

Actualización diagnóstica y terapéutica en infecciones fúngicas invasoras: de los antiguos tópicos a las nuevas evidencias

C. P. GALLEGO LUQUE, J. DE LA TORRE CISNEROS

Sección de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Resumen

En las últimas décadas se ha visto incrementado el número de individuos inmunocomprometidos, y por tanto, con riesgo elevado para desarrollar infecciones fúngicas tanto superficiales como invasoras. De la misma manera han surgido nuevos agentes patógenos considerados previamente como colonizadores y ha aumentado la incidencia de hongos oportunistas infrecuentes como *Fusarium sp.*, *Acremonium sp.*, *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium prolificans* y *Paecilomyces sp.* La dificultad para establecer un diagnóstico de certeza en las infecciones fúngicas invasoras ha condicionado el desarrollo de alternativas diagnósticas como la micoserología, la detección antigénica y las técnicas de biología molecular. El tratamiento del paciente con infección fúngica invasora incluye no sólo el tratamiento antimicótico de acuerdo con las pautas clínicas establecidas para el patógeno aislado, sino la reconstitución inmunológica tanto con citocinas estimuladoras de colonias granulomonocitarias como con transfusiones de granulocitos y drenaje quirúrgico cuando sean necesario. La mayoría de los regímenes terapéuticos incluyen fluconazol y anfotericina B. La terapia empírica con anfotericina B no está exenta de efectos adversos, y así, las formulaciones lipídicas de la anfotericina B, en especial la anfotericina B liposomal, disminuye el riesgo de nefrotoxicidad y permite incrementar la dosis administrada. Se observan crecientes resistencias tanto a fluconazol, en el caso de *Candida non-albicans*, como a la anfotericina B, sobre todo en estos nuevos patógenos, lo que hace necesarios nuevos antifúngicos eficaces y seguros, entre los que los derivados triazólicos de tercera generación como ravuconazol, posaconazol y voriconazol parecen ofrecer un futuro prometedor.

Palabras clave: Infección fúngica. Diagnóstico. Tratamiento. Anfotericina. Azoles.

Summary

During the last decades the number of immuno-compromised—and therefore with a high risk for fungal infection, both super-

Recibido: 18-06-2001

Aceptado: 26-09-2001

Correspondencia: Julián de la Torre Cisneros. Sección de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Reina Sofía. Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14004 Córdoba. E-mail: jtorre@sofia.hrs.sas.cica.es

ficial and invasive—individuals has increased. Similarly, new pathogens have emerged that were previously considered merely colonisers, and the incidence of uncommon opportunistic fungi such as *Fusarium sp.*, *Acremonium sp.*, *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium prolificans*, and *Paecilomyces sp.* has increased. Difficulties to establish definitive diagnosis in invasive fungal infection have led to the development of diagnostic alternatives such as mycose-rology, antigen detection, and molecular biology techniques. Management of patients with invasive fungal infection not only includes anti-fungal therapy according to clinical regimens defined for isolated pathogens, but also immune recovery both with granulocyte colony stimulating cytokines and granulocyte transfusion, as well as surgical drainage if needed. Most therapy regimens include fluconazole and amphotericin B. Empirical therapy using amphotericin B is not free from adverse effects; thus, lipidic amphotericin B formulations, particularly liposomal amphotericin B, reduces the risk for nephrotoxicity while allowing administered doses to be increased. Resistance to fluconazole versus non-albicans *Candida sp.* is increasingly seen, as well as resistance to amphotericin B particularly versus new pathogens. This makes the development of new effective and safe antifungals a need; among these third-generation triazole derivatives—ravuconazole, posaconazole, voriconazole—seem to offer a promising future.

Key words: Fungal infection. Diagnosis. Treatment. Amphotericin. Azoles.

INTRODUCCIÓN

En el mundo desarrollado, los avances médicos y quirúrgicos han permitido que los pacientes infectados por el virus del VIH, los sometidos a trasplante de médula ósea u órgano sólido, y aquellos con profunda neutropenia secundaria a tratamientos quimioterápicos cada vez más agresivos y eficaces, tengan mayor supervivencia y calidad de vida (1,2). Esto supone que el número de pacientes con alteración en la inmunidad celular, y por tanto,

con un riesgo elevado para desarrollar infecciones fúngicas tanto superficiales como invasoras se haya visto incrementado en las últimas décadas. A esto contribuye la mayor longevidad, con el consecuente desarrollo de enfermedades crónicas y/o neoplásicas, los procedimientos diagnósticos y terapéuticos cada vez más agresivos en los pacientes hospitalizados y el empleo de antibioterapia de amplio espectro (2,3).

Aunque en cómputos globales los microorganismos más frecuentes sean *Candida sp.* y *Aspergillus sp.*, están emergiendo nuevos agentes patógenos antes considerados como colonizadores, así como aumentando la incidencia de hongos oportunistas infrecuentes como *Fusarium sp.*, *Acremonium sp.*, *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium sp.*, *Paecilomyces sp.* (4,5). Las importantes dificultades diagnósticas en la enfermedad micótica invasora, sobre todo en el caso de las infecciones originadas por hongos filamentosos, y la incidencia progresivamente ascendente de resistencias a la anfotericina B en estos nuevos patógenos, contribuyen a la creciente morbilidad observada en pacientes inmunocomprometidos, lo que hace necesarios nuevos procedimientos diagnósticos precoces y eficaces, así como el desarrollo de drogas antifúngicas que soslayen esta resistencia creciente a la anfotericina B.

FACTORES PREDISPONENTES PARA INFECCIONES FÚNGICAS INVASORAS

Los pacientes con alteración en la inmunidad celular son más susceptibles a cualquier proceso infeccioso, sin embargo, aquellos patógenos que requieren especialmente de la inmunidad celular para su erradicación, como son los virus y los hongos, tienen una frecuencia significativamente mayor que la observada en individuos inmunocompetentes. Así, la infección por el virus del VIH, la quimioterapia anti-neoplásica o la terapia inmunosupresora necesaria para el mantenimiento del trasplante alogénico al ejercer potentes efectos sobre la inmunidad celular hacen a estos pacientes inmunocomprometidos, más susceptibles a infecciones fúngicas tanto superficiales como invasoras (1). En los pacientes con neoplasias hematológicas se añaden como factores de riesgo para padecer infecciones fúngicas la pancitopenia, la esplenectomía y los defectos en las barreras mucocutáneas. Diversos estudios demuestran que aquellos pacientes con recuento de leucocitos polimorfonucleares (PMN) menores de 100/mm³ tienen un riesgo elevado de sufrir complicaciones potencialmente fatales (fundamentalmente septicemia) especialmente los que tienen recuentos de granulocitos extremadamente bajos durante períodos prolongados (6,7,8).

Amplían el espectro de pacientes inmunocomprometidos con mayor susceptibilidad para el desarrollo de enfermedad fúngica las enfermedades granulomatosas, los procedimientos diagnósticos y terapéuticos cada vez más agresivos en los pacientes hospitalizados, y la

mayor longevidad, con el consecuente desarrollo de enfermedades crónicas como la diabetes o neoplasias subyacentes (2). La hospitalización prolongada, la exposición previa a antimicrobianos que inducen cambios en la flora normal y favorecen el sobrecrecimiento micótico el tratamiento con corticosteroides, la implantación de catéteres venosos centrales, la nutrición parenteral total y la falta de control de la enfermedad subyacente, aumentan la colonización micótica, alteran los mecanismos de defensa del huésped y deben ser reconocidos como fuentes potenciales de complicaciones micóticas, fundamentalmente infección fúngica invasora (9,10,11).

