

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

5a.

Microbiología del trasplante

2 0 1 0

Coordinador: José L. Pérez Sáenz

**Autores: Josefina Ayats Ardite
Jesús Fortún Abete
María de Oña Navarro
José L. Pérez Sáenz
Tomàs Pumarola Suñé**



ISBN-978-84-614-7493-6

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. **Introducción**
2. **Cronología y factores de riesgo de la infección en el trasplantado**
 - 2.1. Trasplante de órgano sólido
 - 2.1.1. Factores de riesgo de infección
 - 2.1.2. Desarrollo cronológico de las infecciones en los TOS
 - 2.2. Trasplante de precursores hematopoyéticos (TPH)
 - 2.2.1. Factores de riesgo de infección
 - 2.2.2. Cronología de la infección en el trasplante de progenitores
3. **Evaluación pretrasplante del donante y el receptor**
 - 3.1. Evaluación microbiológica del candidato a trasplante
 - 3.1.1. Infección aguda
 - 3.1.2. Infección crónica o latente
 - 3.2. Evaluación microbiológica del donante
 - 3.2.1. Infección aguda
 - 3.2.2. Infección crónica o latente
4. **Seguimiento postrasplante: monitorización microbiológica**
5. **Diagnóstico microbiológico de las infecciones en el trasplantado**
 - 5.1. Infecciones bacterianas
 - 5.1.1. Diagnóstico de la infección aguda
 - 5.1.2. Diagnóstico de la infección latente y crónica: micobacteriosis
 - 5.1.3. Otros patógenos bacterianos de especial mención (*Nocardia*, *Listeria*, etc.)
 - 5.2. Infecciones fúngicas
 - 5.2.1. Muestras adecuadas
 - 5.2.2. Métodos diagnósticos
 - 5.2.3. Candidiasis
 - 5.2.4. Criptococosis
 - 5.2.5. Aspergilosis
 - 5.2.6. Otros hongos filamentosos de especial interés en los trasplantados
 - 5.2.7. *Pneumocystis jirovecii*
 - 5.3. Infecciones parasitarias
 - 5.3.1. *Toxoplasma gondii*
 - 5.3.2. *Leishmania infantum*
 - 5.3.3. *Plasmodium* spp
 - 5.3.4. *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas)
 - 5.3.5. *Strongyloides stercoralis*
 - 5.3.6. Otras parasitosis intestinales
 - 5.4. Infecciones víricas
 - 5.4.1. Hepatitis víricas
 - 5.4.2. Infecciones por herpesvirus
 - 5.4.3. Infecciones por retrovirus
 - 5.4.4. Virus respiratorios comunes
 - 5.4.5. Poliomavirus: virus JC y BK
6. **Bibliografía**

ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-MTX-01. Antígeno galactomanano (PLATELIA™ *Aspergillus* EIA)
2. PNT-MTX-02. Procedimientos preanalíticos para el diagnóstico de los herpesvirus en los trasplantados

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

5a. MICROBIOLOGÍA DEL TRASPLANTE. 2010

Coordinador: José L. Pérez Sáenz

**Autores: Josefina Ayats Ardite
Jesús Fortún Abete
María de Oña Navarro
José L. Pérez Sáenz
Tomàs Pumarola Suñé**

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han producido grandes avances en todo lo que conocemos como Medicina del Trasplante. Hoy en día se consiguen cifras de supervivencia del injerto y del trasplantado a tres años que superan ampliamente el 75%. Puesto que la funcionalidad del órgano trasplantado mejora progresivamente, y seguirá mejorando, es evidente que los profesionales deben centrar sus esfuerzos en controlar las complicaciones que se producen por la condición de inmunodeprimido de todo paciente trasplantado, entre ellas las infecciones. En este campo también se han producido avances extraordinarios, en concreto en el diagnóstico y prevención, lo que ha reducido significativamente la morbilidad y mortalidad por esta causa. Aún así, la infección sigue constituyendo el factor negativo más importante a corto y medio plazo.

El laboratorio de microbiología clínica desempeña un papel crucial en el diagnóstico y seguimiento de los trasplantados. De hecho, existe una relación mutua muy estrecha y biunívoca entre el desarrollo de un programa de trasplantes en un hospital determinado y el laboratorio que ofrece sus servicios. Por una parte, la existencia de dicho programa condiciona la estrategia, organización interna y utilización de recursos dentro de los servicios de microbiología quienes, a su vez, se benefician enormemente del conocimiento científico y desarrollo generado alrededor del trasplante. Por otra, el hecho de que el programa de trasplante cuente con un laboratorio bien dotado técnicamente va a afectar decisivamente a la calidad final y al éxito de éste.

Por todas estas razones, el laboratorio de microbiología debería ser consultado antes de iniciar nuevos trasplantes. Se debe comprobar su capacitación técnica y adecuarla a las exigencias en caso necesario. En general, cualquier programa de trasplante requiere que el laboratorio disponga de una amplia cartera de servicios de alta calidad en todas las áreas funcionales en que suele estar dividido: bacteriología, micología, virología, parasitología y serología. La oferta diagnóstica debe estar guiada por criterios eminentemente prácticos, en particular por la disponibilidad de técnicas de respuesta rápida, campo en el que también se ha avanzado mucho. La integración del microbiólogo en los equipos multidisciplinares de trasplante será un factor clave para el éxito del trasplante, no sólo por los beneficios directos para el paciente, sino porque sólo así será posible que su oferta diagnóstica se modifique y adapte a un escenario que, necesariamente, es y será cambiante.

En la presente edición de este Procedimiento se revisan los conceptos básicos que influyen a la hora de definir la estrategia a poner en práctica por el laboratorio de microbiología. A continuación se delimitan las líneas generales que deben guiar dicha estrategia general. Por último, se revisan, desde una visión eminentemente práctica, los métodos diagnósticos actuales para los patógenos más importantes por su frecuencia o la gravedad de las infecciones que causan.

2. CRONOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO DE LA INFECCIÓN EN EL TRASPLANTADO

2.1. TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO

2.1.1. Factores de riesgo de infección. En el receptor de un trasplante de órgano sólido (TOS) se combinan tres circunstancias que le hacen especialmente susceptible al desarrollo de complicaciones infecciosas: a) las acumuladas por la patología de base del receptor, b) las derivadas del procedimiento quirúrgico y requerimientos asistenciales, y c) las relacionadas con el tratamiento inmunosupresor. Estos tres procesos son especialmente críticos en el postrasplante inmediato, donde el riesgo de infección nosocomial y las dosis de inmunosupresión son máximas y algunos de los problemas vinculados a la enfermedad de base todavía están presentes (tabla 1).

No todos los problemas derivados de la enfermedad que condiciona la necesidad de trasplante se resuelven con éste, o al menos, no de forma inmediata. En el caso del trasplante hepático, los signos de hipertensión portal, el riesgo de sangrado, la trombopenia asociada al hiperesplenismo todavía perduran en los primeros días o semanas postrasplante. En el caso del virus de la hepatitis C (VHC), la recurrencia sobre el nuevo injerto es universal y su gravedad dependerá de muchos factores. La diabetes, muchas veces incrementada o precipitada por el tratamiento inmunosupresor con corticoides y fármacos calcineurínicos, es un importante factor de riesgo de infección. De igual forma, la edad, el estado nutricional, la insuficiencia renal, los antecedentes de encefalopatía o los requerimientos previos de ventilación mecánica son factores que pueden condicionar negativamente el postrasplante inmediato. Los pacientes con fibrosis quística o bronquiectasias crónicas, que habitualmente son sometidos antes del trasplante pulmonar a numerosos tratamientos antibióticos que favorecen la colonización por agentes multirresistentes, pueden condicionar la evolución del trasplante pulmonar y la selección de antibioterapias adecuadas.

El órgano trasplantado es un factor determinante en el tipo y localización de las posibles infecciones. La disfunción inicial del injerto trasplantado, por isquemia arterial o por lesión de preservación secundaria a un tiempo de isquemia prolongado, influye en la frecuencia y gravedad de la infección postrasplante. De igual forma, la reacción de alorreactividad contra el injerto le predispone a la infección por determinados virus. La duración del acto quirúrgico y la necesidad de reintervención son factores determinantes en el riesgo de infección bacteriana o fúngica precoz. En el trasplante hepático, la anastomosis biliodigestiva triplica el número de infecciones con relación a la anastomosis biliar termino-terminal. La isquemia prolongada en el trasplante de pulmón altera el mecanismo mucociliar y la anastomosis de la vía aérea. Finalmente, la enfermedad por citomegalovirus (CMV) en el postrasplante suele localizarse con más frecuencia en el injerto trasplantado.

Tabla 1. Resumen de los factores de riesgo de infección en el trasplante de órgano sólido

Factores condicionantes	Tipo de trasplante	Efecto
Dependientes de la patología de base del receptor		
Edad, diabetes, insuficiencia renal	Todos	Mayor riesgo de infección
Hepatitis C	TH	Recurrencia universal
Ventilación mecánica	Todos	Mayor riesgo de infección (bacterias multirresistentes)
Fibrosis quística, bronquiectasias	TP	Mayor riesgo de infección por bacterias multirresistentes
Dependientes de factores quirúrgicos y asistenciales		
Tiempo de isquemia prolongado	Todos	Mayor riesgo de infección a cualquier plazo
Tiempo de cirugía	Todos	Mayor riesgo de infección bacteriana y fúngica precoz
Reintervención quirúrgica	Todos	Más infección bacteriana y fúngica precoz
Anastomosis biliar digestiva/termino-terminal	TH	Riesgo 3 veces superior de infecciones para anastomosis biliar digestiva
Alorreactividad del injerto	Todos	Mayor riesgo de infecciones víricas
Enfermedad focal por CMV postrasplante	Todos	Suele localizarse en el órgano trasplantado
Dependientes del tratamiento inmunosupresor		
Sueros antilinfocitarios, monoclonales OKT3	Todos	Mayor riesgo de enfermedad por CMV
Esteroides	Todos	Infecciones fúngicas, <i>Listeria</i> , <i>Legionella</i> , micobacterias
Azatioprina (neutropenia inducida)	Todos	Mayor riesgo de infección bacteriana y fúngica
Micofenolato (altas dosis)	Todos	Mayor riesgo de enfermedad por CMV
Anticuerpos anti-CD52	Todos	Infección de herida quirúrgica, neumonitis aséptica

Abreviaturas. TH: trasplante hepático; TP: trasplante pulmonar; CMV: citomegalovirus.

Los pacientes sometidos a un trasplante de órgano sólido sufren un trastorno de la inmunidad celular derivado del uso de inmunosupresores utilizados para evitar el rechazo. La administración de tacrolimus o ciclosporina, en asociación con esteroides, micofenolato, azatioprina, inhibidores de la M-TOR (rapamicina y everolimus), anticuerpos policlonales (gammaglobulina antitimocítica), antagonistas de receptores CD25 de interleukina 2 (daclizumab, basiliximab), anticuerpos monoclonales anti-CD3 (OKT3), anti-CD52 (alentuzumab) o anti-CD28 (belatacept), son los responsables habituales de este tipo de complicaciones. Aunque no siempre es fácil delimitar los efectos reales, cada tipo concreto de régimen inmunosupresor se asocia, en general, con un determinado perfil de complicaciones infecciosas. La incidencia de infección y enfermedad por CMV es mayor en los pacientes que reciben sueros antilinfocíticos policlonales o monoclonales (OKT3). Es por ello habitual la profilaxis con ganciclovir con la administración de estos inmunosupresores. El uso de esteroides incrementa el riesgo de infecciones fúngicas o de las producidas por bacterias intracelulares, como *Listeria*, *Legionella* y micobacterias. Aunque ha habido mucha controversia sobre el riesgo de infección asociado al uso de agentes calcineurínicos (tacrolimus y ciclosporina), finalmente éste parece no diferir entre ambos y las diferencias reales se circunscriben a aspectos no infecciosos. La azatioprina puede favorecer la neutropenia e incrementar el riesgo de

infección bacteriana y fúngica. El micofenolato es más seguro que la azatioprina y, aunque se ha relacionado con un mayor riesgo de infección por CMV a dosis altas, este efecto no se observa con las dosis habituales. Los anticuerpos anti-CD25 no se asocian con un claro riesgo de sobreinfección; sin embargo los anticuerpos anti-CD52 sí incrementan el número de infecciones por CMV, virus BK y hongos. Por último, la utilización de rapamicina (sirolimus) y everolimus se ha relacionado con una mayor incidencia de infecciones bacterianas de la herida quirúrgica, un mayor riesgo de neumonitis asépticas y un menor riesgo de infección y enfermedad por CMV.

2.1.2. Desarrollo cronológico de las infecciones en los TOS. Desde un punto de vista académico y práctico las infecciones en estos pacientes se dividen en tres periodos, a veces no del todo bien definidos (tabla 2). En el primer mes o primeras semanas se producen las infecciones relacionadas con el acto quirúrgico y la instrumentación asociada al trasplante y el postoperatorio. Suelen predominar las infecciones bacterianas extracelulares (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*). Son los agentes causales de infecciones de herida quirúrgica, complicaciones de las anastomosis, mediastinitis, peritonitis y abscesos intrabdominales.

Tabla 2. Cronología de las infecciones en el trasplantado de órgano sólido.

	Postoperatorio inmediato	Máxima inmunosupresión	Moderada inmunosupresión
	(0-1 mes)	(2-6 meses)	(Más de 6 meses)
Bacterias	Bacterias hospitalarias	<i>Listeria</i> , <i>Legionella</i> , <i>Nocardia</i> , micobacterias	Infecciones bacterianas comunes
Hongos	<i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i>	<i>Pneumocystis</i> , <i>Aspergillus</i> , criptococo	Infecciones fúngicas comunes
Parásitos		<i>Toxoplasma</i> , <i>Leishmania</i>	Infecciones parasitarias comunes
Virus	VHS, HHV-6	CMV, HHV-6, VHC	VHC, VHB, VEB, VVZ y virus comunes

Abreviaturas. VHS: virus herpes simple; HHV-6: herpesvirus humano 6; CMV: citomegalovirus; VHC: virus de la hepatitis C; VHB: virus de la hepatitis B; VEB: virus Epstein-Barr; VVZ: virus varicela-zóster.

Suelen estar implicados en las complicaciones infecciosas asociadas a los procedimientos invasivos del postoperatorio: neumonías nosocomiales asociadas con la ventilación mecánica, infecciones urinarias por sondaje vesical y bacteriemias asociadas a catéteres endovasculares. Las infecciones por *Candida* spp. también pueden justificar alguna de las infecciones en este periodo, sobre todo las infecciones peritoneales en los receptores de injertos abdominales y las candidemias asociadas a catéteres endovasculares. Las infecciones por *Aspergillus* spp. y otros hongos, así como la mayoría de las infecciones víricas, suelen ser más tardías. La única excepción de éstas últimas la constituyen las infecciones por los virus del herpes simple (VHS), que suelen reactivarse de forma precoz en las primeras etapas del trasplante, habitualmente con afectación mucocutánea y, de forma excepcional, con afectación visceral.

A partir de las 4-6 semanas se empiezan a observar los fenómenos derivados de la depresión de la inmunidad celular, como consecuencia del tratamiento inmunosupresor. Este periodo se suele prolongar hasta los 6-8 meses, pero puede ser mayor en los casos de disfunción del injerto o rechazo crónico u otra situación donde sea necesario incrementar la inmunosupresión. Son muchos los agentes oportunistas que pueden reactivarse tras una infección latente o, más raramente, expresarse como consecuencia de una primoinfección transmitida por el injerto o por hemoderivados. Las complicaciones más frecuentes en este periodo son las víricas y, de éstas, la más importante la infección o enfermedad por CMV. La importancia de este agente es tan relevante que condiciona una estrategia de monitorización mediante marcadores de replicación vírica (antigenemia o PCR) en los casos de pacientes con riesgo de reactivación (receptores seropositivos para el CMV), o la adopción de medidas preventivas con antivíricos en los casos de pacientes con riesgo de primoinfección (receptores seronegativos que reciben un injerto de un donante seropositivo). En el trasplante hepático, la reactivación del VHC, documentada mediante replicación vírica y con elevación de las enzimas hepáticas, suele ocurrir en este periodo. El virus de la hepatitis B (VHB) también puede recidivar pero, en este caso, las medidas preventivas con antivíricos y el uso de gammaglobulinas específicas suelen prevenir esta complicación. Las infecciones por los

virus de Epstein-Barr (VEB), herpesvirus humanos 6, 7 y 8, varicela-zóster (VVZ), adenovirus y virus BK también suelen observarse en este momento del trasplante. También son frecuentes en este periodo las infecciones por microorganismos intracelulares observadas en otros pacientes con inmunosupresión celular. Este es el caso de las infecciones por micobacterias, *Aspergillus* spp. y otros hongos filamentosos, *Cryptococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Pneumocystis jirovecii*, *Nocardia asteroides*, leishmaniasis visceral y *Toxoplasma gondii*. Finalmente, en este segundo período también se pueden observar infecciones bacterianas derivadas del periodo anterior y asociadas a problemas técnicos no resueltos, como la colangitis por estenosis o por fugas biliares, abscesos intraabdominales por sobreinfección de hematomas no drenados, abscesos hepáticos por trombosis arteriales, o pielonefritis por estenosis ureterales.

A partir del segundo semestre postrasplante, los pacientes con buena función del injerto y bajo nivel de inmunosupresión equiparan las infecciones a las del resto de la población, si bien la expresión de éstas puede tener un curso atípico. Otro grupo de pacientes puede sufrir una infección crónica del injerto. El caso más grave suele representarlo en los trasplantados hepáticos la hepatitis crónica por el VHC. En la mayoría de los casos no suele condicionar la función del injerto a corto plazo, pero en unos pocos puede asociarse con formas de progresión rápida a cirrosis (hepatitis colestásica fibrosante). De igual forma, algunas infecciones por el VEB pueden conducir al desarrollo de enfermedades linfoproliferativas. Por último, como ya se ha mencionado, un cierto número de pacientes puede sufrir a lo largo de este período una situación de rechazo crónico que condiciona a su vez una elevada y mantenida situación de inmunosupresión y que, en última instancia, prolonga el riesgo de infecciones oportunistas de forma indefinida o hasta que pueda ser planteada la posibilidad de un nuevo trasplante.

2.2. TRASPLANTE DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS (TPH)

2.2.1. Factores de riesgo de infección.

Los principales riesgos de infección en este tipo de pacientes se relacionan con alguno de los siguientes aspectos: reconstitución inmunohematopoyética, exposición a agentes infecciosos y formas de

tratamiento (antineoplásico, inmunosupresor y antimicrobiano). Estos aspectos se resumen en la tabla 3.

El tipo de trasplante es un factor muy importante en el riesgo de infección. El riesgo de infección de trasplantes autólogos y alogénicos es similar en la fase de preinjerto, pero posteriormente los trasplantes autólogos presentan una frecuencia de infección inferior. Entre los trasplantes autólogos, los pacientes con leucemia o linfoma desarrollan más infecciones que los de tumores sólidos. No obstante, el trasplante autólogo se considera de bajo riesgo de infección en relación al trasplante alogénico, si bien

hay algunas circunstancias que aumentan el riesgo de infección en este tipo de trasplante, como la utilización de fludarabina, alemtuzumab o la manipulación del inóculo (selección de CD34+). Los trasplantes alogénicos de donante no emparentado se asocian a un mayor riesgo de infección que los donantes familiares, por su menor histocompatibilidad y mayor incidencia y gravedad de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH).

Tabla 3. Factores de riesgo de infección en trasplantados de precursores hematopoyéticos^a.

-
- Trasplante alogénico frente a trasplante autólogo
 - Donante no emparentado frente a donante familiar
 - Infusión de dosis bajas de progenitores hematopoyéticos^b
 - Depleción de células T
 - Presencia de EICH agudo o crónico
 - Receptor seropositivo para el CMV
 - Ambientes no protegidos y sistemas de aire sin filtrar^c
 - Uso de corticoides para prevención o tratamiento del EICH
 - Administración de rituximab o alentuzumab
 - Uso de ganciclovir para la profilaxis o el tratamiento del CMV
 - Utilización de inmunoglobulinas
 - Administración de fluconazol^d
 - Administración de productos de hemoterapia
-

^aAbreviaturas. CMV: citomegalovirus; EICH: enfermedad del implante contra el huésped.

^bExcepto en trasplante de precursores de sangre periférica, por mayor riesgo de EICH.

^cAspergilosis en situación de brote y en pacientes con anemia aplásica grave.

^dSobreinfecciones por *Candida glabrata* y *Candida krusei*.

La menor duración de la neutropenia y la más rápida reconstitución inmune en los trasplantes alogénicos de sangre periférica haría pensar en un menor riesgo de infección en estos pacientes; sin embargo, la mayor gravedad de EICH en ellos incrementa el riesgo de infección. De igual forma, los trasplantes con acondicionamiento de intensidad reducida producen menos mielosupresión y menor toxicidad gastrointestinal y se asocian con menor número de neutropenias febriles e infecciones estreptocócicas, pero presentan un mayor riesgo de infección fúngica invasiva. Las dosis bajas de progenitores, expresadas como células CD34+, se han relacionado con una peor evolución y supervivencia, y un mayor riesgo de infección fúngica, independientemente de la fuente (médula ósea, sangre periférica o cordón). No obstante, cuando se utiliza sangre periférica, la infusión de dosis altas también incrementa el riesgo de EICH y de la mortalidad. La depleción de células T del inóculo reduce la frecuencia de EICH pero se asocia con un incremento de infecciones por CMV y *Aspergillus* spp.

La presencia de EICH agudo y crónico es uno de los principales factores de riesgo de infección. Produce una marcada inmunodeficiencia, posiblemente al lesionar el timo, comprometiendo la reconstitución inmune. Además, debilita la función de los neutrófilos, produce hipocelularidad linfoide y afecta la respuesta humoral y celular. Por último,

todos estos efectos se ven incrementados con el tratamiento inmunosupresor que se administra para su control.

La aplicación de entornos estrictamente protegidos en el trasplante de progenitores no se ha traducido en una reducción de las infecciones y un aumento de la supervivencia, salvo en dos excepciones: la disminución parcial de aspergilosis en casos de brotes nosocomiales, conseguido mediante sistemas de filtración de aire, y la disminución general de infecciones, EICH agudo y aumento de supervivencia, en pacientes con anemia aplásica grave. No protegen de la reactivación endógena (v.g. infecciones víricas, candidiasis y micobacterias, entre otras). En relación con la aspergilosis, estas medidas reducen las formas precoces, secundarias a los estados de neutropenia prolongados (primer mes postrasplante), pero no las tardías, relacionadas con el EICH y con fenómenos de sobreinmunosupresión. En la actualidad, estas medidas se han simplificado y la mayoría de los centros manejan estos pacientes en habitaciones con filtros HEPA (*High Efficiency Particulate Airborne*), habitualmente sin flujo laminar por su elevado coste, con un sistema sencillo de aislamiento invertido y dietas con bajo contenido bacteriano. Se debe realizar especial atención en la prevención de agentes nosocomiales como *Legionella* spp., *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, enterobacterias productoras de

betalactamasas de espectro extendido, *Clostridium difficile* y virus respiratorios.

Los riesgos de infección asociados al tratamiento se pueden dividir en: relacionados con el tratamiento de acondicionamiento, derivados de los inmunosupresores utilizados en la prevención de EICH, y los secundarios a terapias antimicrobianas o de soporte. Los agentes utilizados para la prevención de EICH favorecen la aparición de infecciones oportunistas, como ocurre en los trasplantados de órgano sólido. Los calcineurínicos (ciclosporina o tacrólimus), o el micofenolato, son los más utilizados y con bajo riesgo de sobreinfección. Sin duda alguna, éstas son más frecuentes con el uso de corticosteroides, rituximab o alentuzumab, fundamentalmente infecciones víricas y especialmente por CMV. El rituximab se asocia, además del CMV, con infecciones por los VHS, VVZ, parvovirus B19 y VHB. El alentuzumab produce una marcada linfopenia que se ha asociado a un aumento de las infecciones por *P. jirovecii*, aspergilosis, enfermedad por CMV, tuberculosis y reactivación del VHB, además de reactivaciones herpéticas, candidiasis y bacteriemias.

Los antimicrobianos utilizados para la prevención y tratamiento de determinados agentes infecciosos pueden también tener efectos indirectos que condicionen un riesgo añadido de infecciones. Así, el ganciclovir y el valganciclovir, muy utilizados en el manejo de la infección por CMV producen neutropenia, con el consiguiente riesgo de infección bacteriana y fúngica. El cotrimoxazol también puede producir un efecto similar. El uso controvertido de inmunoglobulinas puede acarrear un retraso de la reconstitución de la inmunidad humoral. El fluconazol disminuye las infecciones por *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, pero favorece la sobreinfección por *Candida glabrata* y *Candida krusei*. Por último, la hemoterapia es una potencial fuente de infección, fundamentalmente vírica (virus hepatotropos, VIH, HTLV I/II, parvovirus y CMV) y, más rara, bacteriana (*Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens*, etc.).

A diferencia del trasplante de órgano sólido donde la primoinfección por CMV [estatus receptor(-)/donante(+)] es un factor de riesgo de enfermedad, en el trasplante de progenitores el riesgo lo confiere la infección previa (receptor seropositivo) y, sobre todo, la enfermedad previa reciente, de ahí la necesidad de monitorizar cuidadosamente a estos paciente con antigenemia o pruebas moleculares.

