



## Utilidad de la prueba *Aspergillus*-LFD para el diagnóstico de aspergilosis: primera experiencia en Chile

Eduardo Álvarez

### Utility of *Aspergillus*-LFD: first experience in Chile

The diagnosis of invasive aspergillosis remains a challenge. Detection of galactomannan in serum and bronchoalveolar lavage is a useful tool; however due to methodological and economic reasons, the test frequencies of galactomannan assays vary from daily to weekly, which constitute a risk to the patient. In this study, we aimed to evaluate and correlate the performance of the new kit *Aspergillus*-LFD with the GM-EIA. *Aspergillus*-LFD kit represents a fast, economical and simple test; showed a good performance and excellent correlation with GM-EIA kit. Given the above, the *Aspergillus*-LFD is emerging as an alternative to consider in the early diagnosis of invasive aspergillosis.

**Key words:** Aspergillosis, galactomannan, biomarker, lateral-flow device, invasive fungal diseases.

**Palabras clave:** Aspergilosis, galactomanano, biomarcadores, LFD, enfermedad fúngica invasora.

### Introducción

La enfermedad fúngica invasora (EFI) es una entidad que se asocia con una morbi-mortalidad significativa<sup>1</sup>. Una de las EFI más prevalentes es la aspergilosis invasora (AI), causada principalmente por *Aspergillus fumigatus*. El diagnóstico temprano de la AI es crucial para el inicio de una terapia con resultados satisfactorios en pacientes de alto riesgo. Asimismo, la detección precisa y temprana reduce el uso innecesario de antifúngicos<sup>2-4</sup>. Según lo anterior, se hace necesario contar con herramientas de diagnóstico rápidas y eficaces<sup>5</sup>. Hasta ahora, el método de mejor rendimiento para el diagnóstico de EFI es la detección de antígenos fúngicos en el suero. Una de las pruebas ampliamente utilizadas para este propósito es Platelia™ *Aspergillus* EIA (GM-EIA), un inmunoensayo enzimático que detecta la presencia de galactomanano (GM), principal componente de la pared celular de *Aspergillus*. El kit GM-EIA ha demostrado un buen rendimiento en el diagnóstico de AI a partir de muestras de suero<sup>4,6</sup>; al utilizarse un índice de densidad óptica (IDO) de 0,5 como valor de corte. Se ha reportado una sensibilidad y especificidad aproximada de 78% y 81%; respectivamente<sup>6</sup>. A pesar de que GM-EIA tiene un rendimiento diagnóstico aceptable, presenta

Tabla 1. Comparación del costo y material necesarios para los kit *Aspergillus*-LFD y GM-EIA

	<i>Aspergillus</i> -LFD	GM-EIA
Material requerido	+ (pipeta, centrífuga)	+++ (pipeta, centrífuga, baño maría, lector placas, etc.)
Costo	+ \$15.000 por test apróx.	++ \$25.000 – \$45.000 por test apróx.
Tiempo de trabajo	+ 20 minutos apróx.	+++ 4 horas apróx.

algunos inconvenientes metodológicos, tales como el tiempo de ejecución (3 h), necesidad de instalaciones adecuadamente equipadas y costo económico. Dichos factores son los responsables de que la frecuencia de realización de la prueba GM-EIA pase de ser diaria a semanal, teniendo como consecuencia que los resultados pueden estar disponibles demasiado tarde para ser clínicamente útiles. Una alternativa útil para superar los inconvenientes antes citados es la utilización de pruebas basadas en inmunocromatografía (tecnología de flujo lateral o *lateral flow device*-LFD, en inglés). Recientemente ha sido desarrollada la prueba *Aspergillus*-LFD, que consiste en un ensayo inmunocromatográfico que detecta una glicoproteína extracelular de *A. fumigatus* en el suero o en lavado broncoalveolar (LBA). Entre sus ventajas destacan el tiempo de ejecución (15 min), su simplicidad, y el bajo costo comparado con otras técnicas como GM o la detección de  $\beta$ -glucanos<sup>7</sup> (Tabla 1). Estudios recientes, realizados con sueros obtenidos de modelos animales y con LBA de pacientes con neoplasias y sometidos a trasplante de órganos sólidos, han demostrado la utilidad de *Aspergillus*-LFD<sup>8-10</sup>.

El objetivo del estudio fue comparar el rendimiento diagnóstico del kit *Aspergillus*-LFD con la detección de GM por GM-EIA en una colección de sueros.

### Métodos

Se evaluaron un total de 30 muestras del Laboratorio de Hongos Filamentosos de la Unidad de Micología de la Universidad de Chile: 25 muestras de suero y dos de LBA. Todas las muestras fueron sometidas previamente a la detección de GM con el kit GM-EIA. Además, se utilizó como control positivo una muestra de suero con resultado positivo para GM, y RPC-TR; como control negativo, un suero con resultado negativo para las pruebas de GM y RPC-TR, y como control de reacción cruzada, un suero con diagnóstico de fusariosis.

