aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *J. Clin. Microbiol.* 2009 Feb ; 47(2): 379–84.
157. Thornton C.R. Development of an Immunochromatographic Lateral-Flow Device for Rapid Serodiagnosis of Invasive Aspergillosis. *Clinical and Vaccine Immunology.* 2008 July, p.1095-1105.
158. Wiederhold N., Thornton C.R., Najvar L.K., Kirkpatrick W.R., et al. Comparison of Lateral Flow Technology and Galactomannan and (1,3) β -D-glucan Assays for Detection of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Clinical and Vaccine Immunology.* 2009 Dec, p.1844-1846.
159. Lewis-White P., Parr C., Thornton C., Barnes R.A. Evaluation of Real-Time PCR, Galactomannan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), and a Novel Lateral-Flow Device for Diagnosis Invasive Aspergillosis. *JCM* 2013 May; 51:1510-1516.
160. Hoenigl M., Prattes J., Wagner J., Pruellner F., et al. Performance of Galactomannan, Beta-D-Glucan, Aspergillus Lateral-Flow Device, Conventional Culture, and PCR Test with Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *JCM* 2014 June ;52(6):2039-2045.
161. Held J., Schmidt T., Thornton C.R. Comparison of a novel aspergillus lateral-flow device and Platelia $\text{\textcircled{R}}$ galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis following haematopoietic stem cell transplantation. *Infection* 2013;41:1163-1169.
162. White P.L., Perry M.D., Loeffler J., Melchers W., Klingspor L., Bretagne S., et al. Critical stages of extracting DNA from *Aspergillus fumigatus* in whole-blood specimens. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3753-3755.
163. Freifeld A.G., Bow E.J., Sepkowitz K.A., Boeckh M.J., Ito J.I., Mullen C.A., 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: e56-93
164. Pagano L., Cairra M., Candoni A., Offidani M., Fianchi L., Martino B., et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 2006; 91: 1068-75.

165. Morrissey C.O., Chen S.C., Sorrell T.C., Milliken S. 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 Jun;13(6):519-28.
166. Scotter J.M., Campbell P., Anderson T.P., Murdoch D.R., Chambers S.T., Patton W.N. Comparison of PCR-ELISA and galactomannan detection for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Pathology.* 2005 Jun;37(3):246-53.
167. Armenian S.H., Nash K.A., Kapoor N., Franklin J.L., Gaynon P.S., Ross L.A., Hoffman J.A. Prospective monitoring for invasive aspergillosis using galactomannan and polymerase chain reaction in high risk pediatric patients. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2009 Dec;31(12):920-6.
168. Cornely O.A., Maertens J., Winston D.J., Perfect J., Ullmann A.J., Walsh T.J., et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 2007; 356: 348-359.
169. Ullmann A.J., Lipton J.H., Vesole D.H., Chandrasekar P., Langston A., Tarantolo S.R., et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2007; 356: 335-347.
170. Marks D.I., Pagliuca A., Kibbler C.C., Glasmacher A., Heussel C.P., Kantecki M., et al. Voriconazole versus itraconazole for antifungal prophylaxis following allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation. *Br J Haematol* 2011; 155: 318-327.
171. Meije Y., Aguado J.M., Cuenca-Estrella M. Silent and prolonged *Aspergillus* DNAemia in oncohematological patients receiving antifungal prophylaxis: a new phenomenon with clinical implications. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46: 1016-1017.
172. Mennink-Kersten M.A., Ruegebrink D., Wasei N., Melchers W.J., Verweij P.E. In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-beta-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1711-1718.
173. Walsh T.J., Wissel M.C., Grantham K.J., Petraitiene R., Petraitis V., Kasai M., et al. Molecular detection and species-specific identification of medically important *Aspergillus* species by real-time PCR in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4150-7.