2.2.2. Cronología de la infección en el trasplante de progenitores. Los tiempos en que tienen lugar las infecciones en estos pacientes son consecuencia de los factores de riesgo anteriormente mencionados. Están marcados por los siguientes fenómenos: neutropenia, alteración de barrera cutaneomucosa, estado de reconstitución inmune y desarrollo de EICH. Antes del prendimiento del injerto, la neutropenia y la rotura de las barreras mucosas (oral y gastrointestinal) y cutáneas (por el uso de catéteres) justifican el tipo de infecciones. Éstas son fundamentalmente bacterianas, con

predominio de grampositivos, fúngicas (*Candida* y *Aspergillus*) y víricas (herpes simple). Prácticamente, todos los pacientes desarrollan fiebre en esta fase.

Tras el prendimiento (días 30 a 100), existe una profunda inmunodeficiencia humoral y celular agravada, en algunos pacientes, por la presencia de EICH agudo. En este periodo son frecuentes las infecciones por CMV, *P. jirovecii*, y la mayoría de las infecciones oportunistas anteriormente mencionadas.

En la fase tardía, el aspecto patogénico que protagoniza el tipo de infección es la presencia de EICH crónico. En ausencia de éste, la inmunidad se reconstituye gradualmente hasta normalizarse al cabo de un año. La excepción es el herpes zóster, cuya incidencia es elevada en todos los trasplantes en ausencia de profilaxis prolongada. La aparición o persistencia de EICH retrasa la reconstitución inmunológica más allá de este tiempo, y condiciona un riesgo de complicaciones infecciosas, muchas de ellas derivadas del periodo anterior. La lenta recuperación de la inmunidad humoral puede favorecer las infecciones senopulmonares por agentes encapsulados (*Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*), aunque también son frecuentes en este periodo las infecciones tardías por CMV, habitualmente asociadas a la profilaxis con ganciclovir en etapas tempranas.

3. EVALUACIÓN PRETRASPLANTE DEL DONANTE Y EL RECEPTOR

Como se ha señalado, las complicaciones infecciosas continúan siendo la causa principal, junto al rechazo, de la morbilidad y mortalidad después del trasplante de órganos. Muchas de estas complicaciones tienen un origen exógeno, incluyendo aquí las producidas por aquellos patógenos transmitidos por el órgano trasplantado. En otras ocasiones, es el propio receptor el que alberga previamente, de forma crónica o latente, microorganismos que pueden reactivarse. Ciertas complicaciones pueden prevenirse, o sus efectos negativos aminorarse, mediante una correcta evaluación de donante y receptor.

3.1. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL CANDIDATO A TRASPLANTE

La selección y preparación del candidato a trasplante desde el punto de vista infeccioso es una actividad imprescindible en los programas de trasplante. En dicho estudio se debe descartar cualquier infección activa que pueda suponer una contraindicación para el trasplante y, por lo tanto, la exclusión transitoria o definitiva del paciente de la lista de espera. Por otro lado, el receptor puede albergar de forma crónica o latente, microorganismos que pueden reactivarse con la inmunosupresión ocasionando complicaciones infecciosas postrasplante. Algunas de éstas, se pueden prevenir de forma completa o parcial con la correcta evaluación del receptor.

Con la evaluación se persiguen los siguientes objetivos: a) el diagnóstico y tratamiento de las infecciones activas en el candidato, b) la toma de decisiones sobre su aceptación o exclusión, y c) la identificación de los factores de riesgo para el

desarrollo de infecciones postrasplante (estado serológico y otros), con la consiguiente adopción de medidas de prevención.

3.1.1. Infección aguda. En el caso de una infección activa, el diagnóstico microbiológico es un apartado muy extenso como para formular recomendaciones técnicas particulares. Sin embargo, como ya se ha comentado en la introducción, para iniciar cualquier programa de trasplante es absolutamente necesario disponer de un laboratorio de microbiología con una amplia cartera de servicios de elevada calidad en bacteriología, micología, virología, parasitología y serología.

En ocasiones estas infecciones pueden estar ocultas por lo que debe realizarse una evaluación exhaustiva que incluirá además de una completa historia clínica, una exploración física cuidadosa y la solicitud de diversas exploraciones complementarias. En las tablas 4, 5 y 6 se indican las pautas a seguir. Como principio general, el receptor debe estar libre de infección activa (bacteriana, fúngica, vírica o parasitaria) antes del inicio de la inmunosupresión, con especial cuidado en el área anatómica donde se va a realizar el trasplante. Existen pocos datos acerca del intervalo de tiempo necesario entre la infección y el trasplante. Se ha recomendado, en condiciones normales, un tiempo mínimo de 2 semanas tras la recuperación de la infección activa. Si es posible, hay que documentar la curación clínica, radiológica y microbiológicamente. En ocasiones, como en casos de colangitis en el trasplante hepático o las infecciones de dispositivos de asistencia ventricular en el cardíaco, la infección sólo se resolverá con el trasplante. Las infecciones

activas por tuberculosis, hongos y otros microorganismos oportunistas, constituyen una contraindicación para el trasplante.

La infección y colonización por bacterias multirresistentes ha sido la causa de graves complicaciones en algunas unidades de trasplante. Es previsible que, en el futuro, el número de candidatos expuestos vaya en aumento por múltiples razones. La colonización no implica infección, pero sí puede predecirla. El conocimiento de ésta y de los perfiles antibióticos de estos microorganismos puede ayudar a racionalizar las medidas preventivas y terapéuticas en el candidato que eviten complicaciones infecciosas graves y de difícil tratamiento una vez efectuado el trasplante.

3.1.2. Infección crónica o latente. La realización de marcadores de infección crónica o latente es una actividad fundamental a realizar por el laboratorio, que deberá basarse en la utilización de reactivos y métodos comerciales siempre homologados para uso diagnóstico. Existen en el mercado muchos reactivos para la realización de todas estas pruebas. Aunque, en términos generales, son de calidad aceptable, no todos son equivalentes ni sus resultados equiparables. El laboratorio deberá incluir procedimientos de control interno y externo que aseguren la calidad de los resultados por él emitidos, especialmente en aquellos marcadores más críticos por las consecuencias negativas que pueda acarrear un resultado equivocado. Las recomendaciones se resumen en la tabla 7.

Tabla 4. Antecedentes de enfermedades infecciosas a considerar en el candidato a un trasplante.

-
- **Orofaringe:** caries dental, faringitis, infecciones por el virus del herpes simple.
 - **Respiratorias:** sinusitis, neumonía, tuberculosis.
 - **Cardiovasculares:** enfermedades valvulares, soplo cardíaco.
 - **Gastrointestinales:** diverticulitis, diarrea, hepatitis (A, B, C), parasitosis intestinales, colelitiasis.
 - **Genitourinarias:** infecciones del tracto urinario, prostatitis, vaginitis, uretritis, herpes genital, verrugas genitales, sífilis, gonorrea, enfermedad pélvica inflamatoria, infecciones por *Chlamydia*.
 - **Cutáneas:** infecciones de la piel y de las uñas, varicela y zóster.
 - **Osteoarticulares:** osteomielitis, presencia de prótesis articulares.
 - **Enfermedades infecciosas propias de la infancia:** sarampión, rubéola, varicela, etc.
 - **Otras:** mononucleosis, otras enfermedades no incluidas en los apartados anteriores.
-

Tabla 5. Antecedentes de exposición en el candidato a un trasplante.

-
- **Viajes o estancias:** residencia previa o viaje a áreas geográficas asociadas a micosis o parasitosis endémicas, especialmente histoplasmosis, estrongiloidosis, paludismo.
 - **Tuberculosis:** convivencia con enfermos, resultado de pruebas de PPD previas, enfermedad tratada, anomalías radiográficas compatibles.
 - **Exposición a patógenos de transmisión parenteral:** muy en particular los del VIH.
 - **Contacto con animales y mascotas:** domésticos o no; exposición a *Brucella*.
 - **Exposición ocupacional:** agricultura, ganadería.
 - **Contacto frecuente con niños:** enfermedades exantemáticas.
 - **Hábitos dietéticos:** consumo de carne, pescado o vegetales crudos, productos lácteos no higienizados, fuente del agua para la ingesta.
 - **Prácticas sexuales de riesgo.**
 - **Exposición por las aficiones y durante el tiempo de ocio.**
-

Tabla 6. Exploraciones complementarias a solicitar en la evaluación del candidato a un trasplante^a.

- Prueba cutánea de la tuberculina (efecto *booster* y test de anergia).
- Radiografía de tórax y de senos paranasales.
- Cultivos de sangre, orina, esputo, heces y de todos aquellos focos con sospecha de una infección activa y para descartar colonización, especialmente en tracto respiratorio.
- Cultivos de vigilancia de bacterias multirresistentes^b.
- Examen parasitológico de las heces o de otras muestras si se sospecha una infestación activa o si existen antecedentes clínico-epidemiológicos.
- Marcadores serológicos (y de otro tipo) de las infecciones latentes: VIH 1 y 2, hepatitis B, C y D, VHS 1 y 2, VVZ, CMV, VEB, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*.
- Obtención de suero y otras muestras para archivo y análisis futuro.

^aAbreviaturas: VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; VHS: virus del herpes simple; VVZ: virus varicela-zóster; CMV: citomegalovirus humano; VEB: virus Epstein-Barr.

^bOpcional, o en función de las condiciones de cada centro.

Tabla 7. Recomendaciones para el cribado serológico del candidato a trasplante.

Agente infeccioso	Cribado	Prueba de cribado		Pruebas de confirmación	
		Marcador	Método ^a	Confirmación	Método ^a
VIH	Sí	Anti-VIH	EIA 3 ^a ó 4 ^a gen.	Sí	WB, LIA
VHA	Sí	IgG anti-VHA	EIA	No	
VHB	Sí	HBsAg ^b	EIA	Sí	Neutralización
VHC	Sí	Anti-VHC ^{c, d}	EIA 3 ^a gen.	Sí	RIBA, LIA
VHS	Opcional	IgG anti-VHS	EIA	No	
VVZ	Sí ^e	IgG anti-VVZ	EIA, látex	No	
CMV	Sí	IgG anti-CMV	EIA, látex	Sólo negativos	
VEB	Sí ^e	IgG anti-VCA	EIA, IFI	Sólo negativos	
<i>Toxoplasma gondii</i>	Sí	IgG anti <i>T. gondii</i>	EIA	No	
<i>Treponema pallidum</i>	Sí	Ac no treponémicos	RPR, VDRL	Sí	EIA, TPHA, FTA-Abs

^aAbreviaturas: EIA: enzimoimmunoensayo; FTA-Abs: prueba fluorescente antitreponémica (absorbida); HBsAg: antígeno de superficie del VHB; IFI: inmunofluorescencia indirecta; LIA: *line immunoblot assay*; PCR-C: reacción en cadena de la polimerasa, cualitativa; RIBA: *recombinant immunoblot assay*; RPR: prueba rápida reagínica en plasma; TPHA: hemaglutinación de *T. pallidum*; VCA: antígeno de la cápsida vírica del VEB; VDRL: prueba reagínica del *Veneral Disease Research Laboratory*; WB: western blot.

^bMarcadores del sistema e o ADN vírico si es HBsAg(+).

^cConsiderar ARN VHC en hemodializados.

^dConsiderar PCR cuantitativa (carga vírica) y genotipado para el tratamiento.

^eEspecialmente en niños.

Virus de la inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2)

El esquema diagnóstico no es diferente en estos pacientes respecto al que se emplea en la población general. Deben utilizarse las pruebas más sensibles y específicas, básicamente inmunoensayos (EIA, etc.) de 3^a o 4^a generación que incluya al VIH 1 del subtipo O. Un resultado positivo deberá ser confirmado mediante *western-blot* o inmunoensayo en línea (LIA). Si la prueba es negativa y existen antecedentes epidemiológicos y sospechas fundadas de infección, deberá repetirse con otras muestras posteriores. La determinación cuantitativa de ARN (carga vírica) podría ser de ayuda en este contexto teniendo siempre en cuenta la posibilidad de falsos positivos y que la presencia de ARN en ausencia de anticuerpos no establece el diagnóstico de infección. En esta situación, debe valorarse la actividad de riesgo, la existencia de manifestaciones clínicas de primoinfección y el nivel de la carga vírica. La confirmación diagnóstica se obtendrá tras la positividad de los anticuerpos específicos.

Virus de la hepatitis A

Este virus puede causar una hepatitis grave en el trasplantado, sobre todo en los pacientes de edad avanzada y con enfermedad hepática previa. Por esta razón, se recomienda conocer si el candidato es inmune, pues cabe la posibilidad de vacunarlo eficazmente antes del trasplante. La detección de los anticuerpos específicos totales o de la clase IgG mediante técnicas ELISA o similares se considera el marcador de elección.

Virus de la hepatitis B

Hay que incluir en los procedimientos de evaluación aquellos marcadores de infección, inmunidad y pronósticos actualmente disponibles. Se recomienda que se lleven a cabo de manera secuencial, durante la espera. El marcador clave será el antígeno de superficie (HBsAg). Debe confirmarse en caso de positividad débil utilizando un ensayo de neutralización. Si es negativo, cabe considerar la oportunidad de vacunar al candidato, a menos que sea inmune de forma natural, lo cual se averigua mediante la determinación cuantitativa de los anticuerpos anti-HBs (un valor superior a 100 UI/mL).

sugiere inmunidad). Si el candidato es positivo para el HBsAg, deben realizarse los marcadores del sistema e [antígeno (HBeAg) y anticuerpos (anti-HBe)], que son elementos pronósticos y señalan la actividad del virus. También debe cuantificarse la presencia de ADN vírico como marcador de replicación vírica. Todos estos marcadores tienen especial relevancia por la posibilidad de establecer pautas de profilaxis antes y después del trasplante (ver apartado 5.4 de este documento).

Infección por el virus de la hepatitis C

El método de cribado consistirá en una técnica ELISA de tercera generación, que reduce considerablemente el llamado "efecto ventana", siendo su sensibilidad del 95% o superior. Estas pruebas también son muy específicas, a pesar de lo cual conviene confirmar un resultado positivo mediante una prueba de RIBA (*immunoblot* con antígenos recombinantes) o similar, de última generación. En los pacientes hemodializados las pruebas de detección de anticuerpos son menos sensibles que en la población general. En estas circunstancias, la amplificación del ARN vírico mediante RT-PCR puede ser una alternativa válida para resolver casos dudosos, no así los métodos de RIBA cuyo uso se desaconseja con este propósito. Fuera de esta situación particular, la utilización de la RT-PCR no se recomienda con carácter general, tanto para el diagnóstico de la infección como para la confirmación de los positivos. Siempre que sea posible, sería aconsejable determinar la carga vírica mediante pruebas cuantitativas de ácidos nucleicos (RT-PCR, *branched-DNA*, etc.), pues es un factor pronóstico, prestando atención a que los resultados obtenidos por dos métodos diferentes no son equivalentes entre sí. También hay que considerar el genotipado del VHC en estos pacientes, a pesar de la gran prevalencia del genotipo 1b en nuestro ámbito geográfico, ya que es un dato que tiene interés para el manejo del paciente una vez trasplantado.

Virus del herpes simple 1 y 2 (VHS-1 y VHS-2)

Se calcula que, en torno al 95% de las personas adultas, han pasado la infección y tienen anticuerpos específicos frente al VHS-1. La seroprevalencia frente al tipo VHS-2 es menor, al menos en nuestro ámbito geográfico. A efectos prácticos, aunque la determinación de anticuerpos específicos es norma habitual en los protocolos de evaluación del receptor, su utilidad en la práctica clínica puede ser cuestionable ya que, en muchas ocasiones, se indica la profilaxis con antivíricos una vez que se ha trasplantado al paciente o, simplemente, se tratan las reactivaciones sintomáticas, por lo general de una gravedad moderada. El marcador más apropiado es la determinación de anticuerpos IgG, o totales, para lo que existen buenos reactivos comerciales (ELISA). No se recomienda la determinación de anticuerpos específicos de tipo, entre otras razones porque algunos reactivos comerciales suelen presentar reactividad cruzada. Los anticuerpos IgM y la detección de antígenos o de ácidos nucleicos carecen por completo de interés en esta situación.

Virus varicela-zóster

En torno al 75% de los adultos presentan anticuerpos frente a este virus. En los niños la seroprevalencia es menor, aumentando con la edad. Los pacientes seronegativos serían candidatos a la administración de la vacuna OKA, por lo que se recomienda llevar a cabo esta determinación. El marcador recomendado es la determinación de IgG específica.

Citomegalovirus humano

Como es sabido, la infección por el CMV es la causa más importante de morbilidad y mortalidad de origen vírico en los trasplantados. El conocimiento del estado serológico del receptor condiciona la patogenia, gravedad y frecuencia de las infecciones, por lo que su determinación durante la fase de evaluación de los candidatos resulta imprescindible. Los anticuerpos IgG específicos constituyen el marcador clave. A diferencia de lo que ocurre una vez que el paciente ha sido trasplantado, los marcadores de infección activa como la determinación de los anticuerpos IgM y las detecciones de antígenos (prueba de antigenemia pp65) o de secuencias génicas específicas no deben aplicarse en la evaluación del candidato a un trasplante.

Virus de Epstein-Barr

La infección por este virus se ha relacionado con el síndrome linfoproliferativo postrasplante, una complicación grave que es más frecuente en los niños y en otros pacientes trasplantados con factores de riesgo definidos. La mayor parte de los adultos son seropositivos, pero no así los niños, especialmente cuanto menor es su edad. El marcador a utilizar en el candidato, especialmente en este último grupo de edad, será la determinación de anticuerpos específicos de la clase IgG, no siendo válidas las pruebas de anticuerpos heterófilos que se emplean para el diagnóstico habitual del cuadro de mononucleosis infecciosa en pacientes inmunocompetentes. De los diferentes anticuerpos dirigidos frente a antígenos víricos del VEB, se recomienda determinar la IgG contra el antígeno de la cápsida vírica (VCA-IgG). Los anticuerpos anti-EBNA (antígeno nuclear del VEB) también señalan una infección pasada, pero son menos habituales en los laboratorios diagnósticos.

Toxoplasma gondii

La determinación de anticuerpos específicos frente a este protozoo es obligada por las graves, aunque infrecuentes, complicaciones que puede originar. El riesgo aumenta en los trasplantados cardíacos, en donde se añade la posibilidad de transmisión a través del injerto. La mayor parte de la población adulta suele presentar anticuerpos que revelan una infección pasada y el establecimiento de un estado crónico. El marcador de elección será la detección de los anticuerpos IgG específicos. Los métodos de IgM, ensayos de avididad de anticuerpos o pruebas de amplificación de ácidos nucleicos carecen de interés en esta situación.

Strongiloides stercoralis

Este parásito puede causar infestaciones generalizadas de muy mal pronóstico en los pacientes inmunodeprimidos. En los pacientes que

hayan viajado o residido en áreas endémicas debe descartarse la existencia del parásito en heces antes del trasplante para evitar la diseminación posterior. En teoría, es posible encontrar el parásito en nuestro ámbito geográfico, especialmente entre las personas que han estado expuestas a zonas encharcadas (trabajadores agrícolas, minería, etc.) sin la debida protección de las extremidades inferiores. El hallazgo de eosinofilia puede sugerir la posibilidad de estrongiloidiasis. El diagnóstico suele ser difícil, pues la eliminación de los huevos larvados por las heces suele ser poco intensa e intermitente. Se recomienda realizar la observación microscópica tras someter la muestra a métodos de concentración, así como remitir un mínimo de tres muestras para análisis parasitológico. Si no se observan larvas de *S. stercoralis*, y si los antecedentes epidemiológicos lo aconsejan, el análisis debiera incluir las técnicas de liberación con concentración de larvas rabditoides (método de Baerman, Harada-Mori, etc.). Si está al alcance, también puede intentarse el examen del aspirado duodenal con una sonda (String test®), para la búsqueda de larvas.

Paludismo

Constituye un problema poco habitual en los países como el nuestro, pero que puede incrementarse en el futuro como consecuencia del flujo migratorio. No es infrecuente observar, en pacientes asintomáticos que provienen de áreas endémicas, niveles bajos de parasitemia. Si las circunstancias clínicas lo aconsejan, es conveniente remitir muestras de sangre para el examen microscópico de extensiones finas y gota gruesa o detección antigénica por inmunocromatografía. Normalmente, será necesario examinar varias muestras antes de emitir un resultado negativo.

Tuberculosis

Su prevalencia está aumentada en los trasplantados. La enfermedad activa en el candidato es una contraindicación para el trasplante, aunque se ha sugerido que una vez instaurado el tratamiento adecuado y las baciloscopias sean negativas, cuando se disponga de un órgano, se podría realizar el trasplante. En todo candidato se debe evaluar si existen antecedentes de tuberculosis clínica o radiológica y el tratamiento recibido y, en su ausencia, realizar una prueba de tuberculina junto a un test de reactividad cutánea para antígenos de recuerdo. En caso de ser ésta positiva, tras descartar enfermedad activa se valorará la realización de quimioprofilaxis. Algunos autores han sugerido que a los receptores PPD negativos que reciban órganos de donantes PPD positivos se les debiera realizar siempre quimioprofilaxis.

Treponema pallidum (sífilis)

Aunque la infección latente por esta espiroqueta no constituye una contraindicación absoluta para el trasplante, se recomienda realizar la detección serológica y, si es posible, determinar el estadio de la enfermedad y administrar el tratamiento correspondiente. El cribado debe hacerse mediante una prueba reagínica o no treponémica (VDRL o RPR), para lo que existen buenos reactivos comerciales. Como es bien sabido, las pruebas no

treponémicas presentan falsos positivos biológicos, por lo que un resultado positivo debe ser interpretado de acuerdo con las características del candidato, siendo obligada su confirmación mediante pruebas específicas treponémicas (TPHA, FTA-Abs, etc.).

Serologías para determinar el estado inmunitario frente a patógenos prevenibles mediante vacunación

El período previo al trasplante, mientras el paciente no está inmunodeprimido, representa una gran oportunidad para completar las vacunaciones. Idealmente, todos los candidatos deberían ser vacunados completamente antes del trasplante, porque la respuesta a la vacunación es más intensa en este período. Las vacunas a administrar en el candidato al trasplante se resumen en la tabla 8. Es recomendable, previamente a la vacunación, determinar el estado inmunitario frente a aquellos patógenos cuyas vacunas confieren inmunidad de larga duración (VVZ, sarampión, parotiditis, rubéola, poliomielitis, VHA, VHB, *Bordetella pertussis* y difteria).

3.2. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL DONANTE

La posible transmisión a través del órgano trasplantado de determinados agentes infecciosos de donante a receptor no significa que el trasplante no pueda o no deba realizarse. Alguno de los microorganismos transmitidos con el órgano son perfectamente tolerados por el receptor o muy bien controlados por la terapéutica o la profilaxis. Así, lejos de realizar una identificación exhaustiva y pormenorizada de microorganismos, los objetivos de la investigación microbiológica en el donante serán: a) descartar la presencia de agentes infecciosos transmisibles que puedan comprometer la viabilidad del injerto o la evolución normal del enfermo trasplantado; b) obtener una información útil que permita predecir las posibles complicaciones que surgirán en el receptor y decidir, en ocasiones, cual será el candidato más idóneo para que el trasplante sea más eficiente y seguro, y c) incrementar la disponibilidad de órganos, garantizando la viabilidad de los órganos desde el punto de vista de la infección de cualquier origen, y descartando todos aquellos que fuera necesario, pero con todo rigor científico, para no llevar a la situación contraria de perder órganos para la donación.

3.2.1. Infección aguda. Los potenciales donantes suelen estar ubicados en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), Reanimación, Neurocirugía, Urgencias, etc., en ocasiones durante periodos prolongados, sometidos a ventilación mecánica, con los problemas secundarios de infecciones diversas entre las que destacan las infecciones pulmonares y asociadas a catéteres. Aproximadamente, un 10% de los donantes potenciales no llegan a serlo por problemas de etiología infecciosa. Cuando la estancia en la UCI se prolonga, la incidencia de infecciones puede alcanzar hasta el 40%. Sin embargo, la necesidad de un mayor número de órganos y el incremento del número de muertes de pacientes en lista de espera de trasplante, han llevado a que muchos equipos sean menos rígidos

en la aplicación de los criterios iniciales. Además, estudios recientes han demostrado que la transmisión de patógenos al receptor es mínima o inexistente en los casos en que se utilizan medidas

de prevención o tratamiento en el receptor en casos de infecciones bacterianas comprobadas del donante, incluso cuando han sido responsables del fallecimiento del donante.

Tabla 8. Vacunas recomendables en el candidato a un trasplante.

Vacuna	Antes del trasplante	Después del trasplante	Reinmunización después del trasplante ^a	Determinación de la inmunidad post-vacunación
Varicela	Recomendada ^{b, c}	Contraindicada	No	Sí
Sarampión	Recomendada ^c	Contraindicada	No	Sí
Parotiditis	Recomendada ^c	Contraindicada	No	No
Rubéola	Recomendada ^c	Contraindicada	No	Sí ^d
Polio (VPI)	Recomendada ^e	Indicada	Sí	No
Polio (VPO)	Contraindicada ^f	Contraindicada	No	No
Tos ferina	Indicada	Indicada	Sí	No
Difteria	Indicada	Indicada	Sí	No
Tétanos	Indicada	Indicada	Sí	No
Hepatitis B	Indicada ^g	Indicada	Sí ^h	Sí
Hepatitis A	Indicada	Indicada	Sí	Sí
Gripe	Indicada ⁱ	Indicada	Sí	No
<i>Haemophilus influenzae</i> B	Indicada	Indicada	Sí	Sí
<i>Neisseria meningitidis</i> C	Indicada	Indicada	Sí	No
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Indicada	Indicada	Sí ^j	No

^aEstá indicada cuando la vacunación no se ha completado antes del trasplante, o cuando no se ha alcanzado la inmunidad serológica. Debe reiniciarse una vez que la inmunodepresión se ha atenuado. Esto sucede generalmente después de los 6-12 meses postrasplante en los receptores con evolución favorable. En los receptores que siguen necesitando tratamiento inmunosupresor a dosis altas o presentan disfunción del injerto, la seguridad de las vacunaciones no está establecida y estos receptores no deben ser vacunados.