DIAGNÓSTICO

Un diagnóstico temprano permite la instauración de tratamiento apropiado y así prevenir la elevada mortalidad asociada con las infecciones fúngicas en los pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo, sigue siendo muy difícil determinar un diagnóstico preciso de la enfermedad micótica invasora y, tanto la aspergilosis como la candidiasis, continúan siendo demasiado a menudo un hallazgo de necropsia (9,12). Se ha observado evidencia de invasión micótica *post mortem* en un porcentaje que oscila según las series entre el 69% de los pacientes con granulocitopenia prolongada que fallecieron, no encontrándose en la gran mayoría de ellos evidencia de infección micótica *ante mortem* (13). En el esquema clásico de diagnóstico micológico la observación directa junto con el aislamiento del hongo de una muestra que sea representativa del proceso infeccioso, han constituido los pilares fundamentales en que se basa la demostración del agente etiológico. Las dificultades en estas técnicas y en la obtención de un producto patológico adecuado en las micosis profundas e invasoras han condicionado el desarrollo de procedimientos alternativos para poder efectuar un diagnóstico preciso (14).

La micoserología, junto a la clínica, es útil en el diagnóstico de la enfermedad fúngica, no obstante la detección de anticuerpos (Ac) en el paciente inmunocomprometido presenta importantes limitaciones debidas, precisamente, a esa inmunodepresión, por lo que el uso de pruebas serológicas que detecten Ac son más útiles en la enfermedad aguda y sistémica el huésped inmunocompetente. Por ello, la necesidad del desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas se dirige fundamentalmente a las micosis invasoras y diseminadas en el huésped inmunocomprometido, pues es en este tipo de paciente donde el diagnóstico es más urgente, y además, más difícil de realizar. Las técnicas micoserológicas más empleadas han sido: aglutinación, precipitación (inmunodifusión), fijación de complemento y técnicas inmunoenzimáticas (EIA). También se han desarrollado técnicas para detectar antígenos (Ag) en aspergilosis, candidiasis y criptococosis (14,15).

Micosis invasoras causadas por levaduras

El cultivo e identificación de levaduras es relativamente sencillo, dado que crecen en 48-72 horas y existen sistemas automatizados de identificación, no sólo para las levaduras habituales del género *Candida*, sino para otras menos frecuentes como *C.dubliniensis* (recientemente descrita y asociada en la mayoría de los casos a candidiasis orales en pacientes infectados por VIH), así como especies de *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporom*, *Blastoschizomyces*, *Hansenula*, *Saccharomyces* y *Geotrichum* (16,17,18). No obstante, la biopsia, como prueba histológica definitiva, es obligatoria para establecer el papel exacto de las levaduras aisladas en sitios como esputo, lavado bronco alveolar (BAL), fauces y orina, dada la frecuente colonización de estos pacientes inmunocomprometidos por levaduras. La relevancia clínica de los cultivos para levaduras en estas localizaciones, en especial algunas especies como *C. albicans* sigue siendo tema de controversia, dado que se observan resultados falsos positivos y falsos negativos en los cultivos de control. (13,19). Excepto los hemocultivos positivos para levaduras, los otros obtenidos en las localizaciones mencionadas no deben ser considerados prueba definitiva de candidiasis invasora, aunque aproximadamente el 50% de los pacientes con invasión micótica probada por necropsia no tienen ningún hemocultivo positivo *pre mortem* (20). La fungemia relacionada con un catéter, aunque sea positivo un único hemocultivo, no debe ser considerada como un fenómeno transitorio y debe hacer sospechar una candidiasis invasora en un paciente granulocitopénico y por tanto siempre se debe administrar tratamiento específico a estos pacientes.

Ha suscitado gran interés el desarrollo de pruebas serológicas para el diagnóstico de la candidiasis diseminada (CD) dada la falta de especificidad clínica en los enfermos inmunocomprometidos, así como la frecuente negatividad de los hemocultivos, como ya hemos comentado. Sin embargo, la detección de anticuerpos en pacientes con CD tiene como principales limitaciones la respuesta tardía, reducida o ausente en el huésped inmunocomprometido y la existencia de títulos mayores en los pacientes colonizados respecto a los afectos de CD. Así, en la CD se considera como un índice de recuperación el desarrollo de anticuerpos, y la falta de los mismos como indicativo de mal pronóstico. La detección de anticuerpos antimicelio, recientemente desarrollada, parece prometedora en pacientes con CD, aunque todavía está en fase de experimentación (21,22).

La detección antigénica presenta también importantes limitaciones: a) mediante aglutinación en látex pueden presentarse falsos positivos con el factor reumatoide y falsos negativos cuando la CD es producida por especies diferentes de *C. albicans* (23); b) en el caso de antígeno componente de pared manoproteína o manano, determinado por EIA, la circulación de los mismos cuando existe

CD es muy irregular y transitoria (24) y c) la aglutinación látex pasiva desarrollada por Bailey presenta una sensibilidad según el autor de 81% en CD, pero sin poder diferenciar la CD de otras situaciones clínicas como la candidemia transitoria (25). La determinación de enolasa, la cual se detecta mediante un inmunoensayo "liposomal Sandwich-type", presenta una sensibilidad en CD según Walsh del 85%, pero es necesario realizar la prueba en varias muestras y además esta enzima no es producida por *C.glabrata* (26). La detección de D-arabinitol, que es producido por la mayoría de las especies del género *Candida*, no permite distinguir aquellos pacientes fuertemente colonizados de los que tiene CD (27). En fase todavía experimental, como determinante de patogenicidad que favorece la invasión, se encuentra la determinación de la proteasa ácida que produce *C.albicans*, así como la determinación del antígeno 47kDA, un subcomponente de una de las proteínas de shock térmico (*Heat shock protein*), ampliamente estudiado mediante inmunoblotting, y presente en el suero en la mayoría de los casos de CD (17,26). Ninguna de estas pruebas, como podemos observar, ofrece garantías diagnósticas, por lo que es necesario el desarrollo de técnicas rápidas y eficaces que permitan un diagnóstico precoz y la diferenciación de colonización frente a verdadera infección invasora.

Micosis invasoras causadas por hongos filamentosos

Los hongos filamentosos pueden tardar en crecer 7-15 días y aquellos productores de micosis en pacientes inmunocomprometidos deben ser evaluados cuidadosamente en el cultivo. Al formar parte de la microflora habitual existente en el medio ambiente, la presencia de alguna colonia en la placa puede no ser significativa de agente etiológico, sino tratarse de una contaminación. Además, si la muestra procede de esputo, el crecimiento de algún hongo oportunista, fundamentalmente *Aspergillus fumigatus*, puede indicar sólo colonización de tracto respiratorio y, en algunas ocasiones, sería necesario confirmar su aislamiento al menos tres veces en cultivo puro y con la presencia de más de una colonia (28). No obstante, el aislamiento en secreciones respiratorias o BAL de especies de *Aspergillus* en pacientes granulocitopénicos febriles debe bastar para iniciar tratamiento antimicótico, dado que mejora el pronóstico de los pacientes con aspergilosis invasora (AI), en espera de la realización de pruebas adicionales que confirmen el diagnóstico. La realización de cultivos de control en pacientes de alto riesgo afebriles para detectar colonización nasal por especies de *Aspergillus* sigue siendo controvertido (29). Un aspecto clínico a tener en cuenta para un diagnóstico precoz es que en un grupo no despreciable de casos, las lesiones cutáneas pueden ser la primera manifestación clínica de micosis invasoras, y no sólo indicar infección superficial, fundamentalmente

en los casos producidos por *Fusarium* y *Paecilomyces lilacinus* (8).