174. Kontoyiannis D.P., Marr K.A., Park B.J., Alexander B.D., Anaissie E.J., Walsh T.J., et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 1091-1100.
175. Nucci M., Garnica M., Gloria A.B., Lehugeur D.S., Dias V.C., Palma L.C., et al. Invasive fungal diseases in haematopoietic cell transplant recipients and in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplasia in Brazil. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 745-751.
176. Nicolle M.C., Benet T., Thiebaut A., Bienvenu A.L., Voirin N., Duclos A., et al. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: incidence and description of 127 cases enrolled in a single institution prospective survey from 2004 to 2009. *Haematologica* 2011; 96: 1685-1691.
177. Mandhaniya S., Iqbal S., Sharawat S.K., Xess I., Bakhshi S. Diagnosis of invasive fungal infections using real-time PCR assay in paediatric acute leukaemia induction. *Mycoses* 2012; 55: 372-379.
178. Duarte R.F., Sánchez-Ortega I., Cuesta I., Arnan M., Patiño B., Fernández de Sevilla A., Gudiol C., Ayats J., Cuenca-Estrella M. Serum galactomannan-based early detection of invasive aspergillosis in hematology patients receiving effective antimold prophylaxis. *Clin Infect Dis.* 2014 Dec 15;59(12):1696-702.
179. Oviedo Boyso J., Ochoa Zarzosa A., López M eza J.E., Valdez Alarcón J .J. y Baizabal Aguirre V.M. Modulación de NFk-B por bacterias REB 24 (1): 12-20, 2005.
180. Sun X.F., Zhang H. NFkB and NFkBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. *Histol Histopathol.* 2007 Dec;22(12):1387-98)

9. ANEXOS

ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO ESTUDIO PCRAGA

FORMULARIO DE HOJA DE FIRMA DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

TERAPIA ANTICIPADA DE ASPERGILOSIS INVASORA EN PACIENTES ONCOHEMATOLÓGICOS CON NEUTROPENIA BASADA EN LA DETECCIÓN MEDIANTE PCR DE ASPERGILLUS

Nombre del paciente (mayúsculas) _____

He sido informado por el Dr. /Dra. _____ de forma completa y clara sobre los objetivos, significado y características del estudio y sobre sus posible riesgos y beneficios, así como de los requisitos necesarios para participar en el ensayo. He leído y entendido el texto previo de información al paciente y de este consentimiento informado. El médico del ensayo ha respondido de forma suficiente a mis preguntas.

Soy consciente de que es importante que cumpla fielmente las indicaciones médicas relacionadas con el ensayo clínico y tengo el derecho a finalizar voluntariamente mi participación en el estudio en todo momento, si así lo deseo:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones

3º Sin que ello repercuta en mis cuidados médicos

Acepto, por tanto, voluntariamente participar en el ensayo clínico y autorizo el uso de toda la información obtenida. Entiendo que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

Paciente Fecha Firma

Médico Fecha Firma

En pacientes menores de edad (menores de 18 años), es necesario por motivos legales también el consentimiento por escrito de los dos padres o posibles tutores.

Padre o tutor 1 Fecha Firma

Padre o tutor 2 Fecha Firma

CONSENTIMIENTO INFORMADO ORAL ANTE TESTIGOS

TERAPIA ANTICIPADA DE ASPERGILOSIS INVASORA EN PACIENTES ONCOHEMATOLÓGICOS CON NEUTROPENIA BASADA EN LA DETECCIÓN MEDIANTE PCR DE ASPERGILLUS

Yo,(nombre y apellidos),_____

Declaro bajo mi responsabilidad que: (nombre del participante en el ensayo)

Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.

Ha recibido suficiente información sobre el estudio.

Ha leído recibido la hoja de información sobre el estudio

Ha sido informado por el:

Dr. (nombre del investigador)

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirarse del estudio:

-Cuando quiera

-Sin tener que dar explicaciones

-Sin que ello repercuta en sus cuidados médicos

Presta libremente su conformidad para participar en el ensayo y autorizo el uso de toda la información obtenida.

Firma del testigo Fecha

Firma del investigador Fecha

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL REPRESENTANTE LEGAL (EN CASO DE PACIENTES LEGAL, MÉDICA O MENTALMENTE INCAPACITADOS)

TERAPIA ANTICIPADA DE ASPERGILOSIS INVASORA EN PACIENTES ONCOHEMATOLÓGICOS CON NEUTROPENIA BASADA EN LA DETECCIÓN MEDIANTE PCR DE ASPERGILLUS

Yo,(nombre apellidos),_____

En calidad de: (relación con el paciente) de (nombre del participante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado
He podido hacer preguntas sobre el estudio.
He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.
He recibido suficiente información sobre el estudio.
He hablado con el:

Dr. _____

Comprendo que la participación es voluntaria.
Comprendo que puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera
 - Sin tener que dar explicaciones
 - Sin que ello repercuta en mis cuidados médicos
- En mi presencia se ha dado a (nombre del participante)