^bEstá contraindicada en los pacientes con inmunodepresión grave: leucemia, linfomas, inmunodeficiencias congénitas, infección por el VIH, y pacientes en tratamiento con corticoides a dosis superiores a 20 mg/día durante más de 1 mes.

^cLa vacuna debe administrarse al menos dos semanas antes del trasplante.

^dRecomendada en mujeres en edad fértil.

^eVacuna de la polio con virus inactivado parenteral (Salk). Recomendada sólo si no se ha cumplido la vacunación del calendario.

^fVacuna de la polio con virus atenuado oral (Sabin). Está contraindicada en los candidatos porque la eliminación del virus vacunal por heces es prolongada, hasta 10 semanas. Por la misma razón, está contraindicada en los convivientes del receptor del trasplante.

^gLa vacunación de los candidatos a un trasplante con una pauta acelerada, consistente en tres dosis semanales consecutivas, consigue una respuesta inmunológica del 71%.

^hLa reinmunización está indicada sólo si no ha habido respuesta vacunal.

ⁱIndicada también en todos los convivientes del receptor y en el personal sanitario que le atiende.

^jRevacunación cada 5 años.

Antes de la extracción de los órganos, se recomienda realizar las siguientes exploraciones con el fin de evitar la transmisión de infecciones o bien adecuar el tratamiento en el receptor: a) hemograma completo y fórmula leucocitaria, b) hemocultivos seriados y urocultivo, c) radiografía de tórax, y d) en caso de sospecha clínica de infección pulmonar, cultivo de secreciones o broncoscopia con catéter telescópico, o lavado broncoalveolar si procede. Además, hay que considerar el estudio necrópsico para descartar infecciones ocultas que deban ser tratadas en el receptor.

3.2.2. Infección crónica o latente. Durante el periodo postrasplante y secundariamente a la inmunodepresión, las infecciones latentes o crónicas del injerto pueden reactivarse, provocando infecciones en el receptor, a menudo graves. Algunas de estas infecciones contraindican absolutamente el trasplante y otras se han de tener

en cuenta para tomar las medidas de profilaxis adecuadas en el receptor. Actualmente, la evaluación de la infección crónica en el donante de órganos se basa en la utilización de marcadores serológicos. Sin embargo, éste es un tema en constante evolución y debate. A medida que se acumula el conocimiento científico sobre el cribado serológico de la donación de órganos, la confusión y la incertidumbre aumentan paralelamente. ¿Qué microorganismos cribar, sobre la base de qué marcadores y con qué tipo de reactivos? Todo ello matizado según el tipo de órgano. Ciertamente, son necesarios estudios más profundos de riesgo-beneficio que evalúen el equilibrio entre los microorganismos, los marcadores y los reactivos con sus falsos positivos/negativos y su coste en relación con la disponibilidad de órganos y la mortalidad en las listas de espera.

Crterios generales del cribado serológico

En la realización de los diferentes marcadores serológicos se deberán cumplir una serie de criterios generales:

- a) Las pruebas de cribado serológico deberán ser realizadas en laboratorios con un adecuado control de calidad y con la suficiente experiencia y conocimiento para llevar a cabo las diferentes técnicas e interpretar sus resultados.
- b) Las determinaciones serológicas se realizarán en suero o plasma. No deberían realizarse en otros fluidos o secreciones como humor vítreo y acuoso, debido a una posible pérdida de sensibilidad en los diferentes marcadores.
- c) Deberán utilizarse reactivos homologados para uso diagnóstico y seguirse estrictamente las instrucciones del fabricante en la realización de las diferentes pruebas.
- d) Los diferentes reactivos deberán actualizarse a medida que aparezcan sucesivas generaciones de mayor especificidad, sensibilidad y valores predictivos positivo y negativo.
- e) Gran parte de los algoritmos diagnósticos recomendados en caso de una primera determinación positiva, especialmente para VIH y VHC, son inviables en situaciones de urgencia debido a su prolongado tiempo en la generación de resultados. Desde el punto de vista de la donación, los algoritmos diagnósticos deberían, asegurando la máxima sensibilidad y valor predictivo negativo, pararse en la primera línea de cribado en caso de un resultado inicialmente positivo. Ante un resultado positivo débil, deberá repetirse la serología utilizando un reactivo de principio diferente.
- f) Todos los centros implicados en el cribado serológico de donantes de órganos deberían realizar un registro y archivo de sueros que deberían mantenerse durante un mínimo de 10 años.

Criterios relativos a la realización de los marcadores serológicos

En la actualidad, las diferentes técnicas utilizadas para detectar posibles marcadores de transmisibilidad poseen una elevada calidad en términos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo. Sin embargo, aunque infrecuentes, continúa existiendo la posibilidad de falsos negativos y positivos. Los primeros pueden producirse por las siguientes causas:

- a) **Hemodilución:** la transfusión de un elevado número de unidades de sangre o infusión de cristaloides o coloides al potencial donante, previamente a la realización de las técnicas serológicas, podría resultar, a consecuencia de la hemodilución, en una disminución en la titulación de los marcadores serológicos por debajo de los niveles de sensibilidad de las diferentes técnicas, siendo causa de falsos negativos.
- b) **Período ventana:** la realización de una historia clínica/epidemiológica es el mejor

método para descartar aquellos donantes con procesos infecciosos que pudieran hallarse en período ventana (VIH, VHC, VHB) o para los que no existan marcadores de transmisibilidad (priones). En los donantes vivos de órganos debe realizarse un cribado serológico tres meses antes y otro en el momento de la donación. Adicionalmente, en estos pacientes, se realizará la correspondiente educación higiénico-sanitaria para evitar todas aquellas actividades con riesgo de infección por estos virus.

Es importante utilizar pruebas microbiológicas que permitan la reducción de los periodos ventana, especialmente para el VIH, VHB y VHC, pues reducirían la posibilidad de transmisión de infecciones y aumentarían el número de donaciones y la percepción de seguridad. Una forma eficiente y rápida de cribar el periodo ventana del VHC es la determinación del antígeno del VHC en suero. Los actuales reactivos de PCR a tiempo real permiten generar resultados con una elevada sensibilidad y especificidad en menos de 6 h. Sin embargo, no olvidemos que las dificultades estarán supeditadas a la logística de cada laboratorio en particular, se triplica el tiempo de generación de resultados respecto a las actuales técnicas de cribado y se produce un incremento considerable del coste. Además, los falsos positivos pueden acabar representando una disminución del número de donaciones. En definitiva, ¿en qué situaciones se deberían realizar este tipo de técnicas?, ¿en todos los donantes o en aquellos con factores de riesgo?, ¿en los anti-VHC(+) o en los anti-core VHB(+)/HBsAg(-)? No existe un consenso al respecto.

La utilización de técnicas de microbiología molecular para el cribado de los periodos ventana debe ser evaluada en un futuro teniendo en cuenta sus riesgos y beneficios en el contexto global del cribado de donantes, de la utilización del órgano y de la prevención de la morbi-mortalidad en las listas de espera.

En cuanto a los falsos positivos del cribado, se producen fundamentalmente en el caso de donante cadáver. En éstos, tanto la hemólisis de la muestra como el retraso en su extracción (productos de degradación tisular) pueden ser causa de falsos positivos en las pruebas de cribado serológico. Para evitar la pérdida de posibles donaciones, la demora en la extracción de la muestra en el caso del donante cadáver debería ser mínima.

Marcadores serológicos de transmisibilidad

Debe determinarse en todos los donantes, previamente a la extracción, su capacidad para transmitir VIH, VHB, VHC y *T. pallidum* (Tabla 9). Adicionalmente, con la finalidad de obtener una información útil que permita prevenir o predecir las posibles complicaciones que surgirán en el receptor, se determinarán con una demora no superior a las 24-48 h los marcadores de transmisibilidad de CMV y *T. gondii*. Referente a la serología frente al VEB, considerando que más del 95% de la población es

seropositiva, tan sólo estaría indicado cuando el posible receptor fuera seronegativo, especialmente en

el contexto del trasplante infantil.

Tabla 9. Marcadores serológicos en el donante.

Agente infeccioso	Marcadores recomendados
Previamente a la donación	
VIH 1 y 2	Anticuerpos totales ^a
	Antígeno p24
VHB	HBsAg ^b
	Anticuerpos totales anti-HBc
	Anticuerpos totales y antígeno VHD ^c
VHC	Anticuerpos totales ^d
HTLV-I/II	Antígeno, anticuerpos IgG ^e
<i>Treponema pallidum</i>	Reaginas
	Pruebas treponémicas si las reaginas son positivas
Diferidos 24-48 h	
CMV	IgG o anticuerpos totales
VEB	Ig G anti-VCA ^f
<i>Toxoplasma gondii</i>	IgG (IgM si la determinación de IgG es positiva)

^aVIH1+2, subtipo O, 3^a/4^a generación.

^bSensibilidad analítica: 0,2 ng/ml.

^cSi HBsAg (+).

^dEnzimoensayos de 3^a generación.

^eFactores de riesgo u obligatoriedad en país de destino.

^fTan sólo si el receptor es seronegativo (especial atención en el trasplante infantil).

Un aspecto que genera controversia en la actualidad es el cribado de infección oculta por el VHB. Diferentes estudios han demostrado la presencia del genoma del VHB latente en el hígado de los sujetos con anticuerpos frente al antígeno del *core* del VHB (anti-HBc), independientemente del resultado de cualquier otro marcador de este virus, indicando la probabilidad de transmisión de la hepatitis B a través del hígado. Adicionalmente, estudios recientes han demostrado la presencia de ADN del VHB en sangre en donantes anti-HBc positivos, HBsAg negativos, e independientemente de la presencia o no de anti-HBs. Se desconoce en estos casos: probabilidad de transmisión del VHB a través de órganos extrahepáticos; título de anticuerpos frente al antígeno de superficie en el donante que pueda predecir su capacidad de transmisión (superior a 10 ó 100 UI/mL) y pronóstico en el receptor de la posible hepatitis B transmitida. En nuestro país existe todavía un importante debate sobre la pertinencia en la determinación del ADN del VHB en sangre en los donantes anti-HBc positivos debido a: elevada prevalencia de anti-*core* en la población española; escasa disponibilidad de hígados; elevada mortalidad en lista de espera; posibilidad de vacunar al receptor y establecimiento de profilaxis o tratamiento antivírico en el periodo postrasplante. No olvidemos que la discusión de estos temas es diferente si se trata de donantes de sangre, de órganos (hígado o extrahepático) o de tejidos.

La determinación de marcadores de HTLV I/II deberá realizarse ante la sospecha de factores de riesgo en el donante (inmigrantes que hayan nacido o vivido en zonas endémicas, viajeros a dichas zonas endémicas y familiares de estos inmigrantes o viajeros) o en aquellos casos en que el órgano vaya a ser trasplantado en países en los que dicha

determinación sea obligatoria. Sin embargo, debido a la importancia actual de los flujos migratorios desde áreas endémicas para HTLV y a sus característicos mecanismos de transmisión, es muy difícil cribar por factores de riesgo, por lo que sería recomendable realizar la determinación de anticuerpos específicos frente a HTLV I/II en todos los donantes de órganos. Sin embargo, la baja prevalencia de infección y la baja proporción de positivos que son confirmados mediante *western blot* está obligando a replantear su utilización universal hasta que se desarrollen reactivos de mayor especificidad.

Infecciones en donantes extranjeros o procedentes de países tropicales

Es importante conocer el origen o viajes realizados por los donantes ya que pueden presentar una patología infecciosa especial (con el consiguiente riesgo de transmisión al receptor). Se evaluará en cada situación la necesidad de este tipo de cribado.

Entre los más importantes:

- Paludismo, mediante extensión y gota gruesa o detección antigénica por inmunocromatografía,
- Enfermedad de Chagas, a través de la detección de anticuerpos por inmunoprecipitación, inmunofluorescencia o enzimoimmunoensayo.
- Leishmaniasis visceral por serología.
- Estrongiloidiasis (ven en evaluación del candidato a trasplante).
- En caso de eosinofilia en el donante, detección en diferido de huevos de trematodos en heces (*Clonorchis* spp., *Opistorchis* spp.), en orina (*Schistosoma* spp.) en esputo (*Paragonimus* spp.) o en bilis (*Fasciola hepatica*).

- f) *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*: podría hacerse serología diferida, pero existe una importante dificultad para conseguir los reactivos en nuestro país.

4. SEGUIMIENTO POSTRASPLANTE: MONITORIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

El número de los potenciales patógenos que pueden infectar al paciente trasplantado es amplísimo, ya que a los patógenos primarios se une una larga lista de oportunistas que aprovechan la situación de inmunodepresión y la quiebra de otros mecanismos de defensa propios del trasplantado. En los últimos años, se ha obtenido una gran base de conocimiento de los factores de riesgo dependientes de las características propias del paciente, del tipo de trasplante, de factores ambientales o del período de tiempo en que se producen que han permitido delimitar y predecir las complicaciones infecciosas tras el trasplante y, sobre todo, ayudar a prevenirlas (ver apartados anteriores de este documento). Las estrategias preventivas han ido dirigidas, fundamentalmente, a la evaluación del donante y del receptor, así como a la administración de profilaxis específica para algunos de estos patógenos.

En los primeros años de la era del trasplante, se ponía mucho énfasis en protocolos sistemáticos de vigilancia y seguimiento mediante técnicas microbiológicas de todo tipo, lo que originaba una fuerte carga para el laboratorio y un incremento notable de los costes del programa en sí. Es cierto que, en aquellos momentos, estas búsquedas sistemáticas permitían obtener una información muy valiosa pero, con el paso del tiempo, se ha producido una tendencia hacia una monitorización más simplificada y, en cierto sentido, más adaptada a cada caso en particular. Las razones deben atribuirse a la mejora general de los cuidados del paciente, desde el procedimiento quirúrgico a las modernas pautas de inmunodepresión, al mejor conocimiento de las infecciones y a la disponibilidad de técnicas diagnósticas rápidas. Incluso, hay ocasiones en que la vigilancia sistemática puede aportar información poco predictiva del proceso que queremos investigar (por ejemplo, los cultivos de CMV en orina o saliva de los TOS). Para valorar la conveniencia de estudios de vigilancia, hay que considerar lo siguiente: a) la probabilidad y gravedad de la infección, b) el período de tiempo con mayor riesgo para que se presente, c) el valor predictivo de la prueba diagnóstica, d) la eficacia de las estrategias preventivas que se pueden poner en práctica de acuerdo con los resultados obtenidos, e) el impacto final sobre la salud del paciente, y f) el coste económico. En la tabla 10 se resumen algunas recomendaciones actuales sobre la vigilancia microbiológica establecidos por sociedades científicas o grupos internacionales de expertos.

Respecto a la metodología microbiológica concreta, las recomendaciones acerca de las muestras más apropiadas y las técnicas a emplear no difieren básicamente de las que puede aplicar el laboratorio para otras situaciones clínicas complejas (tablas 11 y 12). Como ya se ha dicho, el laboratorio

que asista a un programa de trasplante deberá contar con un grado de desarrollo técnico y de conocimiento elevados, con áreas diagnósticas que cubran todos los posibles patógenos: bacterias, hongos, parásitos y virus. Es muy conveniente que pueda llevar a cabo estudios de sensibilidad sofisticados para bacterias, hongos y algunos virus. La cartera de servicios aplicada al diagnóstico y seguimiento de las infecciones en estos pacientes deberá hacer énfasis en las pruebas rápidas, como las detecciones de antígeno o las pruebas moleculares. En general, todas ellas deberán presentar un elevado valor predictivo positivo, pero también negativo. La implantación de un sistema de calidad de certificación (normas ISO de la serie 9000) o de acreditación (ISO 15189) es muy recomendable, incluso podría ser exigible para todos los hospitales con programa de trasplante.

5. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES EN EL TRASPLANTADO

En los apartados anteriores se ha puesto énfasis en los aspectos que condicionan la infección del trasplantado y, consecuentemente, en las medidas de profilaxis y control, en las que el laboratorio de microbiología juega un papel determinante. En este apartado, se hace hincapié en la labor que desempeña dicho laboratorio una vez se ha producido el trasplante, cuando se sospecha la posibilidad de un proceso infeccioso.

5.1. INFECCIONES BACTERIANAS

Los pacientes trasplantados reúnen todos los factores de riesgo para el desarrollo de las infecciones bacterianas hospitalarias. Aunque el uso de la profilaxis antibiótica ha disminuido notablemente la incidencia de este tipo de infecciones en este grupo de pacientes, la morbilidad y mortalidad es alta. La infección puede transmitirse a través del órgano trasplantado o tratarse de infecciones de adquisición intrahospitalaria, adquiridas en la comunidad, o de la reactivación de infecciones latentes. El riesgo y tipo de infección bacteriana están relacionados con la situación clínica de partida del receptor, el tipo de trasplante, el período posttrasplante y la evolución de éste, tal como se ha señalado en apartados anteriores.

Tabla 10. Recomendaciones sobre la vigilancia microbiológica de los pacientes trasplantados de órgano sólido^a.

Característica ^b	Recomendación ^c	Grado de Recomendación ^d	Período
Urocultivos de vigilancia en el TR y TRP	Sí	BII	Temprano
Cultivo de drenajes biliares en el TH	No	DII	Temprano
Cultivo de secreciones pulmonares en el TP y TCP ^e	Sí	BII	Temprano
Cultivo de hongos levaduriformes en el THO	No	CII	Temprano-intermedio
Cultivos de vigilancia de <i>Aspergillus</i>	No ^f	DII	Temprano-intermedio
Vigilancia de la infección por el CMV			Intermedio-tardío
Pacientes de riesgo en profilaxis sistemática	No	BIII	Intermedio
Monitorización del tratamiento antivírica	Sí	AII	Cuando proceda
Utilización de pruebas sensibles cuantitativas ^g	Sí	BII	Siempre
Vigilancia sistemática del VHS (cultivo, antígeno)	No	CII	Temprano
Vigilancia de la infección por VEB	No ^{h,i}	CIII	Intermedio-tardío
Vigilancia de los herpesvirus humanos 6 y 7	No	CII	Intermedio
Vigilancia del VHC en los seropositivos	Sí ^j	BII	Continuo
Vigilancia del VHB en pacientes HBsAg+	Sí ^k	BI	Continuo
Vigilancia del poliovirus BK en TR	No	CII	Intermedio-tardío
Monitorización de tratamientos antivirales y antifúngicos	Sí	AII	Durante tratamiento
Vigilancia de la reactivación de <i>Toxoplasma gondii</i>	No	CIII	Tardío

^aTomada de Pérez JL y Ayats (2004), con modificaciones para este procedimiento.

^bAbreviaturas: TR: trasplante renal; TRP: trasplante renal y pancreático; TH: trasplante hepático; TP: trasplante pulmonar; TCP: trasplante de corazón-pulmón; CMV: citomegalovirus; VHS: virus herpes simple; VEB: virus Epstein Barr; VHC: virus de la hepatitis C; VHB: virus de la hepatitis B.

^cCuando no se indica una monitorización sistemática, las pruebas de laboratorio se realizarán sólo si hay sospecha clínica.

^dGrado: A: fuerte evidencia de eficacia y beneficio clínico; B: Moderada evidencia de eficacia; C: insuficiente evidencia de eficacia; D: moderada evidencia de la ineficacia; II: evidencia de más de un ensayo clínico bien diseñado y no aleatorizado; III: evidencia a partir de opiniones de expertos.

^eEn la primera semana post-trasplante.

^fExcepto en los trasplantados de pulmón y pulmón-corazón.

^gAntigenemia o PCR en muestras de sangre o plasma.

^hExcepto en el paciente de alto riesgo donante-positivo/receptor-negativo para el VEB.

ⁱCambios previsibles en el futuro con el desarrollo de técnicas moleculares.

^jARN del VHC (cualitativo o prueba cuantitativa de alta sensibilidad analítica).

^kPerfil serológico: HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, ADN del VHB.

Tabla 11. Evaluación microbiológica en el paciente trasplantado con sospecha de infección^a.

Muestra	Examen microscópico ^b			Cultivo ^b					Pruebas ocasionales
	Gram	Ziehl-Neelsen	Calcofluor	Aerobio	Anaerobio	Micobacterias	Hongos	Virus	
Sangre				XX	XX	XX	XX	XX	Látex criptococo, antigenemia CMV
Orina	X	X		XX		X	X	X	Antígeno <i>Legionella</i>
Espujo	XX	X	X	XX		X	X	X	
LBA, biopsia, cepillado	XX	XX	XX	XX	X ^c	XX	XX	XX	Cultivo <i>Legionella</i> , investigación <i>P. jirovecii</i> , antígeno de VRS u otros virus
Herida quirúrgica	X	X	X	XX	X	X	X		
Lesión cutánea	X	X	X	XX		X	X	X	Antígeno VVZ y de VHS
Tejidos, líquidos	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	
LCR	XX	XX		XX		XX	XX	XX	Látex criptococo, PCR de VHS, CMV, VEB, HHV-6, virus JC, etc
Catéteres ^d	XX			XX					
Heces				XX					Parásitos, toxina de <i>Clostridium difficile</i>

^aModificada de LaRocco y Burgert (1997). Abreviaturas: CMV, citomegalovirus; LBA, lavado broncoalveolar; VRS, virus respiratorio sincitial; VVZ, virus varicela-zóster; VHS, virus herpes simple; LCR, líquido cefalorraquídeo; VEB, virus Epstein-Barr; HHV-6, herpesvirus humano 6.

^bLa marca XX indica que esta técnica suele realizarse de forma rutinaria.

^cSólo en muestras obtenidas con catéter telescópico.

^dCultivo semicuantitativo de la punta; Gram de la conexión y del punto de inserción del catéter.

Tabla 12. Consideraciones sobre la obtención de las muestras para el diagnóstico de las infecciones en pacientes trasplantados.

Muestra	Comentarios prácticos
Drenajes	Similar a otros pacientes
Exudados de herida quirúrgica	Similar a otros pacientes
Exudado faríngeo/nasofaríngeo	Considerar cultivo y pruebas de detección rápidas para virus respiratorios comunes
Tracto respiratorio inferior	Similar a otros pacientes; se prefiere lavado broncoalveolar (LBA) a esputo
Exudado de vesículas cutáneas	Romper la vesícula y absorber con hisopo; frotar enérgicamente la base para pruebas de detección de antígeno
Sangre (hemocultivos)	Mínimo, 10 mL por frasco; prolongar la incubación 3-4 semanas en caso de sospecha de infección fúngica
Sangre (virus)	Utilizar EDTA como anticoagulante, pues permite realizar técnicas de amplificación PCR para distintos patógenos
Orina	No utilizar conservantes ni estabilizantes si se desea investigar la presencia de virus
Heces	No utilizar conservantes si se llevan a cabo pruebas de detección de antígeno o toxina de <i>Clostridium difficile</i>
LCR	Remitir volumen suficiente
Tejidos, biopsias	Similar a otros pacientes; remitir en recipiente sin formol
Catéteres	Similar a otros pacientes

El primer mes postrasplante es el período de mayor incidencia de infecciones por patógenos multirresistentes, aunque en los pacientes con mala evolución este periodo puede ser más largo. La colaboración entre clínicos y microbiólogos en la vigilancia epidemiológica de este tipo de microorganismos permitirá conocer su incidencia, los factores de riesgo y establecer un tratamiento adecuado lo más temprano posible, factor de gran importancia en la evolución de este tipo de pacientes. Como ya se ha indicado con anterioridad, existen numerosos patógenos nosocomiales que pueden infectar a los pacientes trasplantados, con graves problemas terapéuticos. Especial mención merecen *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus* resistente a la metilina,

Enterococcus resistentes a la vancomicina y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a las carbapenemas. La existencia de un adecuado sistema de vigilancia epidemiológica, el control de la política antibiótica y la puesta en marcha de un programa de seguimiento de los pacientes infectados o colonizados por estos microorganismos pueden ayudar al manejo de estos pacientes y evitar la extensión de estos microorganismos. La tabla 13 recoge las recomendaciones descritas por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. En la figura 1, se presenta un diagrama indicando las infecciones más frecuentes en cada periodo postrasplante.

