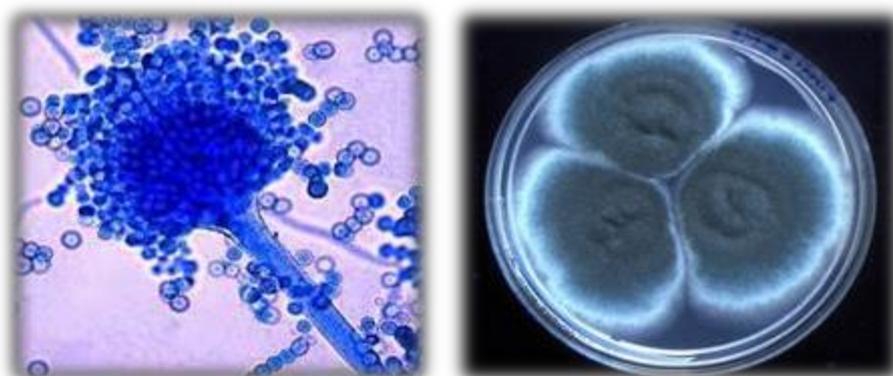


**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
"PEDRO KOURÍ"**

**"Diagnóstico de aspergilosis pulmonar crónica. Hospital
Neumológico Benéfico Jurídico, 2017-2018".**

**Tesis para optar por el título de Máster en
Bacteriología-Micología**



Autora: Lic. Nathalie Beltrán Rodríguez

**La Habana, Cuba
2018**

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
"PEDRO KOURÍ"**

**Título: "Diagnóstico de aspergilosis pulmonar crónica.
Hospital Neumológico Benéfico Jurídico, 2017-2018".**

**Tesis para optar por el título de Máster en
Bacteriología-Micología**

Autora: Lic. Nathalie Beltrán Rodríguez
Licenciada en Tecnología de la Salud
Perfil Microbiología clínica

Tutores: Dr. Gerardo F. Martínez Machín
Especialista en II grado en Microbiología
Máster en Bacteriología- Micología
Profesor auxiliar
Dr C. Carlos M Fernández Andreu
Licenciado Microbiología
Profesor titular

Asesores: Dra. Dulce María Yera Pérez
Especialista en I grado en Neumología
Máster en Enfermedades Infecciosas
Lic. Miriam Barrios Pita
Licenciada en Tecnología de la Salud
Perfil Microbiología clínica
Máster en Enfermedades Infecciosas
Lic. Javier L San Juan Galán
Licenciado en Microbiología

**La Habana, Cuba
2018**

*A toda mi familia que me ha estado a mi lado en todo momento,
en especial a mi esposo Luis Orlando que,
sin su apoyo constante, no hubiera sido posible
llevar a cabo este trabajo de tesis.*

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría manifestar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas, sin las cuales, este trabajo de tesis no hubiera sido posible.

Al Departamento del Laboratorio de Microbiología del Hospital Neumológico Benéfico Jurídico: mis compañeras de trabajo, a Mirita, Sonia, Adita, Milagros, Yamilet que siempre me apoyaron incondicionalmente en todo y en especial a la Dra Carmen Rodríguez Acosta por ser una guía y promotora de esta maestría, quién me inspiró a hacer lo que soy hoy.

A todos los profesionales del Departamento de Bacteriología-Micología del IPK: Oderay, Yanayka, Miriam, Mayda, Rosario, Iraidá, Javier, María Teresa, Rosi, Lili y en especial a mis amigas, hermanas del alma Misle y Grechen que me dieron cobija en su cubículo, me apoyaron con una grata sonrisa, me dieron palabras de ánimo y por encima de todo siempre pude contar con ellas en todo momento.

Al Departamento de Docencia del IPK, mi amiga Niurka que siempre me apoyo para que todas mis notas estuvieran al día.

A mis compañeros de la Maestría, los chinitos Lei Fu y Zexi Tan, y sobre todo a Irina mi amiga y hermana que siempre estuvo a mi lado y nos apoyamos mutuamente.

A mis tutores, el profe Gerardo que me transmitió su experiencia, paciencia, dedicación y su presencia en los momentos cruciales; y a al profe Carlos por su confianza y gran talento científico.

A mis asesores de tesis, sin duda un apoyo científico y personal incalculable, siempre les estaré agradecida.

A mis padres porque son mi ejemplo a seguir y han estado a mi lado a cada paso que doy.

A todos mis familiares y amigos que de una forma u otra han contribuido, a hacer realidad este sueño.

A mi esposo, con el cual siempre he contado para llevar a cabo mis proyectos de estudio y de vida.

Muchas gracias a todos por existir...

La aspergilosis pulmonar crónica es una enfermedad poco reconocida, de difícil diagnóstico, cuya incidencia se estima en más de tres millones de personas en todo el mundo. La supervivencia estimada para 5 años, oscila entre el 48-62% cuando no es tratada. Con el objetivo de contribuir a su diagnóstico, conocer características clínicas de los pacientes y las especies de *Aspergillus* involucradas en la etiología se realizó un estudio prospectivo descriptivo de corte transversal en los pacientes con sospecha clínica en el Hospital Neumológico Benéfico Jurídico, entre mayo del 2017 y abril del 2018. Se realizó cultivo micológico en muestras del aparato respiratorio (esputo, LBA y líquido pleural) y detección de IgG anti *Aspergillus* en el suero de 50 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos. Se confirmó el diagnóstico de APC en el 42% de los pacientes. Los principales síntomas y signos (tos, expectoración, fiebre), la edad promedio (53,8 años) y el discreto predominio del sexo masculino (57,14%) coinciden con los reportes internacionales. Entre las comorbilidades asociadas es de destacar la frecuencia de cavidades en los estudios radiológicos (76%) que mostró asociación estadística con la serología positiva. El cultivo fue positivo solo en cinco (23,8%) de los casos y las especies identificadas fueron tres *A. flavus*, un *A. niger* y un *A. fumigatus*. En los estudios de susceptibilidad *in vitro*, todos los aislados fueron sensibles al voriconazol, dos fueron resistentes al itraconazol y uno a la anfotericina B. La buena respuesta a la terapéutica con itraconazol en los pacientes, además de confirmar el diagnóstico mejoró la calidad y expectativa de vida en los mismos.

ABREVIATURAS y ACRÓNIMOS

IFI: Infecciones fúngicas invasivas.

APC: aspergilosis pulmonar crónica.

ABPA: aspergilosis broncopulmonar alérgica.

API: aspergilosis pulmonar invasiva.

APCC: aspergilosis pulmonar crónica cavitaria.

APCF: aspergilosis pulmonar crónica fibrosante.

APCN: aspergilosis pulmonar crónica necrotizante.

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

ESCMID (por siglas en inglés): Sociedad Europea de Microbiología clínica y Enfermedades Infecciosas.

ERS (por siglas en inglés): Sociedad Europea de Enfermedades Respiratorias.

ITR: itraconazol.

VRC: voriconazol.

AMB: anfotericina B.

HNBJ: Hospital Neumológico Benéfico Jurídico.

TB: tuberculosis pulmonar.

TAC: tomografía axial computarizada.

AISA: aspergilosis invasiva subaguda.

MNT: Micobacteria no tuberculosas.

RXT: Radiografía de tórax

CYP (por siglas en inglés): Citocromo P450.

PDA: Agar papa dextrosa.

ASC: Agar sabouraud con cloranfenicol.

LBA: Lavado Bronquioalveolar.

LP: Líquido pleural.

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

GAFFI (por siglas en inglés): Fondo de acción global para infecciones fúngicas.

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	OBJETIVOS	6
III.	MARCO TEÓRICO	8
1.	Aspergilosis pulmonar crónica	9
1.1.	Definición	9
1.2.	Antecedentes históricos	9
1.3.	Epidemiología	10
1.4.	Patogenia	11
1.5.	Manifestaciones clínicas	12
1.5.1.	Aspergiloma	13
1.5.2.	Aspergiloma pulmonar simple	13
1.5.3.	Aspergilosis pulmonar crónica cavitaria	13
1.5.4.	Aspergilosis pulmonar crónica fibrosante	14
1.5.5.	Aspergilosis pulmonar crónica necrotizante	14
1.5.6.	Nódulo aspergilar	14
1.6.	Diagnóstico	15
1.6.1.	Criterios diagnósticos	15
1.6.2.	Diagnóstico clínico	15
1.6.3.	Diagnóstico radiológico	16
1.6.4.	Diagnóstico microbiológico	17
1.6.4.1.	Muestras	17
1.6.4.2.	Examen microscópico directo	17
1.6.4.3.	Cultivo e identificación	18

1.6.4.4.	Diagnóstico serológico	19
1.6.4.5.	Diagnóstico molecular	20
1.7.	Tratamiento	20
1.8.	Antifúngicos	21
1.8.1.	Clasificación química y la actividad de antifúngicos de uso clínico	22
1.8.2.	Mecanismos de acción de los antifúngicos	22
1.8.3.	Mecanismos de resistencia a los antifúngicos	24
1.9.	Susceptibilidad in vitro a los antifúngicos	24
2.	Micología	26
2.1.	Posición taxonómica del género <i>Aspergillus</i>	26
2.2.	Características macro y micromorfológicas de las principales especies de <i>Aspergillus</i>	27
2.2.1.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	27
2.2.2.	<i>Aspergillus flavus</i>	28
2.2.3.	<i>Aspergillus terreus</i>	28
2.2.4.	<i>Aspergillus niger</i>	29
IV.	MATERIALES y MÉTODOS	30
1.	Diseño del estudio	31
2.	Universo	31
3.	Muestra	31
4.	Criterios de inclusión y exclusión	31
5.	Criterios de diagnóstico micológico y serológico	32
6.	Descripción de técnicas y procedimientos	32

6.1.	Toma de muestra	32
6.1.1.	Toma de muestra del esputo	32
6.1.2.	Toma de muestra del suero	33
6.2.	Cultivo	33
6.3.	Identificación	34
6.3.1.	Técnica de microcultivo	34
6.4.	Susceptibilidad antifúngica	35
6.5.	Procesamiento de los sueros	35
7.	Método estadístico	38
7.1.	Técnicas de procesamiento	38
7.2.	Técnicas de análisis	38
8.	Operacionalización de las variables	39
9.	Consideraciones éticas	40
10.	Limitaciones del estudio	41
V.	RESULTADOS y DISCUSIÓN	42
VI.	CONCLUSIONES	61
VII.	RECOMENDACIONES	63
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
	ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas en general y las infecciones fúngicas invasivas (IFI) en lo particular se han convertido en una importante causa de morbi-mortalidad a escala mundial en las últimas décadas, y su impacto en la salud humana es al menos, de igual magnitud que el generado por bacterias, virus y parásitos. (1). Entre las múltiples infecciones fúngicas invasivas destaca la aspergilosis. Esta comprende un amplio y heterogéneo grupo de enfermedades oportunistas causadas por hongos filamentosos del género *Aspergillus*; son micosis no contagiosas, esporádicas y cosmopolitas, producidas por diferentes mecanismos patogénicos, cuyas formas clínicas pueden presentar diferente gravedad y dependen fundamentalmente de factores relacionados con el huésped. Las infecciones pulmonares por *Aspergillus* constituyen un gran reto diagnóstico, ya que las formas clínicas pueden comportarse como un espectro continuo de manifestaciones dependiente del estado inmunológico del paciente. Además, *Aspergillus* producirá patología en base a su capacidad de colonización, de invadir los tejidos y de provocar fenómenos inmunoalérgicos (2,3).

En la naturaleza se han identificado más de novecientas especies de *Aspergillus* y una veintena de ellas están informadas como agentes patógenos al hombre. *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus* son las especies más frecuentes, aunque también se han descrito casos asociados a *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus nidulans*. Estos hongos filamentosos son ubicuos, con una distribución mundial, ampliamente diseminados por el ambiente (4, 5).

Dentro de las formas pulmonares de la infección por *Aspergillus* se encuentran la aspergilosis pulmonar crónica (APC), la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) y la aspergilosis pulmonar invasiva (API) (6).

La aspergilosis pulmonar crónica incluye varios cuadros clínicos, como la aspergilosis crónica cavitada (APCC), la aspergilosis crónica fibrosante (APCF) y la aspergilosis crónica necrotizante (APCN). La duración de los síntomas en estos cuadros es, a diferencia de la aspergilosis pulmonar aguda, superior a tres meses. Suelen afectar a pacientes inmunocompetentes o con inmunosupresión débil, por lo que es bastante característico que presenten en el suero precipitinas positivas frente a *Aspergillus* spp. En la aspergilosis crónica cavitada los pacientes desarrollan una o más cavidades durante varios meses, habitualmente en lóbulos superiores y si

progresan pueden llegar a desarrollar formas crónicas fibrosantes. Estas formas clínicas se suelen observar en pacientes con tuberculosis, cáncer de pulmón resuelto, neumotórax con formación de bullas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y sarcoidosis fibrocavitada. La aspergilosis crónica necrotizante algunos autores prefieren denominarla como aspergilosis pulmonar subaguda ya que presenta una clínica que puede progresar en semanas más que en meses suele afectar a pacientes con algún grado de compromiso inmunológico, como diabetes, alcoholismo, nutrición, corticoterapia y en menor cuantía a pacientes con sida. (7).

Las estimaciones de la incidencia de APC son difíciles de establecer; sin embargo, la carga global de enfermedad está reconociéndose cada vez más, por ejemplo, la proporción de pacientes con TB como un factor de riesgo subyacente para el desarrollo de APC variará dependiendo de la situación geográfica. En 2011, la incidencia de la APC se estimó en 3600 pacientes en el Reino Unido y en 1,2 millones a escala mundial. En la actualidad se estima que la APC afecta a más de tres millones de personas en todo el mundo y es considerada una de las enfermedades infecciosas pulmonares más refractarias al tratamiento. La supervivencia estimada para 5 años, oscila entre el 48-62%, aunque puede lograrse mayor estabilidad clínica a largo plazo con un diagnóstico precoz y un tratamiento oportuno (8, 9). El 15% de la mortalidad en países desarrollados está subdiagnosticado y confundido con TB y aun así se estima que más de 450 000 personas mueren al año a causa de la APC, a nivel mundial, su prevalencia tras una tuberculosis pulmonar oscila en 1,74 millones de personas, según el Fondo de Acción Global para Infecciones Fúngicas (10).

La sospecha diagnóstica se basa en los hallazgos clínico-radiológicos siendo la presencia de precipitinas o cultivos positivos muy sugerente de esta entidad clínica. Sin embargo, existen procesos intercurrentes o imitadores (infección por micobacterias especialmente), por lo que muchas veces se hace necesaria la realización de broncoscopía para la obtención de muestras de mayor calidad. La positividad del examen directo del esputo es baja (25%), la del cultivo es cercana al 40-50% sin embargo la detección de IgG-anti *Aspergillus* en suero tiene una positividad aproximada del 90%. El diagnóstico definitivo lo aportaría la biopsia, al demostrar la presencia de hifas, necrosis local y/o reacción granulomatosa, pero

como es una técnica invasiva no es fácil de realizar en estos pacientes. En resumen, los criterios diagnósticos para la identificación de pacientes con APC se basan en las manifestaciones clínicas, imágenes radiológicas y los estudios microbiológicos, en particular la detección de IgG-anti *Aspergillus* (11, 12).

Los métodos serológicos son de gran ayuda diagnóstica, se consideran a nivel internacional la técnica de oro. La detección de inmunoglobulinas, principalmente IgG específica anti *Aspergillus*, brinda la posibilidad de distinguir entre colonización e invasión. Existen pruebas de precipitación en gel de agarosa en las que la presencia de una o más bandas de precipitación, se consideran diagnósticas. La técnica de ELISA es también un buen método serológico para detectar anticuerpos específicos, el antígeno utilizado para este tipo de prueba es extraído de *A. fumigatus* o *A. niger*, este método es más sensible y específico que los métodos de inmunoprecipitación (13, 14).

Hasta finales del siglo XX no existían muchas alternativas para el tratamiento de las infecciones fúngicas. En 2016 la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID por sus siglas en inglés), en conjunto con la Confederación Europea de Micología Médica y la Sociedad Europea de Enfermedades Respiratoria (ERS por sus siglas en inglés) emitió la guía terapéutica para el tratamiento de pacientes con aspergilosis pulmonar crónica. Como droga de elección se recomienda el itraconazol (ITR) 400 mg/día por vía oral, y de manera alternativa el voriconazol (VRC) 300 mg/día. El tiempo mínimo de tratamiento es de seis meses, y puede extenderse a 9 meses cuando la respuesta no es favorable. En los pacientes que no responden a triazoles orales o con cuadros clínicos más graves se sugiere iniciar el tratamiento con voriconazol o anfotericina B (AMB) liposomal por vía intravenosa (15,16).

En los individuos con un sistema inmune aparentemente normal, que padecen afecciones pulmonares subyacentes (EPOC, bronquiectasia, enfisemas o sarcoidosis, sospechas de micobacteriosis), sin un diagnóstico definitivo y que son sometidos a múltiples terapias empíricas con antibióticos y corticosteroides, esas afecciones de base constituyen factores predisponentes para el desarrollo de una APC, que se caracteriza por elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. A pesar de que se ha avanzado mucho en el reconocimiento y tratamiento de esta entidad,

queda mucho por hacer en casi todas las áreas del conocimiento asociadas con esta patología. (17, 18).

En nuestro país, por sus características de clima tropical, existe una biodiversidad micológica muy amplia y son frecuentes los reportes de pacientes con patologías respiratorias sin etiología precisada, sin embargo, no existe un conocimiento profundo de la situación real sobre la incidencia de la APC en Cuba (19).

Problema científico:

En el Hospital Neumológico Benéfico Jurídico (HNBJ) se atienden pacientes con cuadros respiratorios crónicos que presentan recurrencia de procesos infecciosos sin embargo, en muchos casos no se puede identificar el agente etiológico, por lo que son sometidos a múltiples tratamientos antimicrobianos; además existen enfermos con diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar (TB) pero su baciloscopía y cultivo son negativos, que no evolucionan favorablemente a la terapéutica específica antituberculosa, y continúan sin resolver su problema de salud.

¿Serán algunos de estos pacientes portadores de una APC?

Este estudio pretende contribuir al diagnóstico de aspergilosis pulmonar crónica en estos pacientes con cuadros clínicos sugerentes y sin diagnóstico etiológico utilizando métodos microbiológicos convencionales y en particular, la detección de anticuerpos IgG anti *Aspergillus* que es el método de elección a escala internacional. Esto permitiría instaurar un tratamiento específico, evitar la progresión de la infección y mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

OBJETIVOS

Objetivo general

Diagnósticar la aspergilosis pulmonar crónica en pacientes con sospecha clínica en el HNBJ.

Objetivos específicos

1. Identificar los pacientes con aspergilosis pulmonar crónica mediante el diagnóstico microbiológico.
2. Describir las características clínicas epidemiológicas de los pacientes diagnosticados con APC.
3. Identificar las especies de los aislados de *Aspergillus* obtenidos a partir de los pacientes con APC.
4. Caracterizar la susceptibilidad antifúngica de los aislados identificados frente a itraconazol, voriconazol y anfotericina B.

MARCO TEÓRICO

1. Aspergilosis pulmonar crónica:

1.1. Definición

La aspergilosis pulmonar crónica es una enfermedad caracterizada por más de tres meses de evolución, que afecta a pacientes inmunocompetentes con alguna afección pulmonar previa o en desarrollo y que por lo general presenta alguna lesión cavitada, con o sin bola fúngica o nódulos en la imagen radiológica de tórax; además de una evidencia directa de infección por *Aspergillus* (microscopía o cultivo de la biopsia) o una indirecta (presencia de anticuerpos anti *Aspergillus*) (15).