Como podemos ver, la enfermedad invasora causada por *Aspergillus sp* presenta especiales dificultades diagnósticas y la enfermedad establecida conlleva una elevadísima mortalidad (30,31). El diagnóstico definitivo de AI sólo puede realizarse tras la obtención de una muestra para biopsia, la demostración de la invasión tisular por hifas, y de forma ideal, el aislamiento concomitante de *Aspergillus sp*. No obstante, la biopsia puede ser negativa hasta en un 20% de los casos de aspergilosis invasora (AI) (31), la fungemia raramente se detecta, especialmente en pacientes que han recibido altas dosis de corticosteroides y, en el caso de la aspergilosis pulmonar invasora (API), el aislamiento de las muestras de BAL tarda demasiado tiempo y la positividad para el cultivo es de aproximadamente del 50-59% en los pacientes con API probada histológicamente (32). Todo esto y la baja sensibilidad de los habituales métodos de cultivo para *Aspergillus* en los pacientes neutropénicos han hecho que se consideren otros métodos que hagan posible un diagnóstico lo más precoz posible.

En el caso de *Aspergillus sp*, la detección de Ac es más eficaz en el diagnóstico de aspergilosis crónica o cuadros alérgicos, y en cambio, la sensibilidad es muy baja en las aspergilosis invasoras, dado que este cuadro lo presentan individuos inmunocomprometidos. Los primeros trabajos en la detección de Ac frente a *Aspergillus* mediante inmunodifusión, fijación de complemento e inmunofluorescencia indirecta, que corresponden a Yong y Bennet, comprobaron que la presencia de Ac en este tipo de pacientes estaba relacionada con la recuperación de la enfermedad, y la falta de los mismos sería, por lo tanto, un índice de gravedad (33).

La detección antigénica de *Aspergillus* mediante la determinación de galactomananos lleva realizándose desde 1979 (34). De las diversas técnicas disponibles la aglutinación pasiva con látex sensibilizado con anticuerpos monoclonales EB-A2 específico frente a galactomano, presenta la ventaja de no existir reactividad cruzada con candidiasis y criptococosis y poseer una especificidad cercana al 86%, no obstante su sensibilidad no es elevada (70%). Recientemente se ha desarrollado una técnica EIA mucho más sensible y específica, con una sensibilidad y especificidad respectivamente del 90 y 84%. En el caso de la detección antigénica de 1,3-β-D glucano, a pesar de una sensibilidad muy elevada, su utilidad en clínica es muy pobre por no diferenciar entre aspergilosis y candidiasis (35). Por lo comentado, la detección antigénica de *Aspergillus* se había descartado previamente a la aparición de técnicas moleculares, por su baja rentabilidad diagnóstica (36). Posiblemente sea para el diagnóstico de AI en pacientes inmunocomprometidos donde mayor número de trabajos basados en técnicas de biología molecular se estén realizando en los últimos años, como lo atestiguan los trabajos realizados por Spreadbury, Tang, Melchers, Einsele y Yamakami donde se

desarrollan técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifican genes no sólo de *A.fumigatus* sino de *A.nidulans*, *A.terreus*, *A.flavus* y *Aspergillus Níger* (37-45). La interpretación de resultados positivos mediante PCR presenta dificultades dado que *Aspergillus sp* puede colonizar cavidades abiertas sin causar ninguna lesión, por lo que las técnicas muy sensibles como la mencionada deben ser cuidadosamente evaluadas. El recientemente desarrollado método de análisis antigénico mediante la determinación de ADN mitocondrial por PCR-ELISA facilita la detección de bajos niveles de antígenos en pacientes en riesgo de AI, no obstante sigue existiendo el problema de diferenciar colonización de verdadera infección. El estudio realizado por Jones y col., describe una sensibilidad de aproximadamente el 100% para enfermedad invasora por *Aspergillus* en muestras de BAL (46). Dado que ninguna técnica parece ser la óptima, se hacen necesarios nuevos estudios, no sólo diseñando nuevos campos de investigación, sino comprobando la sensibilidad y especificidad de pruebas diagnósticas ya conocidas.

TRATAMIENTO ANTIMICÓTICO

Tratamiento antimicótico empírico

Debe sospecharse infección micótica invasora en todo paciente granulocitopénico febril que se mantiene microbiológicamente indocumentado y que no responde a tratamiento antibacteriano empírico de amplio espectro. En estos pacientes debe considerarse el tratamiento antimicótico empírico, y esta actitud es especialmente beneficiosa en los que tienen una granulocitopenia profunda y prolongada, los que tienen un sitio clínicamente documentado de infección (por ejemplo esofagitis o infiltrado pulmonar) o los que no recibieron profilaxis antimicótica previa. El tratamiento antimicrobiano empírico en los pacientes granulocitopénicos febriles con cáncer ha reducido la morbimortalidad infecciosa, sin embargo, los cambios en los microorganismos responsables de la infección, los huéspedes susceptibles a ellos y los agentes antimicrobianos y modificadores de la respuesta biológica disponibles para tratarlos, han expandido el uso del tratamiento empírico y han llevado a la necesidad de una continua evaluación y revisión (47).

El manejo antimicrobiano empírico se formuló en un principio para los pacientes con leucemia aguda (48). No obstante, el tratamiento antineoplásico moderno y los regímenes de transplante de médula ósea u órgano sólido, vuelven a los pacientes con neoplasias hematológicas diferentes a la leucemia aguda, con tumores sólidos, y transplantados, tan granulocitopénicos como los pacientes con leucemia, por lo cual se deben extender los principios del tratamiento empírico a una población siempre creciente de pacientes (49-51). Aunque el tratamiento empírico se concentró inicialmente en la prevención de

una muerte por una infección bacteriana no diagnosticada, los pacientes que se mantienen granulocitopénicos por periodos prolongados corren el riesgo de segundas infecciones e infecciones múltiples, particularmente por micosis invasoras (48). La menor capacidad de respuesta inflamatoria de estos pacientes puede enmascarar los signos y síntomas habituales de infección (10), lo que se corrobora por la elevada frecuencia hallada en algunos estudios de invasión micótica *post mortem* en los pacientes con granulocitopenia prolongada que fallecieron la mayoría sin evidencia de infección *ante mortem* (13). La mortalidad excesiva relacionada con estas infecciones ha promovido el tratamiento antimicótico empírico en algunos pacientes de alto riesgo, ponderándose el riesgo de toxicidad asociada al uso de estos antimicóticos. En general, también se ha utilizado el tratamiento antimicrobiano empírico para los pacientes con sitios clínicamente definidos de infección cuando los riesgos de establecer un diagnóstico microbiológico definitivo mediante un procedimiento invasor parecen prohibitivos (49-51). Por todo esto, el tratamiento empírico en el huésped inmunocomprometido es multifacético y evolutivo en su formulación y aplicación.