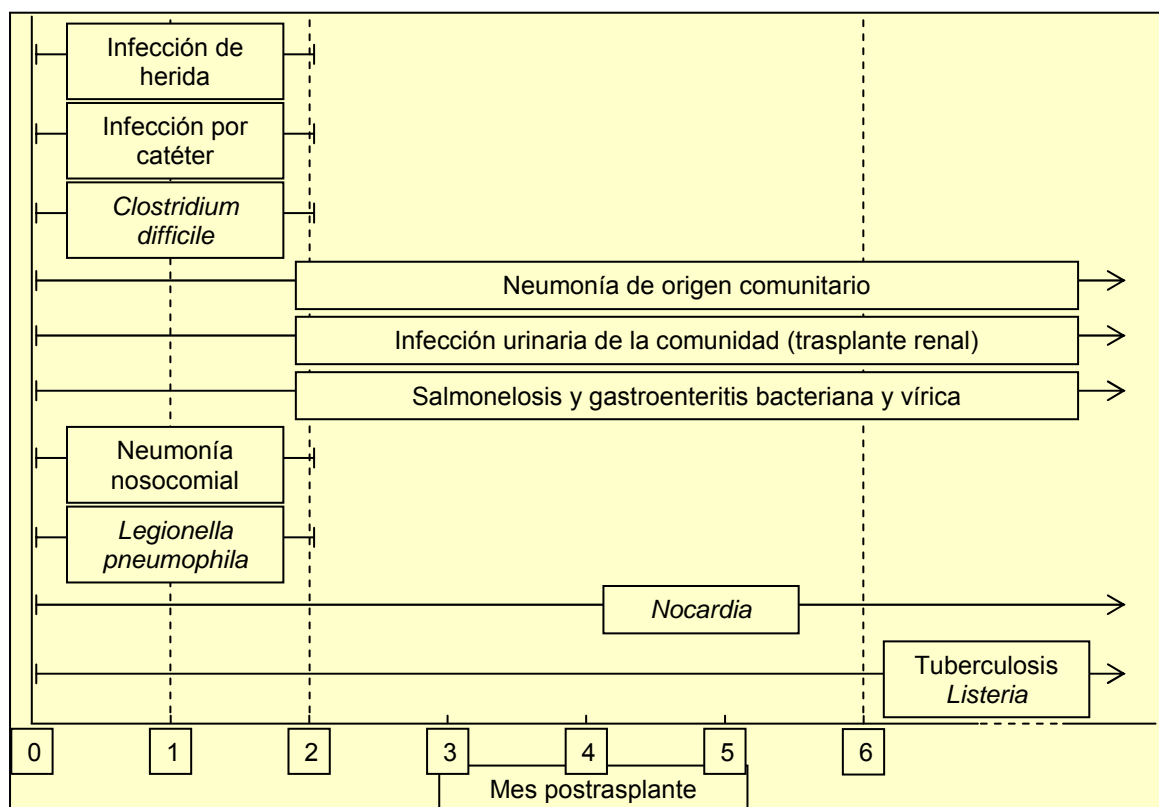


Figura 1. Infecciones más frecuentes en los diferentes periodos postrasplante

No se ha demostrado la utilidad de los cultivos vigilancia sistemáticos para la infección bacteriana, por lo que no se aconseja su realización. El diagnóstico de la infección en este grupo de pacientes se basa en el conocimiento de los factores de riesgo y en mantener una elevada sospecha clínica. En los pacientes trasplantados, la presencia de fiebre puede ser un factor fundamental en el diagnóstico diferencial con el rechazo del trasplante. Debe tenerse en cuenta que los síntomas y signos de infección pueden ser menos evidentes en este grupo de pacientes que en los pacientes inmunocompetentes, debido al tratamiento inmunosupresor. Por estas razones, una buena práctica ante la sospecha de infección en un paciente trasplantado sería la realización de dos hemocultivos seriados, cultivo de puntos de inserción de diferentes dispositivos que muestren señales de infección y de cualquier zona que sugiera esta

posibilidad: úlceras cutáneas, celulitis, muestras respiratorias si existen secreciones, orina si existe algún síntoma urinario, LCR si existe algún signo neurológico, frotis de herida quirúrgica si existen signos de infección, etc. En la tabla 14 se resumen algunas recomendaciones generales sobre la selección de muestras y procedimientos más adecuados para el diagnóstico de las infecciones bacterianas en los pacientes trasplantados.

Las muestras deben recogerse en las condiciones y los recipientes adecuados, deben estar correctamente identificadas y se enviarán lo más pronto posible para su procesamiento. En el laboratorio de microbiología debe revisarse el correcto envío e identificación de las muestras y proceder a su siembra en los medios adecuados y en las condiciones de incubación necesarias según los procedimientos establecidos.

Tabla 13. Vigilancia de la colonización por bacterias multirresistentes.

Bacteria	Muestras clínicas				
	Heces/rectal	Perineal	Faringe	Nasal	Otras
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina	+	+++	+++	++++	++ ^b
<i>Enterococcus</i> resistente a glucopéptidos	++++	++++	(+)	–	++
Enterobacterias productoras de BLEE	++++	++++	+	–	++
<i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente	++++	++	++++ ^c	–	+++ ^{d, e}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> productora de MBL	+	+++	++++ ^c	–	+++ ^d

Abreviaturas. BLEE: β -lactamasa de espectro extendido; MBL: metalo- β -lactamasa (resistencia a carbapenemas).

^aNo parece de interés para su estudio sistemático, aunque algunos estudios sí recogen esta utilidad.

^bAspirado traqueal en pacientes con ventilación mecánica (++) , úlceras crónicas (+++), orina en pacientes sondados (++) .

^cMás habitual: esputo, exudado de traqueostomía, etc. en vez de muestras faríngeas.

^dEn especial muestras de exudado de herida (+++).

^eMuestra perineal (++++).

Tabla 14. Infecciones más frecuentes en la neutropenia febril de acuerdo con el lugar de la infección y la etiología^a

Lugar de la infección	Manifestaciones clínicas	Principales patógenos	Diagnóstico
Sangre	Bacteriemia	Estafilococos coagulasa negativos, <i>Staphylococcus aureus</i> , estreptococos del grupo viridans, <i>Enterococcus faecalis</i> , bacilos gramnegativos (BGN): <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida</i> spp.	Hemocultivos
Infecciones por catéter	Dolor, signos inflamatorios	Estafilococos coagulasa negativos, <i>S. aureus</i> , BGN, <i>Corynebacterium jeikeium</i> , <i>Candida</i> spp.	Hemocultivos cualitativos/cuantitativos, cultivo de punta e inserción del catéter
Cavidad oral	Periodontitis, gingivitis, aftas	<i>S. aureus</i> , estreptococos viridans, herpes, <i>Candida</i> spp.	Cultivo de la lesión
Tracto respiratorio superior	Sinusitis	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus Streptococcus pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , BGN anaerobios, hongos filamentosos	Aspiración de senos, biopsia si no hay mejoría en 3-4 días
Tracto respiratorio inferior	Neumonía (tos, disnea, etc.)	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. Influenzae</i> , estreptococos del grupo viridans, <i>S. aureus</i> , <i>Legionella</i> , <i>Aspergillus</i> , otros hongos filamentosos, <i>Pneumocystis jirovecii</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Radiografía de tórax, examen y cultivo de esputo, lavado broncoalveolar, tinciones específicas (Ziehl-Neelsen, inmunofluorescencia, etc.)
Intestino delgado, disconfort	Tiflitis, colitis (dolor, diarrea)	BGN aerobios y anaerobios, <i>Clostridium difficile</i> , norovirus, rotavirus	Coprocultivo, detección de toxinas, radiografía de colon, TAC abdominal
Lesiones cutáneas perirectales	Celulitis (dolor, eritema, etc.)	BGN aerobios y anaerobios, <i>Enterococcus</i>	Cultivos de lesión, biopsia
Hígado y bazo	Candidiasis hepatoesplénica (fiebre, dolor abdominal, ↑↑ fosfatasas alcalinas)	<i>Candida</i> spp.	TAC abdominal, ecografía
Tracto urinario	Disuria, hematuria	BGN, <i>Enterococcus faecalis</i>	Urinocultivo

^aTabla extraída de Rovira M et al (Enferm Infecc Microbiol Clin 2007; 25:477-86) con modificaciones.

El procesamiento de las muestras procedentes de estos pacientes debe seguir las normas habituales del laboratorio de microbiología, prestando especial atención al aislamiento de microorganismos multirresistentes y de otros microorganismos con mayor incidencia en los trasplantados, como *L. monocytogenes*, especies de los géneros *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Legionella*.

5.1.1. Diagnóstico de la infección aguda. Las infecciones más frecuentes en este grupo de pacientes son la neumonía, la infección urinaria, la bacteriemia y la infección del área quirúrgica. La incidencia de dichas infecciones varía en función del tipo de trasplante. Así, en los pacientes con trasplante renal, la infección de las vías urinarias es la más frecuente, con el consiguiente riesgo de la pérdida del órgano trasplantado. Los agentes etiológicos más habituales no difieren de los de otros pacientes hospitalizados. La neumonía es la complicación más frecuente en los pacientes con trasplante cardíaco y pulmonar, y suele presentarse durante el primer mes del período postrasplante. En esta situación, los agentes más comunes son los patógenos nosocomiales, incluyendo microorganismos multirresistentes, pero no se deben olvidar otros patógenos más convencionales, como *S. pneumoniae* o *H. influenzae*, especialmente en el TPH. La infección de la herida quirúrgica ocurre con mayor frecuencia en los trasplantados que en otros pacientes quirúrgicos pero la etiología no difiere de la de éstos. La bacteriemia es una complicación frecuente en los pacientes con TOS y, sobre todo, en el TPH. Con frecuencia, está relacionada con el catéter y en más del 60% de los casos el agente etiológico son microorganismos grampositivos.

No hay métodos especiales ni estrategias particulares que deba aplicar el laboratorio de microbiología en el diagnóstico de la infección bacteriana aguda, salvo que, por definición, el laboratorio que atiende al trasplante debe estar altamente capacitado, tanto tecnológicamente como desde el punto de vista de profesionales con elevado conocimiento. El resto de consideraciones generales mencionadas en el epígrafe anterior valen también para la infección bacteriana aguda.

5.1.2. Diagnóstico de la infección latente y crónica: micobacteriosis. La infección por micobacterias, muy en particular la tuberculosis, es una complicación relativamente frecuente en los trasplantados de nuestro país. Se ha estimado una frecuencia de hasta el 3%, superior en el caso del trasplante pulmonar. Las complicaciones pueden ser graves, con mayor frecuencia de formas extrapulmonares y diseminadas. La tuberculosis plantea problemas desde el punto de vista del diagnóstico clínico y microbiológico, pero también de tratamiento, por las interacciones medicamentosas de los fármacos antituberculosos y las drogas inmunosupresoras. Por esas razones, la tuberculosis forma parte de la evaluación de los candidatos al trasplante, y es en este período donde deben hacerse los mayores esfuerzos diagnósticos y, si fuese necesario, de tratamiento de la infección latente. A pesar de ello, pueden presentarse casos en el período postrasplante y, por las dificultades

diagnósticas mencionadas, el laboratorio debe dar un buen soporte tecnológico y de conocimiento acorde con los requerimientos generales de cualquier programa de trasplante. Las estrategias y métodos de laboratorio no difieren de las que se aplican para otras situaciones clínicas. El mantenimiento de un alto índice de sospecha por parte de los clínicos responsables del paciente y la buena interconexión entre éstos y los microbiólogos son, una vez más, factores claves.

5.1.3. Otros patógenos bacterianos de especial mención (*Nocardia*, *Listeria*, etc.). A diferencia de lo que ocurre en los pacientes inmunocompetentes, en los que causan generalmente una diarrea leve o moderada, en los pacientes inmunodeprimidos las salmonelas no tifoideas pueden ser el origen de una infección bacteriémica grave con focos metastásicos, entre los que se incluye la pielonefritis, artritis séptica, abscesos en vísceras e infecciones vasculares. Actualmente, la incidencia de salmonelosis en los pacientes trasplantados ha disminuido por el uso del cotrimoxazol en la profilaxis de la infección por *P. jirovecii*.

La infección por *L. monocytogenes* se debe a la ingesta de alimentos contaminados y está también relacionada con el grado de inmunodepresión. En general, se presenta entre el segundo y sexto mes postrasplante. La manifestación clínica más frecuente es la meningitis y la bacteriemia primaria, pero también puede ser causa de otras infecciones localizadas. La incidencia de esta infección también es baja en la actualidad, probablemente debido a la utilización del cotrimoxazol para la profilaxis de *P. jirovecii*.

En los pacientes trasplantados, la incidencia de infección por *Nocardia* spp. está entre el 0,1% y 3,5%. Es más frecuente en los pacientes con trasplante pulmonar. La forma de nocardiosis más habitual es la pulmonar, que cursa como una neumonía que puede diseminarse a otros órganos, como el cerebro y la piel. El examen microscópico de las muestras clínicas puede ser de gran ayuda para el diagnóstico rápido de laboratorio. En la tinción de Gram se observan formas grampositivas bacilares ramificadas y cocobacilares, ácido-alcohol resistentes cuando se realiza la tinción de Ziehl-Neelsen modificada. El cultivo es obligado en caso de sospecha y la incubación debe prolongarse al menos 15 días.

Rhodococcus equi es una causa infrecuente de neumonía recurrente o cavitada en este grupo de pacientes. La sospecha clínica de la infección por este organismo debe informarse al laboratorio de microbiología, para establecer los protocolos necesarios para su cultivo. La variabilidad morfológica (formas cocoides o bacilares grampositivas) de *R. equi* en el examen microscópico depende del tipo de muestra estudiada y de las condiciones de incubación del cultivo. En condiciones de incubación de aerobiosis y en placas de agar sangre, *R. equi* puede desarrollar tres tipos de colonias: colonias mucosas rosadas, colonias no mucosas de color coral y, con menor frecuencia, colonias no mucosas amarillas. Se aconseja la utilización de medios selectivos con antibióticos para

evitar el sobrecrecimiento bacteriano, ya que los cultivos deben incubarse durante un tiempo prolongado.

La infección por *Clostridium difficile* es una entidad no infrecuente en este grupo de pacientes. La presencia de *C. difficile* productor de toxina debe descartarse siempre en los trasplantados que presenten diarrea, ya que en ellos concurren varios de los factores de riesgo: inmunodepresión, administración de múltiples antibióticos, etc. El diagnóstico microbiológico no difiere de otros pacientes hospitalizados y, como en éstos, no resulta totalmente satisfactorio. Debe combinarse la utilización de un método de detección rápida de toxinas A y B (rápido, pero de sensibilidad subóptima) con el cultivo toxigénico (aislamiento del microorganismo y comprobación de su capacidad de producir las toxinas) que mejora notablemente el rendimiento diagnóstico, especialmente en situación de baja endemia, pero que ofrece resultados tardíos.

La incidencia de legionelosis en los pacientes trasplantados es variable, en función de las condiciones epidemiológicas de cada centro. Aunque es más frecuente que se trate de una infección nosocomial, también puede ser de origen comunitario. La forma de presentación clínica es menos definida que en huésped normal. La mayoría de los casos están causados por *Legionella pneumophila* serogrupo 1. El cultivo con medios selectivos (BCYE- α) es el método de elección por su sensibilidad y especificidad. Las muestras recomendadas son las secreciones respiratorias, la sangre y el tejido pulmonar. Los criterios microscópicos de aceptación del esputo para patógenos convencionales no sirven para *Legionella* lo que, junto con el hecho de que la bacteria se cultiva en medios y protocolos específicos (BCYE- α), obliga a advertir al laboratorio de la sospecha clínica. Se recomienda realizar siempre el cultivo, ya que es el único método que permite aislar la cepa para realizar estudios epidemiológicos o de sensibilidad, y porque posibilita el diagnóstico de todos los serogrupos de *L. pneumophila*. En los últimos años, la detección de antígeno en orina se ha erigido como un método de gran utilidad por su sensibilidad, especificidad, simplicidad técnica y rapidez. Es obligado realizarla ante una sospecha de legionelosis en un trasplantado, más aún en situación de brote nosocomial. Debe tenerse en cuenta que la excreción de antígeno puede prolongarse por un tiempo largo, por lo que los resultados positivos deben interpretarse en el contexto clínico. La antigenuria no detecta *Legionella* de serogrupos distintos al serogrupo 1. El diagnóstico serológico tiene una utilidad limitada y no se recomienda con carácter general para estos pacientes.

5.2. INFECCIONES FÚNGICAS

La infección fúngica ha ido aumentando progresivamente en los últimos años debido al aumento de pacientes con inmunosupresión, uso de antimicrobianos de amplio espectro, instrumentación, etc. La población trasplantada cumple todos los factores de riesgo de infección fúngica invasiva (IFI),

siendo un factor clave para desarrollarla el grado y la duración de la neutropenia. El 80-90% de las infecciones fúngicas ocurren dentro de los primeros dos meses postrasplante. Los agentes etiológicos de IFI más frecuentes son *Candida* spp. y *Aspergillus* spp., pero se ha observado un aumento progresivo de la incidencia de especies de otros hongos filamentosos como *Scedosporium*, *Fusarium* y zigomicetos, que causan infecciones con peor pronóstico. La incidencia de infección fúngica varía según el tipo de trasplante y de la metodología diagnóstica empleada, desde el 50% en el TPH hasta el 5% en el trasplante de riñón según distintas series.

Los signos y síntomas de la infección fúngica en el trasplantado son poco específicos. La manifestación clínica más frecuente es la fiebre persistente que no responde al tratamiento con antibióticos de amplio espectro. Aunque se han producido avances en el conocimiento de los factores de riesgo y en el desarrollo de técnicas de imagen, éstos tampoco solucionan por sí solos el problema. La tomografía axial computarizada (TAC) es de gran ayuda para la aspergilosis pulmonar invasiva o diseminada en los pacientes neutropénicos, pero no es siempre lo suficientemente precoz como para cambiar el pronóstico de esta grave infección. Los métodos microbiológicos tienen una sensibilidad subóptima y requieren tiempos de incubación prolongados, lo que retrasa el diagnóstico. Por lo tanto, el diagnóstico de estas infecciones requiere una elevada sospecha clínica y el concurso multidisciplinar de varios profesionales, entre ellos el microbiólogo.

En la valoración de los métodos convencionales de diagnóstico microbiológico (el examen microscópico directo y el cultivo), debe tenerse en cuenta que: a) las muestras remitidas no son siempre lo más adecuadas porque, en este tipo de pacientes, no se pueden realizar exploraciones invasivas que permitirían la obtención de muestras más rentables; b) requieren un tiempo de incubación que retrasa el diagnóstico; c) la contaminación ambiental o con la microbiota habitual puede dificultar la interpretación del cultivo. Las limitaciones de los métodos convencionales han promovido la investigación y el desarrollo de otras técnicas diagnósticas como la detección de antígenos y anticuerpos, productos metabólicos o ADN fúngicos. En la tabla 15 se resumen los aspectos generales relativos al diagnóstico de las infecciones fúngicas en los trasplantados.

5.2.1. Muestras adecuadas. El laboratorio puede ayudar a establecer o confirmar el diagnóstico de las micosis, pero para ello es necesario la selección de las muestras y métodos de procesamiento microbiológicos adecuados. Si no se hace así, incluso podrían generarse errores diagnósticos. Siempre que sea posible, la muestra a estudiar deberá obtenerse directamente del órgano afectado. Dentro de las muestras remitidas para el estudio de la infección micótica, merecen especial mención las respiratorias, las del sistema nervioso central (SNC) y los hemocultivos.

Tabla 15. Consideraciones generales sobre el diagnóstico de las infecciones fúngicas en los trasplantados.

- Obligado el enfoque multidisciplinar y la estrecha colaboración entre clínicos y microbiólogos
- Obligado mantener un elevado índice de sospecha y valorar los factores de riesgo concurrentes
- Necesario el concurso de varios métodos diagnósticos: ninguno por sí solo suele ser suficiente
- La microscopía y el cultivo son ineludibles, a pesar de sus limitaciones
- Se requieren estudios seriados para mejorar la sensibilidad y poder interpretar los resultados
- Se deben obtener muestras del órgano afectado, siempre que sea posible
- El lavado broncoalveolar, mejor que el esputo (infección respiratoria)
- Las biopsias, mejor que los frotis o raspados
- El hemocultivo es obligado, aunque su sensibilidad sea insuficiente
- Tiempos de incubación prolongados (3-4 semanas)
- Conviene triturar los tejidos, no homogeneizarlos (zigomicosis)
- Se debe identificar los hongos aislados, pues puede ser la clave para el tratamiento
- Detección de antígenos: métodos rápidos, algunos de gran utilidad
- Escaso papel de la detección de anticuerpos en el diagnóstico de las infecciones fúngicas
- Pruebas moleculares: técnicas diagnósticas complementarias

La muestra de elección para el diagnóstico de infección por hongos del tracto respiratorio inferior es el lavado broncoalveolar pero, en ocasiones, no pueden realizarse exploraciones agresivas en este grupo de pacientes, por lo que se tiene que recurrir a los esputos o aspirados traqueales. La colonización orofaríngea por *Candida* spp. y la baja calidad de los esputos de los pacientes neutropénicos, por dificultad en la expectoración, determina que el estudio de estas muestras pueda tener poco valor. La interpretación de los cultivos debe realizarse con precaución y siempre dentro del contexto clínico del paciente. La sensibilidad y especificidad del esputo para el diagnóstico de la aspergilosis pulmonar también son variables, pero ambas aumentan si se envían al menos tres muestras para cultivo de hongos y si se obtienen aislamientos repetidos en muestras distintas. A excepción de los patógenos fúngicos primarios como *Histoplasma capsulatum*, en los hongos oportunistas la utilidad de la muestra vendrá determinada por la calidad del esputo, como en los cultivos bacterianos. La punción biopsia pulmonar percutánea dirigida por TAC, permite el diagnóstico de infección fúngica en el 50-80% de casos. El esputo y las secreciones respiratorias claramente purulentas, hemáticas o caseificadas pueden sembrarse directamente en los medios de cultivo. Las muestras fluidas deberán centrifugarse previamente a su siembra, resuspendiendo el sobrenadante en suero fisiológico y las secreciones viscosas deberán fluidificarse con un agente mucolítico.

La infección de nariz y senos puede estar causada por una variedad de hongos (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., hongos dematiáceos y mucorales). En estos casos deben remitirse muestras para estudio histológico y micológico: frotis o raspados nasales, biopsia o lavados de los senos paranasales. La observación de hifas anchas, no tabicadas y con ramificaciones en ángulo recto es sugestiva de infección por mucorales.

En cuanto al diagnóstico de las infecciones del SNC, los principales factores que influyen en la rentabilidad del cultivo del líquido cefalorraquídeo

(LCR) son el volumen de muestra procesado, el tiempo, la temperatura de incubación y la administración de tratamiento antifúngico previo. El examen directo con tinta china permite el diagnóstico de la meningitis criptocócica en el 50-75% de los casos y el cultivo, aproximadamente, en el 90%. En la meningitis candidiásica, el examen directo es positivo en la mitad de los casos y el cultivo en torno el 70%. El estudio del LCR tiene poco valor en las lesiones focales del SNC. En estos casos, la muestra más adecuada para estudio es la punción y biopsia de la zona afectada para estudio histopatológico y cultivo.

El hemocultivo debe realizarse en todos aquellos casos en que se sospeche infección por criptococo, *Candida* spp., *Histoplasma* spp. u otros hongos como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. o *Paecilomyces* spp.. El aislamiento de *Aspergillus* spp. en hemocultivo es extremadamente raro. En pacientes con candidemia, a pesar de realizar hemocultivos seriados, estos son positivos en menos del 50% de los casos. Los factores que influyen en el rendimiento de los hemocultivos son: volumen de la muestra, frecuencia de las muestras, medio de cultivo y método utilizado. La utilización de más de un medio de cultivo, la inoculación de un volumen de 10 mL de sangre en cada frasco, la realización de, al menos, dos hemocultivos seriados, la incubación prolongada (14-21 días) y la práctica de subcultivos ciegos cuando finaliza el protocolo de incubación podrían mejorar el rendimiento de esta muestra. Los métodos actuales comerciales automatizados para hemocultivo tienen mayor rentabilidad en el aislamiento y requieren menos tiempo para el crecimiento de las levaduras que los métodos tradicionales bifásicos, pero no muestran ventajas respecto a los hongos filamentosos. El método de lisis-centrifugación parece tener una mayor sensibilidad para la recuperación de hongos dimórficos y algunos filamentosos, pero es un método laborioso, de difícil aplicación como sistema de rutina en un laboratorio de microbiología. Su utilización estaría condicionada a la existencia de una fuerte sospecha clínica de infección por estos

hongos.

5.2.2. Métodos diagnósticos. Tal y como se ha indicado con anterioridad, las muestras seleccionadas para el diagnóstico de las infecciones fúngicas se deben recoger en las máximas condiciones de esterilidad y remitir rápidamente al laboratorio de microbiología para su procesamiento. Los líquidos estériles deben concentrarse mediante centrifugación o filtración, para posteriormente realizar la siembra en los medios seleccionados y el examen microscópico directo si hay muestra suficiente. Las muestras de tejido y de biopsias deben ser troceadas para su inoculación directa en las placas con los medios de cultivo seleccionados y para el examen directo. No deben ser homogeneizadas, ya que en los casos de infección por zigomicetos la homogenización disminuye la viabilidad del hongo. Todas las muestras deben observarse macroscópicamente y seleccionar la parte más representativa, buscándose en los tejidos las zonas con pus, caseificación o necrosis.

La microscopía nos permite tener un diagnóstico presuntivo de infección fúngica rápido por lo que, siempre que el volumen de la muestra lo permita, debe realizarse el examen microscópico directo. A pesar de ello, el valor del examen microscópico es limitado: es poco sensible y no descarta la infección si no se observan elementos fúngicos, y también puede dar resultados falsos positivos. Aunque en la mayoría de los casos no permite la identificación del hongo causal, la observación de determinadas estructuras fúngicas puede proporcionar un diagnóstico definitivo: cápsula de *Cryptococcus neoformans*, células fumagoides en cromoblastomycosis, levaduras pequeñas intracelulares de *H. capsulatum*, quistes/ascas típicos de *P. jirovecii*, levaduras con brotes de base ancha de *Blastomyces dermatitidis*, levaduras con gemación multipolar en rueda de timón de *Paracoccidioides brasiliensis*, o las esférulas de *Coccidioides immitis*. Por otro lado, el examen microscópico negativo puede ayudar a la interpretación de cultivos positivos como contaminantes.

Son múltiples las técnicas de observación microscópica para el diagnóstico de las micosis. En los exámenes en fresco, la adición de KOH o dimetilsulfóxido facilita la clarificación de la muestra pero requiere una mayor experiencia del observador. La tinción de Gram permite observar las formas levaduriformes, pero tiene menor sensibilidad para las hifas. Las tinciones basadas en métodos fluorescentes no requieren tanta experiencia del observador. Las tinciones argénticas y la del ácido periódico de Schiff son las más utilizadas en histopatología para la visualización de elementos fúngicos.