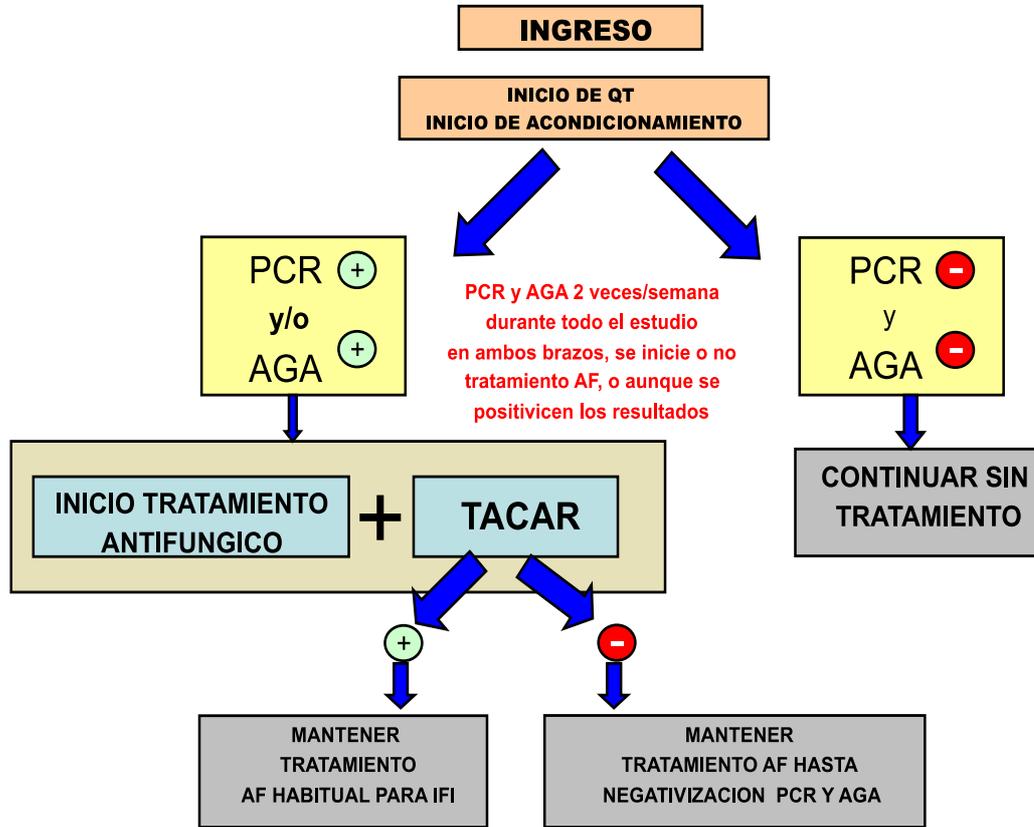
toda la información pertinente, adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar.
Y presto mi conformidad con que (nombre del participante) participe en este estudio.

Firma del representante Fecha

Firma del investigador Fecha

ANEXO 2. ESQUEMA DEL PROTOCOLO PCRAGA

Terapia anticipada de Aspergilosis Invasora en pacientes oncohematológicos de alto riesgo mediante el uso de PCR para la detección precoz de Aspergillus (Estudio PCRAGA)



ANEXO 3. INFORME DEL COMITÉ ÉTICO



COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN Y DE BIENESTAR ANIMAL

Informe

INFORME

Nº: CEI PI 27_2012-v3

El Comité de Ética de la Investigación y de Bienestar Animal del Instituto de Salud Carlos III ha revisado el proyecto titulado “**Identificación de perfiles que gobiernan el desarrollo de enfermedad: Análisis de expresión génica asociada a Infecciones Fúngicas Invasivas**”

remitado por la investigadora: **Laura Alcazar Fuoli**
del **Centro Nacional de Microbiología**.

La citada revisión tiene por objeto comprobar que se cumplen los requisitos éticos y legales exigibles en las investigaciones que utilizan seres humanos, muestras humanas o datos humanos.

El Comité estima que el proyecto **cumple** los requisitos mencionados.

Se recuerda al investigador la obligación de presentar la memoria firmada de la investigación al CEIyBA a la finalización del proyecto/línea de investigación y que ésta debe ajustarse a la memoria descriptiva aprobada. Asimismo, que cualquier modificación relevante debe ser notificada al Comité y requerirá una nueva evaluación.