El fundamento para el uso empírico de un compuesto antimicótico se basa en tres pilares fundamentales: a) la dificultad para el diagnóstico *ante mortem* de enfermedad micótica diseminada en el huésped inmunocomprometido; b) la falta de administración del tratamiento antimicótico hasta el establecimiento de un diagnóstico definitivo empeora considerablemente el pronóstico; y c) éste mejora favorablemente con la instauración temprana de un tratamiento eficaz. Además es posible identificar a los pacientes que tienen un riesgo muy alto para el desarrollo de una micosis invasora (52). Los pacientes neutropénicos que se mantienen febriles a pesar de 4-7 días de tratamiento con antibioterapia de amplio espectro son particularmente propensos a la enfermedad micótica; así, el uso de tratamiento antimicótico empírico perseguiría un doble beneficio, la supresión del sobrecrecimiento micótico que acompaña siempre a los antibióticos de amplio espectro y el tratamiento temprano de la enfermedad micótica localizada subclínica (53,54). El apoyo para la institución empírica de tratamiento antimicótico proviene de los estudios de Burke y Stein (55); ambos estudios comunicaron una reducción de las muertes debidas a micosis invasivas con relación a los grupos controles históricos. Los estudios realizados en el *National Cancer Institute* y en la *European Organization for Research in the Treatment of Cancer* (EORTC), han demostrado que el tratamiento antimicótico empírico con anfotericina B puede disminuir la incidencia de micosis invasiva, especialmente por *Candida sp* (53). Sin embargo, la toxicidad por anfotericina B (AB), unida a que puede ocurrir infección por *Aspergillus* cuando el paciente está recibiendo la dosis habitual empírica de 0,5-0,6 mg/kg/día, hacen necesarias alternativas más seguras, tolerables y eficaces que la anfotericina B (56).

Las formulaciones lipídicas (AB complejo lipídico, AB colesterol sulfato y AB liposomal) tienen muchas ventajas respecto a la anfotericina B convencional, que incluyen menos efectos adversos, fundamentalmente respecto a la nefrotoxicidad, la posibilidad del incremento de la dosis diaria de la droga parenteral de hasta 10 veces y alcanzar altas concentraciones titulares en los órganos dianas (57-59). No obstante, la superioridad en cuanto a eficacia clínica respecto a la anfotericina B convencional o entre ellas no ha sido establecida, y son substancialmente más caras. Teniendo en cuenta el aumento en el número de pacientes sometidos a trasplante y que reciben terapia inmunosupresora que es potencialmente nefrotóxica, y que en la mayoría de los pacientes inmunocomprometidos se hace necesario el uso combinado de antimicrobianos, algunos de ellos también nefrotóxicos como los aminoglucósidos, muchos clínicos se decantan por el uso de formulaciones lipídicas de la AB. Dada esta importante ventaja en cuanto a la nefrotoxicidad, el uso de formulaciones lipídicas, como la AB liposomal (probablemente la menos nefrotóxica), parecería plenamente justificado en las situaciones clínicas que requieran el uso concomitante de otros fármacos nefrotóxicos (aminoglucósidos, ciclosporina A...) o en el caso de afectación conocida de la función renal. Recientemente la *Food and Drug Administration* (FDA) ha aprobado el uso de la formulación liposomal de la Anfotericina B en pacientes con enfermedad micótica sistémica (fundamentalmente AI) cuando ésta es refractaria al tratamiento con Anfotericina B convencional o no es tolerada; tal y como se define a continuación: (1) Cuando se desarrolla disfunción renal (creatinina sérica >2,5 mg/dL) durante la terapia antifúngica; (2) existen efectos adversos graves o persistentes en relación con la infusión endovenosa; y (3) en el caso de progresión de la enfermedad tras la administración de 500 mg o más de la dosis total de anfotericina B convencional. También se ha aprobado el uso de AB liposomal como terapia empírica para los pacientes neutropénicos que tienen fiebre persistente a pesar de tratamiento antibioterápico de amplio espectro, indicación realizada sobre la base del estudio prospectivo realizado por Walsh en 1999, donde se demuestra que la AB liposomal (Ambisome) a dosis de 3 mg/kg/día es tan eficaz como la AB convencional (0,6 mg/kg/día) en el tratamiento empírico de pacientes neutropénicos con fiebre, pero con menos infecciones fúngicas emergentes durante el tratamiento, menos toxicidad aguda relacionada con la infusión intravenosa y con menos nefrotoxicidad (59). En los pacientes que requieren tratamiento con AB por enfermedad fúngica sistémica probable o probada pero con disfunción renal previa (creatinina sérica >2,5mg/dL), la mayoría de los expertos en enfermedades infecciosas se decantan por las formulaciones lipídicas de la AB como terapia inicial. Para la mayoría de los pacientes con candidiasis sistémica, criptococosis y micosis endémicas (blastomycosis, histoplasmosis, coccidiomycosis y paracoccidiomycosis) el tratamiento inicial con formulaciones

lipídicas de la AB no está justificado. En estos pacientes el tratamiento inicial de elección sería la AB convencional o un derivado azólico.

Se han evaluado drogas azólicas como el ketoconazol, fluconazol y el itraconazol, pero ninguno de estos derivados azólicos es sustituto claro de la anfotericina B (54,60). La resistencia de los patógenos fúngicos (especialmente de especies de *Candida*) a fluconazol está incrementándose progresivamente (61). Diversos estudios epidemiológicos han correlacionado la frecuencia incrementada de infecciones por especies de *Candida non-albicans* que a menudo son resistentes a fluconazol, con esta tendencia al alza en la resistencia a este derivado azólico (62,63), a lo que se añade un aumento de la resistencia a fluconazol por parte de *C.albicans* en los pacientes con SIDA y candidiasis orofaríngea, especialmente aquellos con historia previa de exposición prolongada a fluconazol (60). Además, se observa un incremento de infecciones micóticas invasoras por hongos filamentosos resistentes a la anfotericina B, entre los que se encuentran *Scedosporium apiospermum*, *S.prolificans*, *Fusarium sp* y *Aspergillus terreae*. Por todo lo comentado, se necesitan nuevos antimicóticos como alternativas más eficaces, tolerables y seguras. Los derivados triazólicos de tercera generación como ravuconazol, posaconazol y voriconazol parecen poseer una mayor potencia antifúngica sobre hongos filamentosos y dimórficos, fundamentalmente frente aquellos considerados con infrecuentes como *Fusarium sp*, *Acremonium sp.* y *Scedosporium sp*, entre otros (5,64-66). Así, los ensayos que se realizan en la actualidad con estos nuevos derivados azólicos podrían abrir nuevos horizontes en cuanto a un tratamiento antimicótico empírico eficaz y con menores efectos adversos.

Las indicaciones para el tratamiento antimicótico empírico incluyen los pacientes neutropénicos febriles o que tienen recurrencia de la fiebre a pesar de haber recibido antibioterapia de amplio espectro durante una semana. La duración óptima del tratamiento se basa en la experiencia del clínico, teniendo en cuenta que en los pacientes que permanecen neutropénicos, el tratamiento antimicótico debe continuar hasta la resolución de la granulocitopenia. La persistencia o recurrencia de la fiebre debe conducir a investigar causas infecciosas no micóticas como sobreinfección bacteriana o viral.