El cultivo nos permitirá el aislamiento, la identificación y la realización de pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, en el caso de que éstas se consideren necesarias. A pesar de que la mayoría de hongos son poco exigentes y crecen en un gran número de medios de cultivo, se aconseja la selección de medios generales (agar Sabouraud) y

medios selectivos con antibióticos o antifúngicos para inhibir el sobrecrecimiento de la microbiota comensal o de contaminantes. La temperatura de incubación aconsejada es de 30°C y el tiempo de incubación 3-4 semanas. Los medios, condiciones de cultivo así como los métodos de identificación de los hongos filamentosos y levaduras están ampliamente explicados en el Procedimiento nº 21 de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) "Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de la sensibilidad a los antifúngicos".

La detección de antígenos fúngicos o de componentes no antigénicos circulantes en sangre, orina o muestras respiratorias ha sido una de las vías de estudio como método de diagnóstico rápido de las micosis sistémicas en los últimos años. Se han utilizado múltiples moléculas como antígenos para el diagnóstico de las micosis invasivas que se analizarán al tratar de cada uno de los agentes etiológicos individualmente.

La detección de anticuerpos tiene poco valor para el diagnóstico de la infección fúngica en los pacientes neutropénicos. Muchos de estos pacientes no son capaces de generar una respuesta inmunitaria y, además, la presencia de una serología positiva no permite diferenciar entre colonización e infección. Por otro lado, cuando se produce, la respuesta de los anticuerpos es tardía, una vez que ya se ha desarrollado la enfermedad, por lo que tiene poco valor para el diagnóstico rápido, tan necesario en estos pacientes con el objetivo de establecer una terapia adecuada precoz. Las técnicas serológicas son útiles para el diagnóstico de la histoplasmosis y de la coccidioidomycosis, infecciones infrecuentes en Europa, pero que deben tenerse en cuenta en pacientes que hayan viajado a zonas endémicas.

Actualmente, están en desarrollo técnicas de PCR. La falta de estandarización del método de extracción, muestra a utilizar, diana a amplificar, y técnica de PCR empleada dificulta la comparación entre los diferentes estudios publicados y su recomendación como técnica diagnóstica para las infecciones fúngicas. La rotura de la pared celular fúngica y la extracción del ADN es un paso crítico que influye directamente en la sensibilidad de la PCR. Se han evaluado distintos métodos de extracción, pero todavía no existe un consenso sobre cuál es el más adecuado. Por el momento pueden considerarse técnicas complementarias de diagnóstico, pero no el método de elección.

En cuanto a la realización de pruebas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos, la estandarización de los métodos de referencia por parte de distintos comités, como el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) y el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), permite la realización de estas pruebas en los laboratorios clínicos y conocer el perfil de sensibilidad de las cepas clínicas. El desarrollo de nuevas moléculas antifúngicas también justifica la realización de estas pruebas con el fin de detectar resistencias y buscar la mejor alternativa terapéutica. En la actualidad, existen técnicas

comerciales y métodos de difusión en agar con discos que muestran buena correlación con los métodos de referencia, más laboriosos y de difícil aplicación en la práctica diaria en los laboratorios de microbiología clínica.

Existe una cierta controversia sobre la utilidad clínica de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. La mayoría de los expertos coinciden en señalar que los estudios de sensibilidad no son necesarios en todos los enfermos, ya que la información epidemiológica establece cuál puede ser el tratamiento empírico más adecuado. El Grupo de Estudio de Micología Médica (MICOMED) de la SEIMC, recomienda realizarlos en caso de fracaso terapéutico, enfermos con antecedentes de profilaxis antifúngica y aislamiento de una especie infrecuente cuya sensibilidad sea poco predecible. En estos casos, el estudio de la sensibilidad *in vitro* puede ayudar a la detección de resistencias y a la selección de una alternativa terapéutica, lo que es particularmente pertinente en los trasplantados.

5.2.3. Candidiasis. La candidiasis es la infección fúngica más frecuente en los pacientes granulocitopénicos. La incidencia varía en función del tipo de trasplante de órgano, desde el 9-25% en los TPH hasta el 30% en los pacientes con trasplante hepático si se incluye la infección de herida quirúrgica. El espectro clínico de la infección por *Candida* spp. es muy amplio y va desde la infección de la mucosa orofaríngea a la candidiasis sistémica con afectación multiorgánica, incluyendo la esofagitis, infección urinaria, infección relacionada con el catéter, candidiasis hepatoesplénica, etc. El período de riesgo es mayor durante la fase de neutropenia. El diagnóstico de la candidiasis sistémica es difícil y requiere una alta sospecha clínica. En algunos centros, *Candida* spp. es el cuarto agente etiológico de sepsis. Sin embargo, el diagnóstico clínico y microbiológico de una infección sistémica por *Candida* spp. es difícil, debido a la ausencia de síntomas patognomónicos de la enfermedad y al hecho de que únicamente el 50% de los pacientes con candidemia tienen el hemocultivo positivo. La mortalidad general es elevada. En cuanto a la etiología, *C. albicans* es la responsable prácticamente de la mitad de los casos; el resto está causado principalmente por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei*, con incidencia variable según cada centro.

Muchas especies de levaduras forman parte de la microbiota habitual orofaríngea e intestinal, por lo que su aislamiento en muestras rectales o respiratorias no debe ser considerado diagnóstico de infección. El aislamiento en muestras normalmente estériles o en el hemocultivo es muy indicativo de infección diseminada. La punción-biopsia de las lesiones nodulares hepáticas o esplénicas en un paciente trasplantado neutropénico con síndrome febril que no responde al tratamiento empírico con antibióticos de amplio espectro puede ser de gran utilidad para el diagnóstico de candidiasis hepatoesplénica, aunque el cultivo es positivo en sólo el 50% de los pacientes. Ante la sospecha de candidiasis diseminada, deben realizarse siempre

varios hemocultivos. El examen microscópico y cultivo de las lesiones cutáneas, manifestación más frecuente en las candidiasis diseminada que en otras micosis sistémicas, puede ser de gran ayuda para el diagnóstico.

Con el fin de mejorar la sensibilidad, especificidad y rapidez de las técnicas para el diagnóstico de la infección por *Candida* spp., se han desarrollado métodos basados en la detección de diversos componentes fúngicos o de anticuerpos producidos como respuesta a la infección. Tal y como se indica en las recomendaciones del grupo MICOMED de la SEIMC, estas técnicas están todavía en desarrollo y tienen una eficacia limitada, pero pueden ser de ayuda para el diagnóstico de la infección fúngica invasiva, sobre todo cuando se utilizan de forma combinada.

La detección de manano en pacientes con candidiasis invasora no ha demostrado ser útil en el diagnóstico. Su presencia en sangre es transitoria y, por esta razón, se aconseja su utilización conjuntamente con otra técnica como, por ejemplo, la detección de anticuerpos antimanano, para aumentar su sensibilidad o especificidad. La detección de manano por ELISA es más sensible y específica que por aglutinación con partículas de látex.

Además de los anticuerpos antimanano, actualmente hay pruebas comercializadas que detectan anticuerpos frente a la enolasa y frente a los antígenos del micelio de *C. albicans* y del citoplasma. Como ya se ha dicho, la detección de anticuerpos en pacientes colonizados o la ausencia de respuesta inmunitaria en pacientes inmunodeprimidos plantean problemas a la hora de interpretar los resultados en los trasplantados con sospecha de candidiasis invasiva. Su utilidad aumenta cuando se estudian muestras seriadas del paciente, y siempre de forma combinada con otras pruebas diagnósticas.

La detección de componentes no antigénicos liberados por los hongos durante la infección es otra posibilidad en el diagnóstico de estas micosis. El D-arabinitol es un metabolito producido por algunas especies de levaduras presente en sangre de pacientes con candidiasis invasiva y también parece ser útil para el seguimiento de estos pacientes. Se han descrito resultados falsos positivos en pacientes con insuficiencia renal y tratamiento con esteroides. El (1,3)- β -D-glucano es un componente de la pared celular fúngica que se puede detectar en suero y líquidos estériles de pacientes con infección fúngica invasora como la aspergilosis, candidiasis y pneumocistosis. No está presente en la pared celular de *C. neoformans* y algunos estudios recientes parecen indicar que se encuentra en baja cantidad en los mucorales. El (1,3)- β -D-glucano es un marcador panfúngico, es decir, nos permite detectar una infección fúngica invasiva (IFI), pero no nos indica cuál es el agente de la infección. Se recomienda su detección una vez por semana, en muestras de suero seriadas de pacientes con riesgo de presentar una IFI. Se han descrito resultados falsos positivos en pacientes sometidos a hemodiálisis con aparatos que tengan membranas

de acetato de celulosa, o en tratamiento con albúmina, inmunoglobulinas, algunos agentes anticancerosos y sulfamidas. Igualmente, se han referido resultados falsos negativos en pacientes en tratamiento con azitromicina.

Actualmente, las técnicas de PCR deben considerarse un método complementario al cultivo convencional. La falta de estandarización sobre el tipo de muestra adecuado, método de extracción a utilizar, molécula diana y método de amplificación dificulta la comparación de los diferentes estudios publicados y su aplicación habitual en el diagnóstico de la candidiasis invasiva. Como ya se ha indicado para otros hongos, pueden ser de ayuda para el diagnóstico de la candidiasis, pero siempre conjuntamente con otros métodos.

El aislamiento en un paciente neutropénico de una levadura en una muestra estéril debe ser considerado como indicativo de patogenicidad y deberá realizarse la identificación de especie. Aunque *C. albicans* sigue siendo la especie aislada con mayor frecuencia en estos pacientes, algunas especies típicamente resistentes al fluconazol, como *C. krusei* y *C. glabrata*, van adquiriendo cada vez más protagonismo. La identificación de la especie puede ayudar a iniciar una terapia antifúngica adecuada lo más pronto posible. Actualmente, la mayoría de laboratorios utilizan métodos comerciales validados que permiten la identificación de especie en 48-72 h. Algunas pruebas convencionales o clásicas, como la prueba de filamentación o los túbulos germinales, permiten la identificación de *C. albicans* en dos horas. Si fuese negativa, el estudio de la fermentación y asimilación de azúcares, la hidrólisis de la urea, el crecimiento a distintas temperaturas y el estudio de la morfología, entre otras pruebas, permiten la identificación del resto de especies de levaduras. La introducción de la espectrometría de masas (técnica de MADI TOF MS) en los laboratorios facilitará y reducirá el tiempo necesario para su identificación.

La eficacia de los cultivos de vigilancia en el diagnóstico de la candidiasis diseminada depende del microorganismo aislado y del tipo de paciente. La colonización por *Candida* spp. en pacientes con leucemia o TPH es predictiva para el desarrollo posterior de enfermedad invasiva, pero no todos los pacientes colonizados presentarán necesariamente candidiasis diseminada. El valor predictivo positivo es mucho mayor en aquellos pacientes colonizados por otras especies de *Candida* distintas de *C. albicans*. En los pacientes con TOS se ha observado escasa correlación entre colonización y desarrollo de enfermedad invasiva.

5.2.4. Criptococosis. *Cryptococcus neoformans* es un levadura ampliamente distribuida en la naturaleza. La infección se produce por la inhalación de la levadura presente en los excrementos de paloma u otras aves. En el huésped normal da lugar a un cuadro pulmonar, generalmente asintomático y autolimitado pero, en los pacientes con alteración de la inmunidad celular, la infección puede diseminarse con afectación del SNC y, en ocasiones, de otros órganos. En los trasplantados, la criptococosis cursa

con un cuadro sistémico con fiebre, pérdida de peso y alteraciones de conciencia y, con frecuencia, síntomas respiratorios. Algunos pacientes pueden presentar también lesiones cutáneas como pápulas, nódulos, celulitis o úlceras. Suele presentarse en el período tardío del trasplante y, sobre todo, en pacientes en tratamiento con azatioprina y corticoides a dosis bajas.

En los pacientes con afectación meníngea, el examen con tinta china del LCR permite el diagnóstico en el 50-90% de los casos, y el cultivo en el 90%. Los inconvenientes de estas técnicas convencionales son la baja sensibilidad del examen directo y la lentitud del resultado del cultivo. La detección de antígeno criptocócico, tanto en LCR como en suero, tienen buena especificidad y sensibilidad, por lo que son técnicas de elección para el diagnóstico. También pueden utilizarse en muestras respiratorias y orina. En la interpretación de esta técnica, debe tenerse en cuenta que tiene muy buena sensibilidad en el diagnóstico de infecciones sistémicas en pacientes con sida, pero su sensibilidad disminuye en otros pacientes inmunodeprimidos con infección diseminada, como es el caso de los trasplantados, y en las formas localizadas, como la cutánea o la pulmonar. Las técnicas comercializadas se basan, principalmente, en la aglutinación con partículas de látex o el enzimoimmunoensayo. Se han descrito falsos positivos relacionados con la presencia de factor reumatoide, infecciones por *Trichosporon* spp., algunas bacterias y ciertas neoplasias. Los polisacáridos del agar presente en los medios de cultivo también pueden originar falsos positivos, por lo que se debe evitar la contaminación cruzada del material a emplear durante el procesamiento microbiológico.

A diferencia de la mayoría de hongos, *Cryptococcus* spp. no posee (1,3)- β -D-glucano como componente de su pared celular, por lo que esta técnica no estaría indicada en el diagnóstico de estas infecciones. No existen estudios suficientes para la aplicación de técnicas de PCR en muestra clínica para el diagnóstico de criptococosis, pero se han demostrado útiles como métodos de identificación.

5.2.5. Aspergilosis. La aspergilosis es la infección fúngica más frecuente después de la candidiasis en pacientes trasplantados granulocitopénicos. La mayoría de infecciones están causadas por *Aspergillus fumigatus*. Le siguen en frecuencia *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* y *A. glaucus*. La incidencia de la infección aspergilar es variable según las series y el tipo de trasplante, pero puede alcanzar el 8% en pacientes con TPH. Dentro de los pacientes con TOS, la incidencia es mayor en los trasplantados de pulmón y corazón, siendo infrecuente en los renales.

Los hongos del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se aíslan en el suelo, aire, plantas y materia orgánica en descomposición. Dentro de este género, se distinguen varias especies, identificadas en función de las características de macroscópicas y microscópicas y por su capacidad para crecer a

distintas temperaturas, entre otras. La infección se adquiere por vía inhalada, siendo la localización más frecuente la pulmonar o sinusal. La infección puede contraerse fuera o dentro del hospital. Es conocida la aparición de brotes nosocomiales de infección por *Aspergillus* spp. asociados a las construcciones en el hospital o en zonas cercanas. Actualmente, la utilización de filtros HEPA y habitaciones con flujo laminar ha disminuido notablemente el riesgo de este tipo de infecciones en los pacientes con TPH. La manifestación clínica más frecuente en los pacientes trasplantados es la aspergilosis pulmonar invasiva. Otras manifestaciones clínicas pueden ser la rinosinusitis invasiva, la aspergilosis diseminada y la cutánea, asociada a catéteres intravasculares.

El diagnóstico de la aspergilosis es difícil, ya que no existen signos clínicos característicos y los métodos de laboratorio tienen poca sensibilidad, por lo que se requiere una elevada sospecha clínica. El hallazgo en la TAC de lesiones nodulares rodeadas de un halo (signo del halo) aporta una información de vital importancia para el diagnóstico de aspergilosis. La observación microscópica de hifas tabicadas, regulares y dicotómicas, ya sea en cortes histológicos como en preparaciones microbiológicas, es altamente sugestiva de aspergilosis, pero no establece el diagnóstico definitivo, pues no siempre es posible observar estas imágenes con claridad. Además, otros hongos que también pueden infectar a los trasplantados pueden originar imágenes similares. Los cultivos tienen baja sensibilidad para el aislamiento de *Aspergillus* spp.. En menos del 50% de los pacientes con aspergilosis pulmonar invasiva se aísla el hongo en el esputo. La sensibilidad y especificidad de esta técnica pueden mejorarse realizando cultivos seriados de muestra respiratorias, como ya se ha comentado anteriormente. El aislamiento único de *Aspergillus* spp. en una muestra de este tipo procedente de un paciente granulocitopénico debe valorarse con precaución, pero nunca desestimarse. El lavado broncoalveolar tiene una mayor sensibilidad que el esputo para el diagnóstico de la aspergilosis.

Como ocurre con la infección por *Candida* spp., las limitaciones de los métodos convencionales para el diagnóstico de la aspergilosis han sido decisivas para la búsqueda de métodos alternativos basados en la detección de antígenos, componentes de la pared celular o detección de ADN. La detección de anticuerpos no se ha demostrado útil en el diagnóstico de la aspergilosis en el paciente inmunodeprimido.

El galactomanano, ha sido el antígeno más estudiado para el diagnóstico y seguimiento de la aspergilosis invasiva. Su sensibilidad y especificidad varía en función de la frecuencia de muestreo, grupo de pacientes estudiado, muestra seleccionada, técnica y punto de corte utilizado. Se han desarrollado diversos métodos comerciales basados en técnicas de enzimoimmunoensayo (EIA), radioimmunoensayo y aglutinación con partículas de látex, pero parece que la que ofrece una mayor sensibilidad es la técnica comercializada de EIA (Platelia® *Aspergillus*, BioRad). En el estudio

realizado por Martens et al, se valoran muestras seriadas semanales de suero en un grupo de pacientes neutropénicos con TPH alogénico. El valor predictivo positivo fue del 94,4% y el negativo del 98%. La positividad del galactomanano precedió a cualquier signo o síntoma de infección en el 80% de los casos. La detección del galactomanano permite también el seguimiento de estos pacientes y la valoración de la respuesta a tratamiento. En relación con el punto de corte, actualmente se considera que la técnica puede interpretarse de forma dinámica (índices $\geq 0,5$ ng/mL en muestras consecutivas), o estática (índice $\geq 0,7$ ng/mL) en una muestra.

La aplicación de la prueba de galactomanano sérico a los pacientes TOS, incluso en aquéllos que presentan mayor riesgo, como los pulmonares o los hepáticos, no ofrece resultados tan concluyentes, si bien se recomienda llevar a cabo esta técnica conjuntamente con otras, dada la gravedad que tiene la infección aspergilar y el peor pronóstico cuando el diagnóstico se demora en el tiempo. Recientemente, se ha incluido esta prueba como criterio micológico en las definiciones de consenso de aspergilosis invasiva probable de la EORTC/MSG (*European Organization for Research and Treatment of Cancer / Mycoses Study Group del National Institute of Allergy and Infectious Diseases*). En cuanto a otras muestras biológicas, la detección de galactomanano en el lavado broncoalveolar tiene una sensibilidad superior al 80% cuando se utilizan como punto de corte índices ≥ 1 ng/mL, en pacientes con neutropenia, pacientes críticos con alteraciones de la inmunidad y en los trasplantados de pulmón, pero los puntos de corte están menos definidos, dada la escasa experiencia y ciertos condicionantes técnicos, como el volumen de líquido a instilar y recuperar en el lavado broncoalveolar.

Se han descrito resultados falsos positivos en la población pediátrica, sobre todo en neonatos con colonización intestinal por *Bifidobacterium* spp., por absorción de galactomanano procedente de los alimentos a través de la pared intestinal, en pacientes con EICH crónico, en los tratados con piperacilina-tazobactam o amoxicilina-clavulánico, por reactividad cruzada con especies de otros hongos como *Penicillium*, *Alternaria*, *Paecilomyces* y *Cryptococcus*. También se han descrito falsos negativos en aspergilosis muy localizadas, como la traqueobronquitis en trasplante de pulmón, en casos relacionados con especies con baja concentración de galactomanano o por la profilaxis o tratamiento empírico con antifúngicos activos frente a *Aspergillus* spp..

Como ya se ha indicado anteriormente, el (1,3)- β -glucano es un marcador panfúngico de infección. En el caso de la aspergilosis invasiva, puede ser útil para el diagnóstico siempre que se utilice en un grupo con elevado riesgo de infección y se realicen dos muestras seriadas semanales. En este contexto, para la interpretación del resultado, se valorará el aumento progresivo del índice o, al menos, la presencia de dos muestras positivas.

En relación con las técnicas de PCR, la falta de estandarización del método y la variabilidad de los

resultados en los distintos estudios publicados no aconseja su utilización como método diagnóstico habitual en los laboratorios clínicos y, por el momento, sigue estando reservada al ámbito de la investigación o a su utilización como método adicional.

5.2.6. Otros hongos filamentosos de especial interés en los trasplantados. La mucormicosis (zigomicosis) está producida por los hongos del orden *Mucorales*. Estos hongos termotolerantes, ampliamente distribuidos en la naturaleza, se caracterizan por tener un micelio aéreo muy desarrollado de hifas anchas y sin tabicar. Dentro de este orden se distinguen varios géneros en función de las características del esporangio, presencia o no de rizoides y espolones y su relación con el esporangio, y características de la columela. La mucormicosis es una infección oportunista y, al igual que la aspergilosis, se caracteriza por la invasión vascular, trombosis, infarto y necrosis de los tejidos. Suele producirse por la inhalación de esporas, excepto la localización cutánea que se origina por inoculación directa. Las manifestaciones clínicas más frecuentes en trasplantados son la rinosinusitis, la afectación cerebral, la pulmonar y la infección diseminada, todas ellas de rápida y fatal evolución.

La demostración por microscopía de la presencia de mucorales en una muestra tisular es más significativa que el simple aislamiento en cultivo. La observación de hifas anchas, no tabicadas, con ramificaciones en ángulo recto es altamente sugestiva de la infección por este grupo de hongos, pero nunca debe olvidarse el aislamiento en el cultivo. Éste debe ser interpretado con cautela en muestras respiratorias, ya que puede tratarse de contaminaciones de laboratorio, por lo que aquí también es necesaria una estrecha colaboración clínico-microbiológica. El diagnóstico de la zigomicosis sigue basado en los procedimientos del examen microscópico y cultivo, ya que la detección de antígenos y las técnicas de microbiología molecular apenas se han evaluado como técnicas de diagnóstico clínico. Estas especies tienen poca concentración de β -D-glucano en su pared. Aunque en algunos estudios publicados recientemente se incluyen algunos casos de mucormicosis en los que los enfermos tenían cantidades elevadas de este antígeno en sangre, la experiencia acumulada es reducida, por lo que no se puede recomendar la técnica como un método de diagnóstico alternativo en esta micosis.

Fusarium spp. puede causar una infección local, invasiva o diseminada en los trasplantados neutropénicos. Generalmente, la vía de la infección es inhalatoria, cursando como un cuadro sinusal o pulmonar con posterior diseminación, pero también puede ser por inoculación cutánea. Como *Aspergillus* spp., se caracteriza por su capacidad para invadir los vasos con trombosis y necrosis tisular. La presencia de lesiones cutáneas dolorosas, eritematosas, maculares o papulares que evolucionan hacia úlceras necróticas en un paciente con neutropenia grave y fiebre persistente, a pesar de tratamiento antibiótico de amplio espectro, debe hacer pensar en infección por *Fusarium* spp.. La presencia de onicomosis en un trasplantado, especialmente en los TPH y otros

pacientes con fuerte inmunodepresión, debe mover a investigar a *Fusarium* spp. como agente etiológico de esta infección superficial y a considerarlo en el diagnóstico diferencial de una IFI.

El examen histopatológico no permite diferenciar la infección por *Fusarium* spp. de otras micosis, como la aspergilosis, por lo que el diagnóstico se ha de basar en el aislamiento de hongo en las muestras respiratorias, en las lesiones cutáneas o en los hemocultivos, que son positivos en aproximadamente el 60-70% de los casos. Muchas de estas especies pueden detectarse con las técnicas de detección de β -glucano, pero no hay datos suficientes que apoyen su utilización. También se han desarrollado técnicas de identificación y de tipificación basadas en la PCR para ser utilizadas en cultivo o en muestras clínicas. Algunas de ellas están validadas en modelos animales o con algunas muestras clínicas humanas, pero no hay información suficiente como para hacer recomendaciones.

Los hongos del género *Scedosporium*, especialmente *S. prolificans* son una causa menos frecuente, aunque bien reconocida, de IFI, especialmente en el TPH con factores adicionales de riesgo, como tratamiento antibiótico prolongado y EICH. La sintomatología es inespecífica, la mortalidad muy elevada y estos hongos son resistentes a muchos antifúngicos, entre ellos a los nuevos azoles. De nuevo, es fundamental mantener un elevado índice de sospecha y una colaboración estrecha entre clínicos y microbiólogos pues, además, las técnicas de laboratorio disponibles son insatisfactorias. Se basarán en la observación microscópica y el cultivo, con interpretación prudente, pues es difícil de diferenciar de la simple colonización. El resto de métodos carece de aplicación en estos momentos.

5.2.7. *Pneumocystis jirovecii*. *Pneumocystis jirovecii* puede ser causa de neumonía intersticial bilateral en los pacientes trasplantados en los primeros seis meses postransplante o en pacientes con inmunosupresión mantenida debido al rechazo, pero actualmente con el uso de la profilaxis es una patología infrecuente. No crece en los medios de cultivos convencionales y el diagnóstico de la infección está basado en el examen microscópico y en las técnicas de PCR. En ambos casos, las muestras con mayor rendimiento son el esputo inducido y el lavado broncoalveolar.

La selección de las técnicas de tinción dependerá de la experiencia y posibilidad de cada laboratorio en cuestión. Las tinciones de metenamina-plata, azul de toluidina O, ácido peryódico-Schiff y calcoflúor, tiñen la pared de los quistes, pero no las formas tróficas ni los componentes internos de los quistes. Las técnicas convencionales (Giemsa y derivados, Papanicolau, Gram-Wright, etc.) tiñen estos últimos, pero no permiten ver la pared quística. En general, la combinación de una técnica de cada uno de los grupos podría ser una estrategia razonable. Los métodos basados en anticuerpos fluorescentes tiñen todas las estructuras del quiste y trofozoicas.