1.2. Antecedentes históricos

La APC se reconoció por primera vez en 1842 en Edimburgo, Reino Unido. La primera descripción radiológica de aspergilloma fue en Francia en 1938, y se describió como un “mega-micetoma intra-bronquiestasia”. En 1957 se registra el primer paciente tratado con AMB, debido a la complicación con APC en el curso de una tuberculosis. La primera clasificación de aspergilosis fue en 1959, usando el término “mycetoma”, considerando que en la actualidad se refiere a una infección subcutáneas por hongos. En la década de 1960 en Londres, se descubrió y se implementó la detección de anticuerpo anti *Aspergillus* como un método para confirmar la etiología de bolas fúngicas que se observan en las radiografías de tórax y tomografías (15).

Los términos aspergilosis pulmonar semi-invasiva y aspergilosis pulmonar crónica necrotizante se introdujeron a principios de los años ochenta. Los avances en la cirugía torácica, durante esta era, produjeron curas de aspergiloma en algunos pacientes con lesiones únicas y el reconocimiento de que los resultados eran pobres en aquellos con enfermedad multicavitada, denominada aspergiloma complejo. Muy pocos pacientes se describen en la literatura como tratados con AMB y los primeros ensayos abiertos de itraconazol sin criterios de respuesta estandarizados, mostraron beneficios clínicos parciales sin cambio radiológico. Como consecuencia el criterio para el diagnóstico y categorización de pacientes fue propuesto en 2003, y más tarde los refinamientos de los criterios y la clasificación de la enfermedad (20, 21).

El estudio de numerosos pacientes con APC facilitó su comprensión y el desarrollo de las herramientas necesarias para su diagnóstico, esto junto a la evidencias de una buena respuesta a los antimicóticos condujo a la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID por sus siglas en inglés), en colaboración con la Confederación Europea de Micología Médica y la Sociedad Europea de Enfermedades Respiratoria (ERS por sus siglas en inglés), a desarrollar las pautas clínicas para el diagnóstico y manejo de la enfermedad (15).

1.3. Epidemiología

La prevalencia de la APC asociada a la tuberculosis se estima en 1,2 millones de casos. Las cifras son particularmente altas en los pacientes VIH negativo, aunque también pueden ser afectados los pacientes VIH positivos (22).

Aspergillus es un hongo oportunista saprófito ubicuo al que los humanos están expuestos diariamente en la mayor parte del mundo, se encuentra en interiores y exteriores en asociación con el suelo, los desechos orgánicos, los alimentos y el agua. Algunas especies del género son parte de la microbiota normal de diversas zonas del cuerpo como orofaringe, fosas nasales, piel, saco lagrimal, oído y tracto gastrointestinal, por lo que su aislamiento debe tener correlación clínica (23).

El principal agente etiológico de la APC es *Aspergillus fumigatus* a diferencia de otras formas de infección por *Aspergillus*, la APC se detecta en individuos inmuno competentes o con ligero inmunocompromiso y con algún tipo de padecimiento respiratorio subyacente como enfermedades respiratorias intersticiales, bronquiectasias idiopáticas, ABPA, enfisema, individuos con lesiones post-tuberculosis pulmonar, fibrosis quística, sarcoidosis, neumoconiosis. Su incidencia es significativamente elevada en pacientes con EPOC. Cabe señalar que cuando son tratados con corticosteroides estos individuos pueden evolucionar a aspergilosis pulmonar invasiva (20).

No existen diferencias epidemiológicas en cuanto a sexo, ni rasgos étnicos y la infección se reconoce mayormente en pacientes adultos y de la tercera edad. Presenta un periodo de incubación indeterminado, y depende de cada forma clínica (24).

Debido a que los conidios de *Aspergillus* spp. se encuentran constantemente en el ambiente, la principal vía de ingreso al organismo es la respiratoria (25), por lo que el aislamiento de *Aspergillus* en muestras de las vías respiratorias inferiores sin evidencia de enfermedad se define como colonización. La distinción entre colonización y enfermedad se basa en el juicio clínico, aunque un título elevado de anticuerpos específicos, puede indicar enfermedad en lugar de colonización. El riesgo de desarrollar enfermedad clínica posterior a una colonización, depende del grado de compromiso inmunitario del hospedero y de los factores predisponentes (14, 26).

Varios factores predisponentes se señalan como fundamentales para padecer esta enfermedad, entre los que sobresalen desnutrición, tuberculosis, alcoholismo crónico, diabetes mellitus, carcinomas pulmonares, etc.; o se presenta en pacientes inmunocomprometidos por linfomas, leucemias, trasplante de órganos, neutropenicos, VIH-sida y corticoterapia. A pesar del incremento de casos de VIH-sida, pocos se asocian con cuadros de aspergilosis, y cuando se presentan, lo hacen en forma diseminada. La escasa cantidad de casos se ha explicado porque la aspergilosis se produce en pacientes con neutropenia y no con linfopenia, la cual normalmente presentan los enfermos con sida; sin embargo, la sobrevivencia de éstos por los actuales tratamientos, hace que tengan ambos procesos de inmunosupresión (25).

1.4. Patogenia

Es la principal micosis pulmonar en pacientes críticos. Se adquieren por inhalación de propágulos, pero la actividad de los macrófagos alveolares y neutrófilos es capaz de erradicarlos en situación de competencia inmune, es decir la eliminación de conidios inhalados tiene lugar por células epiteliales de la vía aérea y fundamentalmente por macrófagos alveolares, estos realizan el aclaramiento de las conidios y tras reconocer determinados antígenos fúngicos de la pared celular, secretan mediadores inflamatorios que favorecen el reclutamiento de neutrófilos y la activación de la inmunidad celular, determinantes en la eliminación de hifas y en la constitución de la respuesta inmunológica (27). La patología se desarrolla por deterioro de esa línea defensiva, o, más raramente, inhalación excesiva de conidios como ocurre en grandes catástrofes (derrumbes, huracanes, terremotos) (28).

La infección inicia por el contacto del hongo con el individuo que, dependiendo de sus factores de predisposición, presenta una forma clínica específica (25).

Aspergillus tienen factores de virulencia diversos; los más importantes son: adhesinas, pigmentos melánicos, paquetes enzimáticos y sustancias tóxicas (25).

La APC se produce por el crecimiento fúngico local de predominio en lóbulos superiores; la diseminación es excepcional, su formación se inicia por la aspiración de conidios, los cuales se desarrollan en antiguas cavidades tuberculosas o lesiones tumorales, formando una masa micelial amarilla-café o verdosa que se rodea de una pared fibrosa y en general es única. El centro del aspergiloma está compuesto de una membrana corrugada, constituida por fibrina, restos celulares y elementos fúngicos (hifas, conidios y cabezas aspergilaras), los cuales se sitúan en la capa interna de la cavidad. Al desarrollarse, el aspergiloma actúa mecánicamente como una válvula, provocando obstrucción bronquial. En raras ocasiones el hongo invade la pared de la cavidad y el pulmón adyacente (25). El principal factor de riesgo es la presencia de una neumopatía crónica que genere algún grado de inmunosupresión local, como por ejemplo tuberculosis, infección por otras micobacterias, asma y EPOC con corticoterapia, neoplasia pulmonar, entre otras. Se ha asociado con polimorfismos en lectinas de unión a manosa, déficit de surfactante y deficiencia de producción de interferón (26), (29).

1.5. Manifestaciones clínicas

La contribución del sistema inmune del hospedero es tan grande que las enfermedades individuales, descritas colectivamente como aspergilosis pulmonar, pueden considerarse como un espectro continuo de enfermedad, y la evolución de las entidades patológicas se produce en asociación con cambios en la respuesta inmune. La APC, comúnmente causada por *A. fumigatus*, se observa en individuos con un sistema inmune aparentemente normal y enfermedad pulmonar subyacente importante (30).

Los signos y síntomas clínicos son insidiosos y ocurren en un período de meses o años. La fiebre, la tos, la hemoptisis, el malestar general y la pérdida de peso son comunes. Por lo general, las anomalías radiológicas progresan muy lentamente (de meses a años), lo que exige una imagen repetida y una comparación en serie de

radiografías. La cavitación progresiva y la extensión del engrosamiento pericavitario son marcadores de la actividad de la enfermedad y pueden usarse para guiar la terapia antimicótica. En ocasiones se puede ver fibrosis masiva (31).

Las manifestaciones menos comunes de APC incluyen nódulo de *Aspergillus* y aspergiloma simple, entre la forma más común se encuentra la APCC que no tratada puede progresar a APCF. Todas estas entidades se encuentran en pacientes no inmunocomprometido con enfermedad respiratoria previa o actual. La APCN se caracteriza por una infección rápidamente progresiva (<3meses) usualmente encontrada en pacientes moderadamente inmunocomprometidos (15).

1.5.1. Aspergiloma

Apariencia morfológica de una bola fúngica, que consta casi enteramente de hifas y la matriz extracelular, es la imagen más característica de la APC y se visualiza en la tomografía axial computarizada (TAC) del tórax, en una cavidad pulmonar o pleural. Puede encontrarse en todas las formas de APC excepto en el nódulo de *Aspergillus*. El aspergiloma es una manifestación tardía de la enfermedad, formada por el colapso en una cavidad del crecimiento de la superficie, es excepcional e inusual que una bola fúngica sea causada por cualquier otro hongo (15).

1.5.2. Aspergiloma pulmonar simple

Cavidad pulmonar única que contiene una bola fúngica, con pruebas microbiológicas que implican *Aspergillus* spp. en un paciente no inmunocomprometido con síntomas menores o inexistentes y progresión radiológica durante al menos tres meses de observación (15).

1.5.3. Aspergilosis pulmonar crónica cavitaria (APCC)

La APCC, antes llamada aspergiloma complejo, generalmente muestra múltiples cavidades, que pueden o no contener un aspergiloma en asociación con síntomas pulmonares o sistémicos, levantado marcadores inflamatorios durante al menos 3 meses de observación. Sin tratamiento, durante años, estas cavidades pueden agrandarse, unirse y desarrollar infiltrados pericavitarios o perforar en la pleura y un aspergiloma puede aparecer o desaparecer. Por lo tanto, la evidencia serológica o microbiológica de *Aspergillus* spp, es necesaria para el diagnóstico de esta entidad

(15). Afecta a pacientes inmunocompetentes que desarrollan una o más cavidades durante varios meses, habitualmente en lóbulos superiores y si progresan pueden llegar a desarrollar formas crónicas fibrosantes (7).

1.5.4. Aspergilosis pulmonar crónica fibrosante (APCF)

Generalmente es el resultado final de una APCC no tratada, identificada como fibrosis extensas con destrucción parenquimatosa de al menos dos lóbulos pulmonares complicando a la APCC, dando lugar a una gran pérdida de la función pulmonar. Por lo general, la fibrosis es sólida en su aspecto, pero pueden observarse cavidades grandes o pequeñas con fibrosis circundante, pueden estar presentes uno o más aspergilomas. Las pruebas serológicas o microbiológicas que implican *Aspergillus* spp. son necesario para el diagnóstico. (15) Esta forma clínica se suelen observar en pacientes con neumotórax con formación de bullas, EPOC, tuberculosis, sarcoidosis fibrocavitada y cáncer de pulmón resuelto (7).

1.5.5. Aspergilosis pulmonar crónica necrotizante (APCN)

Conocida también como aspergilosis invasiva subaguda (AISA). El término APCN se reserva para pacientes con algún grado de inmunosupresión, con una duración de la enfermedad más corta a diferencia de la APCC (32), en estos pacientes hay mayor probabilidad de detectar el antígeno aspergilar en la sangre y demostrar hifas invadiendo el parénquima pulmonar si se realiza una biopsia. Típicamente ocurre en pacientes con diabetes mellitus, desnutrición, alcoholismo, edad avanzada, administración prolongada de corticosteroides u otros agentes inmunosupresores, EPOC, trastornos del tejido conectivo, radioterapia, micobacterias no tuberculosas y VIH (15, 21).

1.5.6. Nódulo aspergilar

Los nódulos aspergilaes son muy similares a los nódulos malignos, son redondeados pudiendo tener zonas de calcificaciones en su interior, pueden ser únicos o múltiples (<3 cm), generalmente no cavitados, son una forma inusual de presentación de la APC. El diagnóstico solo puede ser hecho mediante histología (9, 15).

1.6. Diagnóstico

1.6.1. Criterios diagnósticos

El diagnóstico de la APC requiere de un alto grado de sospecha clínica por parte del neumólogo asistencial, la combinación de varias características clínicas, radiológicas y microbiológicas demuestran la presencia de esta enfermedad. Presencia de cavidades en las imágenes radiológicas (preferiblemente por TAC), la evidencia directa de infección por *Aspergillus* o de respuesta serológica a *Aspergillus* spp., sintomatología por al menos tres meses y la exclusión de algún diagnóstico alternativo contribuyen a su diagnóstico de certeza (8, 15).

En pacientes con una o más cavidades sugerentes de APC, puede usarse para confirmar diagnóstico: la detección de IgG anti *Aspergillus* o precipitinas contra *Aspergillus* (>90% de los casos); presencia de antígeno (sensibilidad y especificidad, 77% en ambos casos) o ADN aspergilar en fluidos respiratorios; biopsia percutánea o quirúrgica que muestre hifas en la microscopía o *Aspergillus* spp. en crecimiento en alguna cavidad. Si las hifas se ven invadiendo el parénquima, el diagnóstico será el de una aspergilosis invasiva aguda o subaguda. Las muestras respiratorias que presentan hifas sugerentes de *Aspergillus* spp. en crecimiento y/o PCR positivo a *Aspergillus* contribuyen al diagnóstico, pero no son suficientes por sí solos para confirmar una APC, ya que otras afecciones por este agente pueden presentarse en las vías aéreas (15, 17).

La infección por micobacterias es un diagnóstico diferencial frecuente de la APC, ya sea tuberculosis (TB) o micobacterias no tuberculosa (MNT), las que pueden preceder, seguir u ocurrir junto a la APC (15).

1.6.2. Diagnóstico clínico

Como no hay marcadores específicos para la APC e incluso menos para los subgrupos de esta entidad, el diagnóstico siempre se extraerá de una sinopsis de las características típicas de predisposición, por lo que los hallazgos clínicos (incluida la respuesta clínica a la terapia antifúngica específica) son muy importantes para comenzar a sospechar esta enfermedad junto a otros datos diagnósticos (33).

Como se mencionó anteriormente la APC tiende a afectar generalmente a pacientes inmunocompetentes, teniendo un curso progresivo asintomático que puede durar años. Las señales clínicas usuales y los síntomas constitucionales incluyen fiebre, malestar, fatiga y pérdida de peso, además, los pacientes pueden exhibir los síntomas respiratorios no específicos como la tos productiva crónica y hemoptisis (20).

1.6.3. Diagnóstico radiológico

La radiografía de tórax (RXT) sigue siendo la primera modalidad imagenológica para la sospecha y el diagnóstico de la APC, aunque la TAC ofrece mayor información (12, 15, 20).

Las características imagenológicas de la APC resultan de una combinación de hallazgos relacionados con la enfermedad pulmonar subyacente y los cambios secundarios debido a la infección por el *Aspergillus*. La APC se desarrolla más comúnmente en una cavidad broncopulmonar o pleural preexistente, aunque también causa directamente la formación y expansión de nuevas cavidades o nódulos y rara vez una consolidación alveolar. Los cambios secundarios a la infección van desde la típica apariencia de una bola fúngica dentro de una cavidad pulmonar hasta características pleuropulmonares complejas relacionadas con la enfermedad cavitaria destructiva progresiva (12, 15).

El aspergiloma se presenta típicamente como una masa intracavitaria sólida, redondeada u oval, ubicada en el lóbulo superior y parcialmente rodeada de aire (signo del aire creciente). Puede aparecer fija e inmóvil como una esponja irregular que llena la cavidad y contiene espacios aéreos. Se pueden observar nódulos densos o calcificación extensas (15, 17).

La apariencia típica de la APCC es la presencia de áreas de consolidación unilaterales o bilaterales asociadas a múltiples cavidades de paredes gruesas, las que pueden tener uno o más aspergilomas, y engrosamiento pleural variable. Estos hallazgos son frecuentemente asimétricos y predominan en áreas con alteraciones preexistentes. Si no instaura tratamiento oportuno, estas cavidades pueden agrandarse y la bola fúngica aparecer o desaparecer. La APCF se presenta como fibrosis que puede estar limitada a uno o ambos lóbulos superiores, aunque también

es común que abarque todo un hemitórax. No existe ninguna característica distintiva de la fibrosis en la APC, excepto la cavitación y las bolas fúngicas que se ven en la proximidad. La APCN presenta infiltrados en lóbulos superiores, cavitación, opacidades nodulares y engrosamiento pleural que va progresando en los días o semanas. Los nódulos aspergilaes son muy similares a los nódulos malignos (15, 21, 32).

1.6.4. Diagnóstico microbiológico

1.6.4.1. Muestras

La presencia de *Aspergillus fumigatus* en el esputo no es diagnóstico. Las tasas de positividad de los cultivos varían entre el 25-80% en los estudios publicados. Los métodos de detección moleculares como la PCR son más sensibles que los cultivos (15).

La presencia de anticuerpos anti *Aspergillus* en el suero diferencia entre colonización e infección con un valor predictivo positivo del 100% para detectar infección. Los títulos de los anticuerpos no tienen relación con la extensión ni severidad de la enfermedad, aunque títulos muy altos son más comunes en los aspergilomas, generalmente los títulos bajan con el tratamiento, pero rara vez se hacen indetectables a menos que se continúe la terapia durante años (14, 15).

1.6.4.2. Examen microscópico directo

Se basa en la identificación de estructuras micóticas a partir de preparaciones en fresco con KOH al 20%, ácido láctico, blanco de calcofluor entre otros. La principal ventaja de estas pruebas es la relativa rapidez del diagnóstico y la principal desventaja la baja sensibilidad y especificidad, ya que no se puede identificar la especie del hongo (34).

El KOH es un reactivo que clarifica y disuelve la mayoría de los elementos celulares sin afectar la pared de quitina de la célula de los hongos, dicha preparación se puede observar en un microscopio convencional donde se verán hifas tabicadas con ramificaciones dicotómicas (13).

El blanco de calcofluor es uno de los compuestos conocido como sustancia fluorescente o agente blanqueador, se une al β 1-3 y al β 1-4 glucano que se

encuentran en la celulosa y la quitina, componentes de la pared celular de la célula fúngica. En una técnica muy sensible y específica, pero tiene la desventaja que se necesita de un microscopio de fluorescencia para su realización (35).

1.6.4.3. Cultivo e identificación

Aunque *Aspergillus* spp. puede recuperarse en la mayoría de medios de cultivo de rutina tanto sólidos como líquidos, se debe incluir un medio de cultivo selectivo al momento de la siembra inicial, como el agar Sabouraud dextrosa con antibióticos. La desventaja principal de los cultivos es el tiempo de crecimiento fúngico, que está genéticamente determinado y puede tardar varios días, la capacidad de crecer a 37°C diferencia las especies de *Aspergillus* de los mohos saprófitos ambientales (32).