Tratamiento antifúngico con etiología conocida

Los pacientes con infección micótica documentada deben ser tratados acorde con las pautas clínicas establecidas para el patógeno aislado (Tablas I y II), junto con terapias encaminadas a la reconstitución inmunológica cuando sea posible, y tratamiento quirúrgico en determinadas situaciones clínicas. Diversos estudios destacan la capacidad de ciertas citocinas, entre la que se encuentra

el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CFS), no sólo de proteger a los pacientes de infecciones fúngicas invasoras mediante la recuperación acelerada de la neutropenia, sino de tener efecto sinérgico con determinados antifúngicos como fluconazol, voriconazol, posaconazol y anfotericina B (67). No obstante, no parece ser útil en los casos de inmunosupresión debida a corticosteroides y existen por ahora pocos datos clínicos que apoyen la eficacia de G-CFS, si exceptuamos algunos casos aportados en la literatura mostrando buenos resultados con la combinación de G-CFS y la terapia antifúngica para el control de la enfermedad micótica invasora, y los escasos estudios randomizados realizados por Avilés, Heil y Kullberg que examinan el efecto de GCFS en pacientes inmunocomprometidos con neoplasias hematológicas y en pacientes no neutropénicos, tanto como tratamiento como de forma preventiva (68-70).

In vitro se observa sinergismo entre G-CFS y voriconazol frente a *A.fumigatus* cuando se añade a cultivo de PMN. Tanto G-CFS como el factor estimulador de colonias granulomonocitarias (GM-CFS) estimulan la colaboración entre PMN para destruir candidas e incrementan la capacidad destructiva mediada por los PMN para eliminar las hifas de *A.fumigatus*, en sinergismo con voriconazol y con fluconazol (71). La incubación de fagocitos con G-CFS y GM-CFS incrementa la actividad candidicida, y fluconazol exhibe un efecto sinérgico con estas citocinas (72). Los resultados *in vivo* de los efectos combinados de G-CFS y los agentes antifúngicos son dispares, más complicados de interpretar y parecen depender del *status* del sistema inmunológico. En un reciente modelo murino de aspergilosis, mientras G-CFS no ofrecía protección frente al desarrollo de aspergilosis en los ratones tratados con corticosteroides, sí se demostró eficaz en combinación con itraconazol. En ratones tratados con ciclofosfamida, G-CFS parece ofrecer protección frente a CD, incluso sin tratamiento antifúngico simultáneo. Cuando se combina con agentes antifúngicos se observa sinergismo con anfotericina B y con itraconazol a altas dosis, pero no con fluorocitosina. La combinación de G-CFS con anfotericina B, fluconazol e itraconazol tienen efectos sinérgicos en caso de candidiasis. También se ha observado este efecto recientemente entre posaconazol y G-CFS en pacientes neutropénicos con aspergilosis. En cambio, en pacientes pretratados con corticosteroides. G-CFS antagoniza de forma importante la actividad antifúngica de posaconazol (67,73,74). Estos hallazgos parecen sugerir que la combinación entre G-CFS y un antifúngico puede ser sinérgica, indiferente o antagonista, dependiendo de factores subyacentes no bien establecidos. En un reciente ensayo randomizado donde se administra simultáneamente fluconazol y G-CFS a pacientes no neutropénicos con CD, se observa que no existen diferencias significativas en la supervivencia entre los tratados en combinación y los que sólo recibieron fluconazol, en cambio el curso clínico es más favorable en los que sus recuentos

Tabla I. Pautas de tratamiento en infecciones causadas por hongos filamentosos

Hongo filamentosos	Tratamiento	Tratamiento alternativo
<i>Aspergillus sp</i> - <i>A.fumigatus</i> - <i>A.niger</i> - <i>A.flavus</i> - <i>A.terreus</i>	Anfotericina B (1-1,5 mg/kg/d) o formulaciones lipídicas de la AB (5 mg/kg/d).	Itraconazol 200-600 mg/día ^a Derivados triazólicos de tercera generación.*
<i>Fusarium sp</i> - <i>F.solani</i> - <i>F.oxysporum</i> - <i>F.moniliforme</i>	Anfotericina B (1-1,5 mg/kg/d) o formulaciones lipídicas de la AB (5 mg/kg/d).	Derivados triazólicos de tercera generación ^a
<i>Acremonium sp</i>	Anfotericina B (1-1,5 mg/kg/d) o formulaciones lipídicas de la AB (5 mg/kg/d).	Derivados triazólicos de tercera generación ^a
<i>Paecilomyces sp</i> - <i>P.variotii</i> - <i>P.lilacinus</i>	Anfotericina B (1-1,5 mg/kg/d) o formulaciones lipídicas de la AB (5 mg/kg/d) (de primera elección para <i>P.lilacinus</i>).	Itraconazol 200-600 mg/día ^a (sólo <i>P.variotii</i>) Derivados triazólicos de tercera generación ^a
<i>Pseudallescheria boydii</i> y <i>Scedosporium apiospermum</i>	Anfotericina B (1-1,5 mg/kg/d) o formulaciones lipídicas de la AB (5 mg/kg/d).	Itraconazol 200-600 mg/día ^a Derivados triazólicos de tercera generación ^a
<i>Scedosporium prolificans</i>		
<i>Trichoderma</i> - <i>T.longibrachiatum</i>	Anfotericina B (1-1,5 mg/kg/d) o formulaciones lipídicas de la AB (5 mg/kg/d).	Derivados triazólicos de tercera generación ^a
<i>Scopulariopsis</i> - <i>S.brevicaulis</i>	Anfotericina B (1-1,5 mg/kg/d) o formulaciones lipídicas de la AB (5 mg/kg/d)	Derivados triazólicos de tercera generación ^a
Infecciones profundas por dermatofitos - <i>Trichophyton sp</i> - <i>Miaosporon sp</i> - <i>Epidermophyton sp</i>	Fluconazol 400 mg/día o Itraconazol 200-400 mg/día o Terbinafina 250 mg/día.	

^aIncluidos ravuconazol, posaconazol y voriconazol. En investigación.

*Se recomienda la monitorización de los niveles séricos. Máximo 600 mg/día. Tratamiento intravenoso: 200 mg/12 horas seguido de 200 mg/día, máximo 14 días.

de PMN eran mayores. Por otra parte, aunque teóricamente G-CFS sólo es útil cuando existe neutropenia, reduciendo la duración e intensidad de la misma, los hallazgos de Kullberg y cols. muestran que el tratamiento con G-CFS en ratones no neutropénicos ayuda en la resolución de la candidiasis diseminada (67,70). En el estudio de Polak-Wyss, el tratamiento con G-CFS protegía a ratones tratados con ciclofosfamida y a ratones inmunocompetentes frente a aspergilosis y candidiasis, y sólo combinado con un derivado azólico en ratones pretratados con corticoides (73,74). Basándonos en todos estos estudios, la administración de estas citocinas parece proteger de la infección fúngica invasora, tanto acortando los periodos de neutropenia, como incrementando la actividad antifúngica de estas células.

Debe valorarse el drenaje y desbridamiento en el caso de lesiones focales causadas por levaduras, cuando hay enfermedad invasora por hongos filamentosos con origen en senos paranasales, y en el caso de lesiones dérmicas o de tejido celular subcutáneo cuando la escisión completa no es posible. Además, es necesario retirar cualquier material protésico potencialmente infectado y los catéteres venosos centrales en el caso de fungemia, ya sea por levaduras o por hongos filamentosos. En el caso de API las indicaciones de resección pulmonar son las siguientes: a) riesgo elevado de hemoptisis masiva en API que amenaza la integridad de la arteria pulmonar; b) para reducir masa residual de *Aspergillus* antes de un nuevo tratamiento mieloablativo, y c) biopsia pulmonar a cielo abierto para confirmar el diagnóstico de API (5,75).