Las técnicas de PCR son, potencialmente, un método más sensible que la observación morfológica. Se han desarrollado distintas técnicas

de PCR con diferentes dianas (*internal transcribed spacers* del ADN ribosómico, genes mitocondriales, etc.). Las técnicas de mayor aplicabilidad clínica son las de PCR a tiempo real cuantitativas que permitirían diferenciar entre la colonización y la infección. Aunque estas pruebas han demostrado ser de gran utilidad en el diagnóstico de la infección por *P. jirovecii* en los pacientes con sida, parecen tener menor sensibilidad en otros pacientes.

5.3. INFECCIONES PARASITARIAS

5.3.1. *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii* es un protozoo parásito intracelular frecuente en nuestro medio. En el receptor de un trasplante, la toxoplasmosis puede ser debida a la transmisión del parásito a través del órgano trasplantado desde un donante seropositivo a un receptor seronegativo, la reactivación de una infección latente en un receptor seropositivo o la transmisión derivada de una transfusión sanguínea. La situación más grave se produce en el primero de los supuestos y en el trasplante cardíaco, debido a la predilección de los quistes por la musculatura estriada, siendo la miocarditis la manifestación clínica principal. En ausencia de profilaxis específica (cotrimoxazol) se ha estimado una incidencia del 25-45% de que se transmita el parásito al receptor seronegativo. La toxoplasmosis en los pacientes trasplantados puede manifestarse como coriorretinitis, un síndrome mononucleósico o la afectación orgánica. En los pacientes con TPH alogénico, la reactivación de la infección tiene una mortalidad elevada. En este caso, la presentación clínica más frecuente es en forma de abscesos cerebrales, aunque se han comunicado casos de lesiones múltiples, meningitis, neumonitis y toxoplasmosis diseminada con afectación multiorgánica.

Las pruebas de laboratorio tienen un valor limitado debido a la elevada frecuencia de la infección en la población general, la dificultad de los pacientes inmunodeprimidos en desarrollar una buena respuesta de anticuerpos y las peculiaridades de la infección. En la TAC o la resonancia magnética se pueden observar lesiones múltiples o únicas con captación de contraste en anillo, rodeadas por edema, que sugieren esta etiología. La demostración del parásito en sangre, fluidos o tejidos ofrece el diagnóstico definitivo de la enfermedad, pero su sensibilidad puede ser insuficiente para los métodos de tinción o cultivo (taquizoítos). Las técnicas cuantitativas basadas en la PCR a tiempo real mejoran la sensibilidad y permiten monitorizar la evolución de la enfermedad. Se considera el diagnóstico de toxoplasmosis probable en caso de evidencia clínica o radiológica y, al menos, un resultado positivo para PCR en sangre, LCR o lavado broncoalveolar, sin confirmación histológica y en ausencia de otro patógeno. Un resultado negativo de PCR tiene un alto valor predictivo negativo, aunque no descarta por completo el diagnóstico.

El diagnóstico serológico de la toxoplasmosis es complejo y, generalmente, requiere de la combinación de varias pruebas serológicas. En los casos de infección transmitida por el donante a un

receptor seronegativo, la seroconversión temprana tras el procedimiento con la positividad de anticuerpos IgM o IgG es un indicador de infección y, por lo tanto, de riesgo de enfermedad. La técnica de enzoinmunoanálisis (EIA) de avidéz de IgG, permite diferenciar los anticuerpos con baja afinidad por el antígeno, originados en las fases iniciales de la infección, de los anticuerpos IgG con alta afinidad, que aparecen en fases más tardías. En la fase de reactivación se observaría un incremento en los títulos de IgG con una avidéz alta. De todas formas, no se ha podido demostrar una relación directa entre este aumento y la aparición de clínica sugestiva de toxoplasmosis en los trasplantados. El diagnóstico de reactivación aún es más difícil si los títulos de anticuerpos no se modifican. En esta situación, una PCR positiva podría ayudar en el diagnóstico, si bien debería interpretarse junto al contexto clínico ya que se han observado determinaciones positivas transitorias asintomáticas, especialmente en pacientes receptores de un TPH.

5.3.2. *Leishmania infantum*. La leishmaniasis es una parasitosis endémica en los países mediterráneos. En España, el parásito está ampliamente distribuido a lo largo de todo el arco e islas mediterráneas, y en los valles de los grandes ríos peninsulares, entre otras localizaciones. Por esta razón, la enfermedad visceral debe ser tenida en cuenta en el contexto del trasplante, y así se han descrito casos en nuestro país. Los casos en trasplantados se producen como reactivación de una infección latente, como ocurre en otros pacientes inmunodeprimidos. La transmisión por transfusión se ha descrito en otras situaciones clínicas y, aunque en teoría sería posible la transmisión a través del órgano donado, no existe evidencia de que esto ocurra. Por razones obvias, es crucial mantener un elevado índice de sospecha que dirija las investigaciones de laboratorio. A tal efecto, se recomiendan los métodos parasitológicos directos, ya que los trasplantados, al igual que otros inmunodeprimidos, desarrollan una respuesta serológica errática. El examen microscópico directo en aspirados de médula ósea o en biopsia esplénica (cuando no esté contraindicado) tras tinción convencional puede establecer el diagnóstico de una manera sencilla. Cuando la sospecha sea muy fuerte y la microscopía negativa, puede intentarse el cultivo en medios especiales (NNN, Diamond, etc.) y, mejor aún, la amplificación de ácidos nucleicos por PCR. Tanto el cultivo como la PCR no están disponibles en todos los laboratorios pero, dada la gravedad y las dificultades de tratamiento en estos pacientes, parece totalmente justificado derivar las muestras a un centro externo que pueda realizarlos.

5.3.3. *Plasmodium spp.* La malaria en los trasplantados es un fenómeno raro en países como el nuestro en los que la enfermedad no es endémica. Sin embargo, debe ser considerada como consecuencia de la inmigración, viajes y estancias en zonas de riesgo. El problema afecta, sobre todo, al cribado de las donaciones, aunque también al paciente candidato al trasplante o que ya ha sido trasplantado. En éste, el cuadro clínico y los

antecedentes epidemiológicos del propio receptor, del donante de órganos y de los donantes de los hemoderivados transfundidos como consecuencia del trasplante, deben orientar la investigación microbiológica. Los métodos diagnósticos a aplicar no cambian respecto a otras circunstancias clínicas, salvo que el esfuerzo diagnóstico será más intenso, dada la gravedad con que cursa el paludismo en los trasplantados. Se basarán en la observación microscópica con extensiones finas y examen de gota gruesa, siempre ineludibles y, si fuera necesario, repetidos. Las pruebas de detección de antígeno pueden ser una ayuda, especialmente en aquellos casos con baja concentración de elementos parasitarios, aunque su sensibilidad no es óptima y no permiten establecer el diagnóstico de especie de *Plasmodium*. Si la sospecha clínica es muy patente o si los exámenes de laboratorio iniciales son negativos, se recomienda la detección mediante técnicas moleculares de amplificación (si es necesario, derivar a un centro de referencia externo). Las pruebas de PCR en tiempo real empiezan a comercializarse, con lo que el acceso a esta técnica va a cambiar para muchos laboratorios que no disponen de ella en estos momentos.

5.3.4. *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas). La existencia de flujos migratorios desde zonas endémicas, así como el fenómeno de la globalización, obliga a tener en cuenta a esta parasitosis en los trasplantados. Ante la presencia de circunstancias epidemiológicas compatibles (inmigrantes, hijos de inmigrantes, residentes o viajeros de áreas geográficas con riesgo conocido de transmisión), la recomendación es descartar o confirmar la presencia de la infección por este parásito durante la evaluación pretrasplante siempre que sea posible hacerlo. A las razones obvias de un mejor cuidado del paciente una vez trasplantado, se añade también el hecho de las limitaciones de los métodos diagnósticos existentes.

En la evaluación pretrasplante, se recomienda el estudio serológico, para lo que se dispone de reactivos comerciales, algunos incluso para diagnóstico rápido (pruebas inmunocromatográficas). Dado que no existe una prueba serológica satisfactoria por sensibilidad y especificidad, la recomendación actual es establecer el diagnóstico de infección mediante dos pruebas que utilicen antígenos diferentes y, en caso de discordancia, realizar una tercera prueba. Es difícil que un centro pueda disponer de dos métodos diferentes, por lo que es recomendable que realice una prueba de cribado y que disponga de un centro externo al que derivar la muestra.

La presencia del parásito en la sangre de pacientes infectados crónicamente (la situación habitual que se encontraría en la práctica) es intermitente y de baja intensidad. Por esta razón, la sensibilidad del diagnóstico microscópico o el cultivo en medios axénicos es insuficiente. Las pruebas moleculares de amplificación (PCR) mejoran la sensibilidad, pero un resultado negativo tampoco descarta la infección. A pesar de ello, debe intentarse realizar el diagnóstico parasitológico

directo, esencialmente por PCR, remitiendo la muestra, si es necesario, a un centro de referencia.

La estrategia diagnóstica no cambia una vez el paciente ha sido trasplantado, si bien hay que hacer la consideración de que la prueba de PCR podría poner de manifiesto también una infección latente sin reactivación, y que la proporción de falsos negativos con las pruebas serológicas aumenta debido a la dificultad de todo inmunodeprimido en desarrollar una respuesta inmune apropiada. Por lo tanto, es obligado valorar rigurosamente todos los resultados de las pruebas de laboratorio conjuntamente con las circunstancias clínicas de cada paciente en concreto.

5.3.5. *Strongyloides stercoralis*. Se trata de un nematodo endémico en países tropicales y subtropicales, pero también está distribuido en algunas áreas geográficas españolas (humedales de la costa levantina). La enfermedad suele producirse en el trasplantado por la reactivación de una infestación crónica contraída muchos años antes y la manifestación más grave es el síndrome de hiperinfestación a consecuencia de la inmunodepresión producida en estos pacientes. Se ha comunicado al menos un caso en España. La transmisión a través del órgano trasplantado es posible, pero esta situación es una rareza dentro de lo excepcional. Con el fenómeno de la globalización (viajes, estancias prolongadas en zonas endémicas, etc.), parece obligado tener en consideración a este parásito en los programas de trasplante, especialmente antes de que éste se produzca. La sospecha clínica y los antecedentes epidemiológicos (país de procedencia, enfermedad profesional en agricultores del arroz o la minería, ciertas actividades de ocio, etc.) van a orientar la búsqueda de una infección oculta, especialmente si el hemograma nos muestra una eosinofilia elevada. La investigación parasitológica exigirá el examen microscópico de, al menos, tres muestras de heces, para la búsqueda de larvas rhabditoides características. Se recomienda realizar no menos de 6 preparaciones de cada muestra pues, en ocasiones, la observación es muy difícil por el bajo contenido en larvas. Si la sospecha es muy elevada, puede ser recomendable analizar nuevas muestras. Por el contrario, cuando se produce una hiperinfestación, la observación microscópica no suele plantear dificultades, pero es obvio que el objetivo es evitar que se presente esta grave complicación una vez realizado el trasplante. En cualquier caso, es recomendable practicar técnicas adicionales de concentración (Baermann, etc.) o coprocultivo parasitario. Los estudios serológicos podrían ser una ayuda en ciertos casos, pero debe tenerse en cuenta la existencia de reacciones cruzadas con otros helmintos y, sobre todo, que los pacientes trasplantados suelen mostrar una respuesta seroinmune errática.

Aunque la hidatidosis es una enfermedad controlada en nuestro país, todavía debe tenerse en cuenta y, de hecho, se han producido trasplantes de hígado como consecuencia de la infección previa por este parásito.

5.3.6. Otras parasitosis intestinales. La amebiasis es una enfermedad producida por *Entamoeba*

histolytica, a considerar en los trasplantados que procedan o hayan viajado a zonas endémicas. Aunque es motivo de controversia, no parece que en nuestro país lo sea. En el paciente inmunocompetente, sólo una parte de los infectados parecen desarrollar síntomas. En el trasplantado las manifestaciones son más frecuentes y de mayor gravedad, como la colitis fulminante, debido a la inmunosupresión. Ante un cuadro diarreico con antecedentes epidemiológicos compatibles, se deberá realizar un examen parasitológico mediante la observación microscópica. Aunque morfológicamente *E. histolytica* no se diferencia de *Entamoeba dispar* (comensal), está claro que la observación de quistes o formas trofozoicas compatibles por parte de un microbiólogo entrenado debe instar al tratamiento para evitar complicaciones. A veces puede ser necesario realizar exámenes de al menos tres muestras, si bien en el paciente trasplantado, y en el inmunodeprimido en general, la presencia de formas parasitarias en las heces suele ser más abundante que en el paciente normal. En el caso de sospechar absceso amebiano, no es raro que el examen de las heces sea negativo. En este caso, las pruebas serológicas (inhibición de la hemaglutinación, EIA) suelen dar buenos resultados, con títulos elevados, aunque conviene saber que el descenso del título se puede prolongar en el tiempo, incluso tras una buena respuesta al tratamiento. Por el contrario, no son recomendables si la afectación es sólo intestinal. Recientemente, se han introducido pruebas comerciales de detección de antígeno en heces, y se han descrito métodos moleculares. De momento, no está claro el verdadero valor de dichas técnicas.

Cryptosporidium spp. es un agente etiológico bien conocido de diarrea aguda en los inmunodeprimidos, también en los trasplantados, en donde debe tenerse en cuenta en el caso de una diarrea profusa y persistente sin etiología definida y que no responde al tratamiento sintomático, especialmente si hay antecedentes de riesgo (vida en el medio rural, baños en piscinas comunitarias, conviviente con lactantes con diarreas, etc.). Este parásito es muy resistente a la desinfección y a los sistemas de potabilización de agua, fundamentalmente a la cloración. Se han descrito epidemias muy extensas a través del agua de suministro o de las piscinas. En el paciente normal adulto, no es infrecuente el estado de portador asintomático. Los lactantes y los inmunodeprimidos suelen presentar manifestaciones clínicas, con una diarrea profusa y explosiva que dispersa gran cantidad de quistes en el ambiente, lo que cierra el círculo. El diagnóstico debe basarse en la sospecha, y es obligado realizar tinciones específicas para *Cryptosporidium* spp. en el estudio de las diarreas postrasplante. Se ha descrito también afectación biliar y respiratoria. Las tinciones de ácido-alcohol-resistencia modificadas (Ziehl-Neelsen, Kinyoun, etc.) son suficientes para poner de manifiesto el parásito (oosquistes redondos de 4-5 µm), pues suele estar presente en gran concentración. Si no fuese así, hay que repetir los exámenes microscópicos antes de considerar la

muestra negativa. Las tinciones fluorescentes específicas son también útiles, pero su coste es superior y no mejoran de manera clara el rendimiento diagnóstico de una tinción común.

Las infecciones por *Isospora belli* también son más frecuentes en los inmunodeprimidos que en el huésped inmunocompetente, y por lo tanto deben ser consideradas en los cuadros diarreicos de los trasplantados. A diferencia de *Cryptosporidium* spp., suelen originar episodios autolimitados, con manifestaciones diarreicas moderadas. Los ooquistes se eliminan con los métodos de limpieza y desinfección habituales. Por estas razones, las infecciones por *I. belli* son menos frecuentes que la criptosporiosis en los inmunodeprimidos. Para llevar a cabo el diagnóstico, se pueden utilizar las mismas tinciones de resistencia a la decoloración con ácido-alcohol que para *Cryptosporidium* spp. En el caso de *I. belli*, los ooquistes son muy característicos, en forma ovoide o piriforme, con hasta dos esporoquistes en su interior. Es recomendable realizar varios exámenes parasitológicos, ya que la eliminación de quistes por las heces puede ser escasa e intermitente.

5.4. INFECCIONES VÍRICAS

5.4.1. Hepatitis víricas.

Virus de la hepatitis B (VHB)

El control de la infección por el VHB en la población general ha modificado sustancialmente su impacto sobre los pacientes trasplantados en nuestro medio respecto a las primeras épocas. Por otra parte, el cribado sistemático de los donantes de órganos y productos biológicos han conducido a que la transmisión del VHB en el contexto del trasplante se haya reducido a niveles excepcionales. Sin embargo, la enfermedad terminal por este virus continúa siendo todavía una causa no despreciable que conduce al trasplante hepático. Además, las consecuencias de una infección en el paciente trasplantado son mucho más graves que en el inmunocompetente, con porcentajes de hepatitis fulminante, de paso a un estado crónico y de progresión clínica mayores.

El VHB adquiere más protagonismo en el caso del trasplante hepático ya que se calcula que, en torno al 5% de estas intervenciones, tienen su origen en la enfermedad terminal por este virus. En ausencia de medidas preventivas, el porcentaje de recidivas sobre el órgano implantado es superior al 50%, con graves complicaciones clínicas. En los últimos años, la administración profiláctica de inmunoglobulinas hiperinmunes anti-VHB y de antivíricos, lamivudina especialmente, han cambiado drásticamente el panorama y, hoy en día, la probabilidad de una reactivación en el nuevo hígado no suele superar el 10% de los pacientes trasplantados a causa del VHB. Por otra parte, la infección *de novo* (detección de HBsAg o ADN del VHB en un trasplantado previamente negativo para ambos marcadores) está bien documentada. Al margen de los casos puramente excepcionales atribuibles a un error técnico en el cribado serológico de las donaciones, en la práctica el

problema se circunscribe a la transmisión del virus a partir de un donante con infección oculta. Esta circunstancia puede producirse en aquellos donantes con anticuerpos anti-HBc como único marcador del virus, incluida la ADNemia (*core* aislado), cuya frecuencia en nuestro medio se ha estimado en torno al 10-15% de las donaciones. El estado inmune del receptor condiciona mucho el riesgo de adquisición *de novo* de la hepatitis B, de manera que los que carecen de inmunidad previa para el VHB tienen un riesgo muy elevado de padecer la infección y con graves repercusiones clínicas (formas fulminantes y crónicas). Por el contrario, el riesgo es virtualmente nulo en receptores inmunes con anticuerpos demostrables anti-HBs, de ahí la importancia de vacunar a éstos durante el período de evaluación previo al trasplante.

En otros tipos de TOS distintos al hepático, el problema es menor. En los renales tiene mayor protagonismo, debido a que han estado más expuestos a la transmisión como consecuencia de periodos prolongados de hemodiálisis, con una frecuencia alrededor del 1-2%. Por eso, no es infrecuente que algunos de ellos requieran un doble trasplante, renal y hepático. En el resto de TOS la infección por el VHB es infrecuente, con porcentajes no muy distintos de la población general. El riesgo de transmisión *de novo* a partir de donantes con infección oculta por el VHB parece que es bajo. En el TPH, el porcentaje de pacientes con HBsAg positivo previo al trasplante oscila en torno al 3% en algunas series históricas, aunque es probable que sea menor actualmente. La vacunación previa de candidatos al trasplante y de los posibles donantes es una medida recomendable.

Como se ha señalado, existe la posibilidad de adoptar medidas preventivas y terapéuticas en pacientes con riesgo de reactivación de una infección por el VHB o que la adquieran *de novo*. En los primeros, la profilaxis se suele hacer con inmunoglobulinas y lamivudina, y suele comenzar antes del trasplante, lo que, en ocasiones, incluso permite diferir éste. El mayor problema deriva de la baja barrera genética de la lamivudina, de manera que un porcentaje significativo de pacientes desarrolla resistencia al cabo del tiempo (más del 60% a los seis meses de tratamiento). La resistencia se produce por la selección de mutantes YMDD. Existe menos experiencia en la profilaxis y tratamiento con otros antiviricos alternativos a la lamivudina en caso de resistencia, siendo el adefovir el más empleado en estas situaciones. Se conocen mutaciones de resistencia a este último compuesto (N236T y A181V), pero la frecuencia de selección de estos virus mutantes es menor que para la lamivudina.

De todo lo anterior se desprende el papel clave que tiene el laboratorio de microbiología en el control y seguimiento de esta infección, también después del trasplante. Desde el punto de vista de técnicas diagnósticas a emplear, el trasplante no plantea exigencias especiales respecto al manejo

de otros pacientes con infección por este virus. Debe tenerse en cuenta también que, debido a su inmunodepresión, la respuesta serológica puede ofrecer patrones atípicos, por lo que las pruebas moleculares tendrán más protagonismo a la hora de diagnosticar la reactivación o la infección *de novo*. Es asimismo evidente que los centros con trasplante deben disponer de pruebas moleculares cuantitativas (carga vírica) del VHB, además de los marcadores serológicos clásicos, debido a su carácter pronóstico y su utilidad en el seguimiento de la eficacia de la profilaxis o del tratamiento antivirico. También es recomendable que tengan acceso a la detección de mutaciones de resistencia. Todos estos marcadores suelen estar al alcance de los laboratorios de los centros con programa de trasplante.

Virus de la hepatitis C (VHC)

A diferencia de lo que ocurre con el VHB, en el caso del VHC, la ausencia de vacunas ha sido un obstáculo para el control eficaz de esta infección en la población general. Además, la tendencia a la cronicidad característica del VHC ha conducido a que, de hecho, la cirrosis secundaria a la infección por este virus constituya, con mucho, la primera indicación de trasplante hepático en los países occidentales. Como es previsible, el mayor impacto clínico de la infección por el VHC afecta fundamentalmente a los receptores de un trasplante hepático y, en menor medida, a los renales. La prevalencia de la infección por el VHC en los candidatos al trasplante cardíaco o pulmonar no es mucho mayor que en la población general, no así en los renales, buena parte de los cuales han sido sometidos a hemodiálisis durante periodos largos, o han sido transfundidos repetidamente, lo que aumenta el riesgo de contraer dicha infección. Los candidatos a TPH también tienen un mayor riesgo, debido a las transfusiones y técnicas invasivas a que son sometidos antes de que se lleve a cabo el trasplante. El control de las transfusiones de derivados sanguíneos y el cribado de las donaciones ha reducido de manera significativa la transmisión del virus, por lo que la infección *de novo* es excepcional en el TOS, aunque posible, ya que las pruebas serológicas no son totalmente sensibles y el cribado mediante métodos moleculares no resulta factible en la situación de urgencia en que se producen las donaciones.

En los trasplantados hepáticos previamente infectados por el VHC, la recurrencia del virus en el injerto es casi la norma, sin que pueda actuarse con medidas preventivas, como ocurre con la hepatitis B. La historia natural en el trasplantado de hígado no es muy diferente de los pacientes inmunocompetentes, pero el curso clínico está claramente acelerado respecto a estos últimos, con un mayor ritmo de fibrosis, progresión a cirrosis y descompensación de ésta. Como consecuencia, la supervivencia del injerto y del paciente se reduce de forma significativa. En conjunto, la infección por el VHC constituye un problema de primer orden en términos de morbilidad y mortalidad en el trasplante

hepático actual. La carga vírica y, probablemente, el genotipo (genotipo 1b), son factores pronósticos de gravedad dependientes del virus. De la misma manera, la carga vírica elevada y el genotipo 1 son factores negativos de respuesta vírica sostenida cuando se pauta el tratamiento antivírico (interferón pegilado y ribavirina), condicionando también la duración de éste. En los trasplantados renales, la infección por el VHC también afecta negativamente al pronóstico general a medio y largo plazo. El comportamiento en otros tipos de TOS y en el TPH es más controvertido, fundamentalmente por escasez de estudios amplios, aunque es previsible que el curso clínico sea más agresivo y que las tasas de respuesta al tratamiento sean inferiores que en el paciente inmunocompetente, como ocurre con otros pacientes inmunodeprimidos.

El laboratorio de microbiología tiene un papel en el diagnóstico de la infección y, sobre todo, en el seguimiento de los pacientes infectados por el VHC. Los métodos a utilizar no difieren de los que están disponibles en los laboratorios actuales. Las pruebas moleculares tienen mayor protagonismo diagnóstico en el ámbito del trasplante, ya que, o bien la infección por el virus ya se conoce antes de llevar a cabo éste o, si se plantea el diagnóstico *de novo*, la sensibilidad de la determinación de anticuerpos es insuficiente por la respuesta serológica errática derivada de la inmunodepresión. Las pruebas moleculares cuantitativas actuales de amplificación en tiempo real añaden una elevada sensibilidad analítica con un amplio intervalo de linealidad, por lo que dan respuesta a todos los objetivos que se plantean en los trasplantados (diagnóstico, pronóstico y control del tratamiento).

5.4.2. Infecciones por herpesvirus. La familia *Herpesviridae* está compuesta por 8 virus que comparten una serie de características comunes. En función del tipo de virus, el tipo de células que infectan y el estado de activación de éstas, los virus herpes son capaces de provocar infecciones tanto líticas como persistentes. Dentro de estas últimas, las infecciones provocadas pueden ser latentes, recurrentes o incluso inmortalizantes (virus de Epstein-Barr). Todos los virus herpes producen infecciones persistentes latentes. La recurrencia de éstas va a depender de muchos factores, siendo el estado inmunológico del huésped el más importante. Por esta razón, las infecciones por herpesvirus tienen una importancia capital en los trasplantados. La mayor parte de la patología asociada a los herpesvirus va a derivar de la reactivación de una infección latente, lo cual es más frecuente conforme avanza la edad (el trasplante infantil tiene características propias), pero cuando se produce una infección primaria, ésta se suele acompañar de un cuadro clínico más grave que, en ocasiones, compromete seriamente la vida del paciente o la viabilidad del órgano trasplantado. La aportación del laboratorio de microbiología es crucial para el buen cuidado de estos pacientes, no sólo desde el punto de vista diagnóstico sino también para establecer el pronóstico y guiar el tratamiento antivírico.