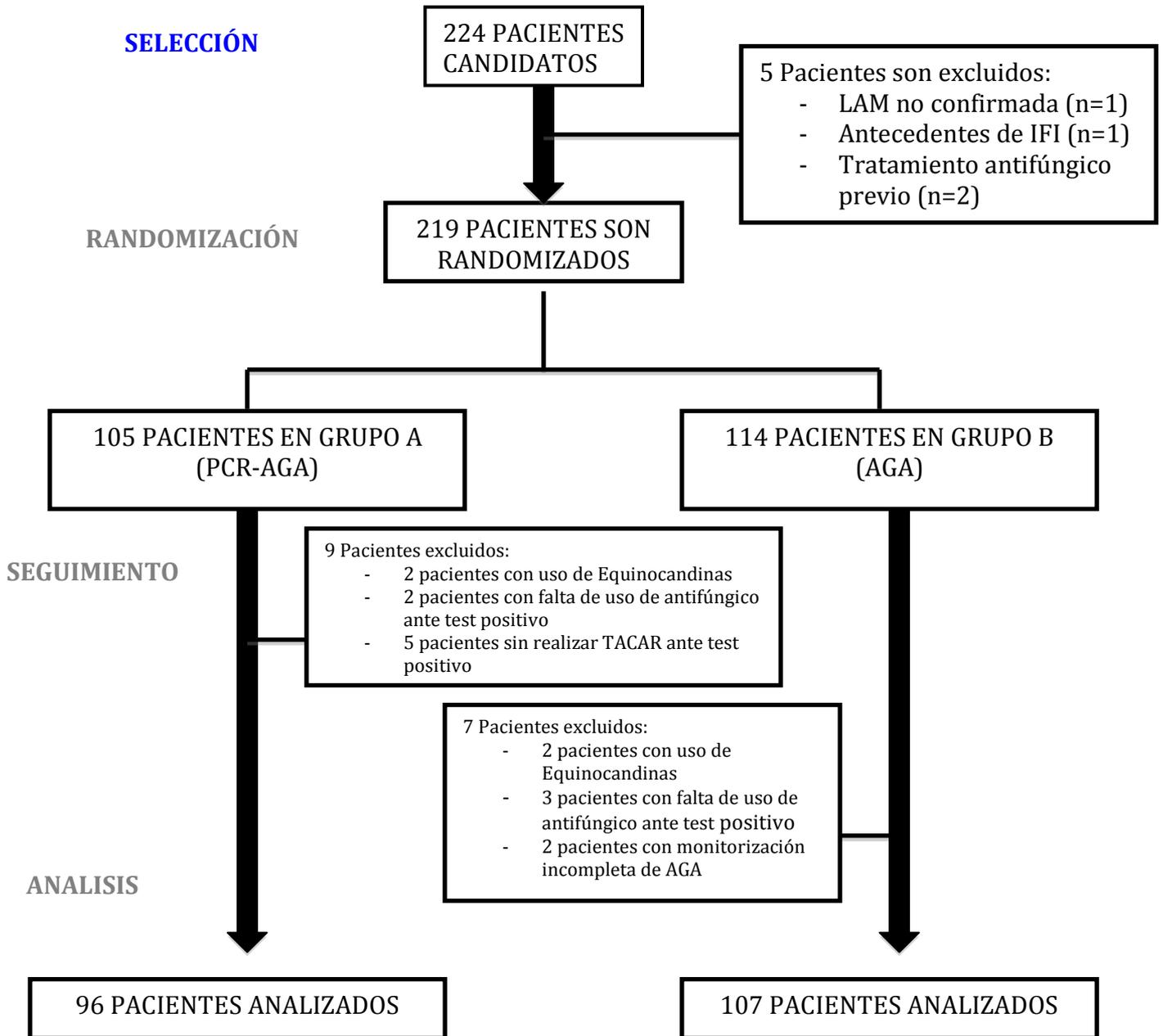
Madrid, a 16 de Julio de 2012

LA SECRETARIA

Mª Concepción Martín Arribas



ANEXO 4. DIAGRAMA DE FLUJO ESTUDIO PCRAGA



10. PERMISOS

Permission is granted for the inclusion of Fig 1 on p. 4 of the article detailed below in your PhD thesis. Please cite this article as Cold Spring Harb Perspect Biol 2010;2:a000109

Name: TERESA VILLAESCUSA
CompanyInstitution: FUNDACI N JIMENEZ DIAZ Library Address: AVDA. REYES CATOLICOS N2 Library Address (line 2): CEA BERMUDEZ 66
City: MADRID
State (US and Canada):
Country: SPAIN
Zip: 28040
Title: CONSULTANT
Lab/Department: HEMATOLOGY
Phone: +34 915504800
Fax: 915496670
Email: mtvillaescusa@gmail.com
Title of Publication: NFKB POLIMORPHISM IN THE INVASIVE ASPERGILLOSIS
Authors/Editors: TERESA VILLAESCUSA (DOCTORAL THESIS)
Publisher:
Title of CSHLP Journal/Book: COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN BIOLOGY Title of Article/Chapter: Oncogenic Activation of NF-kB CSHL
Authors/Editors: Louis M. Staudt Page Numbers: 4 Figure Numbers: 1 Figure
Page Numbers: 4 Copyright Date: Copyright # 2010 Cold Spring Harbor Laboratory Press; all rights reserved; doi: 10.1101/cshperspect.a000109
Language: SPANISH
Territory: SPAIN
Format: PRINT
Additional comments: TO USE FIGURE 1 TO EXPLAIN THE NFKB ACTIVATION. THE DOCTORAL THESIS IS ABOUT INVASIVE ASPERGILLOSIS (DIAGNOSTIC METHODS AND NFKB POLIMORPHISM)