El cultivo se realiza en los medios habituales, no es recomendable utilizar medios con cicloheximida, porque puede inhibir el crecimiento de algunas especies de *Aspergillus*; debido a que estos hongos son contaminantes del ambiente, e incluso de vías respiratorias, piel y conducto auditivo externo, es importante hacer cultivos a intervalos separados (de días). El periodo de incubación es de 1 a 3 días; entre 25°C y 37°C; se ha recomendado el medio de agar Czapek para la caracterización los aislamientos. Las colonias crecen rápido (en 3 a 4 días), son de color blanco, verde, amarillo, café o rojizo, y puede difundir el pigmento hacia el medio de cultivo, la superficie es aterciopelada, granulosa o pulverulenta; los márgenes pueden estar bien delineados o ser difusos e irregulares. Estos hongos se identifican por el aspecto y la pigmentación de la colonia (25, 36).

Su identificación es fundamental no solo con fines epidemiológicos y científicos, sino también por la diferente susceptibilidad a los antifúngicos entre especies del mismo género, generalmente se basa en el estudio de caracteres morfológicos, micro y macroscópico del hongo (37). En el estudio microscópico las hifas son tabicadas; la visualización de la reproducción asexual es muy importante para su identificación, por lo característico de sus estructuras de fructificación: (36). (ver Anexo 1)

a) El conidióforo, filamento largo y hialino, con o sin tabiques, a veces ramificado, que termina en una dilatación o vesícula; nace en una hifa vegetativa; esta base del conidióforo puede ser hialina o pigmentada, lisa o rugosa, y se llama célula pie (36).

b) La vesícula, que tiene diferente forma y tamaño, y en la que se disponen hileras de fiálides; puede ser semiesférica, globosa o elíptica en forma de clava; la pared puede ser delgada o gruesa y casi nunca se observa tabique que la separe del conidióforo (36).

c) Fiálides, en forma de botella, nacen de manera directa de la vesícula (uniseriadas); también pueden nacer de células estériles llamadas métulas (biseriadas), portan cadenas de esporas redondeadas y basipétalas (la más joven es la basal y es un tipo de conidiogénesis enteroblástica). La forma de la vesícula y la disposición de las fiálides hacen que los conidios tengan una disposición en columnas o radiada; la pigmentación de los conidios es el principal factor que determina el color de la colonia (36).

1.6.4.4. Diagnóstico serológico

Si se sospecha una APC, una prueba para la detección de anticuerpos IgG específica anti *Aspergillus* es esencial para confirmar la infección, que, en combinación con la presencia de una bola fúngica, será positiva en más del 90% de los casos. La presencia de anticuerpos anti *Aspergillus* en el suero diferencia entre colonización e infección con un valor predictivo positivo del 100% para detectar infección por lo que a nivel mundial las técnicas serológicas se definen como el estándar de oro, lo que las convierten en una poderosa herramienta de diagnóstico cuando se utiliza en combinación con otras modalidades diagnósticas (15, 38).

Recientemente se ha resumido la respuesta de los anticuerpos específicos anti *Aspergillus*, su papel en el diagnóstico y manejo del APC, y un resumen de las diversas técnicas disponibles para monitorear el tratamiento (38). El uso de múltiples métodos para la confirmación serológica de la infección por *Aspergillus* es motivo de preocupación y no está claro que la realización de estas pruebas sea comparable entre hospitales o grupos de pacientes con APC (39). También se debe tener en cuenta que en un pequeño grupo de estos sujetos, la IgG de *Aspergillus* puede permanecer negativa incluso en presencia de síntomas, radiología y diagnósticos de laboratorio que sugieren la enfermedad (30). Las razones para esto no están claras, pero pueden incluir hipogammaglobulinemia, falla en la respuesta adecuada del anticuerpo a *Aspergillus* o infección con una especie distinta a *A. fumigatus*. Es por esta razón que la ausencia de IgG anti *Aspergillus* o precipitinas

no puede usarse como una herramienta definitiva para excluir el diagnóstico. Se puede observar una prueba de IgG anti *Aspergillus* negativa en presencia de un único aspergiloma estable o nódulos de *Aspergillus* (30). En los casos en que las pruebas de anticuerpos no son concluyentes, pero se sospecha APC (y se han eliminado los diagnósticos diferenciales, incluidas las formas alérgicas de aspergilosis), se debe buscar evidencia para apoyar el diagnóstico utilizando técnicas alternativas (38).

1.6.4.5. Diagnóstico molecular

El desarrollo de técnicas de biología molecular puede dar lugar a métodos muy sensibles y rápidos que favorezcan el pronóstico de las aspergilosis más graves. Recientemente se ha desarrollado una PCR que amplifica una región de ADN ribosomal muy específica de *Aspergillus fumigatus* cuyos resultados preliminares son muy alentadores por su elevada sensibilidad y especificidad. La PCR, es un método mucho más sensible que el cultivo, ya que además de definir infección, demuestra una carga fúngica alta, evalúa la terapia antifúngica y realiza una detección directa de las mutaciones de resistencia. Sin embargo, aún no está lo suficientemente estandarizado ni validado para su uso habitual (15).

1.7. Tratamiento

El tratamiento de la APC tiene como objetivo aliviar la carga de síntomas para las personas afectadas, reducir los episodios de hemoptisis y prevenir la fibrosis pulmonar, y así preservar la función pulmonar. Este enfoque se basa en el control de tres aspectos: la infección por *Aspergillus*, las complicaciones y las comorbilidades coexistentes; por lo tanto, el tratamiento es a menudo de por vida (15).

La terapia con triazoles es la piedra angular del tratamiento oral para la APC actúa a través de la inhibición de CYP51p e interfiere la conversión de lanosterol a ergosterol, alterando la estructura y función de la membrana de las células fúngicas, ejerciendo así efectos fungistáticos y, en ciertas circunstancias, fungicidas sobre *Aspergillus*. El espectro de actividad antifúngica de itraconazol y voriconazol se usan secuencialmente en el tratamiento de APC de acuerdo con la necesidad clínica. Una excepción importante a esto es el manejo del aspergiloma único, donde si las

comorbilidades lo permiten, el tratamiento definitivo es la resección quirúrgica, que brinda mejor posibilidad de curación a largo plazo (15, 40, 41).

La decisión de tratar una APC con triazoles orales depende del tipo de enfermedad y de la necesidad de tratamiento quirúrgico. Como recomendación general, la terapia con triazoles orales probablemente tendrá beneficios en casos de APC progresiva y/o sintomática. El itraconazol oral (200mg/12h) podría utilizarse para prevenir o tratar la hemoptisis con riesgo vital, también mostró ser superior al tratamiento conservador para estabilizar las manifestaciones clínicas y radiológicas en la APCC y se considera actualmente como el tratamiento de elección para esta patología. El voriconazol también es efectivo para la APCC con una tolerancia aceptable en varios estudios como terapia primaria o después del uso de itraconazol (ya sea por falla o intolerancia). En la APFC, el tratamiento a largo plazo con itraconazol podría ser beneficioso para estabilizar la condición general del paciente con impacto limitado sobre la disnea (15. 42).

La duración de la terapia en los casos de APCC es prolongada, sin embargo, la mayoría de los pacientes que responden lo harán cerca de los 6 meses, por tanto, un mínimo de 4-6 meses de terapia con triazoles orales es lo recomendado inicialmente. En los pacientes con mínima respuesta, se recomienda extender el tratamiento por 9 meses para evaluar respuesta. La terapia intravenosa puede usarse en pacientes con enfermedad progresiva y en aquellos que falla la terapia oral o que son tolerantes o resistentes. La anfotericina B o las equinocandinas son las drogas alternativas a los triazoles y son exclusivamente para uso intravenoso (15).

1.8. Antifúngicos

En comparación con la terapia antibacteriana, los tratamientos antifúngicos son limitados en cuanto a su eficacia y también son pocos los fármacos disponibles. Por otra parte, a diferencia de las bacterias, la resistencia en los hongos no emerge rápidamente, debido a su largo tiempo de replicación (43).

En la actualidad, la emergencia de resistencia antimicótica se debe, principalmente, al reciente aumento de especies con resistencia natural y a la selección de cepas resistentes durante la terapia antimicótica. Sin embargo, el uso continuo de

tratamientos antifúngicos, principalmente en pacientes inmunosuprimidos, induce menor susceptibilidad y cierta resistencia a los azoles, de algunos aislamientos (44).

Los antifúngicos o antimicóticos incluyen una variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción, su clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura (polienos, azoles, alilaminas, lipopéptidos, derivados de la morfolina, piridonas, benzofuranos, tiocarbamatos), su origen (sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química), su espectro de acción (amplio o reducido), sus mecanismos de acción (fungistático o fungicida), su vía de administración (oral, parenteral, tópicos o sistémicos) su toxicidad y su selectividad de acción (25, 36).

1.8.1. Clasificación química y la actividad de antifúngicos de uso clínico

Clase	Fármacos	Actividad
Polienos	anfotericina B convencional, anfotericina B liposomal, complejo lipídico de anfotericina B, anfotericina B en dispersión coloidal, nistatina	Fungicida
Imidazoles	clotrimazol, miconazol, ketoconazol	Fungistático
Triazoles 1ra generación	fluconazol, itraconazol	Fungistático
2da generación	voriconazol, ravuconazol, posaconazol	Fungistático
Equinocandinas	caspofungina, micafungina, anidulafungina	Fungicida
Pirimidinas	5-fluorocitosina	Fungistático

1.8.2. Mecanismos de acción de los antifúngicos

➤ Azoles:

Son moléculas sintéticas con un anillo de cinco carbonos unido a una cadena alifática con un grupo fenilo. Existen dos familias de azoles que se distinguen por las moléculas de nitrógeno que contiene el anillo azólico, dos en el caso de los imidazoles y tres en el de los triazoles. La actividad antifúngica de estos fármacos reside en la capacidad de unirse con el grupo hemo, que forma parte de muchas de

las enzimas implicadas en la síntesis de ergosterol, particularmente la 14-alfa demetilasa dependiente del citocromo P450 (CYP por sus siglas en inglés), es decir la acción de los azoles sobre el género *Aspergillus* está dada por la acción de estos genes *cyp51A* y *cyp51B*, los cuales producen inhibición de la síntesis del ergosterol de la membrana fúngica. Esta unión bloquea la síntesis de ergosterol, constituyente fundamental de la membrana celular fúngica que actúa como regulador biológico de la fluidez e integridad de la membrana de los hongos, acumulándose esteroides 14-alfa metilo, lo que inhibe el crecimiento de la célula fúngica (25, 36, 45, 46).

➤ Polienos:

Los polienos son moléculas macrólidas con cadenas insaturadas de gran actividad antifúngica. Tiene como características su escasa biodisponibilidad digestiva, una baja solubilidad en agua y su toxicidad, aunque las formulaciones lipídicas consiguen reducirla significativamente y aumentar la dosis, lo que hace que pueda ser administrada sin que aparezcan efectos adversos graves (17, 45).

Se unen a todos los esteroides, aunque muestran una mayor afinidad por el ergosterol que forma parte de la membrana fúngica. Esta unión genera la formación de poros o canales, que consisten en 8 moléculas de anfotericina B ligadas hidrófobamente a los esteroides de la membrana por los que la célula fúngica pierde iones y moléculas. Los residuos hidroxilpolieno están orientados hacia el interior del poro, lo que origina una alteración de la permeabilidad de la membrana con escape de contenido citoplasmático vital y eventualmente la muerte del microorganismo. También se une con esteroides intracelulares causando daños celulares, principalmente en las vías de la respiración celular (45).

➤ Equinocandinas:

Son una familia de fármacos pertenecientes a la clase de las candinas. Son antifúngicos lipopéptidos que actúan inhibiendo la 1,3-betaglucano sintetasa, enzima necesaria para la formación de polímeros, uno de los componentes de la pared fúngica. La inhibición de esta enzima reduce la síntesis del glucano, lo que causa inestabilidad osmótica en la célula fúngica y su posterior muerte (45).

1.8.3. Mecanismos de resistencia a los antifúngicos

Como con otros microorganismos, la resistencia de los hongos filamentosos frente a los antifúngicos es un concepto amplio que puede clasificarse en resistencia microbiológica y resistencia clínica. La primera se puede subdividir en: (47).

1. Resistencia intrínseca o innata: Es aquella que presentan todas las cepas de una misma especie de un hongo y no tiene relación con la exposición al antifúngico.
2. Resistencia primaria: Es la que ocurre en una especie de cepas normalmente sensibles a un antifúngico cuando aparecen de forma espontánea cepas resistentes, sin haber estado en contacto previo con el antifúngico.
3. Resistencia secundaria o adquirida. Es la que se desarrolla después de la exposición a los antifúngicos y que puede ser debida a alteraciones fenotípicas o genotípicas que se manifiestan de forma estable o transitoria.

La resistencia de *Aspergillus* a los azoles podría estar relacionada con el uso masivo de antifúngicos en tratamientos empíricos y en profilaxis, utilización comprensible si se tiene en cuenta el mal pronóstico de algunas de estas infecciones (47).

Se han descrito dos mecanismos de resistencia a los azoles en este género, uno por mutaciones en *cyp51A* y el otro por reducción de las concentraciones intracelulares de las drogas. Las mutaciones específicas en *cyp51A* han sido asociadas con resistencia cruzada entre los azoles y la reducción de las concentraciones intracelulares, como resultado de la sobreexpresión de bombas de eflujo o reducción de la penetración de la droga (48).

La AMB es un fármaco fungicida, en la resistencia de *A. terreus* se ha descrito un aumento de la actividad de su catalasa, lo que podría colaborar a reducir el daño oxidativo originado por este (45).

1.9. Susceptibilidad in vitro a los antifúngicos

Las pruebas de susceptibilidad tienen como objetivo conocer si los microorganismos evaluados son sensibles o resistentes a los antimicrobianos y sirven para elegir el tratamiento antifúngico óptimo. Existen diferentes métodos comerciales, con

resultados comparables a los de referencia, que permiten la determinación de los perfiles de sensibilidad *in vitro* y la obtención de datos para detectar la resistencia antifúngica (49).

El método de referencia para la determinación de la susceptibilidad de los hongos filamentosos no dermatofitos es el documento M38-A2 que refiere la selección de agentes antifúngicos (anfoterina B, triazoles y equinocandinas), preparación de las soluciones madre y diluciones para la aplicación, interpretación de los procedimientos de prueba, y los requisitos de control de calidad; para detectar especies intrínsecamente resistentes a los antimicóticos en estudio, con CMI más elevadas que lo habitual, asociadas a las fallas terapéuticas (43).

Los métodos comerciales, como la técnica de E-test® (AB BioDisk, Solna, Sweden), por su facilidad en el montaje, y de la lectura de sus zonas de inhibición, proporcionan una más amplia gama de concentración mínima inhibitoria (CMI) y, con resultados reproducibles, permiten establecer una asociación entre los perfiles de sensibilidad de los hongos miceliales y los resultados clínicos (49)

El método de E-test tiene un valor potencial en las pruebas de sensibilidad para hongos miceliales patógenos, aunque este método aún no tiene establecidos los puntos de corte de uso clínico, es útil para establecer las especies miceliales potencialmente resistentes, lo cual lo hace mucho más eficaz que el método de referencia, para el estudio sistemático de los agentes antifúngicos y su actividad frente a los diferentes hongos aislados, además de la evaluación *in vivo-in vitro* de la eficacia terapéutica y la predicción de una posible resistencia antifúngica (50).

Es un método simple, una técnica cuantitativa que consiste en la utilización de una tira de plástico que, en una de sus caras, lleva un gradiente de concentración del antimicrobiano. Tras la incubación, la intersección entre el crecimiento del microorganismo y la zona de inhibición en forma de elipse indican la CMI de anfotericina B, fluconazol, itraconazol, flucitosina, voriconazol, posaconazol y caspofungina (51).

2. Micología

2.1. Posición taxonómica del género *Aspergillus* (36).

- Dominio: Eucarya
- Reino: Fungi
- División: Ascomycota
- Sub-División: Pezizomycotina
- Orden: Eurotiales
- Familia: Aspergillaceae
- Género: *Aspergillus*
- Especies: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. versicolor*, etc.

Las especies del género *Aspergillus* presentan una gran versatilidad metabólica y una gran capacidad para dispersar sus conidios dado que su cabeza conidial puede producir más de 500.000 propágulos. Al género *Aspergillus* pertenecen aproximadamente 900 especies unidas por características morfológicas, fisiológicas y filogenéticas, tienen distribución mundial y sus conidios son inhalados en forma permanente por el hombre; pueden ser aislados de cualquier sustrato que contenga materia orgánica y humedad como por ejemplo del suelo, restos vegetales en descomposición, alimentos etc., por lo tanto, puede afectar nuestro bienestar de diferentes formas: (36).

- Como patógeno humano y animal.
- Como productores de micotoxinas.
- Como contaminantes de cultivos, productos alimenticios, cueros, tejidos, etc., produciendo una disminución del valor comercial de los mismos.

A pesar de su ubicuidad sólo unas pocas especies están relacionadas con patologías en el hombre, independientemente del sexo, edad y raza (36).

2.2. Características macro y micromorfológicas de las principales especies de *Aspergillus* (ver Anexos 2 y 3)

2.2.1. *Aspergillus fumigatus*

Hongo saprófito, patógeno oportunista ubicuo, aislado con mayor frecuencia en las micosis pulmonares, al que los humanos están expuestos diariamente en la mayor parte del mundo, se puede aislar a partir de una amplia variedad de sustratos durante todo el año, posee un metabolismo versátil que cumple con sus requerimientos nutricionales bajo diferentes condiciones ambientales, crece óptimamente a 37°C y pH de 3,7-7,6. La termotolerancia de *A. fumigatus* es aún más notable en las ascosporas, los propágulos producidos en el ciclo sexual (22). Crece en los medios de agar Sabouraud y agar papa dextrosa (PDA) a 28°C (25, 36).

- **Macromorfología:** Se observan colonias que se desarrollan entre 3 y 5 días; son planas, ilimitadas, polvosas o aterciopeladas, de color verde y en ocasiones presentan un halo micelial blanco alrededor de la colonia; al reverso raras veces se ve un pigmento de color ocre o sin pigmentos, en ocasiones da pigmento café-amarillo difusible (25, 36).
- **Micromorfología:** Al microscopio se observan hifas vegetativas tabicadas de 2 a 4 µm de diámetro, e hifas reproductivas casi siempre cenocíticas de 4-6 µm, que terminan en las clásicas cabezas aspergilaes, las cuales son más pequeñas que las de *A. niger*; miden de 30-50 µm y presentan conidióforos cortos (20-30 µm), que terminan con una vesícula ligeramente alargada, de la que nace una sola serie de fiálides que miden de 20 a 30 µm de diámetro cada una, con tendencia a disponerse hacia arriba en un ángulo aproximado de 180° (como “pelos parados”); de las fiálides nacen microconidios redondos de aproximadamente 2.5-3 µm. Recién se ha reportado su fase teleomórfica: *Neosartorya fumigata* (25, 36).

2.2.2. *Aspergillus flavus*

De distribución mundial, en lugares con alta humedad se encuentra como saprofito del suelo, puede crecer en rango de temperatura de 12-48°C siendo a 37°C la temperatura óptima (52). Crece en los medios de cultivo como agar Sabouraud y PDA a 28°C (25).

- **Macromorfología:** Se observan colonias que se desarrollan con rapidez de 3 a 5 días: son ilimitadas, polvosas o aterciopeladas, de color verde amarillento brillante, puede formar esclerotes en colonias viejas o cuando se siembran en medios pobres; al reverso algunas cepas producen pigmento café ligeramente difusible (25, 36).
- **Micromorfología:** Al microscopio se observa micelio tabicado (2-4 μm) y hialino; las cabezas aspergilaes llegan a medir hasta 100 μm de diámetro y están compuestas por conidióforos largos (80-100 μm), generalmente de textura rugosa, con vesículas redondas (25-45 μm), de las que nacen dos series de fiálides (biseriado), las primeras de 8-10 μm y las subsecuentes de 5-6 μm ; de estas últimas nacen microconidios redondos de 2-3 μm . Al igual que *A. niger*, la disposición de las fiálides es en un ángulo aproximado de 360°. No se ha reportado estado teleomórfico (24, 25).