Importancia clínica

Los **virus del herpes simple** (VHS) producen en el trasplantado infecciones líticas y persistentes, dependiendo de las características del paciente. En ausencia de profilaxis específica, las infecciones por el virus del herpes simple son muy frecuentes (25-35%) y se producen en su mayor parte por reactivación de una infección latente. Desde el punto de vista cronológico, estas infecciones se localizan preferentemente en las 4-6 primeras semanas postrasplante. La infección mucocutánea es la forma de presentación clínica más frecuente, muy en particular la gingivoestomatitis causada por el VHS tipo 1, pero también la afectación genital por el VHS tipo 2. Además, puede originar enfermedad focal y diseminada, con esofagitis, hepatitis y neumonitis. Esta última es más frecuente en los trasplantados de pulmón o pulmón-corazón. La utilización de pautas de profilaxis hace que estas formas complicadas sean muy poco frecuentes hoy en día. La afectación del sistema nervioso central (meningoencefalitis) es posible, pero muy rara, y suele producirse en el contexto de una fuerte inmunodepresión y en ausencia de profilaxis.

El **virus varicela-zoster** (VVZ) suele presentarse bajo la forma de zóster, esto es, la reactivación de una infección latente. Sin embargo, hay que tener presente que la seroprevalencia en la edad adulta está alrededor del 75%, por lo que es posible también la aparición de una varicela, tanto más posible cuanto menor sea la edad del trasplantado. Al igual que en el caso de los VHS, las infecciones por este virus son muy frecuentes en los trasplantados, y su frecuencia oscila entre el 10-20% en el TOS, y más aún en el TPH en ausencia de profilaxis. La cronología es diferente, y suelen ser una complicación más tardía, más allá del segundo mes postrasplante, incluso después del sexto mes, una vez suspendida la profilaxis con aciclovir. La forma de presentación clínica suele ser más grave que las infecciones en los pacientes inmunocompetentes, con mayor frecuencia de afectación polimetamérica y formas diseminadas (neumonitis, hepatitis).

El **citomegalovirus** humano (CMV) es un virus muy ubicuo en la población general, y la causa más importante de infección vírica en los trasplantados. El 85% de los adultos de nuestro país está infectado por el virus, pero esta seroprevalencia tiende a disminuir en los últimos años y, como es lógico, aumenta con la edad. Por esta razón, la mayor parte de las infecciones se producen por reactivación, pero la infección primaria es más grave y clínicamente manifiesta. En este caso, el virus se transmite a través del órgano trasplantado o de las transfusiones requeridas en el proceso. En los TOS, las mayores complicaciones se producen en el receptor seronegativo que recibe un órgano de un donante seropositivo, mientras que en el TPH la seropositividad del receptor se considera un factor de riesgo. Una característica importante del CMV en el trasplantado es que no todas las infecciones activas (replicación del virus en las células

permisivas) se traducen en manifestaciones clínicas, esto es, la llamada enfermedad por CMV.

Cronológicamente, las infecciones por el CMV son típicas del segundo o tercer mes postrasplante, pero se pueden presentar de forma más temprana y también más tardía (más allá del sexto mes), fenómeno éste que es más frecuente cuando se utiliza la profilaxis sistemática con valganciclovir, de larga duración. La forma de presentación clínica más habitual es el cuadro mononucleósico llamado síndrome vírico: fiebre con leucopenia, trombocitopenia y alteración de pruebas hepáticas en presencia del virus en sangre. En los casos más graves, produce afectación orgánica, siendo la gastrointestinal la más frecuente. También puede observarse neumonitis y, más raramente, encefalitis y esofagitis. Además de estos efectos directos atribuibles a la replicación activa del virus, el carácter inmunomodulador que tiene el CMV ha sentado las bases teóricas para explicar una serie de efectos indirectos, concepto que es motivo de una notable controversia actual. Entre estos posibles efectos indirectos hay que señalar la mayor frecuencia de infecciones oportunistas (víricas y fúngicas) y las disfunciones crónicas del injerto, como la aterosclerosis del trasplante cardíaco o la bronquiolitis obliterante de los trasplantados de pulmón.

En los últimos años se han producido grandes avances en el conocimiento de los factores de riesgo y en los métodos diagnósticos de laboratorio para el CMV, lo que ha permitido establecer pautas de prevención y tratamiento tempranos que han tenido un efecto muy positivo sobre la morbilidad y mortalidad. Por estas razones, el diagnóstico de laboratorio tiene una importancia fundamental en el seguimiento de los trasplantados, tanto a efectos del diagnóstico propiamente dicho como con fines pronósticos o de control del tratamiento.

Los **herpesvirus humanos 6 (VHH-6) y 7 (VHH-7)** son betaherpevirus linfotropos relacionados con el CMV, tanto virológicamente como desde el punto de vista patogénico. Las infecciones son muy ubicuas en la población general y suelen contraerse en la edad infantil. Se sabe que el 95% de los niños está infectado por el VHH-6 a la edad de dos años. La seroprevalencia del VHH-7 llega al 90% en la edad adulta. Por lo tanto, estos virus pueden reactivarse en los trasplantados, como consecuencia de su inmunodepresión. Cronológicamente, suelen hacerlo en el primer o segundo mes postrasplante, y algunos autores lo consideran un factor desencadenante de la infección por el CMV. Las consecuencias clínicas no están bien definidas, especialmente para el VHH-7 y, probablemente, son más patentes en el TPH que en los pacientes con TOS. Entre los efectos directos, cabría citar un síndrome vírico similar al del CMV (podrían ser el origen de algunos cuadros que mejoran con ganciclovir en ausencia de confirmación virológica de CMV). También podrían ser la causa de hepatitis o neumonitis. En los pacientes con TPH muy inmunodeprimidos y con EICH se ha descrito la afectación del sistema nervioso central. Se ha atribuido a estos virus un carácter inmunomodulador,

similar al del CMV, por lo que pueden originar también efectos indirectos, lógicamente más controvertidos que en éste último.

El **virus de Epstein-Barr (VEB)** tiene dos características que lo hacen especial dentro de los virus herpes. Por una parte, puede inmortalizar las células que infecta, de manera que cuando el sistema inmune no controla la infección por el VEB, éste es capaz de originar tumores. Por otra parte, su tropismo y rango de especie son muy estrechos, ya que sólo es capaz de infectar linfocitos B (célula diana) y algunas células epiteliales que expresen su receptor específico (CD28). Las enfermedades que produce difieren según se trate de una primoinfección o una reactivación. La seroprevalencia en la edad adulta es elevada, pero las consecuencias clínicas son mayores en el contexto de una primoinfección, de ahí su mayor importancia en el trasplante infantil. La transmisión del virus puede realizarse a través del órgano trasplantado. El VEB se asocia con la llamada enfermedad linfoproliferativa postrasplante (ELPT), la cual engloba una serie de trastornos linfoproliferativos que van desde la mononucleosis hasta proliferaciones monoclonales de muy mal pronóstico. Cronológicamente, la ELPT es una complicación tardía en el TOS (más de seis meses). En el TPH suele presentarse antes, entre el segundo y tercer mes. Aunque no es muy frecuente, los factores de riesgo empiezan a ser delimitados. Entre ellos, la primoinfección (estado donante-positivo/receptor-negativo) multiplica el riesgo por 10-50 veces, y por ello es más frecuente en el trasplante infantil, en donde también suele presentarse de forma más precoz. Los regímenes inmunosupresores más agresivos también representan un factor de riesgo bien conocido. Se ha sugerido que la ELPT se podría favorecer por la infección por el CMV, si bien la atribución de este efecto indirecto es objeto de controversia.

El **herpesvirus humano 8 (VHH-8)** es el último virus herpes que se ha descubierto (1994), por lo que el conocimiento del que se dispone en relación con el trasplante es relativamente escaso. Posee capacidad transformante, como el otro gammaherpesvirus, el VEB, pero su espectro de infección celular es más amplio: linfocitos B, linfocitos indiferenciados, células endoteliales y otras células epiteliales. El VHH-8 no es tan ubicuo como el resto de herpesvirus. En nuestro país hay una seroprevalencia media, en torno al 5%. El VHH-8 es el virus causal del sarcoma de Kaposi, el linfoma primario de efusión y la enfermedad de Castleman. La seroprevalencia diferente explica la distinta frecuencia de aparición en los trasplantados. La primoinfección se asocia con un mayor riesgo de complicaciones asociadas al VHH-8, al igual que la intensidad de la inmunosupresión.

Diagnóstico virológico

El diagnóstico de las infecciones por herpesvirus está condicionado por su patogenia y por el hecho de establecer infecciones latentes. Por estas razones, las pruebas diagnósticas a aplicar dependerán de cada circunstancia clínica en

particular, y no todas las pruebas disponibles serán útiles en todas las situaciones. Por ejemplo, como norma general, la serología carece de interés en el seguimiento y diagnóstico postrasplante. También las muestras sobre las que realizar el diagnóstico variarán en función de la sospecha clínica y del tipo de virus. En la tabla 16 se resumen las muestras más convenientes según el proceso de que se trate. Dadas las características biológicas y la gravedad de algunas infecciones por herpesvirus, las pruebas rápidas deben marcar la estrategia diagnóstica de los laboratorios de microbiología que atienden un programa de trasplante.

Los métodos a emplear para el diagnóstico de las infecciones por los **VHS 1 y 2** en los trasplantados no difieren de los que se aplican para otros pacientes. En muchas ocasiones, el diagnóstico es clínico, pero conviene confirmar la sospecha mediante pruebas de laboratorio, dada la condición de inmunodeprimidos. El diagnóstico se realizará dependiendo de la patología que presenten. Así, en

las **infecciones mucocutáneas**, donde se producen lesiones vesiculosas y ulcerosas de localización variable, se recogerán frotis y exudado de la lesión. La obtención de una buena muestra es fundamental para las pruebas que debemos aplicar: debe recogerse tanto líquido de la vesícula (rico en partículas víricas), absorbiendo con el hisopo el líquido, como células de la base de la lesión, frotando enérgicamente. Se remitirá en medio de transporte de virus con la mayor rapidez posible al laboratorio. Allí, se recomienda realizar, en primer lugar, una técnica rápida (30-40 minutos) de inmunofluorescencia (IF) sobre el sedimento celular obtenido tras una breve centrifugación (de ahí la conveniencia de obtener material suficiente). Es aconsejable realizar dos preparaciones que se teñirán con anticuerpos monoclonales frente a ambos tipos de virus ya que, cada vez más, las localizaciones anatómicas preferentes de ambos tienden a superponerse.

Tabla 16. Muestras adecuadas para el diagnóstico de las infecciones por herpesvirus.

Virus ^a	Situación clínica ^b	Muestras recomendadas ^c
VHS 1 y 2	Herpes orofacial Herpes genital Herpes ocular Panadizo herpético Infección del SNC Infección diseminada	Ex de vesícula, faríngeo, nasal Ex de vesícula, endocervical, uretral, rectal Ex conjuntival, lágrimas Ex de vesícula LCR, biopsia Ex de vesícula, LCR, biopsias, LBA
VVZ	Infección mucoepitelial Infección del SNC	Ex de vesícula, faríngeo, LBA LCR
CMV	Pretrasplante Postrasplante Sospecha de infección/enfermedad	Suero Leucocitos, plasma, suero, orina Leucocitos, plasma, biopsias, LCR
VHH 6 y 7	Sospecha de infección/enfermedad	Leucocitos, plasma, biopsias, LCR, suero
VEB	ELPT	Leucocitos, plasma, suero
VHH 8	Sarcoma de Kaposi	Leucocitos, plasma, biopsias

^aVHS: virus herpes simple; VVZ: virus varicela-zóster; CMV: citomegalovirus; VEB: virus de Epstein-Barr; VHH: herpesvirus humanos (6, 7 y 8).

^bSNC: sistema nervioso central; ELPT: enfermedad linfoproliferativa postrasplante.

^cEx: exudado; LCR: líquido cefalorraquídeo; LBA: lavado broncoalveolar.

El sobrenadante puede utilizarse para cultivo. Ambos VHS crecen bien en diferentes substratos celulares y pueden utilizarse diversos formatos para el cultivo; la variante de centrifugación *shell vial* es un método rápido que permite realizar la mayor parte de diagnósticos en 24 h. Si se quiere realizar estudios de sensibilidad a los antiviricos, en este caso debe recuperarse la cepa mediante el cultivo convencional, que igualmente da buenos resultados, aunque se puede demorar ligeramente. En este tipo de lesiones las técnicas moleculares sólo se aplicaran cuando los resultados de la IF y el cultivo sean negativos con clara sospecha diagnóstica, o cuando las lesiones sean atípicas, circunstancias que se dan con relativa frecuencia en este tipo de pacientes, siendo importante conocer la etiología para instaurar un tratamiento precoz. Por el contrario,

en las **infecciones del SNC**, como encefalitis, meningitis o mielitis, el diagnóstico se realiza por detección genómica, siendo la muestra de elección el LCR. También, en las **infecciones diseminadas** con afectación multiorgánica (esofagitis, hepatitis, neumonitis, etc.) se aplican técnicas de PCR sobre muestras que serán, fundamentalmente, de sangre periférica, o biopsias si estuvieran indicadas. El aislamiento en cultivo de secreciones respiratorias no establece necesariamente el diagnóstico de neumonitis, ya que la excreción asintomática no es un hecho infrecuente en los trasplantados, y debe ser complementado con los exámenes histopatológicos.

El paciente trasplantado sufre episodios frecuentes de herpes zóster. También puede presentar varicela, especialmente en el trasplante infantil, aunque la

profilaxis durante la evaluación pretrasplante ha reducido mucho esta posibilidad. El diagnóstico es, básicamente, clínico pero, en muchas ocasiones, las lesiones son atípicas, lo que justifica el diagnóstico etiológico. Para ello, se debe de recoger una muestra de las lesiones cutáneas siguiendo la pauta señalada para los VHS y realizar una detección rápida de antígeno mediante IF. El cultivo puede intentarse, especialmente si se pretende aislar el virus para caracterizarlo o para llevar a cabo estudios de sensibilidad antivírica, pero su rendimiento es claramente inferior al de la detección de antígeno. La amplificación por PCR debe reservarse para casos muy seleccionados en los que la IF resulte insatisfactoria (afectación del SNC, etc.). Se han descrito técnicas de PCR anidada o múltiple que permiten detectar conjuntamente el VVZ y los VHS, aunque no están comercializadas y son de desarrollo propio del laboratorio.

En el caso de las **infecciones por CMV** existen protocolos de seguimiento de la infección/enfermedad por CMV que los llevan a cabo muchos grupos de TOS y TPH de forma que monitorizan a los pacientes durante los primeros meses del trasplante. La tendencia actual es a simplificar en la medida de lo posible dichos protocolos y reservar las pautas más estrictas para las situaciones de mayor riesgo (TOS donante-positivo/receptor-negativo sin profilaxis, trasplante de pulmón o intestino, etc.). Conforme el riesgo disminuya, la monitorización se relajará progresivamente e, incluso, cuando es muy bajo, podría estar indicado un seguimiento guiado por las manifestaciones clínicas. El objetivo fundamental que deben perseguir las pruebas diagnósticas es diferenciar la enfermedad por CMV (la que cursa con sintomatología atribuible al virus) de la infección activa asintomática. Al igual que con otros herpesvirus, las pruebas serológicas no tienen interés en el postrasplante. En este período, las pruebas cuantitativas en sangre son fundamentales, y se utilizan con tres propósitos: a) predecir la aparición de la enfermedad por CMV antes de que ésta se presente, b) diagnosticarla cuando aparecen síntomas compatibles, y c) comprobar la eficacia del tratamiento antivírico. Muy en particular, las pruebas cuantitativas son ineludibles si se adopta la estrategia preventiva del tratamiento anticipado (*preemptive therapy*), que está bastante extendida entre determinados grupos dedicados al trasplante en nuestro país para grupos de pacientes seleccionados. Por definición, esta estrategia requiere una monitorización del paciente más precisa.

Las pruebas cuantitativas en sangre pueden realizarse mediante las técnicas de **antigenemia** pp65 y de carga vírica (ADNemia o viremia). La primera detecta el antígeno pp65 de CMV que expresan los leucocitos de sangre periférica infectados por el virus. El recuento de antigenemia, que se expresa en células CMV+/10⁵ leucocitos totales, se correlaciona directamente con la carga vírica en sangre. A partir de una cifra límite, o mejor de una cinética creciente, el riesgo de presentar

enfermedad por CMV, teóricamente, se hace mayor. La antigenemia es una prueba barata, de realización sencilla y al alcance de todos los laboratorios. En su día constituyó un avance muy importante, pero tiene una serie de inconvenientes técnicos. El mayor de ellos deriva de la inestabilidad del antígeno pp65, lo que obliga a realizarla antes de 6 h de extraída la muestra. Por esta razón, no se adapta bien al seguimiento de los pacientes una vez que son dados de alta, en el caso de que tengan que remitirse las muestras a un centro externo o, simplemente, cuando la organización del trabajo en el laboratorio no permita el procesamiento en ese intervalo corto de tiempo. No es aplicable en situación de leucopenia, lo que no es infrecuente en el TPH, justamente cuando mayor es el riesgo de presentar enfermedad por CMV. Además, la estandarización entre laboratorios se ha demostrado imposible de llevar a cabo a lo largo de dos décadas, por lo que los valores límite o de dinámica vírica no son intercambiables entre distintos centros ni entre diferentes tipos de trasplante. Sin embargo, la prueba de antigenemia sigue teniendo su vigencia en centros donde pueda procesarse bajo las condiciones señaladas antes, especialmente para el diagnóstico de los pacientes no monitorizados con sospecha de enfermedad por CMV, en donde los recuentos suelen ser elevados, por encima de 50 células CMV+/10⁵ leucocitos. Hay que señalar que en los trasplantados con afectación intestinal, la forma focal más frecuente de enfermedad por CMV, no muestra cargas víricas elevadas en sangre, por lo que las cifras de antigenemia son muy bajas, o incluso negativas.

La prueba de **carga vírica de CMV** (ADNemia) permite solventar algunas de las insuficiencias de la antigenemia, aunque también tiene sus propias limitaciones. El ADN vírico es más estable que el antígeno pp65, por lo que es la prueba de elección para el seguimiento de los trasplantados cuando la muestra deba ser derivada a otro centro externo. Asimismo, la ADNemia parece ser un reflejo más directo de la carga de virus en la sangre, por lo que también podría ser el marcador de elección para el control del tratamiento antivírico. La dinámica vírica es más fácil de seguir con la ADNemia y, en consecuencia, se adelanta a la antigenemia como marcador predictivo de desarrollo de enfermedad, de la misma manera que permite un control más preciso de la eficacia del tratamiento. Existen diversos formatos de amplificación por PCR, muchos comercializados; de éstos, los métodos basados en PCR a tiempo real están sustituyendo a las PCR competitivas. La ADNemia puede realizarse sobre sangre total o plasma. La realización de la PCR a partir de sangre completa tiene la ventaja de detectar simultáneamente las copias de ADN vírico en leucocitos y en plasma; esta variante de diagnóstico requiere un recuento previo de las células blancas de la sangre y una extracción automatizada a partir de sangre completa, que algunos sistemas de extracción, aunque no todos, lo contemplan. Los valores de ADNemia en células y en sangre total son más elevadas que en plasma, y reflejan mejor la

carga vírica que los correspondientes en plasma, si bien existe una correlación buena entre los distintos valores. La elección de una u otra muestra dependerá de consideraciones prácticas de cada laboratorio, si bien el seguimiento de un paciente se llevará a cabo, siempre que sea posible, sobre el mismo tipo de muestra. Como se ha señalado, la ADNemia tiene sus limitaciones, entre ellas el coste, claramente superior al de la antigenemia. Aunque es más estable que ésta, tampoco está exenta de variabilidad y no está estandarizada, por el momento. Esto quiere decir que los valores críticos para establecer el diagnóstico o para indicar el inicio de un tratamiento anticipado van a depender del tipo de trasplante y de factores internos a cada centro. En tanto no se adquiera la necesaria experiencia propia, valores de 2000 copias/mL de plasma en la mayoría de los TOS, o de 500 copias/mL en los TPH se asocian con presencia de síntomas atribuibles o predicen el desarrollo inmediato de enfermedad por CMV. Sin embargo, hay que insistir en el carácter orientativo de estas cifras, como bien demuestran los distintos valores *cut-off* que están referidos en la literatura. En el caso de la enfermedad focal gastrointestinal, los valores de ADNemia suelen ser bajos, como ocurre con la antigenemia.

Como se ha señalado, en los pacientes de bajo riesgo se tiende a prescindir de la monitorización sistemática, reservando las pruebas para cuando hay sospecha de enfermedad (por lo general, síndrome vírico con leucopenia, fiebre y elevación de enzimas hepáticas). En esta situación, de nuevo la sangre es la muestra de elección, y se deben realizar pruebas cuantitativas. El cultivo en sangre aporta poco al diagnóstico, dada su lentitud y toxicidad de la muestra sobre la monocapa celular. Las pruebas de PCR cualitativa también pierden vigencia, ya que los nuevos métodos a tiempo real poseen una sensibilidad analítica similar a las técnicas cualitativas convencionales.

Cuando exista sospecha de enfermedad focal por el CMV, se recomienda obtener una muestra representativa del órgano afectado. En el caso de la encefalitis, la muestra adecuada es el LCR y la prueba a realizar, una detección genómica con alta sensibilidad analítica (cualitativa o a tiempo real). Cuando exista sospecha de neumonitis, deben obtenerse muestras de lavado broncoalveolar u otra secreción respiratoria de vías bajas y procesarlas mediante cultivo o técnica molecular. La detección de CMV en muestras de vías respiratorias altas, especialmente mediante métodos de PCR, no establece el diagnóstico de neumonía, que siempre deberá ser corroborado mediante la observación de las inclusiones intracelulares típicas en el examen histopatológico. Este mismo principio se aplica a la enfermedad gastrointestinal, la forma más frecuente de enfermedad focal en los trasplantados. En cualquier caso, es conveniente recoger muestras de sangre en caso de enfermedad focal, ya que es un marcador evidente de replicación del virus.

Desde hace años se dispone de antivíricos con actividad específica frente al CMV (ganciclovir, valganciclovir, foscarnet, cidofovir). En algunos

grupos de riesgo, se preconiza su utilización como profilaxis de larga duración, lo que sienta las bases de la selección de cepas resistentes, fenómeno que está bien documentado en la literatura. En los trasplantados, la aparición de resistencia en el curso del tratamiento es rara, aunque en aumento. Es más frecuente en el TPH, donde se dan mejor los factores de riesgo, que en el TOS. Sin embargo, aunque sea algo ocasional, la experiencia actual abona la recomendación de disponer de pruebas de sensibilidad a los antivíricos, preferiblemente en centros de referencia experimentados, que se aplicarán en el caso de fallo terapéutico. Para llevarlas a cabo, se pueden aplicar métodos fenotípicos o genotípicos. Los primeros reflejan mejor lo que ocurre *in vivo*, pero resultan lentos y sólo aplicables en el contexto de técnica de investigación. Hay que aislar la cepa responsable, preferiblemente a partir del cultivo de material del órgano afectado, lo que no siempre es posible. En su lugar, se pueden utilizar los aislamientos obtenidos a partir de muestras de sangre o de orina, mucho más fáciles de conseguir. Los métodos genotípicos ponen de manifiesto mutaciones puntuales en el gen UL97 del CMV, las más frecuentes y de mayor relevancia clínica. También se produce resistencia por mutaciones en la polimerasa codificada en el gen UL54 y, en este caso, es posible la resistencia cruzada entre antivíricos. Los métodos genotípicos proporcionan resultados más rápidos, especialmente si se lleva a cabo la amplificación directa sobre la muestra, seguida de la correspondiente secuenciación. Aunque la presencia de mutaciones de resistencia no explica por completo el fracaso terapéutico, que puede ser debido a otras causas, sí que es una guía útil, y de ahí la recomendación con perspectiva de futuro.

Como se ha indicado, los cuadros linfoproliferativos constituyen la complicación más importante asociada al VEB en los trasplantados, por fortuna poco frecuente. El diagnóstico es difícil, para lo que resulta imprescindible mantener un elevado índice de sospecha clínica, que se complementará con pruebas de laboratorio microbiológicas y exámenes hematológicos. A diferencia de lo que ocurre con otros herpesvirus, aquí las pruebas serológicas pueden tener su aplicación en el postrasplante, ya que la ELPT es más frecuente en niños, especialmente en el transcurso de una primoinfección. En consecuencia, es obligado realizar un seguimiento serológico temporal riguroso en aquellos niños trasplantados que eran seronegativos previamente. En los seropositivos pretrasplante, niños y adultos, la serología tiene escaso interés, pues no existen marcadores fiables de infección activa. En estos casos se recurre a la detección genómica cuantitativa en sangre, para lo que existen pruebas comerciales a tiempo real, las más recomendables hoy en día para el trasplante. Sin embargo, ninguno de estos métodos está suficientemente estandarizado, y el primer problema que se plantea es la elección de la muestra adecuada: sangre completa, fracción linfocitaria o plasma. Aunque existe una controversia no resuelta,

la recomendación actual es la de llevar a cabo la prueba sobre sangre total, ya que combina mejor las ventajas de reflejar de forma más precisa la replicación del virus (celular) con la facilidad de manejo, sin tener que añadir el proceso laborioso de separación de los linfocitos. El valor crítico a partir del cual el riesgo de ELPT es elevado, tampoco está resuelto, y varía según el tipo de trasplante (TPH alogénico o no, tipo de TOS), la edad del paciente, el propio método de laboratorio y la forma en que se expresan los resultados (sobre número de células o sobre volumen de muestra). Además, existe un considerable solapamiento entre los valores de carga vírica de VEB entre los pacientes con ELPT y los grupos de control, por lo que se recomienda utilizar la cinética vírica como marcador de riesgo más preciso. Como es lógico, no es posible dar cifras orientativas, que siempre deberán obtenerse a partir de la propia experiencia de cada centro. En estas circunstancias, es evidente la recomendación de llevar a cabo el seguimiento de estos pacientes en el mismo laboratorio y mediante la misma prueba de laboratorio, siempre que sea posible.