Tabla II. Pautas de tratamiento en infecciones causadas por levaduras

Hongo levaduriforme	Tratamiento	Tratamiento alternativo
<i>Candida sp</i>	Fluconazol (400-800 mg/d) (no en <i>C.Krusei</i>) o AB (21 mg/kg/d) o formulaciones lipídicas de la AB. ^a	Derivados triazólicos de tercera generación ^b
<i>Trichosporum sp</i>	Fluconazol (400-800mg/d) ±AB (≥1 mg/kg/d).*	Derivados triazólicos de tercera generación ^b
<i>Blastoschizomyces sp</i>	Fluconazol (400-800 mg/d) ±AB (≥1 mg/kg/d) ^a	Derivados triazólicos de tercera generación ^b
<i>Malassezia sp</i>	AB (0,5-1 mg/kg/d) o formulaciones lipídicas de la AB (5 mg/kg/d) ^d o fluconazol (400-800 mg/d).	
Otras infecciones por levaduras raras - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - <i>H.anomala</i> - <i>C.laurentii</i>	Anfotericina B (0,5-1 mg/kg/d) ±5-fluorocitosina(100 mg/kg/d) ^c o formulaciones lipídicas de la AB (5 mg/kg/d) ^d	Fluconazol (400-800 mg/d) o derivados triazólicos de tercera generación ^b

^a En combinación con fluconazol en pacientes neutropénicos.

^b Incluidos ravuconazol, posaconazol y voriconazol. En investigación.

^c Necesaria la monitorización de niveles séricos.

^d En pacientes que no toleren la AB.

Las transfusiones de neutrófilos han sido considerados como una aproximación lógica al tratamiento de infecciones fúngicas en pacientes con neutropenia prolongada o defectos intrínsecos de la función de los mismos, y llevan ensayándose desde hace más de 65 años. No obstante, disponemos en la literatura de pocos estudios que avalen este tipo de terapia aplicada a infecciones fúngicas, sólo algunas pequeñas series de pacientes cuyos resultados deben ser evaluados cuidadosamente, dado que la mayoría de enfermos a los que se les transfundió con granulocitos procedentes de un donante tenían un pronóstico *a priori* pobre. Además, con los separadores celulares actuales se obtienen de 1 a 3×10^{10} granulocitos, siempre que los donantes sean premedicados con corticoides, dosis que se ha demostrado insuficiente. Por esto y por no estar exenta de reacciones adversas fundamentalmente pulmonares, esta terapia decayó a partir de la década de los 80. El uso combinado de G-CFS a dosis de 450-600 µg subcutáneo en dosis única junto con 8 mg de dexametasona vía oral doce horas antes de la recolección de neutrófilos del donante permite obtener $8+2,3 \times 10^{10}$ granulocitos funcionalmente activos. La administración de G-CFS a individuos sanos parece ser segura y bien tolerada, siendo los efectos adversos más frecuentemente encontrados artromialgias y cefalea. A pesar de que parece ser un tratamiento seguro para el donante sano, la eficacia clínica del tratamiento de individuos neutropénicos con transfusiones de granulocitos obtenidos mediante este tipo de estimulación no ha sido claramente establecida y son necesarios ensayos clínicos controlados para establecer el papel exacto de esta terapia en las infecciones fúngicas. Por otra, parte podemos encontrarnos con el desarrollo de

aloimmunización o de enfermedad de injerto contra huésped como potenciales complicaciones. La aloimmunización secundaria a la terapia con transfusión de granulocitos parece ser sólo un obstáculo en individuos con alteraciones en la función de los PMN, como por ejemplo en las enfermedades granulomatosas crónicas. En cambio, en pacientes que han recibido trasplante de células madres hematopoyéticas, si previamente han recibido granulocitos estimulados con G-CFS procedentes de donantes incompatibles, sufren disminución de las cifras de leucocitos e incremento del número de días con fiebre, y que requieren por tanto tratamiento antibiótico. Por lo comentado, no debe considerarse esta terapia como de rutina en el manejo de las complicaciones infecciosas en los pacientes neutropénicos, sino reservarla en el caso de enfermedad fúngica invasora con compromiso vital. (76).

PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN Y PROFILAXIS ANTIMICÓTICA

Entre las medidas para prevenir o reducir la aparición de infección en los pacientes inmunocomprometidos, la más importante identificada es a la vez la más sencilla: las prácticas cuidadosas del lavado de manos. Está bien documentado que aproximadamente un 85% de los microorganismos responsables de las infecciones en estos pacientes derivan de la flora endógena y casi el 50% de éstos se adquieren en el medio hospitalario. Los objetos inanimados del ambiente hospitalario (orificios de canillas, flores de duchas, respiradores, plantas, piso) son reservorios de microorganismos patógenos, sin embargo, la mayoría de

los estudios epidemiológicos sugieren que con la transmisión de estas fuentes inanimadas requiere habitualmente un vector humano, y por lo tanto la intervención más sencilla y más eficaz a la que puede recurrirse es el cumplimiento de las precauciones estrictas para el lavado de manos (77). Se ha recomendado además mantener una dieta de alimentos cocidos en los periodos de granulocitopenia, dado que los alimentos frescos están contaminados naturalmente por bacterias gram negativas. Las fuentes ambientales pueden contribuir a la colonización y la infección micótica (especialmente por especies de *Aspergillus*). Se acepta la hipótesis de que la inhalación de esporas de *Aspergillus*, bien directamente o con colonización previa nasofaríngea puede ser la causante directa de infección pulmonar en pacientes inmunocomprometidos. Recientemente se ha sugerido como nueva fuente transmisión de *Aspergillus* a las conducciones de agua. En los centros en los cuales *Aspergillus* es un problema importante, pueden resultar útiles sistemas especiales de filtración (78). Dado que como ya hemos comentado en los pacientes granulocitopénicos, la severidad y duración de la granulocitopenia es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de micosis invasivas, el reducir la duración y la severidad de esta granulocitopenia se convierte en otra arma preventiva, y esto hace necesario a veces el uso de citocinas estimuladoras de colonias granulocíticas y de macrófagos (67).

Debido a la incidencia creciente de micosis invasoras en los huéspedes inmunocomprometidos, también se ha estudiado la profilaxis antimicótica. La mayoría de los regímenes profilácticos se han dirigido a una reducción de las infecciones invasivas debidas a especies de *Candida*, no teniendo impacto sobre *Aspergillus* (77,79). La profilaxis antimicótica se ha demostrado que produce una disminución en la colonización micótica, especialmente de especies de *Candida*, sin embargo, una menor colonización no implica una disminución de la incidencia de enfermedad micótica invasora (aunque en algunos estudios se ha observado una disminución de la infección superficial), y tanto la terapéutica antimicótica profiláctica como empírica producen un desplazamiento en el patrón de colonización de los microorganismos micóticos, en general hacia hongos más resistentes (80). En el Estudio de Goodman y cols. se ha sugerido que el fluconazol administrado de forma profiláctica en los pacientes sometidos a trasplante de médula ósea podría disminuir la incidencia de infecciones micóticas superficiales e invasivas, sin embargo no previno la infección por *C. Krusei*, y su espectro de actividad no incluye *Aspergi-*

llus ni mucor (81). A esto hay que añadir que la mayoría de los regímenes profilácticos incluyen anfotericina B o fluconazol y en ambas drogas se ha recogido una tendencia creciente de resistencias. Por todo esto hay que valorar cuidadosamente los beneficios potenciales de la instauración de un régimen profiláctico, teniendo en cuenta las posibles toxicidades, qué microorganismos queremos cubrir y el riesgo de selección de microorganismos resistentes.