2.2.3. *Aspergillus terreus*

Hongo saprofito común del suelo, produce unas células localizadas lateralmente a las hifas llamadas conidias accesoria o aleuroconidia, son resistente a la anfotericina B (53).

- **Macromorfología:** Se observan colonias ilimitada, pulverulenta, granulosa, de color beige-café con un halo micelial blanco, al reverso sin pigmentos (26).
- **Micromorfología:** Al microscopio se observa micelio macrosifonado, hialino, tabicado (2-4 μm), cabezas aspergilaes que miden 40-60 μm de diámetro, con conidióforos largos cenocíticos y vesículas subesféricas de 10-25 μm , con dos series de fiálides (pequeñas y grandes) en un ángulo aproximado de 180° con conidios redondos de 1.5-2.5 μm (26).

2.2.4. *Aspergillus niger*

Se puede encontrar en el suelo, crece sobre la materia orgánica en descomposición, puede crecer en un rango de temperatura de 6-47°C y en valores extremos de pH pueden ser de 1.4 a 9.8 (54). Crece en los medios de cultivo ordinarios como agar Sabouraud y PDA a 28°C (26).

- **Macromorfología:** Se observan colonias que se desarrollan con rapidez, transformándose en colonias planas, granulosas, negras e ilimitadas; al reverso no presentan pigmento (26).
- **Micromorfología:** Al microscopio se observan hifas tabicadas de 2-4 µm de diámetro; las hifas reproductivas son más anchas, de 4-8 µm; éstas terminan con las clásicas “cabezas aspergilaes” que miden en total de 80-200 µm de diámetro; están compuestas por conidióforos cenocíticos largos (100-200 µm), vesículas redondas (25-100 µm de diámetro), de donde nacen dos series de fiálides en un ángulo de casi 360° (biseriadas); las primeras fiálides son más grandes (8-10 µm) que las segundas (5-7 µm); de éstas nacen microconidios redondos o elípticos de 3.5-5 µm, negros y equinulados. No se ha reportado estado teleomórfico (26).

MATERIALES y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio prospectivo descriptivo de corte transversal en los pacientes con sospecha clínica de aspergilosis pulmonar crónica en el Hospital Neumológico Benéfico Jurídico, durante el periodo comprendido entre el 1ro de mayo del 2017 y el 30 de abril del 2018.

2. Universo

Pacientes hospitalizados y de consulta externa, con sospecha clínica de APC, durante el periodo de estudio.

3. Muestra

Se constituyó por cincuenta pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y fueron seleccionados de manera aleatoria por el neumólogo asistencial que forma parte del estudio.

4. Criterios de inclusión y exclusión

Para definir la selección de la muestra poblacional se tomaron en cuenta los criterios propuestos por la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID por sus siglas en inglés), en conjunto con la Confederación Europea de Micología Médica y la Sociedad Europea de Enfermedades Respiratoria (ERS por sus siglas en inglés) (15).

Criterios para la selección de la muestra	
Paciente con cuadro clínico de enfermedad pulmonar crónica progresiva con evolución de más de 3 meses sin etiología conocida.	
Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión
<ul style="list-style-type: none">➤ Pacientes con baciloscopía y cultivo para TB negativos.➤ Pacientes con diagnóstico de EPOC con cuadros de agudizaciones y bacteriología negativa.➤ Enfermos con diagnóstico de Bronquiectasias, cavidades residuales clínica de infección y o cuadro infeccioso con bacteriología negativa.	<ul style="list-style-type: none">➤ Pacientes con diagnóstico de asma bronquial.➤ Pacientes con tratamiento antifúngico en el último mes.

5. Criterios de diagnóstico micológico y serológico

Aquellos pacientes con sospecha clínica de aspergilosis pulmonar crónica que en el estudio micológico se confirmó cultivo y prueba serológica positiva (detección de anticuerpos IgG anti *Aspergillus*) o solamente prueba serológica positiva. Los pacientes con cultivo positivo y serología negativa no se diagnosticaron como portadores de APC.

6. Descripción de técnicas y procedimientos

A todos los pacientes seleccionados por el neumólogo asistencial, se les redactó una ficha de datos obtenidos de las historias clínicas (Anexo 4), con previo consentimiento informado (Anexo 5) que incluyó información actualizada acerca de la enfermedad y se les realizó una toma de muestra para su posterior procesamiento en el laboratorio.

6.1. Toma de Muestra

Las muestras que se emplearon para este estudio fueron suero y esputo. También se utilizaron lavado bronquioalveolar (LBA) y líquido pleural (LP) en los casos que se realizó este proceder por indicaciones médicas.

6.1.1. Toma de muestra del esputo

Siguiendo las indicaciones específicas se realizó la toma de muestra programada para cada paciente:

1. Al levantarse en horas de la mañana, retirar las prótesis (en caso que fuera necesario) y realizar aseo matutino bucal, adecuado.
2. Recoger en un frasco estéril con tapa de rosca y color ámbar la primera expectoración de la mañana, mediante inspiración, seguida de tos profunda, tratando de no recoger saliva.
3. Enviar lo antes posible la muestra al laboratorio (separada de la orden de análisis) (55).

6.1.2. Toma de muestra del suero

1. Se extrajeron de 3 a 5 mL de sangre total por venipuntura a cada paciente en ayunas, cumpliendo las normas de asepsia y antisepsia. La sangre extraída se colocó en un tubo de 13x100 mm, limpio, seco, rotulado y sin anticoagulante, colocando el mismo a temperatura ambiente hasta que se produjo la retracción del coágulo.
2. Una vez retraído el coágulo, se utilizó un aplicador de madera que se deslizó por las paredes del tubo de 13x100 con el objetivo de lograr la separación del coágulo, posteriormente se centrifugo a 2 500 rpm durante un cuarto de hora, se decanta el suero en viales plásticos empleando pipetas de Eppendorf.
3. Nota: De no utilizarse el suero obtenido de inmediato este fue guardado en refrigeración a temperatura entre 4-8 °C (sólo por 7 días), para su empleo posterior en el estudio. Los sueros lipémicos y hemolíticos se desecharon (56).

6.2. Cultivo

Simultáneamente se realizó la siembra en dos tubos de agar dextrosa Sabouraud con cloranfenicol (ASC), un tubo se incubó a 28°C y el otro a 37°C, se incubaron en posición horizontal las primeras 24 horas, las tapas se ajustaron para que el cultivo tuviera una adecuada aireación. La incubación comprendió un periodo de una semana, y se prolongó hasta cuatro semanas para descartar el cultivo como negativo (13, 57).

El examen macroscópico del cultivo consistió en distinguir el crecimiento a diferentes temperaturas, la morfología de la colonia, sus características culturales como, el color y textura de la colonia, pigmento en el anverso y reverso, y la emisión de pigmentos al medio. El examen microscópico del cultivo, consistió en depositar en un portaobjeto un pequeño fragmento de la colonia con lactofenol azul de algodón, donde se observó las características micromorfológicas como las estructuras de reproducción asexual y otros elementos (formación de esclerotes, cleistotecios, células de Hülle) en los casos positivos (55, 58).

6.3. Identificación

Para identificar una especie, seguido del examen microscópico del cultivo, se realizó una resiembra en tubos con agar Czapek, lo cual permitió ver la pigmentación del cultivo y se realizaron microcultivos para observar mejor las estructuras de fructificación (55, 59). (ver Anexo 2 y 3)

6.3.1. Técnica de Microcultivo (36).

Procedimiento:

- A) Se preparó la placa estéril para cultivo, procediendo de la siguiente manera:
- Se cubrió el fondo de una placa de Petri con papel de filtro.
 - Se colocó sobre el papel de filtro, un puente de vidrio torcido en forma de "u", un portaobjetos y un cubreobjetos.
 - Se tapó y se puso en la autoclave 25 minutos a 121°C.
- B) Se preparó el inóculo, teniendo en cuenta los siguientes pasos:
- En el flujo laminar se colocó el portaobjetos sobre el puente.
 - Se seleccionaron dos medios conocidos que facilitaron la esporulación del agente en estudio (agar harina de maíz y agar papa dextrosa), se cortó un bloque de 1cm² de cada medio y se colocaron sobre el portaobjeto.
 - Se agregó 1-2 mL de agua estéril al papel de filtro, se tapó la placa de Petri, se incubó a temperatura ambiente (28°C) y se observó si hubo esporulación a intervalos de tiempo mediante el examen de la preparación bajo microscopio. Se mantuvo la preparación húmeda, adicionando agua estéril cada vez que lo requirió y sin que se formara condensación en la tapa de la placa.
- C) Cuando el crecimiento fue adecuado se procedió a realizar las preparaciones definitivas:
- Con una pinza estéril se retiró el cubreobjeto y se colocó sobre un nuevo portaobjeto, al cual se le añadió previamente una gota de lactofenol azul de algodón.
 - Luego se procedió a retirar y desechar los bloques de medios de cultivo y tras añadir una gota de lactofenol azul de algodón se colocó un nuevo cubreobjeto.

- De esta manera se obtuvieron dos láminas para la identificación del agente.

D) Interpretación:

- La esporulación del hongo quedó evidenciada mediante modos de conidiogénesis claramente visibles por el estudio.

6.4. Susceptibilidad antifúngica

Se realizaron los estudios de susceptibilidad antifúngica mediante el método E-Test (AB Biodisk) según el proceder del fabricante con modificaciones para determinar el valor de concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aislados frente AMB, ITR y VRC: (47).

- Se empleó como medio de cultivo agar RPMI-1640, con ácido [3-N-morfolino] propanosulfónico (MOPS) como tampón y suplementado con 2% de glucosa.
- Se distribuyó el medio en placas Petri de 90 mm x 13 mm.
- El inóculo se preparó en 5 mL de solución salina 0,85 % con 0,01 mL de Tween 80 y su concentración fue ajustada a $0.5-4 \cdot 10^4$ conidios/mL según lo establecido por el documento M38-A2 del CLSI.
- Las placas fueron inoculadas mediante siembra en sábana y por cada placa se tendrán dos réplicas. Como control de calidad y cepa de referencia se utilizó la cepa *Candida parapsilosis* ATCC®22019.
- Todas las placas se incubaron a 35°C durante 48 horas.
- La lectura se realizó de forma visual con la determinación del punto de corte tangencial de la elipse de inhibición sobre la escala de CMI del E-Test. Se considerará válido como CMI la concentración donde se observe hasta un 80% de inhibición del crecimiento.

Los patrones de susceptibilidad se definieron como susceptible, intermedio o resistente para concentraciones menores/iguales que $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, iguales a $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ o igual/mayor que $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectivamente (59).

6.5. Procesamiento de los sueros

Los sueros se procesaron siguiendo el manual de procedimiento de serología IBL AMERICA *Aspergillus fumigatus* IgG antibody ELISA Test para la detección de anticuerpos IgG específicos frente a *Aspergillus fumigatus*, destacándose aquí los principales pasos del método:(60).

IV. MATERIALES y MÉTODOS

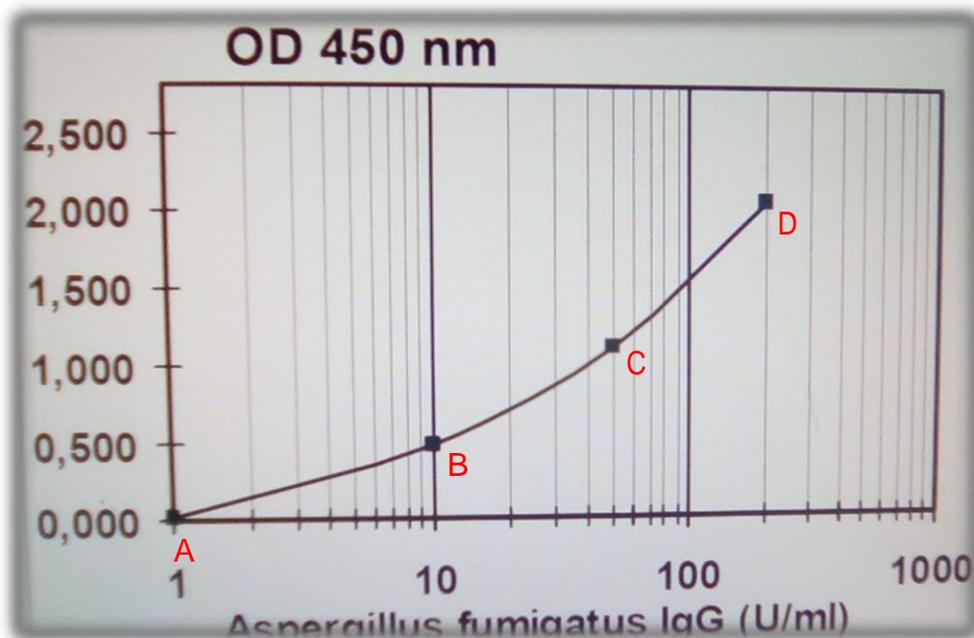
1. Se preparó una cantidad suficiente de pocillos de microtitulación para los estándares, controles y muestras por duplicado, así como para un blanco de sustrato.
2. Se depositó 100 μl en la placa de cada una de las muestras diluidas (1: 100), el blanco de sustrato, los estándares y controles listos para su uso.
3. Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos.
4. Se vació los pocillos de la placa (vertedero o aspirado) y se añadió 300 μl de solución de lavado. Este procedimiento se repitió tres veces, se eliminó la humedad residual invirtiendo la placa de microtitulación repetidamente con fuerza en un papel de filtro.
5. Se añadió 100 μl del conjugado-enzima en los pocillos.
6. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.
7. Se vació los pocillos de la placa y se repitió el proceso de lavado de la misma manera que la anterior.
8. Se añadió 100 μl del sustrato en cada uno de los pocillos.
9. Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos.
10. Para terminar la reacción del sustrato, se añadió 100 μl de la solución de parada en los pocillos.
11. Después de mezclar bien y limpiar el fondo de la placa, se realizó la lectura de la absorción a 450 nm (Opcionalmente longitud de onda de referencia de 620 nm) antes de los 60 minutos.

Interpretación:

Los datos obtenidos se representaron gráficamente en función de su concentración (eje x, logarítmica), mediante un método automatizado. Para el cálculo de la curva estándar se aplicó cada señal de los estándares. La concentración de las muestras se leyó desde la curva. La dilución inicial se tuvo en cuenta al leer los resultados del gráfico.

➤ *Curva de calibración típica*

Estándar	U / ml	Media OD
A (control negativo)	1	0,013
B (estándar de corte)	10	0,489
C (Control Positivo Débil)	50	1.117
D (Control Positivo) 20°	200	2.061



➤ Interpretación de los resultados:

U/mL	Interpretación
< 8	negativo
8 - 12	Indeterminado *
> 12	positivo

* En estos casos se recomienda o se sugiere repetir la prueba después de un periodo de 15 días o 1 mes. A los efectos del presente trabajo los casos indeterminados se consideraron como negativos.

7. Método estadístico

7.1. Técnicas de procesamiento

- La información se obtuvo a través de la confección de una ficha de datos individual para cada paciente, adquiridos de las Historias Clínicas (HC) y los resultados del departamento de Microbiología (Libro de Trabajo Técnico). Los cuales se llevaron a una base de datos en Microsoft Excel. El procesamiento estadístico se realizó mediante el programa SPSS IBM Statistics V.21.
- En los pacientes con confirmación serológica de APC el neumólogo responsable del estudio realizó un análisis exhaustivo de las HC para su adecuada caracterización y les impuso tratamiento con itraconazol según el esquema establecido en la institución para evaluar la respuesta a la terapéutica. Al finalizar el estudio, los pacientes en tratamiento fueron clasificados, de manera cualitativa, por el neumólogo según los criterios: mejoría clínica, sin mejoría clínica y no evaluable.

7.2. Técnicas de análisis

Se realizó un análisis estadístico descriptivo, para todas las variables se halló la frecuencia absoluta y relativa. Para la variable cuantitativa se hallaron todos los estadísticos descriptivos (media, moda, mediana, cuartiles, etc.) y se estableció un intervalo de confianza del 95% (IC95). Se realizó un test exacto de Fisher basado en Chi-cuadrado para determinar la asociación entre manifestaciones pulmonares de base (bronquiectasias, EPOC, presencia de cavidades) y la positividad de la serología como indicador del diagnóstico de APC.

8. Operacionalización de las variables

Nombre y definición de la variable	Tipo de la variable	Definición operacional	Escala a utilizar	Indicador
Resultados del Cultivo	Cualitativa nominal dicotómica	Se considera positivo si se obtiene crecimiento de colonias sugerentes de <i>Aspergillus</i>	Positivo (+) Negativo (-)	Frecuencia absoluta y relativa.
Resultados de la Serología	Cualitativa nominal dicotómica	Se considerara positivo si los valores de titulación son mayores que el valor de corte definido por el kit diagnóstico.	Positivo (+) Negativo (-)	Frecuencia absoluta y relativa.
Clasificación de especies aisladas.	Cualitativa nominal politómica	Cada especie será identificada según los resultados del microcultivo y las pruebas serológicas.	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. terreus</i>	Frecuencia absoluta y relativa.
Susceptibilidad antifúngica Método E-Test (ITR, VRC y AMB)	Cualitativa ordinal.	Valor de concentración del antifúngico en el E-test donde la de inhibición corta tangencialmente la tira del kit.	Sensible (S): ≤ 1 Intermedio (I): = 2 Resistente (R): ≥ 4	Frecuencia absoluta y relativa.
Edad	Cuantitativa discreta	19 - 34 35 -50 51 - 66 67 - 82	Números naturales	Frecuencia absoluta y relativa
Sexo	Cualitativa nominal dicotómica	Femenino y Masculino.	Según Sexo biológico	Frecuencia absoluta y relativa

IV. MATERIALES y MÉTODOS

Nombre y definición de la variable	Tipo de la variable	Definición operacional	Escala a utilizar	Indicador
Diagnóstico clínico	Cualitativa nominal politómica	TB negativos. EPOC. Bronquiectasia. Neoplasia de pulmón.	Según la impresión del Diagnóstico clínico del paciente	Frecuencia absoluta y relativa
Signos y síntomas	Cualitativa nominal politómica	Tos. Expectoración. Fiebre Hemoptisis. Dolor torácico. Pérdida de peso. Disnea. Anorexia. Decaimiento. Falta de aire.	Nominal	Frecuencia absoluta y relativa
Radiología	Cualitativa nominal politómica	Cavidades residuales. Nódulos. Bola de hongos. Lesiones sugestivas.	Nominal	Frecuencia absoluta y relativa
Respuesta al tratamiento	Cualitativa nominal politómica	Mejoría clínica Sin mejoría clínica No evaluable	Según la impresión del neumólogo	Frecuencia absoluta y relativa

9. Consideraciones éticas

Siguiendo lo establecido por las normas éticas (Institucionales y Regionales) en la medicina actual, se le solicitó a cada individuo su consentimiento informado por escrito para participar de manera voluntaria y gratuita en el estudio en cuestión, previa explicación de su importancia para el desarrollo y avance de la medicina; además el beneficio de conocer si padecía aspergilosis pulmonar crónica. Se aclaró al paciente que si formara parte del estudio no cometería ninguna violación, y no le traería consecuencia alguna para el bienestar de su persona, relación médico-paciente, ni paciente-institución; por lo que podría continuar contando con la

asistencia médica de forma gratuita que ofrece y garantiza nuestro sistema de salud. La información de la investigación se conservó con carácter confidencial y los datos de los participantes se mantuvieron bajo estricta confidencialidad, solo accesibles a los investigadores partícipes en el estudio.