ipaddress: 088.084.078.132
view here: http://www.cshlpress.com/subs_admin.tpl
Filter message: [fmsg]

Default Footer
Default Footer - line2

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

May 04, 2015

This is a License Agreement between TERESA VILLAESCUSA ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier Elsevier Limited

The Boulevard, Langford Lane
Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK

Registered Company

Number

1982084

Customer name TERESA VILLAESCUSA

Customer address REYES CATOLICOS 2

MADRID, MA 28040

License number 3620231100217

License date May 01, 2015

Licensed content publisher Elsevier

Licensed content publication Biology of Blood and Marrow Transplantation

Licensed content title Guidelines for Preventing Infectious Complications among

Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective

Licensed content author Marcie Tomblyn, Tom Chiller, Hermann Einsele, Ronald Gress, Kent

Sepkowitz, Jan Storek, John R. Wingard, Jo-Anne H. Young, Michael A.

Boeckh

Licensed content date October 2009

Licensed content volume

number

15

Licensed content issue

number

10

Number of pages 96

Start Page 1143

End Page 1238

Type of Use reuse in a thesis/dissertation

Portion figures/tables/illustrations

Number of

figures/tables/illustrations

2

Format both print and electronic

Are you the author of this

Elsevier article?

No

Will you be translating? Yes

Number of languages 1

Languages SPANISH

Original figure numbers FIGURES 1 AND 2

Title of your

thesis/dissertation

ASPERGILLUS INFECTION IN HIGH RISK HEMATOLOGYC PATIENTS.

USE OF ASPERGILLUS PCR AND GENETIC POLIMORPHISM STUDY

Expected completion date Jun 2015

Estimated size (number of

pages)

200

Elsevier VAT number GB 494 6272 12

Permissions price 0.00 EUR

VAT/Local Sales Tax 0.00 EUR / 0.00 GBP

Total 0.00 EUR

11. ABREVIATURAS (por orden alfabético)

- Aa: aminoácido
- AGA: antígeno de galactomanano
- AI: aspergilosis invasora
- Allo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- BG: 1-3 β -D glucano
- CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica
- CI: intervalo de confianza.
- CMV: citomegalovirus
- Crom: cromosoma
- cSNP: Polimorfismos de un solo nucleótido codificantes
- DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
- DE: desviación estándar
- Dectin-1: Dendritic cell-associated C-type lectin-1
- Dectin-2: Dendritic cell-associated C-type lectin-2
- EICH: enfermedad injerto contra receptor
- EORTC/MSG: European Organisation for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group.
- E: Especificidad
- GETH: grupo español de trasplante hematopoyético
- HGV: hospital general de Valencia
- HLA: antígenos de histocompatibilidad leucocitarios humanos
- HUS: hospital universitario de Salamanca
- IFI: infección fúngica invasora
- I κ Bs: inhibidores de κ B
- IL-10: interleukina 10
- IL-1: interleukina 1
- IL-6: interleukina 6
- ISCIII: instituto de salud Carlos III
- LLA: leucemia aguda linfoblástica
- LMA: leucemia aguda mieloblástica

- LT α : Linfoxina α
- MAF: alelo de menor frecuencia
- NF κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- OR: odds ratio
- PCRAGA: (EU ensayo clínico número 2010-019406-17)
- PCR-TR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
- PP: por protocolo
- PRRs: receptores de reconocimiento
- rSNP: polimorfismos de un solo nucleótido reguladores
- S: sensibilidad
- SMD: síndrome mielodisplásico
- SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido
- srSNP: polimorfismos de un solo nucleótido estructurales
- TACAR: tomografía axial computarizada de alta resolución
- TNF α : factor de necrosis tumoral α
- TNFR1: receptor 1 de factor de necrosis tumoral
- TNFR2: receptor 2 de factor de necrosis tumoral
- TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos
- UP: universidad de Perugia (Italia)
- VPN: valor predictivo negativo
- VPP: valor predictivo positivo