CONCLUSIONES

Las principales innovaciones en el diagnóstico de las infecciones fúngicas se encaminan fundamentalmente a las micosis invasoras y diseminadas en el huésped inmunocomprometido, donde el diagnóstico es más urgente y más difícil de realizar. Las técnicas de amplificación genómica y la detección de metabolitos fúngicos parecen las técnicas más prometedoras para el diagnóstico de los patógenos más frecuentes en nuestro medio (*Aspergillus sp* y *Candida sp.*). No obstante, hay que soslayar limitaciones, como la baja sensibilidad en algunos casos, y la dificultad para diferenciar colonización de verdadera infección invasora, tanto en aspergilosis como en candidiasis.

El tratamiento antimicótico en los individuos inmunocomprometidos presenta múltiples facetas, dado que además de proporcionarse la droga antifúngica apropiada según el agente etiológico, debe valorarse la reconstitución inmunológica cuando sea posible y el tratamiento quirúrgico siempre que sea necesario. Se ha observado un incremento de patógenos antes considerados como colonizadores, en los que se han comprobado resistencias crecientes a la anfotericina B, fundamentalmente en el caso de los hongos filamentosos. Esto ha hecho necesario el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos más eficaces y además con menor toxicidad que la anfotericina B. En este sentido, tanto la anfotericina B liposomal que ha demostrado una menor nefrotoxicidad a la vez que permite una dosificación mayor, como en un futuro los derivados triazólicos de tercera generación y las equinocandinas, permiten una ampliación del arsenal terapéutico. También se han comunicado resistencias crecientes al fluconazol en especies de *Candida no-albicans*. Por todo lo comentado el tratamiento antifúngico, ya sea empírico, profiláctico o con etiología conocida necesita una continua evaluación y revisión.

Bibliografía

1. Dunn DL. Diagnosis and treatment of oportunist infections in immunocompromised surgical patients. *Am Surg* 2000; 66(2): 117-25.
2. Vartivarian SE, Anaissie EJ, Bodey GP. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis and management. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (Suppl 2): S487S491.
3. Schwartz DA, Bryan RT. Infections disease pathology and emerging infections. Are we prepared? *Arch Pathol Lab Med* 1996; 120: 117-24.
4. Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunistic are coming. *Clin Infect Dis* 1996; 22 (Suppl 2): S112-S118.

5. Groll AH, Walsh TJ. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7 (Suppl. 2): 8-24.
6. Freireich ET, Keating M, Cabanillas F. Leukemia. Lymphoma and myeloma. *Cancer* 1984; 2741-50.
7. Schimpff SC. Therapy of infection in patients with granulocytopenia. *Med Clin North Am* 1978; 61: 1101-18.
8. Klastusky J, Zinner SH, Calandra T and the ORTC International Antimicrobial Cooperation Group. Empiric antimicrobial therapy for the febrile granulocytopenic cancer patients: Lessons from ORTC trials. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24: S35-S45.
9. Richardson MD, Kokki MH. New perspectives in the diagnosis of systemic fungal infections. *Ann Med* 1999; 31(5): 327-35.
10. Sickles EA, Green WH, Wiernik PT. Clinical presentation of infection in granulocytopenic patients. *Arch Intern Med* 1975; 135: 715.
11. Wald A, Leisering W, van Burik J-A, Bowden RA. Epidemiology of Aspergillus infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1997; 175: 1459-66.
12. Sanford GR, Merz WG, Wingard JR. The value of fungal surveillance cultures as predictors of systemic fungal infections. *J Infect Dis* 1980; 142: 503-9.
13. Cho SY, Choi HY. Opportunistic fungal infection among cancer patients. *Am J Clin Pathol* 1979; 72: 617-21.
14. Know-Chung KJ, Benett JE. Laboratory diagnosis: en Medical Mycology, Know-Chung y Benett, Lea y Febinger, London 1992; 44-78.
15. De Repentigny L, Reiss E. Current trends in immunodiagnosis of candidiasis and aspergillosis. *Rev Infect Dis* 1984; 6: 301-2.
16. Sullivan DJ, Westneng TJ, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp.: Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidiasis in VIH infected individuals. *Microbiology* 1995; 141: 1507-21.
17. Rubio-Calvo MC, Ponton J, Rezusta A, Gil J, Benito R. *Candida dubliniensis*, aproximación a su diagnóstico. *Rev Esp Quimioterap* 2000; 13: 107-12.
18. Warren NG, Hazen K. *Candia*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance 1184-1200. In: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover R. *Manual of clinical microbiology* 7th edition. American Society for Microbiology 1999 Washington DC.
19. Kramer BS, Pizzo PA, Robichaud KJ. Role of serial microbiologic surveillance and clinical evaluation in the management of cancer patients with fever and granulocytopenia. *Am J Med* 1982; 72: 561-8.
20. Krick J, Remington J. Opportunistic fungal infections in patients with leukemia and lymphoma. *Clin Hematol*. 1976; 5: 249-310.
21. Rubio-Calvo C, Gil J, Benito R. Novedades en el diagnóstico de las infecciones fúngicas. XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Interna. Aran 2001: 99-108.
22. Ponton J, Quindos G, Arilla MC, Mackenzie DWR. Simplified adsorption method for detection of antibodies to *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 217-19.
23. Gentry LO, Wilkinson L. Latex agglutination test for detection of *Candida* antigen in patients with disseminated disease. *Eur J Clin Microbiol* 1983; 2: 122-28.
24. Nakamura A, Ishikawa N, Suzuki N. Diagnosis of invasive candidiasis by detection of mannan antigen by using the avidin-voitin enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2363-67.
25. Bailey JW, Sada E. Diagnosis of systemic candidiasis by latex agglutination for serum antigen. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 419-432.
26. Walsh TJ, Hathorn JW. Detection of circulating *Candida* enolasa by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis. *N Engl J Med* 1991; 324: 1026-31.
27. Bernard EM, Christiansen KJ. Rate of arabinitol production by pathogenic yeast species. *J Clin Microbiol* 1981; 14: 189-194.
28. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310-350.
29. Denning DW, Evans EGW, Kibbler CC. Guidelines for the investigation of invasive fungal infections in haematological malignancy and solid organ transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 424-36.
30. Denning DW. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 608-15.
31. Crawford SW, Hackman RC, Clark JG. Open lung biopsy diagnosis of diffuse pulmonary infiltrates after marrow transplantation. *Chest* 1998; 94: 949-53.
32. Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of the invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Med* 1996; 100: 171-8.
33. Young RC, Bennett JE. Invasive aspergillosis. *Am Rev Respir Dis* 1971; 104: 710-16.
34. Eiss E, Lehman PF. Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. *Infect Immun* 1979; 25: 357-65.
35. Verweij PE, Stynen D, Rijs JMM, Pauw BB. Sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay compared with Pastored latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1912-14.
36. Andriole VT. *Aspergillus* infection: problems in diagnosis and treatment. *Infect Agent Dis* 1996; 5: 47-54.
37. Hopfer RL, Waldon P. Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. *J Med Vet Mycol* 1003; 31: 65-75.
38. Fujita SI, Hashimoto T, Lasker BA. Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR amplified DNA from *Candida* species in blood. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 962-67.
39. Spreadbury C, Holden DW, Aufauvre-Brown A, Bainbridge BD, Cohen J. Detection of *Aspergillus fumigatus* by PCR. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 615-621.
40. Tang CM, Holden DW. The detection of *Aspergillus* spp. by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 1313-17.
41. Melchers WJG, Verweij PE, van der Hurk P, van Belkum A, de Pauw B, Meiss JF. General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus*. *J Clin Microbiol* 1994; 32, 1710-17.
42. Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, Poron F, Cordonnier C, Vidaud M, et al. Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1164-68.
43. Einsele H, Hebart H, Roller G, Lofler J, Rothenhofer I, Muller A et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1353-60.
44. Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M. PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3619-23.
45. Yamakami Y, Hashimoto A, Yamagata E, Kamberi P, Karashima R, Nagai H et al. Evaluation of PCR for detection of DNA specific for *Aspergillus* species in sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3619-23.
46. Jones ME, Fox AJ, Barnes AJ, Oppenheim BA, Balagopal P, Morgerstern GR et al. PCRELISA for the early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis infection in neutropenic patients. *J Clin Pathol* 1998; 51: 652-6.
47. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP. 1997 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with unexplained fever. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 551-73.
48. Gerson SL, Talbot GH, Hurwitz S, Strom BL, Lusk EJ, Cassileth PA. Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive aspergillosis in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1984; 100: 345-51.
49. Hibberd PL, Rubin RH. Clinical aspects of fungal infection in organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1994; 19 (Suppl 1): S33-S40.
50. Nampoory MRN, Khan ZU, Johnny KV. Invasive fungal infections in renal transplant recipients. *J Infection* 1996; 33: 95-101.
51. Morrison VA, Haake RJ, Weisdorf DJ. Non-candida fungal infections after bone marrow transplantation: risk factors and outcome. *Am J Med* 1994; 96: 497-503.
52. Pizo PA, Robichaud KJ, Gill FA. Empiric antibiotic and antifungal therapy for cancer patients with prolonged fever and granulocytopenia. *Am J Med* 1982; 72: 101-11.
53. EORTC International Antimicrobial Therapy Cooperative Group. Empiric antifungal therapy in granulocytopenic patients. *Am J Med* 1989; 86: 668-72.
54. Walsh TJ, Rubin M, Hathorn J. Amphotericin B vs high-dose ketokonazol for empirical antifungal therapy among febrile, granulocytopenic cancer patients: A prospective, randomized study. *Arch Intern Med* 1991; 151: 765-70.
55. Stein RS, Kayser J, Flexner J. Clinical value of empirical anfotericina B in patients with acute myelogenous leukemia. *Cancer* 1982; 50: 2247-53.

56. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 12 (2): 310-50.
57. Hiemenz JR, Walsh TJ. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. Clin Infect Dis 1996; 22 (Suppl 2): S133-S44.
58. Wong-Beringer A, Jacobs RA, Guglielmo BJ. Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacy and toxicities. Clin Infect Dis 1998; 27: 603-18.
59. Walsh TJ, Finberg RW, Arndt C. Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. N Engl J Med 1999; 340 (10): 764-71.
60. Dismukes WE. Introduction to antifungal drugs. Clin Infect Dis 2000; 30: 653-7.
61. Marr KA, White TC, van Burik J-AH, Bowden RA. Development of fluconazole resistance in *Candida albicans* causing disseminated infection in patient undergoing marrow transplantation. Clin Infect Dis 1997; 25: 908-10.
62. Hoesley C, Dismukes WE. Overview of oral azole drugs as systemic antifungal therapy. Semin Resp Crit Care Med 1997; 18: 301-9.
63. Kauffman CA, Carver PL. Use of azoles for systemic antifungal therapy. Advan Pharmacol 1997; 39: 143-89.
64. Clancy CJ, Nguyen MH. In vitro efficacy and fungicidal activity of voriconazole against *Aspergillus* and *Fusarium* species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17: 573-75.
65. Torre-Cisneros J, González-Ruiz A, Hodges MR and Lutsar I. Voriconazole for the treatment of *S.apiospermum* and *S.prolificans* infection. From 38th Annual Meeting of the Infectious Disease Society of America (IDSA). September 2000; 7-10.
66. Walsh TJ. Amphotericin B resistant filamentous fungi: *Fusarium*, *Pseudoallescheria*, and other tenacious moulds. From 38th Annual Meeting of the Infectious Disease Society of America (IDSA). September 2000; 7-10.
67. Roilides E, Farmaki E. Granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines in antifungal therapy. Clin Microbiol Infect Dis 2001; 7 (Suppl 2): 62-7.
68. Avilés A, Guzmán R, García EL, Talavera A, Díaz-Maqueo JC. Results of a randomized trial of granulocyte colony-stimulating factor in patients with infection and severe granulocytopenia. Anti-cancer Agents 1996; 7: 392-7.
69. Heil G, Hoelzer D, Sanz MA et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study of Filgrastin in remission induction and consolidation therapy for adults with de novo acute myeloid leukaemia. Blood 1997; 90: 4710-18.
70. Kullberg BJ, van de Woude K, Aoun M et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled phase II study of filgrastin (recombinant granulocyte colony-stimulating factor) in combination with fluconazole for treatment of invasive candidiasis and candidemia in nonneutropenic patients (Abstract J-100). In: Program and Abstracts of 38th Interscience Conference Antimicrob Agents Chemother. San Diego CA, 1998.
71. Vora S, Chauhan S, Brummer E, Stevens DA. Activity of voriconazole combined with neutrophils or monocytes against *Aspergillus fumigatus*: effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Antimicrob Agents Chemother 1998;42: 2299-303.
72. Natarajan U, Randhawa N, Brummer E, Stevens DA. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on candidacidal activity of neutrophils, monocytes or monocyted derived macrophages and synergy with fluconazole. J Med Microbiol 1998; 47: 359-63.
73. Polak-Wyss A. Protective effect of human granulocyte colony-stimulating factor on *Cryptococcus* and *Aspergillus* infections in normal and immunosuppressed mice. Mycoses 1991; 34: 205-15.
74. Polak-Wyss A. Protective effect of human granulocyte colony-stimulating factor on *Candida* infections in normal and immunosuppressed mice. Mycoses 1991; 34:109-18.
75. Caillot D, Mannone L, Cuisenier B, Couaillier JF. Role of early diagnosis and aggressive surgery in the management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. Clin Microbiol Infect Dis 2001; 7 (Suppl 2): 54-61.
76. Hubei K, Dale DC, Engert A, Liles WC. Current status of granulocyte (neutrophil) transfusion therapy for infectious disease. J Infect Dis 2001; 183: 321-28.
77. Anaissie E. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: Experience at a cancer center and a review. Clin Infect Dis 1992; 14 (Suppl): S43-s53.
78. Muñoz P, Burillo A, Bouza E. Environmental surveillance and other measures in the prevention of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Infect Dis 2001; 7 (Suppl 2): 38-45.
79. Nemunaitis J. Use the macrophage colony-stimulating factor in the treatment of fungal infections. Clin Infect Dis 1998; 26: 1279-81.
80. Meunier-Carpentier F, Kiehm T, Armstrong D. Fungemia in the immunocompromised host: Changing patterns, antigenemia, high mortality. Am J Med 1981; 71: 363.
81. Goodman JL, Winston DJ, Greenfield RA. A controlled trial of fluconazole to prevent fungal infections in patients undergoing bone marrow transplantation. N Engl J Med 1992; 326: 845-51.