La investigación fue evaluada por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y el Comité de Ética de las investigaciones del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (CEI-IPK 06-18) y se realizó en el Laboratorio Nacional de Referencia de Micología y el Laboratorio de Microbiología del Hospital Neumológico Benéfico Jurídico.

10. Limitaciones del estudio

La presente investigación tiene limitaciones que deben ser reconocidas: El tamaño de la muestra estuvo limitado a 50 pacientes y no se pudo realizar el seguimiento de los casos indeterminados por la insuficiente disponibilidad de reactivos para el diagnóstico serológico. Fue imposible realizar el examen directo de las muestras por problemas de la dinámica de trabajo del Hospital Neumológico Benéfico Jurídico y los criterios para valorar la respuesta al tratamiento fueron solo cualitativos lo cual los hace un tanto subjetivos.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

La APC se define como un síndrome pulmonar de progresión lenta causado por especies de *Aspergillus* y se reconoce como un serio problema de salud a escala global. Su diagnóstico es muy complejo y el término APC se torna un tanto vago, en particular por la ausencia de hallazgos clínicos patognomónicos y por el curso tan complejo de las patologías pulmonares de base en las que se inserta tales como: tuberculosis previa, bronquiectasias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cáncer de pulmón, neumotórax y coinfección con micobacterias no tuberculosas (26).

En la actualidad el término de APC se conforma de un espectro de cinco enfermedades (aspergiloma, nódulos por *Aspergillus*, aspergilosis pulmonar crónica cavitaria, aspergilosis pulmonar crónica fibrozante y aspergilosis pulmonar crónica necrotizante) algunas de las cuales superponen y fusionan en función de la enfermedad de base del paciente, la virulencia del agente etiológico y sobre todo, del estado inmunológico del hospedero (61).

La complejidad asociada al diagnóstico e identificación de los diferentes subgrupos o formas clínicas de presentación que engloba la APC promovió ingentes esfuerzos, en la comunidad científica internacional, para desarrollar criterios diagnósticos estandarizados. Los resultados de este esfuerzo se han publicado recientemente como las guías europeas para el diagnóstico y manejo de la APC (15). En las que se define como criterio diagnóstico de aspergilosis pulmonar crónica: “la aparición de signos y síntomas clínicos (tos, expectoración, hemoptisis, pérdida de peso, fiebre) por un período superior a 3 meses en ausencia de inmunosupresión, con evidencias radiológicas de lesiones pulmonares progresivas (meses a años) y pruebas directas o indirectas de laboratorio que sean positivas para la detección de *Aspergillus*. Es importante el reconocimiento de una condición respiratoria concomitante subyacente y descartar el diagnóstico alternativo de otro agente etiológico (ej.: micobacterias atípicas)” (37).

Tomando en consideración los postulados anteriores, se diseñó el estudio de tal manera que los criterios de inclusión se adaptaran estrictamente a lo referido en la definición, lo cual dejaba las pruebas directas o indirectas de laboratorio como criterio definitivo para la confirmación del diagnóstico de APC en los pacientes estudiados.

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

En el Laboratorio de Microbiología del Hospital Neumológico Benéfico Jurídico, en colaboración con el Laboratorio Nacional de Referencia de Micología del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, se recibieron y procesaron muestras del aparato respiratorio (esputo, LBA y líquido pleural) y suero de 50 pacientes con diagnóstico presuntivo de aspergilosis pulmonar crónica en el período comprendido entre el 2017 al 2018. Los pacientes que integraron el estudio fueron seleccionados por el neumólogo a cargo de la investigación siguiendo los criterios de inclusión y exclusión establecidos.

Como se expresó en materiales y métodos una de las limitaciones del estudio fue la imposibilidad de realizar el examen microscópico directo de las muestras. En los trabajos publicados se reporta como una prueba poco sensible y específica debido a que la existencia de cavidades como sitio prioritario de localización del agente etiológico, requiere que las mismas estén en comunicación con un bronquio permeable para que se puedan visualizar las hifas en los esputos. Por el contrario, el carácter ubicuo de estos hongos impide interpretar su presencia en esputo como un criterio diagnóstico, ya que puede ser la expresión de una colonización del tracto respiratorio o de la contaminación de la muestra. En tales casos, la serología u otros diagnósticos alternativos (detección de antígeno o PCR) son necesarios para distinguir entre infección y colonización (15, 33).

En la tabla 1 se presenta los resultados de los estudios microbiológicos indirectos realizados. De los 50 pacientes con sospecha clínica de esta patología, en 9 (18%) se lograron aislamientos a partir de las muestras cultivadas y un total de 24 casos fueron positivos mediante serología para la detección de anticuerpos IgG anti *Aspergillus*.

Tabla 1. Resultados de los estudios microbiológicos indirectos. HNBJ, 2017-2018.

Diagnóstico Microbiológico		Serología n=50		Total
		Positivo	Negativo	
Cultivo n=50*	Positivo	5	4	9
	Negativo	19	22	41
Total		24	26	50

**El cultivo micológico en la tabla hace referencia a los resultados obtenidos en los pacientes y no a las muestras procesadas.*

De las 62 muestras procesadas para cultivo micológico, 44 fueron esputos, 17 lavados bronquioalveolares y una fue un líquido pleural. De los nueve aislados, cinco se definieron como agentes etiológicos de APC porque los pacientes cumplían con el resto de los criterios clínicos, radiológicos y de laboratorio. Los cuatro pacientes restantes tuvieron serología negativa y por tanto se concluyó que dichos aislados fueron colonizadores transitorios de las vías respiratorias o contaminantes. El tipo de muestra empleada, es crucial en la recuperación e interpretación de aislados de *Aspergillus*. Según Denning *et al.* la presencia de *Aspergillus* en cultivos de esputo no es un criterio diagnóstico definitivo, Tienen más valor cuando los aislados se obtienen a partir de lavados bronquioalveolares, líquido pleural o cepillado bronquial pues en esos casos se relacionan más con infección que con colonización (15).

Para la mayoría de las enfermedades infecciosas el cultivo resulta la “prueba de oro” en el diagnóstico, prueba irrefutable de la presencia del microorganismo que está causando la infección. En el caso de la aspergilosis, delimitar cuando un aislado es agente causal y cuando contaminante o colonizador es una tarea compleja, no obstante, aun cuando los análisis moleculares e inmunológicos han sido un avance prometedor en el diagnóstico rápido, la microscopía y los cultivos siguen siendo herramientas esenciales ya que permiten el aislamiento del agente etiológico, lo que es indispensable para su identificación y hace posible los estudios de susceptibilidad (62).

Iribarren *et al.* en Madrid, comentan en un estudio que el cultivo de esputo llega a ser negativo hasta en el 50% de los casos, la relación entre cultivo positivo y enfermedad clínica siempre debe cuestionarse, atendiendo al estado inmunitario del paciente y a la presentación clínica, ya que *Aspergillus* spp. es un contaminante frecuente en los laboratorios de microbiología y en el aire exterior. Este autor también comenta que, por el contrario, la serología es positiva hasta en el 90% de los casos, aunque pueden existir falsos negativos en pacientes en tratamiento con corticoides (63).

Otras publicaciones muestran resultados superiores con respecto al cultivo, con una positividad del 83.3%. En el estudio realizado por Restrepo *et al.* informan que la positividad del cultivo de esputo ha sido variable, con reportes entre 30% y 95% de los pacientes; declarando un promedio del 60% (64). Curbelo *et al.* describen una positividad del cultivo del esputo cercana al 40-50% en una investigación realizada, (28) y Camara *et al.* en Francia encuentran una frecuencia del 70 (65). En múltiples ocasiones, las bajas tasas de positividad en el cultivo tienen su origen debido al tratamiento de la enfermedad previo al diagnóstico.

Otro de los problemas fundamentales del cultivo micológico de muestras respiratorias es la velocidad de crecimiento de *Aspergillus* con respecto al resto de los comensales de la microbiota humana. El ecosistema microbiano bucal tiene una amplia diversidad de bacterias y levaduras que duplican su población en un tiempo mucho más corto que cualquiera de las especies de *Aspergillus*, afectando de esta forma la recuperación de aislados de este género fúngico en muestras que, como el esputo, atraviesan la cavidad oral. El empleo de inhibidores microbianos y agentes mucolíticos puede ser muy útil para aumentar la probabilidad de aislar *Aspergillus* con éxito. En un estudio realizado por Pashley *et al.* obtuvieron mejores tasas de recuperación de *Aspergillus fumigatus* de muestras de esputo utilizando ditiotreitolo (mucolítico) para el procesamiento y agar papa dextrosa suplementado con cloranfenicol, gentamicina y fluconazol para el cultivo micológico (66). En el presente estudio, el número de aislados pudiese haber sido mayor de emplearse alguna de estas metodologías. Cabe destacar que los cultivos negativos no descartan un diagnóstico de aspergilosis cuando la sospecha clínica es alta y está respaldada por datos radiológicos y serológicos (67).

El diagnóstico serológico en esta investigación mostró una respuesta imprevista con casi la mitad de los pacientes evaluados con valores por encima del umbral positivo definido para el ELISA IgG-anti *Aspergillus* (tabla 1). De acuerdo con numerosos expertos en la temática, la alta sensibilidad y especificidad de la detección de IgG específicas en pacientes con APC hacen de esta prueba una de las mejores herramientas en el diagnóstico de esta enfermedad. Según la información del fabricante del ELISA empleado, tanto la sensibilidad como la especificidad de la técnica superan el 85% (60). Otros paquetes comerciales como ThermoScientific ImmunoCAP y Siemens Immunolite tienen igualmente gran confiabilidad con valores que rebasan el 90 % para ambas características (39).

Novak-Frazer en 2016 publica que la detección sérica de anticuerpos IgG-anti *Aspergillus* se considera el método más confiable para diagnosticar APC, como técnica de oro a nivel mundial, ya que es esencial para confirmar la infección por *Aspergillus*, que, en combinación con la presencia de una bola fúngica, será positiva en más del 90% de los casos (38). Además, títulos altos de IgG-anti *Aspergillus* también tienen valor predictivo en la diferenciación de individuos infectados y colonizados, lo que la convierte en una poderosa herramienta de diagnóstico cuando se utiliza en combinación con otras técnicas diagnósticas (38). Hedayati *et al.* en el 2015 informan en un estudio un 44.3% de casos positivos mediante la detección de IgG anti-*A. fumigatus*, y plantea que el método ELISA es útil para diagnosticar APC en casos con cultivos negativos (68). Page *et al.* en estudios de detección de IgG mediante ELISA muestran valores de sensibilidad y especificidad de un 93% y 99% respectivamente, y reafirman con estos resultados la importancia de la serología como elemento esencial para confirmar la infección (69). En otras investigaciones de este mismo autor se informan datos de sensibilidad y especificidad por encima del 90 % (39).

Otras técnicas inmunológicas también pueden ser útiles en el diagnóstico de APC. La detección de precipitinas mediante inmunodifusión doble puede ser una herramienta poco costosa para la confirmación de casos probables, sin embargo, son menos sensibles y específicas que los ELISA. Un estudio comparativo realizado por Fujuchi *et al.* demostró que casos positivos mediante la detección de precipitinas mostraban valores inferiores al umbral de corte de IgG específica para *Aspergillus* lo que refiere una disminución en la especificidad (70).

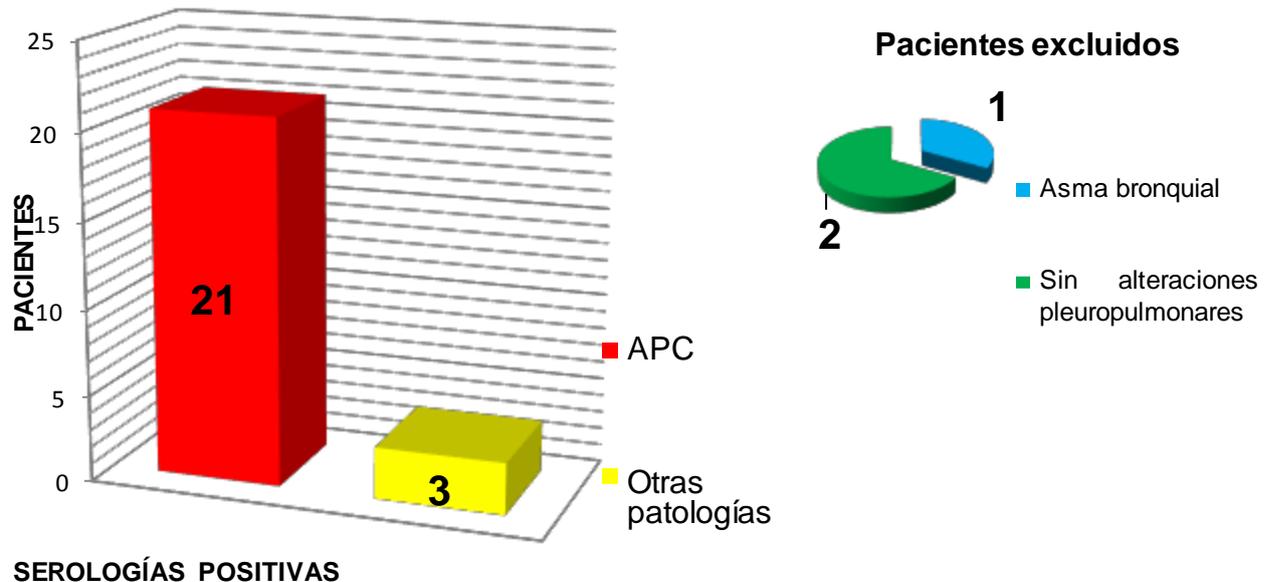


Figura 1: Distribución de los pacientes con sospecha clínica de APC con serologías positivas. HNB, 2017-2018.

Después de una búsqueda exhaustiva en las HC, dentro del grupo de pacientes con serología positiva (24) se identificaron tres individuos que no cumplían estrictamente con los criterios de inclusión. En uno de esos pacientes se constató el reporte de episodios previos de asma bronquial y los otros dos no presentaban alteraciones pleuropulmonares en las imágenes radiológicas. El caso particular del asma bronquial con niveles elevados de IgG anti-*Aspergillus* puede constituir un posible caso de ABPA. Esta es una reacción compleja de hipersensibilidad que se produce cuando el árbol bronquial es colonizado por *Aspergillus* spp. y conlleva episodios repetidos de obstrucción bronquial, inflamación e impacto mucoso, provocando bronquiectasias, fibrosis y compromiso respiratorio. (71). Los criterios diagnósticos y de clasificación de la ABPA según la ISHAM (Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal, por sus siglas en inglés) se presentan a continuación (72):

- Asma bronquial.
- Reacción de hipersensibilidad inmediata al antígeno de *Aspergillus*.
- Niveles séricos de IgE > 1.000 U/ml.
- Niveles de IgG específicos para el antígeno de *Aspergillus* y duplicación de los niveles de IgE respecto al valor medio, más dos desviaciones estándar en casos de asma por hipersensibilidad a *Aspergillus*.
- Bronquiectasias centrales por TAC.

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

- Precipitinas en suero contra *Aspergillus fumigatus*.
- Opacidades pulmonares fijas o flotantes en la radiografía de tórax.
- Eosinófilos en sangre periférica > 1.000 células/ μ l.
- Cultivos de esputo que muestran crecimiento de *Aspergillus*.
- Tapón de moco expectorado de color gris-negruzco.
- Reacción cutánea tipo III a *Aspergillus fumigatus*.

No existen criterios suficientes para poder clasificar el caso en cuestión como una ABPA, no obstante, aunque no se consideró como tal, ambas enfermedades pueden estar concomitando. En un estudio realizado por Smith y Denning en el 2011 encuentran que el 14.3% de los casos de APC tenía un diagnóstico coexistente de ABPA (73). De forma similar Lowes *et al.* informan del diagnóstico paralelo de ABPA y APC en 42 pacientes, aunque plantean la necesidad de más información para confirmar estos resultados. Cabe destacar este detalle a tener en cuenta en el tratamiento de los pacientes con ABPA que pudiesen evolucionar a una APC y beneficiarse de una terapia antifúngica (74).

Los dos casos excluidos del estudio por no presentar imágenes radiológicas coherentes con los criterios de la investigación pudieron tratarse de falsos positivos de la serología, según el manual del fabricante del Kit serológico IBL-AMERICA *Aspergillus fumigatus* IgG antibody ELISA Test para la detección de anticuerpos IgG específicos frente a *Aspergillus fumigatus*, las condiciones del suero son fundamentales para el buen desempeño del test. Además, en las estadísticas serológicas la sensibilidad y especificidad rodean el 90%, esto sugiere que puede existir falsos positivos y falsos negativos; el propio fabricante reconoce la posibilidad de falsos positivos que se contemplan en la sensibilidad y especificidad inferior al 100%. De igual manera los falsos negativos también pueden estar contemplados entre los pacientes que no se diagnosticaron con serología positiva y por tanto puede existir una subestimación de casos (60). No obstante otros autores consideran que pudieran tratarse de un estado precoz de la enfermedad. Ohara *et al.*, en un estudio realizado en Japón, expresan que la ausencia de síntomas y signos radiológicos puede presentarse en casos de APC que se hallen en una fase temprana o estable de la enfermedad (6). Esclarecer esta problemática requiere de estudios futuros, que involucren otras técnicas diagnósticas para analizar esta fase

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

precoz de la enfermedad, y así obtener un diagnóstico temprano y tratamiento adecuado de la APC.

La presente investigación brindó una discreta perspectiva sobre la posible prevalencia de la APC en Cuba. No existe mucha información sobre las estadísticas de las infecciones por *Aspergillus* en el país, sin embargo, en los anuarios de salud publicados ante las organizaciones internacionales pertinentes (OMS, OPS) quedan referidas muchas enfermedades de declaración obligatoria que constituyen factores de riesgo para adquirir una APC tales como la tuberculosis pulmonar (75). El empleo de la serología es un elemento esencial para un diagnóstico correcto, ya que permite la diferenciación con otras enfermedades, además de ser un proceso fácil y rápido (24 horas) en comparación con la velocidad de crecimiento del cultivo.

Del total de pacientes atendidos quedaron confirmados con diagnóstico de APC 21 (42%). De ellos el 57,14% del sexo masculino y el 42.86% del sexo femenino, el promedio de edad fue de 53,81 años con un rango entre 21 – 77 años (ver Anexo 6).

De acuerdo con las condiciones predisponentes, esta enfermedad afecta a cualquier grupo de edad o rasgos étnico, y a ambos sexos; predominando los varones adultos. Denning *et al.* establecen que esta enfermedad afecta a pacientes inmunocompetentes o ligeramente inmunocomprometidos de mediana edad, predominantemente varones (76). Restrepo *et al.* refieren, en un estudio multidisciplinario con 31 pacientes, una preponderancia del sexo masculino con 55.9% de hombres y 44.1% de mujeres (64). Muldoon *et al.* informan resultados similares a los de la presente investigación con 54.5% de pacientes masculinos y una edad media de 58 años para un rango de 27–80 años (9). En la India, Chawla *et al.* reportan en 22 pacientes una edad media de 52.5 años dentro de un rango de edad de 19 a 81 años, predominando el sexo masculino (77). Por lo general es en las edades adultas a partir de los 40 años cuando empiezan aparecer condiciones pulmonares deficientes que constituyen un factor de riesgo para esta enfermedad (78).