Para la determinación con el kit *Aspergillus*-LFD se procedió a mezclar 50  $\mu$ L de suero con 100  $\mu$ L de PBS / EDTA (4% w/v) y se incubó durante 3 min a 100°C. Tras una centrifugación por 5 min a 16.000 g. se depositaron 100  $\mu$ L del sobrenadante en la zona de carga del kit *Aspergillus*-LFD. Los resultados fueron leídos después de 15 min (Figura 1).

Para los análisis estadísticos de sensibilidad y especificidad se utilizó el programa MedCalc® 14.

### Resultados

Un total de 30 sueros fueron evaluados con *Aspergillus*-LFD (Tabla 2). Del total de muestras, con la prueba de detección de GM fue posible

Universidad de Chile  
Instituto de Ciencias Biomédicas  
Unidad Micología - Hongos Filamentosos

Recibido: 15 de septiembre de 2014 / Aceptado: 30 de diciembre de 2014.

No hay conflicto de intereses

Financiamiento: Sin financiamiento externo.

**Correspondencia a:**  
ealvarezd@med.uchile.cl



Tabla 2. Muestras y resultados utilizando los kit *Aspergillus*-LFD y GM-EIA

SAMPLE		ODI	GM	LFD
1	Suero	0,07	Negativo	Negativo
2	Suero	0,7	Positivo	Positivo
3	Suero	0,34	Negativo	Negativo
4	Suero	0,37	Negativo	Negativo
5	Suero	2,37	Positivo	Positivo
6	Suero	0,8	Positivo	Positivo
7	LBA	1,11	Positivo	Positivo
8	Suero	0,67	Positivo	Positivo
9	Suero	0,65	Positivo	Positivo
10	Suero	0,58	Positivo	Ligeramente positivo
11	Suero	1,49	Positivo	Positivo
12	Suero	0,6	Positivo	Positivo
13	Suero	1,5	Positivo	Positivo
14	Suero	0,7	Positivo	Positivo
22	Suero	2,37	Positivo	Positivo
23	Suero	0,8	Positivo	Positivo
34	LBA	1,11	Positivo	Positivo
35	Suero	0,67	Positivo	Positivo
36	Suero	0,65	Positivo	Positivo
37	Suero	0,58	Positivo	Positivo
38	Suero	1,49	Positivo	Positivo
43	Suero	0,6	Positivo	Positivo
44	Suero	1,5	Positivo	Positivo
49	Suero	0,5	Positivo	Positivo
51	Suero	0,51	Positivo	Positivo
52	Suero	3,77	Positivo	Positivo
53	Suero	1,69	Positivo	Positivo
Fus -1	Suero	0,72	Positivo	Negativo
C +	NA	1,95	Positivo	Positivo
C -	NA	-	Negativo	Negativo

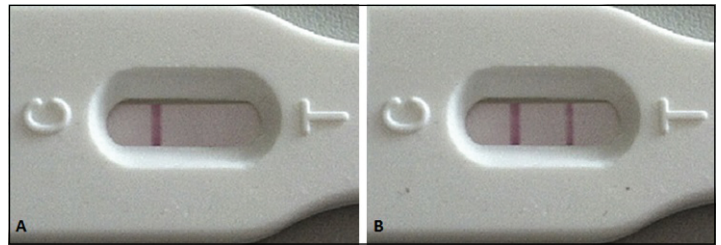


Figura 1. Visualización de las líneas testigo y muestra en el *Aspergillus*-LFD. (A) resultado negativo, (B) resultado positivo.

positiva para fusariosis; la cual obtuvo un resultado positivo (IDO=0,72) en la prueba de GM y negativo para *Aspergillus*-LFD.

Como control positivo se utilizó un suero con resultado positivo por GM y RPC-TR, obteniéndose una reacción positiva con *Aspergillus*-LFD. Con el control negativo no se obtuvo reacción en las pruebas de GM, RPC-TR, ni *Aspergillus*-LFD.

### Discusión

El diagnóstico de la AI sigue siendo complejo, dado principalmente por lo inespecífico, costoso y laborioso de las técnicas actualmente utilizadas. Técnicas como la RPC-TR ofrecen una buena sensibilidad y especificidad; sin embargo, tiene desventajas como su estandarización y costosa implementación en laboratorios asistenciales; quedando limitadas casi exclusivamente a centros de investigación, al menos en nuestro medio.

Las técnicas rápidas y de bajo costo representan una ayuda real en el diagnóstico de EFI. Así, la inmunocromatografía conocida como LFD ha demostrado un buen rendimiento en el diagnóstico de criptococosis, y ahora, en el diagnóstico de AI. En este sentido, al realizar un análisis de los costos aproximados comparando *Aspergillus*-LFD y GM-EIA, el primero aventaja con creces al antiguo inmunoensayo enzimático en cuanto a tiempo de trabajo, equipamiento necesario y costos asociados; siendo éstos de casi un tercio (Tabla 1).