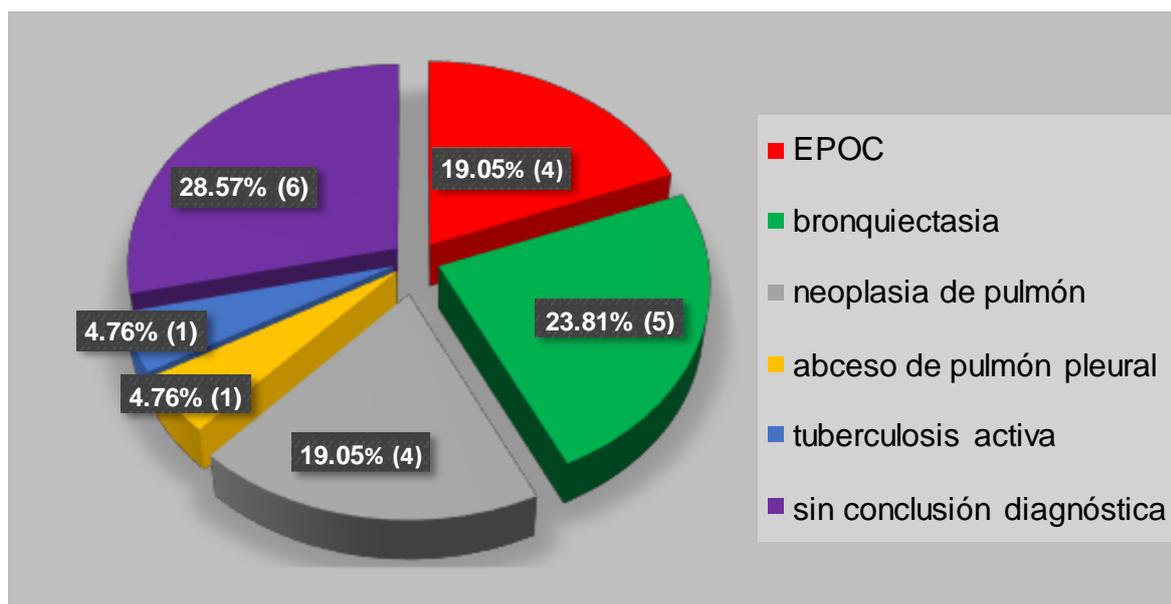


Figura 2. Distribución de las comorbilidades asociadas a los pacientes con diagnóstico de APC. HNB, 2017-2018. (n=21)

Como se puede observar en la figura 2, la presencia de bronquiectasias, EPOC y neoplasias de pulmón son factores frecuentes asociados al diagnóstico de APC. Smith y Denning en el 2011 publican estas enfermedades pulmonares de base como las más frecuentes junto a la sarcoidosis, neumotórax y lesiones post-tuberculosis pulmonar (73). En grupo mayoritario de pacientes (28,57%) no se constató un diagnóstico clínico previo definido. En estos casos, tras los exámenes radiológicos, clínicos y microbiológicos, se concluyó que presentaban una APC por cumplir con todos los criterios propuestos. En la mayoría de los entornos, esta enfermedad puede ser poco reconocida y algunos de estos pacientes pueden ser erróneamente diagnosticados con tuberculosis u otras infecciones pulmonares de origen bacteriano o micológico. La concomitancia de la APC con ellas también ocurre y hace mucho más difícil un diagnóstico preciso (15). En Cuba hay poca información sobre el comportamiento epidemiológico de las infecciones por *Aspergillus* incluidas las formas crónicas y, por el contrario, existe un programa bien capacitado y respaldado por diferentes entidades nacionales e internacionales para la lucha contra la tuberculosis. Pudiera suceder que algunos casos de APC escapen al diagnóstico correcto al confundirse con infecciones micobacterianas pulmonares,

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

(baciloscopías y cultivos negativos) por lo que descartar este tipo de infecciones fúngicas pudiera contribuir significativamente a la disminución de casos de tuberculosis que quizás se notifiquen como tal cuando no lo son (79).

Recientemente Salzer *et al.* en el 2017 comentan de sus resultados que de 71 pacientes diagnosticados como APC, la enfermedad respiratoria subyacente más común era el enfisema pulmonar con un 49%, seguido de EPOC con un 42%, bronquiectasias con un 38%, 35% de los pacientes tenían una infección por micobacterias actual o anterior y 30% tenía una enfermedad sub yacente no respiratoria adicional (80). Valores similares se han referido por investigadores de Colombia, Francia, y Corea (64, 65, 81). El reconocimiento de este tipo de factores de riesgo es fundamental para garantizar un diagnóstico temprano de la APC.

Para el análisis estadístico de las variables del estudio se evaluó la existencia de asociación entre casos positivos por serología y EPOC y casos positivos por serología y bronquiectasia. Para ambas determinaciones el test exacto de Fisher no mostró diferencias significativas (ver Anexo 7 y 8). No obstante, las evidencias que se mencionan en los epígrafes anteriores sobre estas enfermedades como factores de riesgo tienen un gran peso para el diagnóstico.

Tabla 2. Principales signos y síntomas identificados en los pacientes con diagnóstico de APC. HNBJ, 2017-2018.

Signos y Síntomas	Pacientes	
	No.	%
Tos	21	100%
Expectoración	18	85.71%
Fiebre	9	42.86%
Falta de aire	6	28.57%
Hemoptisis	5	23.81%
Dolor torácico	5	23.81%
Pérdida de peso	5	23.81%
Disnea	3	14.29%
Decaimiento	3	14.29%
Anorexia	2	9.52%

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

El diagnóstico clínico de aspergilosis es a menudo difícil, con signos y síntomas inespecíficos, muy comunes para otros agentes etiológicos. Entre ellos la hemoptisis, es un signo alarmante que puede manifestarse en cualquiera de las variantes de la APC o formas de aspergilomas y es una de las manifestaciones clínicas con mayor repercusión en la vida del paciente (61), (82). En el caso de la bola fúngica por *Aspergillus*, muchos pacientes experimentan un curso clínico relativamente tranquilo por lo que la hemoptisis no necesariamente indica una exacerbación de la infección fúngica (82).

Investigaciones realizadas por Restrepo *et al.* encuentran que los síntomas más frecuentes en 31 pacientes con APC fueron disnea (n = 24; 77,5%), tos productiva (n = 26; 83,9%), en muchos casos acompañadas de hemoptisis (n = 12; 38,7%), esputo hemoptoico (n = 9; 29%), deterioro del estado general (n = 21; 67,7%) y fiebre (n = 19; 61,3%) (64). Camara *et al.* también identifican en un total de 44 pacientes que la tos estaba presente en todos (100%), mientras que la pérdida de peso solo en 57%, la fiebre en 41% y la hemoptisis en 23% (65). La presente investigación difiere con las mencionadas anteriormente en algunas de estas manifestaciones clínicas como la disnea, la hemoptisis y el deterioro general, sin embargo, el diagnóstico integrado con los resultados radiológicos y serológicos brindan una mayor seguridad en la correcta identificación de los casos positivos.

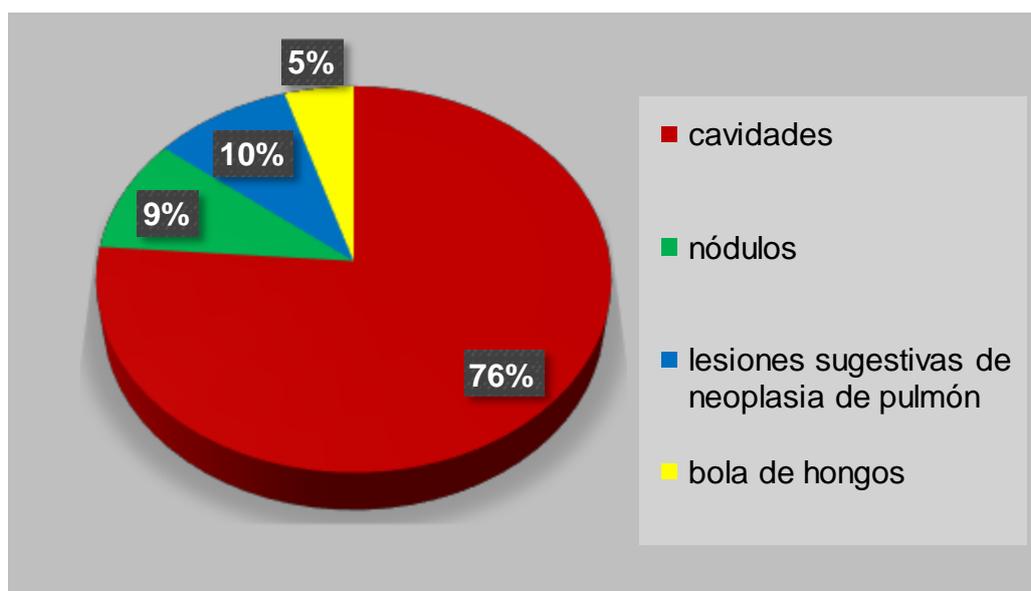


Figura 3. Distribución de los hallazgos radiológicos observados en los pacientes con diagnóstico de APC. HNBJ, 2017-2018.

En la guía para el manejo de la APC del 2016 Denning *et al.* refieren que las imágenes radiográficas son la primera línea para la sospecha y el diagnóstico de esta enfermedad, aunque la tomografía axial computarizada (TAC), como tecnología de avanzada, ofrece mayor información (15). En la figura 3 se muestran las diferentes manifestaciones radiológicas que se observan en los pacientes diagnosticados con APC. Resalta entre ellas la presencia de cavidades, un factor determinante para el asentamiento de esta infección crónica. Dichos cambios en la arquitectura del pulmón favorecen el nicho para el hongo desde donde la invasión del tejido será gradual, aumentando el riesgo de mortalidad con el tiempo. La asociación mediante test de Fisher entre los casos positivos por serología y la presencia de cavidades fue positiva con una significación estadística de $p=0,0225$ ($\alpha=0,05$) y un odd-ratio de 4,5 (ver Anexo 9) lo que sugiere que un paciente con un pulmón cavitado tiene más probabilidades de adquirir una APC.

Un estudio multicéntrico realizado por Jhun *et al.* encuentran en sus pacientes con APC un 100% de presencia de cavidades ($n=70$) con un 44% de ellas ($n=31$) en el lóbulo superior derecho y 96% de infiltraciones del parénquima ($n=67$) (81). Ohara *et al.* en investigaciones en Japón observaron hallazgos radiológicos en todos sus pacientes en los cuales predominaron las lesiones cavitarias, las infiltraciones de estas lesiones, la formación de bolas fúngicas, el engrosamiento pleural y la formación de nódulos (6), Camara *et al.*, Hou *et al.* y Naito *et al.* publican cifras similares en algunos de sus trabajos (65, 83, 84).

Maghrabi y Denning plantean que la evolución de la APC puede involucrar un lóbulo entero y progresar a cavitaciones con pérdida del volumen del pulmón. De manera general, la APC afecta los lóbulos superiores y puede aparecer una o múltiples cavidades de varios tamaños (85). Es importante que los neumólogos consideren este signo radiológico como un elemento clave para el diagnóstico y el tratamiento. Godet *et al.* afirman que para estos casos la TAC permite evaluar cambios sutiles en el parénquima pulmonar y realizar un seguimiento durante varios periodos en el cual el cambio de las apariencias radiológicas puede ser indicador del control o progresión de la enfermedad. A través de esta técnica se ha podido correlacionar la respuesta al tratamiento calificando la reducción del engrosamiento de la pared de la cavidad, del engrosamiento pleural y del volumen de material intracavitario durante la terapia (86).

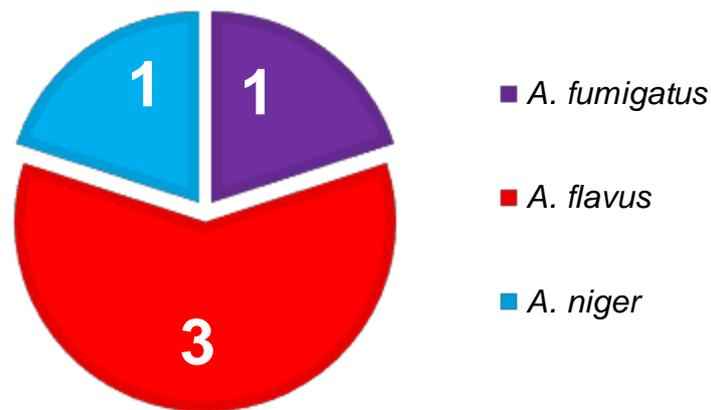


Figura 4. Distribución por especie de los aislados de *Aspergillus* obtenidos de los pacientes con APC. HNBJ, 2017-2018.

El cultivo obtenido en cinco (23%) de los 21 pacientes diagnosticados con APC, mostró un discreto predominio de la especie *A. flavus*, seguido por *A. niger* y *A. fumigatus* en igual proporción. Estas son especies que con frecuencia se informan como causantes de aspergilosis pulmonar (87). La taxonomía tradicional del género *Aspergillus* se basa principalmente en el análisis de los caracteres fenotípicos y fisiológicos, los cuales han aportado satisfactorias delimitaciones de las especies, sin embargo, existen variaciones morfológicas en varias secciones del género que han llevado a controversias en sus esquemas taxonómicos. En el nuevo siglo 21 varios autores han investigado *Aspergillus* y sus teleomorfos con métodos polifásicos (morfológicos, fisiológicos y moleculares) para examinar la variabilidad entre sus especies y la clasificación taxonómica que ha cambiado de manera consecuente (88, 89, 90).

La mayoría de los estudios se han centrado en *A. fumigatus*, la especie patógena más frecuente. Sin embargo, algunos investigadores afirman que las infecciones por *A. flavus* pueden ser mucho más virulentas que *A. fumigatus* en términos de inóculo requerido (52). En las regiones tropicales y subtropicales, como nuestro país, *A. flavus* es más común en la aeromicobiota que *A. fumigatus*, como causa probable debido a los niveles de humedad y temperatura, (19). Aunque hay investigadores que plantean que la APC raramente es causada por *A. flavus*, existen pocos

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

estudios clínicos en países con una alta prevalencia de esta especie en sus ecosistemas aéreos (52, 76). La confirmación de *A. flavus* como agente causal más frecuente en este tipo de regiones requiere investigaciones clínico, epidemiológico y microbiológicas de mayor profundidad.

Tabla 3. Distribución de especies de *Aspergillus* aisladas según el tipo de muestra, valores de concentración mínima inhibitoria y patrón de susceptibilidad. HNBJ, 2017- 2018.

Especie aislada	Tipo de muestra	Valores de CMI frente a AMB	Valores de CMI frente a ITR	Valores de CMI frente a VRC
<i>A. flavus</i>	Espuito	0,125 (S)	0,75 (S)	0,75 (S)
<i>A. flavus</i>	LBA	≥16 (R)	2 (I)	1 (S)
<i>A. flavus</i>	LBA	0,75 (S)	1 (S)	0,25 (S)
<i>A. niger</i>	Espuito	0,19 (S)	≥16 (R)	0,38 (S)
<i>A. fumigatus</i>	LBA, LP	0,19 (S)	4 (R)	0,125 (S)

Leyenda: LBA: lavado bronquioalveolar; LP: líquido pleural; S: sensible; I: sensibilidad intermedia; R: resistente.

Los estudios de susceptibilidad antifúngica que se realizaron a los aislados se muestran en la tabla 3. Como se puede apreciar la respuesta al voriconazol *in vitro* fue excelente con el total de aislados susceptibles. De forma diferente se observó la acción del itraconazol donde se encontraron dos aislados resistentes pertenecientes a las especies *A. fumigatus* y *A. niger* y uno con susceptibilidad intermedia de *A. flavus*. De la misma manera para anfotericina B se observó un aislado resistente.

Para los polienos, específicamente la anfotericina B, la tasa global de resistencia es desconocida y los mecanismos moleculares detrás de esta respuesta están asociados a bajos niveles de ergosterol en la membrana celular del hongo, lo que conlleva una menor acción del fármaco (91), o a la presencia de mutaciones en el gen *erg3* que originan la inactivación de la 5,6-esterol desaturasa, una enzima que participa en la ruta de biosíntesis del ergosterol y genera esteroides anormales

cuando se ve afectada. Otro mecanismo presente en algunas especies de *Aspergillus* es la capacidad de producir enzimas con actividad reductora, que disminuyen el efecto oxidativo de la anfotericina B en el metabolismo fúngico (92).

En investigaciones anteriores realizadas por especialistas del IPK los resultados fueron similares a los aquí presentados para los estudios de susceptibilidad donde los mayores valores de resistencia a anfotericina B se detectaron en la especie *A. flavus* y *A. niger* (93). Muchos expertos plantean que estas especies poseen una resistencia intrínseca a los polienos con base en las características estructurales de su membrana citoplasmática y en su fisiología (94, 95). Otros trabajos como el de Gomez-Lopez *et al.*, Sutton *et al.*, y Hsueh *et al.* refieren una alta frecuencia de aislados resistentes a anfotericina B de *A. flavus* (96, 97, 98).

La resistencia a los triazoles ha sido mucho más estudiada. El voriconazol es uno de los fármacos que mejor actividad posee frente a este género fúngico y a nivel mundial son pocos los aislados resistentes. En las guías terapéuticas de Estados Unidos y el Reino Unido el voriconazol está recomendado como el tratamiento de primera línea para los pacientes con infecciones graves por *Aspergillus* (99). La posible causa de una mejor actividad de este antifúngico con respecto a otros triazoles, como el itraconazol, reside en su acción secundaria sobre otras dianas moleculares diferentes a la 14 α -esterol demetilasa (100). En un estudio prospectivo, realizado en Japón, de 71 pacientes con APC tratados con voriconazol, el 60.6% tuvieron una buena respuesta, el 26.8% no tuvieron respuesta y el 5.6% tuvieron progresión (101).

El itraconazol es uno de los antimicóticos frente al cual se ha observado mayor aparición de resistencia dentro del género *Aspergillus*. Al igual que otros triazoles actúa sobre una de las enzimas de la ruta de biosíntesis del ergosterol afectando de esta manera la homeostasia de la célula. En la actualidad se han descrito varios mecanismos que propician la aparición de resistencia al itraconazol, fundamentalmente a nivel del gen *cyp51A* que codifica la 14 α -esterol demetilasa. A modo general, las modificaciones que provocan la reducción de la susceptibilidad son alteraciones del sitio alostérico de la enzima donde se une el fármaco y la sobreexpresión de la enzima por mutaciones a nivel del promotor del gen (102).

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

La gran mayoría de las investigaciones en torno a la resistencia antifúngica se concentran en *A. fumigatus*, sin embargo, se ha observado este fenómeno en especies pertenecientes a la sección *Nigri* (103). Un estudio realizado por Gheith, *et al.*, encuentra valores elevados de la concentración mínima inhibitoria frente al itraconazol en 17 cepas de *A. niger* aisladas de pacientes con enfermedades hematológicas en Túnez (104). Tokarzewski, *et al.*, en un grupo de 10 cepas de *A. niger*, obtienen valores de CMI90 frente a este antifúngico de hasta 8 µg/ml mediante el método M38-A (105). San Juan-Galán *et al.* publican un estudio en Cuba donde evaluaron la sensibilidad *in vitro* de cepas de *Aspergillus* spp y *Aspergillus niger* resultó ser la única especie (3 aislados) resistente al itraconazol (93). En el presente estudio las especie que mostraron resistencia a itraconazol fueron *A. fumigatus* y *A. niger*. Estos casos pueden constituir todo un reto para el médico a la hora de decidir el tratamiento pues la anfotericina B es un medicamento muy nefrotóxico para utilizarse durante periodos largos (91). Aquí se hace indiscutible la utilidad del voriconazol frente al que no se observó resistencia alguna.

Sería muy ventajoso la realización de investigaciones de epidemiología molecular que permitieran definir el origen de los aislados y de esa manera entender la adquisición de la resistencia.

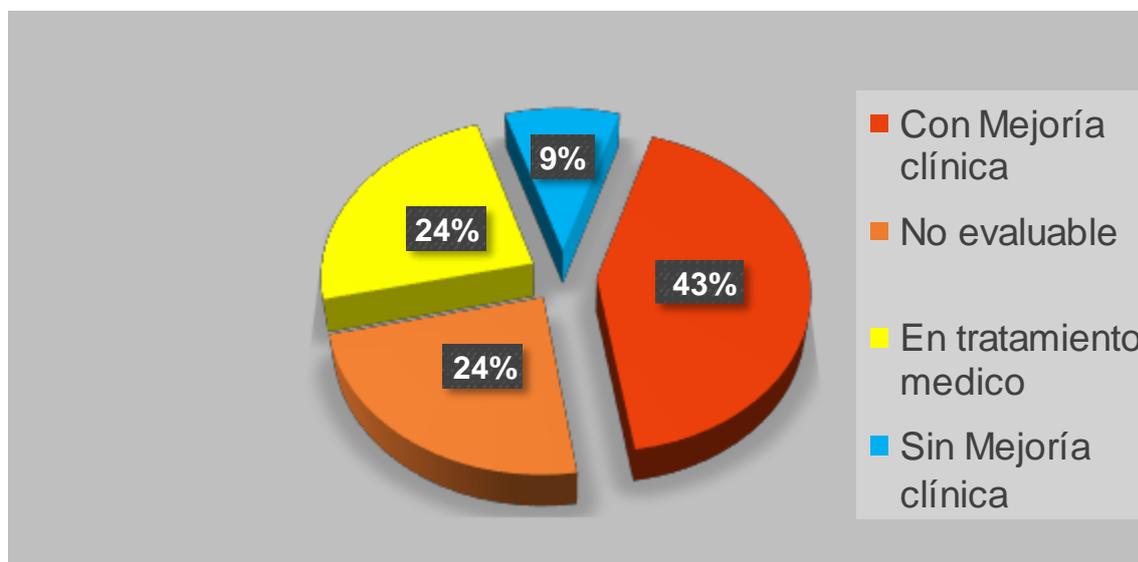


Figura 5. Distribución del seguimiento de los pacientes diagnosticados con APC bajo tratamiento con itraconazol. HNBJ, 2017-2018.

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

Como parte del trabajo, a los pacientes diagnosticados con APC se les indicó terapia con itraconazol asignada por un grupo de especialistas en neumología. En la figura 5 se muestran los resultados del seguimiento de estos pacientes. Como se puede apreciar, el grupo mayoritario se concentra en aquellos con mejoría clínica. Desafortunadamente un número considerable de pacientes no continuó la asistencia a las consultas, representados en la fracción naranja del gráfico, y por tanto se desconoce el estado clínico de los mismos.

Otro grupo de pacientes representados en color amarillo es aquel donde los individuos enfermos empezaron el tratamiento muy cercano al cierre del estudio. Estos pacientes tienen muy poco tiempo de uso del itraconazol y por tanto no se pueden realizar conclusiones sobre su estado clínico tras la terapia. Existieron 2 pacientes fallecidos de los cuales se conocía que estaban en una fase terminal de neoplasia de pulmón. El tratamiento de la APC bajo el esquema de itraconazol durante 6 meses mostró una efectividad positiva, mejorando la calidad de vida de los pacientes. Este también es un elemento que indirectamente refuerza el diagnóstico preciso de la APC. En las estadísticas presentadas por el Fondo de Acción Global para Infecciones Fúngicas (GAFFI, por sus siglas en inglés) el empleo del itraconazol, como droga de primera línea, para el tratamiento de infecciones crónicas como la APC reduce de forma significativa la morbilidad y mortalidad de los pacientes, prolongando su tiempo estimado de vida en más de cinco años. Los triazoles como línea de tratamiento tienen a su favor una baja toxicidad en comparación con otros antifúngicos y es por ello que resultan idóneos para esquemas de dosificación durante periodos extensos como los que requiere la APC (10). Como otras infecciones crónicas, la cura total de la APC tiene una baja probabilidad y son pocos los casos que resuelven en su totalidad. Muchas veces la combinación de métodos quirúrgicos con empleo de antimicóticos puede contribuir a una disminución en la magnitud de la infección y a un mejor manejo de la misma (15).

Esta investigación constituye la primera evidencia epidemiológica de la APC en Cuba y los resultados han repercutido de manera positiva tanto en los pacientes involucrados como en el cuerpo médico quienes tienen ahora más herramientas para el diagnóstico de infecciones respiratorias de origen fúngico. También es un discreto aporte al estudio de la susceptibilidad antifúngica en el género *Aspergillus*,

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

una temática de gran interés en la actualidad. Se hace necesario la continuación de este estudio en otros grupos de riesgo específicos y el análisis filogenético de los aislados que se obtengan para comprender mejor la epidemiología de la enfermedad y cómo actuar para su control. Estos resultados deben ser informados a las autoridades competentes para incluir la vigilancia y control de la aspergilosis pulmonar crónica como parte del Programa Nacional de Control de las Infecciones Respiratorias o como enfermedad asociada al Programa Nacional del Control de la Tuberculosis tomando en consideración la estrecha relación que existe entre ambas.

CONCLUSIONES

- El diagnóstico de múltiples pacientes como portadores de APC, sugiere que esta es una patología frecuente en Cuba y que se requiere sistematizar su flujograma diagnóstico, a escala nacional, para disminuir las elevadas tasas de morbimortalidad asociadas a la misma.
- La asociación entre aspergilosis pulmonar crónica y la presencia de cavidades resalta la importancia de esta imagen radiológica, como factor de riesgo y signo de alerta para el diagnóstico de esta enfermedad.
- Las principales especies de *Aspergillus* pueden estar involucradas en la etiología de la aspergilosis pulmonar crónica. El discreto predominio de *Aspergillus flavus*, aunque difiere de lo reportado internacionalmente, no permite concluir la importancia de esa especie como principal agente causal de esta enfermedad en nuestro país.
- El voriconazol mostró ser más efectivo que el itraconazol *in vitro* frente a las especies del género *Aspergillus*, lo que lo destaca como el mejor candidato para la terapia de la aspergilosis pulmonar crónica.

RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

- Informar a las autoridades sanitarias, por las vías establecidas, sobre los resultados de esta investigación como parte de la actualización de los programas de salud del país.
- Realizar estudios de epidemiología molecular que garanticen un mejor entendimiento de la dinámica de la aspergilosis pulmonar crónica.
- Extender estas investigaciones a otros grupos de riesgo y centros de salud del país para realizar estimaciones sobre la epidemiología de la aspergilosis pulmonar crónica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Figueras Nadal C, CDdHR NG, M.L., Rosello Moyans E, Álvarez González F. Infección fúngica invasiva: Actualización. Protocolo diagnóstico terapéutico de la AEP: Infectología pediátrica 2008.
2. Nucci M, Queiroz-Tellez F, Colombo A. Características epidemiológicas de las infecciones fúngicas oportunista. *Clinical Infection Disease* 2010;51(5):561-70.
3. Oxilia RGO H-G, Morales L, Falco F. Aspergilosis: una patología a considerar. Fundación Dr. JR Villavicencio Sanatorio Parque, Diagnóstico Médico Oro, Hospital Italiano de Rosario. Argentina 2008.
4. Toledano Grave de Peralta Y, Campos Muñoz M, Silveira Digón S. Aspergilosis en una mujer adulta. *Sistemas Integrado de Urgencias Médicas, Santiago de Cuba* 2016;20(8).
5. B A. Aspergilosis. *Clínica de Enfermedades Infecciosas. Montevideo, Uruguay* 2001:1-9.
6. Ohara S TY, Tanaka Y, Noda H, Horiuchi H, Usui K. Clinical characteristics of patients with *Aspergillus* species isolation from respiratory samples. Comparison of chronic pulmonary aspergillosis and colonization. *Respiratory Investigation* 2016; 54:92-7.
7. Caffrey A, Lehmann M, Zickovich J, Espinisa V, Sheppardson K, Watschpher. IL-Signaling is Critical for Leukocyte Recruitment after Pulmonary *Aspergillus fumigatus* challenge. *PLOS Pathogens* 2015;2.
8. Helmut J.F SaOAC. Awareness of predictors of mortality may help improve outcome in chronic pulmonary aspergillosis. *Eur Respir J* 2017;49.
9. Muldoon EG, Sharman A, Page L, Bishop P, Denning DW. *Aspergillus* nodules, another presentation of chronic pulmonary aspergillosis. *BMC Pulmonary Medicine* 2016; 16:123.
10. Denning D. Fondo de Acción Global para Infecciones Fúngicas Geneva, Switzerland 2016.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11. Valle J, González-Barcala F, Álvarez J, Valdés L. La aspergilosis pulmonar invasi va en la enfermedad pulmonar obstructi va crónica. Rev Med Chile 2010; 138:612-20.
12. Schweer K, Bangard C, Hekmat K, Cornely O. Chronic pulmonary aspergillosis. Review article 2014; 57:257-70.
13. Tovar D. Aspergilosis. Laboratorio de Investigación Médica, Hospital de Especialidades CMN, Siglo XXI 2015.
14. Malcom D, Richardson LD. *Aspergillus* serology: Have we arrived yet? Medical Micology Advance Access ISHAM 2016; 00:1-8.
15. David W Denning JC, Catherine Beingelman-Auby, Florence Ader, Arunaloke Chakrabarti, Stijin Blot, Andrew J Ullmann, George Dimopoulos and Christoph Lage. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management, European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases and European Respiratory Society. Eur Respir J 2016; 47:45-68.
16. Cuenca M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia en el mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencia. Rev Esp Quimoter 2010;23(4):168-76.
17. Walsh TJ, Denning DW, Hebrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, Morrison VA. Treatment of aspergillosis: Clinical practice guidelines of the Infections Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2008;46:327-60.
18. Chowdhery A, Sharma C, Katherine S, Hagen F, Meis J. Prevalence and mechanism of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* in a refarral chest hospital in Delli, India. Fronteirs in Microbiology 2015.
19. Sánchez K, Almaguer M. Aeromicología y Salud humana. Revista Cubana de medicina tropical 2014;66(3):322-37.
20. Godet C, Philipe B, Laurent F, Cadranel J. Chronic pulmonary aspergillosis: an update on diagnosis and treatment. Respiration 2014; 88:162-74.
21. Izumikawa K TT, Tashiro M. Pathogenesis and clinical features of chronic pulmonary is it possible to distinguish CNPA and CCPA clinically? J Infect Chesmother 2014;20:208-12.
22. How Common Are Fungal Diseases? Chronic fungal disease. Fungal Infection Trust 2017.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

23. Kwon-Chung KJ, Suque JA. *Aspergillus fumigatus*-what makes the species ubiquitous human fungal pathogen? PLOS Pathogens 2013;9(12).
24. Denning DW, Pleurvry A, Cole DC. Global burden of allergia bronchopulmonary aspergillosis with asthma its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. Med Mycol 2013; 51:361-70.
25. Bonifaz A. Micología Médica Básica, Aspergilosis y Antimicóticos. Cuarta ed. 2012.
26. Kosmodis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. Postgrad Med J 2015; 91:403-10.
27. Segal BH. Aspergilosis. N Engl J Med 2009; 360:1870-84.
28. Curbelo J, Galván JM, Aspa J. Actualización sobre *Aspergillus*, *Pneumocystis* y otras micosis pulmonares oportunistas. Servicio de Medicina Interna, Madrid, España Arch Bronconeumol 2015;51(12):647-53.
29. Patterson K, Strk ME. Diagnosis and treatment of pulmonary aspergillosis syndromes. Chest 2014; 146:1358-68.
30. Page ID, Richardson M, Denning DW. Antibody testing in aspergillosis-Quo vadis? Med Mycol 2015;53:417-39.
31. Malcom D, Hope W. Chronic pulmonary aspergillosis. Clinical Mycology 2009.
32. Blanco JJ, González Barcala FJ, Álvarez Moure MA, González Mao MC, Temes E, Guerra JL. Aspergilosis pulmonar necrotizante crónica como complicación de silicosis An Sist Sanit Navar 2011;34(1):109-14.
33. Uffredi ML, Mangiapan G, Cadranel J, Kac G. Significance of *Aspergillus fumigatus* isolation from respiratory specimens of nongranulocytotoxic patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003;22:457-62.
34. Cuero-Maldonado SI, Gómez- Rincón JC, Rivas P, Orlando-Guevara F. Actualización en Aspergilosis con énfasis en Aspergilosis Invasora. Infection 2010;14(52):131-44.
35. Harrington B, Hageage G. Calcofluor white: A review of its uses and applications in clinical Micology and Parasitology. Laboratory Medicine 2003;34(5).
36. Arenas R. Micología Médica Ilustrada Quinta ed 2014.
37. Linares M, Solis F. Identificación de otros hongos miceliares. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica 2007.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

38. Hayes GE, Novak-Frazer L. Chronic pulmonary aspergillosis-Where are we? and Where are we going? J Fungi 2016;2(18).
39. Page ID, Richardson MD, Denning DW. Comparison of six *Aspergillus*-specific IgG assays for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis (CPA). J Infect 2016; 72:240-9.
40. Favid S, Mohamed S, Devbhandari M, Kneale M, Richardson M, Soon SY. Results of surgery for chronic pulmonary aspergillosis, optimal antifungal therapy and proposed high risk factors for recurrence-A national centre's experience. J Cardiothorac Surg 2013; 8:180.
41. Regnard JF, Icard P, Nicolosi M, Spagiarsi L, Magdeleinat P, Jauffret B, et al. Aspergilloma: A series of 89 surgical cases. Ann Thorac Surg 2000; 69:898-903.
42. Felton TW, Baxter C, Moore CB, Roberts SA, Hope WW, Denning DW. Efficacy and safety of posaconazole for chronic pulmonary aspergillosis. Clin Infect Dis 2010; 51:1383-91.
43. Zapata González F, Cardona Castro N. Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. Rev CES Med 2012;26(1):71-83.
44. Chamilo G, Kontoyiannis DP. Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*. Drug Resist Upda 2005;8(6):344-58.
45. Cuenca- Estrella M. Antifúngico en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia en el mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencia Rev Esp Quimoter 2010;23(4):169-76.
46. Espinal A. Mecanismo de resistencia a los antifungicos: levaduras y hongos filamentosos. Rev Iberoam Micol 2008.
47. Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2002;20(10):523-30.
48. Saurav K, Kannabiran K. In vitro Susceptibility pattern and Distribution of *Aspergillus spp* in hospitalized patients with chronic pulmonary infection. Br J Pharm Toxicol 2010;1(1).
49. BIOD ISK A. E-Test technical guide 4b: antifungal susceptibility testing of molds. Suiza. AB BIODISK com 2007.
50. Lass-Flörl C, Perkhöfer S, Mayr A. In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. Mycoses 2010; 53:1-11.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

51. Arian S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol* 2007; 45:569-87.
52. Hedayati MT, Pasqualotto ACW, P. A.2, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 2007; 153:1677–92.
53. Lass-Fiori C. *Aspergillus terreus*: How inoculum size and host characteristic affect its virulence. *JID* 2012.
54. Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad J, VanDijck W. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;59.
55. González Alfaro BJ, Barrial González RT. Instrumentación y principios básicos. Laboratorio de Microbiología 2004.
56. Dr. Rodríguez Pérez CM. Procedimientos técnicos en Microbiología clínica. Grupo provincial de Microbiología, La Habana, Cap. 17 Serología 2004.
57. Palacios A. El diagnóstico de laboratorio de la Aspergilosis invasora. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20:90-8.
58. LEP. Aportes morfotaxonómicos en el género *Aspergillus* Link: Claves para las especies ambientales y clínicas más comunes. *Boletín Micológico* 2008;23:49-66.
59. Badiie P, Alborzi A, Moeini M, Haddadi P, Farshad S, Japoni A. Antifungal susceptibility of the *Aspergillus* species by E-Test and CLSI reference methods. *Arch Iran Med* 2012;15(7):429-32.
60. *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA, Enzyme immunoassays for the detection of human IgG antibodies against *Aspergillus fumigatus* in serum and plasma. Product information IBL American Instruction Manual 11-01-17; version 6/JS.
61. Izumikawa K. Recent advances in chronic pulmonary aspergillosis. *Respir Investig* 2016; 54:85–91.
62. McClenny N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. *Medical Mycology Supplement* 2005; 1(43): S125-S8.
63. Erro Iribarren M, Sánchez Azofra A, Roca Noval A, Hernández Olivo M, Acosta Gutiérrez CM, Zamora García E. Aspergiloma pulmonar. Servicio de Neumología. Instituto de Investigación. Hospital Universitario de La Princesa. Madrid. *Rev Patol Respir* 2017;20(1): 33-6.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

64. Restrepo R, Soto JA, Gutiérrez F, Gómez I, Franco L, Restrepo A. Aspergilosis pulmonar. Aspectos clínico -radiológicos Acta Médica Colombiana Marzo-Abril 1994; 19 (2).
65. Camara B, 2, Reymond E, 6, Saint-Raymond C, 2, Roth H, 2,7,8, Brenier-Pinchart M-P, 3, Pinel C, 3, et al. Characteristics and outcomes of chronic pulmonary aspergillosis: a retrospective analysis of a tertiary hospital registry The Clinical Respiratory 2014 1752-6981.
66. Pashley CH, Abbie Fa, Morley JP, Tailor S, Gbetile JA, Afadhel MB. Routine processing procedures for isolating filamentous fungi from respiratory sputum samples may underestimate fungal prevalence Medical Mycology 2012; 50:433–8.
67. Denning DW. Chronic forms of pulmonary aspergillosis Clin Microbiol Infect 2001; 7:25–31.
68. Hedayati MT, 2, Azimi Y, 2, Droudinia A, Mousavi B, 2, Khalilian A, Hedayati N. Prevalence of chronic pulmonary aspergillosis in patients with tuberculosis from Iran. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015; 34:1759–65.
69. Page ID, Richardson M, Denning DW. Antibody testing in aspergillosis-Quo vadis? Med Mycol 2015;53:417-39.
70. Fujiuchi S, Fujita Y, Suzuki H, Doushita K, Kuroda H, Takahashi M, et al. Evaluation of a Quantitative Serological Assay for Diagnosing Chronic Pulmonary Aspergillosis. Journal of Clinical Microbiology 2016; 54 (6).
71. Fortum J, Meije Y, Fresco G, Moreno S. Aspergilosis, Formas clínicas y tratamiento. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España Enferm Infecc Microbiol Clin 2012.
72. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, 6, Guleria R, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria Clinical & Experimental Allergy 2013; 43:850–73.
73. Smith NL, Denning DW. Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma. Eur Respir J 2011;37 (4):865-72.
74. Lowes D, Chishimba L, Greaves M, Denning DW. Development of chronic pulmonary aspergillosis in adult asthmatics with ABPA. Respiratory Medicine 2015; 109:509e15.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