En un estudio en que se evaluaron 529 muestras de sueros, se comunicó que *Aspergillus*-LFD presentó una especificidad de 98%, similar a la RPC (96,6%) y levemente superior a GM-EIA (91,5%). En cuanto a la sensibilidad, *Aspergillus*-LFD presentó un 81,8%; siendo inferior que la RPC (95,5%), pero mejor que GM-EIA (77,3%)<sup>11</sup>. Nuestros resultados corroboran lo demostrado anteriormente, demostrando la mayor especificidad de *Aspergillus*-LFD (100%) sobre GM-EIA (83%); discriminando la presencia de antígenos de *Fusarium* de los de *Aspergillus* en la muestra de reacción cruzada. La sensibilidad para ambos métodos fue de 100% en el presente estudio.

En términos generales, podemos concluir la ventaja que significa el uso de *Aspergillus*-LFD en el diagnóstico de la AI con respecto a GM-EIA. La inmunocromatografía aquí ensayada, demostró ser altamente sensible y específica en sueros y LBA de pacientes con AI; superando a la detección de GM, permitiendo diferenciar una fusariosis de una aspergilosis. Asimismo, *Aspergillus*-LFD es una técnica fácil y rápida, pudiendo ser realizada por personal de laboratorio sin entrenamiento específico. La duración del método es de sólo 20 min, contrastando con los 240 min necesarios para GM-EIA. Otro factor a destacar, es el bajo costo del nuevo LFD, representando

obtener un resultado positivo en 29 de ellas (sueros y LBA). Al evaluarse los sueros con *Aspergillus*-LFD se obtuvo una correlación de 100%. No obstante, en una de las muestras evaluadas fue posible observar una débil reacción con *Aspergillus*-LFD. Dicha muestra obtuvo un índice de 0,58 en la prueba de GM. Según lo anterior, hubo una sensibilidad y especificidad de 100% para *Aspergillus*-LFD; superando a la especificidad mostrada por GM-EIA en el presente estudio (83%).

Adicionalmente, y con el objetivo de evaluar una posible reacción cruzada con otros hongos filamentosos, se evaluó una muestra de suero



casi un tercio del valor de una determinación de GM. Además, requiere una escasa implementación de equipos. Dado lo anteriormente expuesto, *Aspergillus*-LFD se perfila como la prueba de diagnóstico de AI de rutina para cualquier laboratorio de nuestro país, no siendo necesario invertir en entrenamiento de personal, equipos ni tiempo de trabajo.

A pesar del excelente rendimiento de *Aspergillus*-LFD demostrado, son necesarios nuevos estudios para evaluar un mayor número de muestras y así determinar con mayor certeza los resultados y aplicabilidad de la prueba en el diagnóstico temprano de la AI.

*Agradecimientos:* A OLM y G. McGonnell por la distribución del kit *Aspergillus*-LFD. A las Dras. Estibaliz Mateo y Valentina Salas por la revisión del manuscrito.

## Referencias bibliográficas

- 1.- Kurosawa M, Yonezumi M, Hashino S, Tanaka J, Nishio M, Kaneda M, et al. Epidemiology and treatment outcome of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies. *Int J Hematol* 2012; 96: 748-57.
- 2.- Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, Verschakelen J, Lagrou K, Verbeken E, et al. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1242-50.
- 3.- Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge R J, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 199-205.
- 4.- Pfeiffer C D, Fine J P, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1417-27.
- 5.- von Eiff M, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zuhlsdorf M, van de Loo J. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration* 1995; 62:341-7.
- 6.- Leeflang M M, Debets-Ossenkopp Y J, Visser C E, Scholten R J, Hooft L, Bijlmer H A, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 4:CD007394.
- 7.- Thornton C R. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15:1095-105.
- 8.- Wiederhold N P, Thornton C R, Najvar L K, Kirkpatrick W R, Bocanegra R, Patterson TF. Comparison of lateral flow technology and galactomannan and (1-3)-betaD-glucan assays for detection of invasive pulmonary aspergillosis. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16:1844-6.
- 9.- Wiederhold N P, Najvar L K, Bocanegra R, Kirkpatrick W R, Patterson T F, Thornton C R. Interlaboratory and interstudy reproducibility of a novel lateral-flow device and influence of antifungal therapy on detection of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 459-65.
- 10.- Hoenigl M, Koidl C, Duettmann W, Seeber K, Wagner J, Buzina W, et al. Bronchoalveolar lavage lateral-flow device test for invasive pulmonary aspergillosis diagnosis in haematological malignancy and solid organ transplant patients. *J Infect* 2012; 65: 588-91.
- 11.- White P L, Parr C, Thornton C, Barnes R A. Evaluation of real-time PCR, galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and a novel lateral-flow device for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1510-6.