75. Dr.C Zacca Peña E, Dra. Bess Constantén S, Dr. Santin Peña M. Sistema de información estadística. Enfermedades de declaración obligatoria. Ministerio de Salud Pública, Dirección de Registros Médicos y Estadística de Salud. Edición financiada con la colaboración de la oficina OPS/OMS en Cuba.
76. Denning DW, Riniotis, K., Dobrashian, R. & Sambatakou, H. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature and review. *Clin Infect Dis* 2003;37:S265–S80.
77. Chawla K, KoSaraju K, rayaSaM S, MuKhopadhyay C. Clinico-Microbiological Profile of Chronic Pulmonary Aspergillosis from a Tertiary Care Centre in Southern India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2013;7(12):2712-5.
78. Ocampo JM, Aguilar CD, Gómez JF. Envejecimiento del Sistema Respiratorio. *Revista de Neumología* 2005;17(3).
79. Resolución Ministerial No. 277. Ministerio de Salud Pública. Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Manual de Normas y Procedimientos. La Habana: Ed. Ciencias Médicas 2013.
80. Salzer HJF, Heyckendorf J, Kalsdorf B, Rolling T, Lange C. Characterization of patients with chronic pulmonary aspergillosis according to the new ESCMID/ERS/ECMM and IDSA guidelines. *Mycoses* 2017; 60:136–42.
81. Jhun BW, Jeon K, Eom JS, Lee JH, Suh GY, Kwon OJ. Clinical characteristics and treatment outcomes of chronic pulmonary aspergillosis 2013; 51:811–7.
82. Kokkonouzis I, Athanasopoulos I, Doulgerakis N. Fatal hemoptysis due to chronic cavitary pulmonary aspergillosis complicated by nontuberculous mycobacterial tuberculosis. *Case Rep Infect Dis* 2011.
83. Hou X, Zhang H, Kou L, Lv W, Lu J, Li J. Clinical features and diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis in Chinese patients. *Medicine* 2017; 96:42.
84. Naito M, Kurahara Y, Yoshida S, Ikegami N, Kobayashi T, Minomoto S. Prognosis of chronic pulmonary aspergillosis in patients with pulmonary non-tuberculous mycobacterial disease. *Respiratory Investigation* 2018.
85. Maghrabi F, Denning DW. The Management of Chronic Pulmonary Aspergillosis: The UK National Aspergillosis Centre Approach. *Curr Fungal Infect Rep* 2017; 11:242–51.
86. Godet C, Laurent F, Bergeron A. CT imaging assessment of response to treatment in chronic pulmonary aspergillosis. *Chest* 2016;150(1):139–47.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

87. Krijghsheld P, Bleichrodt R, Van Veluw GJ, Wang F, Müller WH, Dijksterhuis J, et al. Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 2012; 74:1-29.
88. Samson RA, Pitt JI. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Amsterdam: Harwood Academic Publishers 2000.
89. Samson RA, Hong SB, Frisvad JC. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology* 2006;44: S133-S48.
90. Samson RA, Vargas J. *Aspergillus* systematics in the genomic era. *Studies in Mycology* 2007; 59:1-206.
91. Ellis D. Amphotericin B: Spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:7-10.
92. Knechtel SA, Klepser ME. Amphotericin B resistance: Epidemiology, mechanisms, and clinical relevance. *J Invasive Fungal Infect* 2007; 1:93-8.
93. San Juan JL, Fernández CM, Almaguer M, Perurena MR, Martínez GF, Velar RE, et al. Sensibilidad in vitro de cepas cubanas de *Aspergillus* spp. de origen clínico y ambiental. *Biomédica* 2017; 37:452-9.
94. Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus flavus*: An emerging non-*fumigatus* *Aspergillus* species of significance. *Mycoses* 2009; 52:206-22.
95. Seo K, Akiyoshi H, Ohnishi Y. Alteration of cell wall composition leads to amphotericin B resistance in *Aspergillus flavus*. *Microbiol Immunol* 1999; 43:1017- 25.
96. Gomez-Lopez A, Garcia-Effron G, Mellado E, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. In vitro activities of three licensed antifungal agents against Spanish clinical isolates of *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3085–8.
97. Sutton DA, Sothergill QA, Rinaldi MF. *Aspergillus* in vitro antifungal susceptibility data: new millennium trends. In *Advances Against Aspergillosis*. *Med Mycol* 2004;43(1): S1–S319.
98. Hsueh PR, Lau YJ, Chuang YC, Wan JH, Huang WK, Shyr JM, et al. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:512–7.

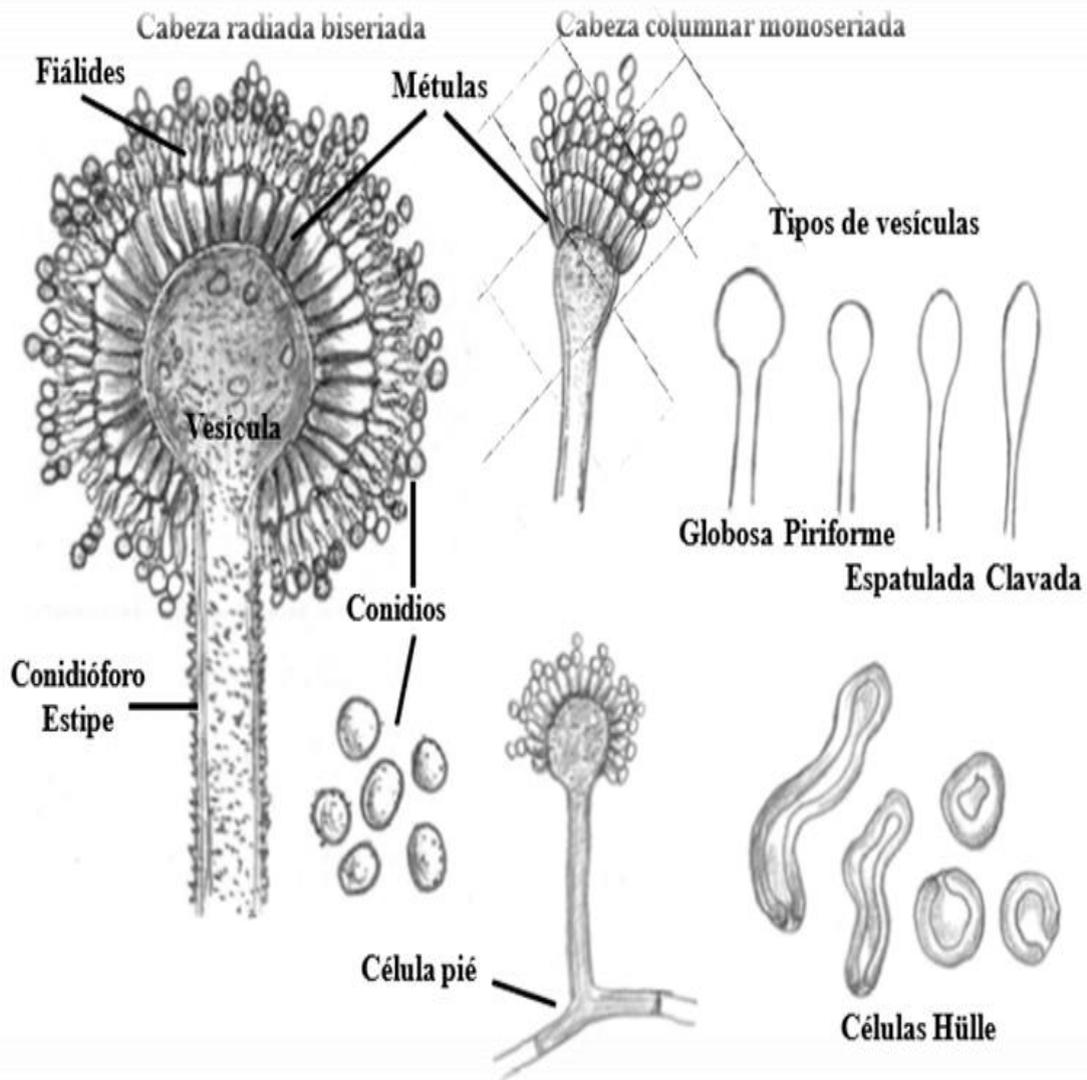
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

99. Al-shair K, Atherton GT, Harris C. Long-term antifungal treatment improves health status in patients with chronic pulmonary aspergillosis: a longitudinal analysis. *Clin Infect Dis* 2013; 57:828–35.
100. Pemán J, Salavert M, Cantón E, Jarque I, Romá E, Zaragoza R. Voriconazole in the management of nosocomial invasive fungal infections. *Ther Clin Risk Manag* 2006; 2:129-58.
101. Saito T, Fujiuchi S, Sasaki Y. Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of chronic pulmonary aspergillosis: experience in Japan. *Infection* 2012; 40:661–7.
102. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis* 2009;15(7):1068-76.
103. Van der Linden JW, Warris A, Verweij PE. *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Med Mycol* 2011; 49:82-9.
104. Gheith S, Saghrouni F, Bannour W, Ben Youssef Y, Khelif A, Normand AC. In vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole and caspofungin of *Aspergillus* spp. isolated from patients with hematological malignancies in Tunisia. *Springerplus* 2014; 3:1-8.
105. Tokarzewski S, Ziółkowska G, Nowakiewicz A. Susceptibility testing of *Aspergillus niger* strains isolated from poultry to antifungal drugs a comparative study of the disk diffusion, broth microdilution (M 38-A) and Etest® methods. *Pol J Vet Sci* 2012; 15:125-33.



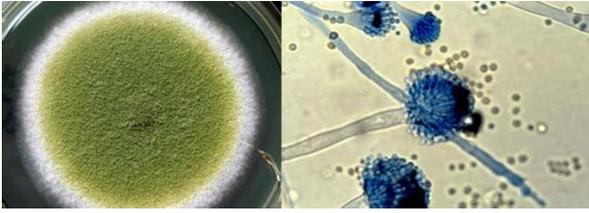
ANEXOS

Anexo 1: Estructuras morfológicas en el género *Aspergillus*: cabezas radiadas y columnares, tipos de vesículas, célula pie, células Hülle.



Anexo 2: Morfología de especies de *Aspergillus* de importancia clínica.

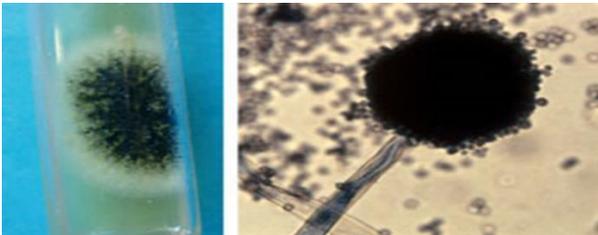
➤ Morfología de *A. fumigatus*.



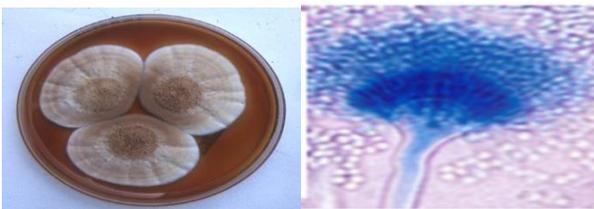
➤ Morfología de *A. flavus*.



➤ Morfología de *A. niger*.



➤ Morfología de *A. terreus*.



Anexo 3: Características macromorfológicas y micromorfológicas de las especies de *Aspergillus* asociadas con enfermedades en humanos. (25)

	Características	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>
Colonia	Aspecto	Plano, aterciopelado, algodonoso	Pulverulento	Punteado negro	Aterciopelado, flocoso
	Color	Verde botella, blanco grisáceo	Verde amarillento	Blanco amarillento	Marrón amarillento
	Reverso	Incoloro, rojo amarillento	Incoloro, café amarillento	Incoloro, amarillento	Incoloro, beige
Reproducción asexual	Conidióforo	Corto, liso, incoloro 300 µm	Regular, pared rugosa	Largo, 1.5 a 3 mm	Regular, hialino liso
	Vesícula	Mazo o domo	Esférica	Globosa	Subesférica
	Fialides	Una serie, paralelas	Una o dos series radiadas	Dos series radiada	Dos series ligeramente columnar
	Conidios	Globosos, equinulados, verdes	Piriformes o globosos, verde amarillentos	Globosos, negros	Globosos, estriados, amarronados
Reproducción sexual	Cleistotecios	Globosos, amarillos
	Ascospora	Globosos con crestas ecuatoriales
	Células en avellana
	Esclerotes	Blanco o negro
Otros	Temperatura de desarrollo óptimo	37 a 50°C	37°C	37°C	37°C

Anexo 4: Ficha de datos obtenidas de las Historias Clínicas(HC)

No. Inclusión: _____ Consentimiento: Sí _____ No _____ Fecha: ___/___/___

➤ Nombre y Apellidos (Iniciales) _____

➤ Edad: _____ Sexo: Femenino _____ Masculino _____

➤ Provincia: _____ Municipio: _____

Datos Clínicos:

➤ Antecedentes de enfermedad pulmonar: Previa _____ Actual: _____

➤ Diagnostico:

EPOC: Sí _____ No _____ Diagnóstico previo: Sí _____ No _____ Fecha: ___/___/___

Bronquiectasia: Sí _____ No _____ Diagnóstico previo: Sí _____ No _____

Fecha: ___/___/___

Tuberculosis: Sí _____ No _____

Otras Patologías: _____

➤ Signos y síntomas: Fiebre: _____ Tos: _____ Expectoración: _____

Pérdida de peso: _____ Hemoptisis: _____

Dolor Torácico: _____

Comienzo de los síntomas: <1 semana _____ 1-3 semanas _____ >3 semanas _____

➤ Radiología: Cavidades: una: _____ más: _____

Bola de hongos presente: Sí _____ No _____

Nódulos en la imagen torácica: Sí _____ No _____

Diagnóstico microbiológico:

✓ Muestras:

❖ Esputos: Sí ____ No ____.

En caso de sí:

Cuantos: 1 ____ 2 ____ 3 ____

Espuito Bacteriológico: Sí ____ No ____ . Positivo ____ Negativo ____

Espuito BAAR: Sí ____ No ____ . Positivo ____ Negativo ____

Espuito Micológico: Sí ____ No ____ . Positivo ____ Negativo ____

❖ Suero: Sí ____ No ____ . Positivo ____ Negativo ____

❖ Otras muestras:

Lavado bronquioalveolar: Sí ____ No ____ . Positivo ____ Negativo ____

Líquido pleural: Sí ____ No ____ . Positivo ____ Negativo ____

✓ Resultado del Examen microscópico directo: Positivo ____ Negativo ____

✓ Resultado del Cultivo: Positivo ____ Negativo ____

✓ Resultado de la Serología: Positivo ____ Negativo ____

✓ Niveles de IgG: _____

✓ Clasificación taxonómica:

A. fumigatus: ____ *A. flavus*: ____ *A. niger*: ____ *A. terreus*: ____

✓ Susceptibilidad antifúngica: (E-Test)

Itraconazol (ITR): Sensible: ____ Intermedio: ____ Resistente: ____

Voriconazol (VRC): Sensible: ____ Intermedio: ____ Resistente: ____

Anfotericina B (AMB): Sensible: ____ Intermedio: ____ Resistente: ____

Anexo 5: Consentimiento informado para participar en un estudio de Investigación médica.

Título del protocolo: Contribución al diagnóstico de aspergilosis pulmonar crónica en pacientes con sospecha clínica de esta patología en el Hospital Neumológico Benéfico Jurídico, 2017-2018.

Investigador Principal _____

Sede donde se realizará el estudio: _____

Nombre del Paciente _____

A Usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase libre de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si Usted decide participar entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

Yo _____, en pleno juicio de mis facultades mentales y de manera voluntaria, accedo a participar en el estudio de APC. Dicha investigación se lleva a cabo por investigadores cubanos del "Hospital Benéfico Jurídico" y del Instituto de Medicina Tropical.

He recibido información de que: La Aspergilosis pulmonar crónica afecta a más de 3 millones de personas en todo el mundo, es considerada una de las enfermedades infecciosas pulmonares más difícil de diagnosticar pues sus síntomas son similares a las de otras enfermedades con las que se puede confundir. La supervivencia estimada de 5 años, oscila entre el 50-85%, pero la estabilidad clínica a largo plazo puede lograrse con un diagnóstico precoz y un tratamiento temprano adecuado. Este estudio pretende confirmar el diagnóstico de Aspergilosis pulmonar crónica en pacientes con cuadros clínicos sugerentes utilizando métodos microbiológicos convencionales y en particular, la detección de anticuerpos IgG anti Aspergillus que es el método de elección a escala internacional. De confirmarse la misma, esto permitiría instaurar un tratamiento específico y así evitar la progresión de la infección y mejorar el pronóstico y la calidad de vida de estos pacientes

Estamos invitando a todos los adultos (hombres y mujeres) con síntomas respiratorios crónicos (más de 3 meses) y que no se ha podido establecer su diagnóstico definitivo a participar de manera voluntaria en esta investigación. Si decide participar a usted se le solicitara tres muestras de esputo y una de suero para realizar los estudios correspondientes. De confirmarse la enfermedad usted se beneficiará de un tratamiento específico que le permitirá mejorar considerablemente su estado de salud. Estoy consciente de la importancia científico-social de mi participación en esta investigación. He sido informado(a), que los resultados de este estudio aportarán nuevos conocimientos a la comunidad científica nacional sobre este problema de salud. Además, no recibiré beneficio material alguno por mi participación y puedo dejar de formar parte del proyecto cuando lo desee, sin que por ello reciba daño alguno.

Confío en que los investigadores que participan en el estudio mantendrán la confidencialidad de toda la información entregada. Para que conste firmo el consentimiento informado junto con el profesional que me brindó las explicaciones en _____, a los ____ días del mes de _____ de _____.

Firma del Paciente

Firma del Investigador

Anexo 6: Tabla de Sexo y Rango de edades de pacientes con APC. (n=21)

RANGO DE EDADES	TOTAL		SEXO			
	No.	%	M		F	
			No.	%	No.	%
19 - 34	5	23.81%	1	4.76%	4	19.05%
35 -50	3	14.29%	1	4.76%	2	9.52%
51 - 66	6	28.57%	4	19.05%	2	9.52%
67 - 82	7	33.33%	6	28.57%	1	4.76%
TOTAL	21	100%	12	57.14%	9	42.86%

Anexo 7: Asociación entre Bronquiectasias con Serología positiva.

Contingency			
Table analyzed	Bronquiectasia vs Serología		
Fisher' exact test			
P value	0,3525		
P value summary	ns		
One- or two- sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Odds ratio	0.50		
95% confidence interval	0.14 to 1.8		
Data analyzed	Pacientes con bronquiectasia	Pacientes sin bronquiectasia	Total
Serología positiva	5	19	24
Serología negativa	9	17	26
Total	14	36	50

Anexo 8: Asociación entre EPOC con Serología positiva.

Contingency			
Table analyzed	EPOC vs Serología		
Fisher' exact test			
P value	0,5260		
P value summary	ns		
One- or two- sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
Strength of association			
Odds ratio			
95% confidence interval	0.16 to 2.2		
Data analyzed	Pacientes con EPOC	Pacientes sin EPOC	Total
Serología positiva	5	19	24
Serología negativa	8	18	26
Total	13	37	50

Anexo 9: Asociación casos positivos por serología y la presencia de cavidades.

Contingency			
Table analyzed	Cavidades vs Serología		
Fisher' exact test			
P value	0,0225		
P value summary	*		
One- or two- sided	Two-sided		
Statistically significant? (alpha<0.05)	Yes		
Strength of association			
Odds ratio			
95% confidence interval	4.5		
	1.4 to 15		
Data analyzed	Con cavidades en pulmón	Sin cavidades en pulmón	Total
Serología positiva	16	8	24
Serología negativa	8	18	26
Total	24	26	50