La experiencia clínica en el trasplante sobre las complicaciones atribuibles al VHH-6 y al VHH-7 es limitada, por lo que el seguimiento sistemático no se recomienda en la actualidad, restringiendo la utilización de pruebas diagnósticas a aquellas situaciones con sospecha clínica fundada. Ambos virus se diagnostican también a partir de los leucocitos, plasma o sangre completa, por PCR anidada que puede cuantificarse mediante técnicas a tiempo real, cuya oferta comercial es restringida en estos momentos. Como es lógico, los valores críticos están lejos de la estandarización. Por último el VHH-8, que produce el sarcoma de Kaposi, se diagnostica a partir de la biopsia de la lesión. También se puede detectar el ADN en linfocitos, siempre por técnicas genómicas mediante técnicas de amplificación genómica y, preferiblemente, por métodos de PCR a tiempo real.

5.4.3. Infecciones por retrovirus. El origen de las infecciones por retrovirus en los pacientes receptores de trasplante de órganos sólidos puede ser: a) el órgano trasplantado, procedente de un donante con infección en periodo ventana o con infección latente no detectada mediante el cribado, b) la infección *de novo* producida tras el trasplante, a través de los mecanismos de transmisión habituales para esos virus, y c) el propio paciente que sufría una infección silente previa al trasplante, pero que no contraindicaba éste. Los dos retrovirus con mayor impacto sobre los programas de trasplante son el VIH-1 y el virus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1).

Infección por el VIH-1 en el receptor

Las estrategias de cribado serológico del VIH-1, tanto de los órganos donados como de los productos sanguíneos han reducido al mínimo la posibilidad de transmisión al receptor, y los casos descritos se deben, esencialmente, a errores humanos o a la infección reciente del donante (periodo ventana). El paciente trasplantado puede también infectarse después de recibir el injerto, como cualquier individuo

inmunocompetente, si está expuesto a los mecanismos de infección bien conocidos (vía parenteral, transmisión sexual). Asimismo, el trasplante de órganos en pacientes con infección conocida por el VIH-1 es una práctica cada vez más frecuente en nuestro medio. Por lo tanto, en el período postrasplante podría darse la circunstancia de necesitar pruebas de laboratorio para el diagnóstico de una infección contraída en el curso del trasplante o para el seguimiento de la infección previamente establecida. Tanto en uno como en otro caso, las técnicas y estrategias diagnósticas serán similares a las empleadas en cualquier otro paciente, salvo que el seguimiento temporal es más estrecho.

Infección por el virus linfotrópico humano (HTLV-I)

Es un retrovirus endémico en ciertas regiones geográficas: sudeste de Japón, Caribe, países de la parte norte de Sudamérica, sudeste de Estados Unidos, áreas de África central y del oeste, Melanesia, Oriente Medio e India. Su mecanismo de transmisión es similar al del VIH, incluyendo la transmisión vertical. La persona infectada se convierte en portadora de por vida, ya que el genoma vírico se integra en los linfocitos T. Si bien la primoinfección puede cursar de forma asintomática, con el paso de los años, un 2-4% de los infectados puede desarrollar las enfermedades asociadas a este virus, como la paraparesia espástica tropical o la leucemia/linfoma de células T. En los inmunodeprimidos, la tasa de progresión es mucho más elevada y las complicaciones más graves. Se han producido casos de transmisión en trasplantados a través de la donación de una persona asintomática, con consecuencias particularmente graves, pero también hay una serie publicada de 16 donaciones de riñón HTLV-I(+) que no presentaron complicaciones. En España, el problema tiene dos vertientes, derivadas del notable flujo de inmigración o las estancias en países ribereños del Caribe (República Dominicana, Venezuela, Colombia, etc.). Por una parte, el cribado de las donaciones, de las que ya se ha hablado en el apartado correspondiente de este documento y, por otra, la posibilidad de que se produzca una reactivación en el propio trasplantado que procede o ha vivido en esta zona geográfica, o nacido de una madre originaria de estos países. Desde el punto de vista del diagnóstico, las pruebas a utilizar serán las serológicas, para lo que existen métodos comerciales basados en distintos formatos de inmunoensayo, que pueden complementarse mediante pruebas moleculares en plasma o linfocitos. En el caso del seguimiento en el trasplantado con infección confirmada por el HTLV-I, se recomienda determinar la carga vírica, lo que sólo está disponible en laboratorios de referencia especializados. El significado clínico de otro retrovirus relacionado, el HTLV-II, no está muy bien definido en la población general. Aunque se han descrito casos de transmisión por las donaciones, el impacto real en el trasplante es desconocido.

5.4.4. Virus respiratorios comunes. El paciente trasplantado, como cualquier otro, está expuesto a la infección por los virus respiratorios que afectan a la población normal. Desde hace años se conoce este hecho, y también se sabe que el pronóstico es mucho peor, con afectación frecuente de las vías bajas, de

ahí la conveniencia de prevenirlas. Los trasplantes de mayor riesgo son el TPH y el pulmonar. Los virus más frecuentes son rinovirus, virus respiratorio sincitial, virus de la gripe y adenovirus. En la infección respiratoria aguda de tracto respiratorio superior las técnicas de diagnóstico serán las mismas que en la población normal, con especial énfasis en las técnicas rápidas, como la detección de antígenos, que debe complementarse con métodos basados en el cultivo o en la detección de ácidos nucleicos por PCR. Sin embargo, el planteamiento diagnóstico será diferente en los casos de neumonía. En este caso, la mejor muestra es el lavado broncoalveolar, pero debido a su carácter invasivo se utiliza en contadas ocasiones. En la mayoría de casos, las muestras disponibles serán un frotis nasal o faríngeo. En los casos de neumonía, tanto el cultivo celular como la detección antigénica, en muestras de tracto respiratorio superior, poseen una baja sensibilidad, por lo que la técnica de elección será la amplificación de ácidos nucleicos. En la actualidad existen sistemas de PCR a tiempo real que permiten la detección simultánea de la mayoría de virus respiratorios en pocas horas con una elevada sensibilidad y especificidad. Probablemente, el principal inconveniente es la sensibilidad, que suele ser causa de la detección conjunta de varios virus en una misma muestra, siendo muy difícil interpretar los resultados y no hay que olvidar que las técnicas de PCR no distinguen la viabilidad vírica. Por ello, son necesarios estudios futuros para determinar la probabilidad de colonización vírica de vías respiratorias.

Una importante característica de estas infecciones en los pacientes inmunodeprimidos es la persistencia de la replicación vírica en el tracto respiratorio durante prolongados periodos de tiempo. Así, deberán tomarse todas las precauciones necesarias para evitar la transmisión a los contactos, en especial durante el ingreso hospitalario y, cuando se inicie un tratamiento antivírico específico (por ejemplo, con inhibidores de la neuraminidasa frente a los virus de la gripe), se deberá monitorizar la selección de mutaciones de resistencia mediante secuenciación o PCR específica de alelo.

5.4.5. Poliomavirus: virus JC y BK. El virus JC es el agente causal de una grave enfermedad, la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP). Por fortuna se trata de una complicación muy rara pero que, con los progresos diagnósticos, cada vez se reconoce con más frecuencia en los pacientes trasplantados, tanto en los de órgano sólido como en los TPH. Este virus infecta a las personas sanas a lo largo de la vida, estableciendo infecciones asintomáticas persistentes en el tracto urinario, excretándose de forma más o menos continua a través de la orina. Se calcula que, en la edad adulta, hasta un 80% de las personas estarían infectadas y, consecuentemente, también los trasplantados. La reactivación, por causas no bien aclaradas, conduce al cuadro desmielinizante y últimamente fatal que caracteriza a la LMP. El factor de riesgo más importante es el grado de "inmunodepresión neta", por lo que esta complicación es típica de

trasplantados en situación de fuerte inmunodepresión.

El diagnóstico de sospecha es clínico, y se complementa con pruebas de imagen neurológicas. Aunque el diagnóstico de certeza es por examen anatomopatológico de la biopsia cerebral, el laboratorio de microbiología puede tener una contribución importante cuando se sospeche esta complicación. Por las razones antes apuntadas, las pruebas serológicas (no comerciales) carecen de interés, tanto a la hora de evaluar al donante y receptor, como para diagnosticar un cuadro sospechoso de LMP. Los métodos de cultivo tampoco son practicables en el contexto clínico, por dificultad técnica y lentitud. Tampoco es útil el diagnóstico citológico en el sedimento urinario.

En los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares de amplificación, en múltiples formatos, que constituyen claramente la mejor opción de diagnóstico microbiológico. De todas ellas, las más recomendables son las de PCR a tiempo real, hoy en día disponibles comercialmente para diversas plataformas instrumentales. Pueden llevarse a cabo sobre material de biopsia aunque, por razones obvias, la mayor aportación clínica es sobre muestra de LCR. La mayor experiencia con estas técnicas se adquirió con los pacientes con sida antes de disponer de los modernos tratamientos antirretrovíricos, por lo que la extrapolación de sus resultados al mundo del trasplante debe ser realizada con cautela. Las series con trasplantados son muy cortas y, cuando se ha intentado, la prueba de PCR ha sido positiva en la práctica totalidad de casos, lo que podría traducir una mayor concentración de ADN vírico en el LCR de los trasplantados, a diferencia de los pacientes con sida, en donde la sensibilidad no suele superar el 75%. La experiencia del diagnóstico molecular sobre biopsia cerebral es anecdótica: la sensibilidad en casos confirmados de LMP es total, aunque existen dudas acerca de su especificidad (podría detectar el virus latente en tejido cerebral).

El virus BK está filogenéticamente muy relacionado con el virus JC, con quien comparte algunas características epidemiológicas y patogénicas, como el establecer infecciones asintomáticas persistentes con reactivaciones en el tracto urinario, que se asocian con la cistitis hemorrágica de comienzo tardío en los TPH y con la nefritis intersticial en los trasplantados renales. Se ha sugerido la existencia de otras posibles asociaciones patológicas en otros tipos de trasplante, pero sigue siendo algo controvertido. También lo es el mecanismo patogénico, y no está claro si la reactivación del virus es la causa de la patología observada en algunos pacientes o se trata de un simple epifenómeno derivado de un estado inmune alterado general o local. En cualquier caso, ambos cuadros clínicos se relacionan con la replicación no controlada del virus, esto es, con la carga vírica. El concurso del laboratorio es indispensable en ambos casos, dada la inespecificidad de las manifestaciones clínicas.

La cistitis hemorrágica es muy frecuente en el TPH infantil, pero también en el adulto. Los factores de

riesgo más citados son la presencia de reacción del injerto contra el huésped agudo y el régimen de acondicionamiento para el trasplante. Las cifras de carga vírica urinaria suelen ser muy altas, de hasta 8-10 unidades logarítmicas. Los cuadros más prominentes (cistitis grado 4), también muestran una tendencia hacia valores más elevados. Sin embargo, estas asociaciones son de tipo estadístico, de manera que, cuando se trasladan al diagnóstico en casos concretos, se observa un amplio solapamiento entre pacientes asintomáticos y los que padecen esta complicación. En niños TPH con reactivación asintomática del virus pueden detectarse cifras de carga vírica como las señaladas anteriormente. El control del cuadro (básicamente tratamiento sintomático) también se relaciona con un descenso progresivo de la carga vírica, aunque pueden persistir cifras altas durante tiempos prolongados, con marcadas diferencias individuales y, en consecuencia, con solapamiento.

La nefritis intersticial del trasplantado renal es una complicación grave que afecta a la funcionalidad y la supervivencia del implante. Está relacionada con la inmunodepresión neta, por lo que determinados regímenes de inmunosupresión podrían favorecerla. Esto podría explicar las diferencias en cuanto a frecuencia entre los grupos de trasplante norteamericanos (8-10%), más proclives a pautas agresivas para evitar el rechazo, respecto a los grupos europeos. En España, la complicación se presenta en no más del 1-3%, circunstancia que condiciona la estrategia diagnóstica a desarrollar en los programas de trasplante. Con esa frecuencia, no resulta eficiente el cribado sistemático postrasplante, debiendo restringirse a aquellos pacientes con sospecha clínica (alteración de la función renal). En esta situación sí que es importante realizar el diagnóstico, ya que las manifestaciones clínicas y el tiempo de presentación son superponibles con los episodios de rechazo, cuyo manejo clínico es el contrario al de la nefritis intersticial (reducción de la pauta de inmunosupresión).

El diagnóstico de referencia de la nefritis intersticial es el histopatológico, mediante tinciones inmunohistoquímicas específicas en biopsia renal. El diagnóstico microbiológico puede ayudar en tanto no esté indicada esa exploración. Por las mismas razones que en el virus JC, la serología o el cultivo no son practicables. La observación de células típicas (*decoy cells*) en el sedimento urinario mediante tinciones convencionales denota tan sólo la excreción activa de ambos virus, sin que sea posible diferenciarlos. Algunos grupos han preconizado utilizarla para el cribado sistemático, dado su alto valor predictivo negativo, aunque los resultados no son siempre igual de favorables para todos ellos.

Las pruebas más útiles son las técnicas moleculares, para lo que se han comercializado reactivos específicos. Se recomiendan los métodos cuantitativos de amplificación por PCR a tiempo real. La muestra más conveniente es la orina, pero en este caso no se pueden aplicar las técnicas cualitativas (muy bajo valor predictivo positivo). Los pacientes con nefritis intersticial muestran valores

mayores de 4 unidades logarítmicas, típicamente entre 7-8 unidades, aunque puede existir un cierto solapamiento. La carga vírica suele descender con el control de la patología (disminución de la pauta inmunosupresora). Es aceptable la detección cualitativa del ADN del virus BK en suero, que se asocia con la presencia del cuadro. Sin embargo, la generalización de los métodos cuantitativos le resta interés práctico. Cuando se analiza el suero, los valores de carga vírica suelen ser en torno a 3 unidades logarítmicas más bajos que los correspondientes en orina, con un notable paralelismo de estas cifras en función de la evolución clínica.

6. BIBLIOGRAFÍA

Cronología y factores de riesgo de infección en el trasplantado

1. Aguado JM, Gavaldà J, San Juan R. Cronología y factores de riesgo de la infección en el paciente con trasplante de órgano sólido. En: Aguado JM, Fortún J, Gavaldà J, Pahissa A, de la Torre (eds). Infecciones en pacientes trasplantados, 3ª ed. Barcelona: Elsevier; 2009. pp. 97-107.
2. De la Cámara R, Jarque I. Cronología y factores de riesgo de la infección en el paciente con trasplante de progenitores hematopoyéticos. En: Aguado JM, Fortún J, Gavaldà J, Pahissa A, de la Torre (eds). Infecciones en pacientes trasplantados, 3ª ed. Barcelona: Elsevier; 2009. pp. 109-129.
3. Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR); National Marrow Donor Program (NMDP); European Blood and Marrow Transplant Group (EBMT); American Society of Blood and Marrow Transplantation (ASBMT); Canadian Blood and Marrow Transplant Group (CBMTG); Infectious Disease Society of America (IDSA); Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA); Association of Medical Microbiology and Infectious Diseases Canada (AMMI); Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Bone Marrow Transplant. 2009; 44:453-558.
4. Gea-Banacloche JC, Opal SM, Jorgensen J, Carcillo JA, Sepkowitz KA, Cordonnier C. Sepsis associated with immunosuppressive medications: an evidence-based review. Crit Care Med. 2004; 32(supl 11):S578-590.
5. San Juan R, Aguado JM, Lumbreras C, Fortún J, Muñoz P, Gavaldà J et al. RESITRA Network of the Spanish Study Group of Infection in Transplantation. Impact of current transplantation management on the development of cytomegalovirus disease after renal transplantation. Clin Infect Dis. 2008; 47:875-882.

Evaluación pretrasplante del donante y receptor

1. González R, Torres P, Castro E, Borbolla L, Candotti D, Koppelman M, et al. Efficacy of hepatitis B virus (HBV) DNA screening and characterization of acute and occult HBV infections among blood donors from Madrid, Spain. Transfusion. 2010; 50:221-230.
2. Hollinger FB, Sood G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation. J Viral Hepatitis. 2009; 17:1-15
3. Humar A, Morris M, Blumberg E, Freeman R, Preiksaitis J, Kiberd B, et al. Nucleic acid testing (NAT) of organ donors: Is the best test the right test? A consensus conference report. Am J Transpl. 2010; 10:889-899.
4. Kaul DR, Taranto S, Alexander C, Covington S, MAarvin M, Nowicki M, et al. Donor screening for human T-cell

lymphotrophic virus 1/2: changing paradigms for changing testing capacity. *Am J Transpl*. 2010; 10:207-213.

5. Pruss A, Caspari G, Küger DH, Blümel J, Nübling CM, Gürtler L, et al. Tissue donation and virus safety: more nucleic acid amplification testing is needed. *Transpl Infect Dis*. 2010; Apr 19. [Epub ahead of print]
6. Solves P, Mirabet V, Alvarez M, Vila E, Quiles F, Villalba JV, et al. Donor screening for hepatitis B virus infection in a cell and tissue bank. *Transpl Infect Dis*. 2008; 10:391-395.
7. Tuke PW, Grant PR, Waite J, Kitchen AD, Eglin RP, Tedder RS. Hepatitis C virus window-phase infections: closing the window on hepatitis C virus. *Transfusion*. 2008; 48:594-600.

Monitorización microbiológica

1. Fishman JA. Infection in solid-organ-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2007; 357:2601-2614.
2. LaRocco MT, Burgert SJ. Infection in the bone marrow transplant recipient and role of the microbiology laboratory in clinical transplantation. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10:277-297.
3. Pérez JL, Ayats J. El laboratorio de microbiología en el trasplante. En: Aguado JM (ed). *Infecciones en pacientes trasplantados*, 2ª ed. Madrid: Elsevier España, 2004; pp. 111-151.
4. Snyderman DR. Posttransplant microbiological surveillance. *Clin Infect Dis*. 2001; 33(supl 1):S22-S25.

Infecciones bacterianas

1. Aguado JM, Torre-Cisneros J, Fortún J, Benito N, Meije Y, Doblas A, Muñoz P. Tuberculosis in solid-organ transplant recipients: consensus statement of the Group for the Study of Infection in Transplant Recipients (GESITRA) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Clin Infect Dis*. 2009; 48:1276-1284.
2. Ausina V, Catalán V, Cercenado E, Pelaz Antolín C. Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, número 20. Madrid, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2005.
3. Cacho Calvo MB, Meseguer Peinado MA, Oliver Palomo A, Puig de la Bellacasa J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, número 25. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2007.
4. Cano ME, Domínguez MA, Ezpeleta Baquedano C, Martínez Martínez L. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, número 26. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2007.
5. Peleg AY, Husain S, Qureshi ZA, Silveira FP, Sarumi M, Shutt KA, et al. Risk factors, clinical characteristics, and outcome of *Nocardia* infection in organ transplant recipients: a matched case-control study. *Clin Infect Dis*. 2007; 44:1307-1314.

Infecciones fúngicas

1. Azoulay E, Bergeron A, Chevret S, Bele N, Schlemmer B, Menotti J. Polymerase chain reaction for diagnosing pneumocystis pneumonia in non-HIV immunocompromised patients with pulmonary infiltrates. *Chest*. 2009; 135:655-661.
2. Cuenca Estrella M, Gadea Gironés I, Martín Mazuelos E, Pemán García J, Pontón J, Rodríguez Tudela JL. Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, número 21. Madrid: Sociedad

Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2006.

3. Cuenca Estrella M, Bernal Martínez L, Buitrago MJ, Castellí MV, Gomez López A, Zaragoza O, et al. Update on the epidemiology and diagnosis of invasive fungal infection. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 32(Supl 2):143-147.
4. Husain S, Paterson DL, Studer SM, Crespo M, Pilewski J, Durkin M, et al. *Aspergillus* galactomannan antigen in the bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Transplantation*. 2007; 83:1330-1336.
5. Maertens J, Maertens V, Theunissen K, Meersseman W, Meersseman P, Meers S, et al. Bronchoalveolar lavage fluid galactomannan for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases. *Clin Infect Dis*. 2009; 49:1688-1693.
6. Martino R, Subirá M, Rovira M, Solano C, Vázquez L, Sanz GF, et al. Invasive fungal infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: incidence and risk factors in 395 patients. *Br J Haematol*. 2002; 116:475-482.
7. Miceli MH, Graziutti ML, Woods G, Zhao W, Kocoglu MH, Barlogie B, et al. Strong correlation between serum *Aspergillus* galactomannan index and outcome of aspergillosis in patients with hematological cancer: clinical and research implications. *Clin Infect Dis*. 2008; 46:1412-1422.
8. Obayashi T, Negishi K, Suzuki T, Funata N. Reappraisal of the serum (1-3)-beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections—a study based on autopsy cases from 6 years. *Clin Infect Dis*. 2008; 46:1864-1870.
9. Rovira M, Ruiz Camps I. Infecciones en el trasplante de progenitores hematopoyéticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007; 25:477-486.

Infecciones parasitarias

1. Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis*. 2008; 191-199.
2. Cañavate C, Cuadros J, Martínez Ruiz R, Martín-Rabadán P. El laboratorio de Microbiología ante las enfermedades parasitarias importadas. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, número 35. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2009.
3. Kun H, Moore A, Mascola L, Steurer F, Lawrence G, Kubak B, et al. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clin Infect Dis*. 2009; 48:1534-1540.
4. Len O, Ayats J. Infecciones por protozoos. En: Aguado García JM, Fortún Abete J, Gavalda Santapau J, Pahissa Berga A, de la Torre Cisneros J (eds). *Infecciones en pacientes trasplantados*, 3ª ed. Barcelona: Elsevier 2009; pp. 323-338.

Infecciones víricas

1. Benlloch, Pérez S, Berenguer Haym M. Virus de la hepatitis. En: Aguado García JM, Fortún Abete J, Gavalda Santapau J, Pahissa Berga A, de la Torre Cisneros J (eds). *Infecciones en pacientes trasplantados*, 3ª ed. Barcelona: Elsevier; 2009; pp. 255-278.
2. Dropulic LK, Jones RJ. Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2008; 41:11-18.
3. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3:611-623.
4. Pérez JL, De Oña M, Gimeno C, Navarro D. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por herpesvirus, 2ª ed. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, número 8a. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2005.

5. Preiksaitis JK, Keay S. Diagnosis and management of posttransplant lymphoproliferative disorder in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2001; 33(supl 1):S38-S46.
6. Razonable RR, Payá CV. Herpesvirus infections in transplant recipients: current challenges in the clinical management of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *Herpes* 2003; 10:60-65.
7. De la Torre Cisneros J, Pérez Sáenz JL. Citomegalovirus y otros herpesvirus. En: Aguado García JM, Fortún Abete J, Gavaldà Santapau J, Pahissa Berga A, de la Torre Cisneros J (eds). *Infecciones en pacientes trasplantados*, 3ª ed. Barcelona: Elsevier; 2009. pp. 239-253.
8. Westall GP, Michaelides A, Williams TJ, Snell GI, Kotsimbos TC. Bronchiolitis obliterans syndrome and early human cytomegalovirus DNAemia dynamics after lung transplantation. *Transplantation* 2003; 75:2064-2068.
9. Zamora MR. Cytomegalovirus and lung transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4:1219-1226.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Antígeno galactomanano (Platelia™ <i>Aspergillus</i> EIA)	PNT-MTX-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir un método inmunoenzimático que permite la detección del antígeno galactomanano de *Aspergillus* en muestras humanas de suero y lavado broncoalveolar (LBA) mediante el equipo comercial Platelia™ *Aspergillus* EIA de BioRad.

Este método se aplica como técnica de detección rutinaria y de seguimiento en pacientes con riesgo para aspergilosis invasiva. Este método es aplicable a todos los laboratorios de Micología que realicen esta determinación.

Se describen los tipos de muestras, su procesamiento en el laboratorio y los criterios de interpretación.

2. FUNDAMENTO

El kit Platelia™ *Aspergillus* EIA de BioRad es una técnica inmunoenzimática (ELISA) en un tiempo, de tipo *sandwich* en microplaca, que permite la búsqueda del galactomanano en sueros humanos mediante el anticuerpo monoclonal de rata EBA-2 dirigido específicamente contra el galactomanano de *Aspergillus*. El anticuerpo monoclonal se utiliza, por una parte, para sensibilizar los pocillos de la microplaca y captar el antígeno y, por otra, como detector (acoplado a la peroxidasa).

La realización de la prueba comprende cuatro pasos:

- 1) Tratamiento del suero con calor en presencia de EDTA para disociar los inmunocomplejos y precipitar las proteínas séricas que puedan interferir con el procedimiento ELISA.
- 2) Incubación simultánea del suero y del conjugado en los pocillos de la microplaca sensibilizados con el anticuerpo monoclonal (AcMo). En presencia de antígeno se forma un complejo del tipo AcMo-Galactomanano-AcMo/peroxidasa.
- 3) Revelado, después del lavado, de los complejos AcMo-Ag-AcMo formados por adición del sustrato. Éste reacciona con los complejos ligados al pocillo y se produce una reacción de color azul.
- 4) Lectura de la reacción a 450/620 nm tras 30 min de incubación a temperatura ambiente y parada de la reacción con ácido sulfúrico. La adición de ácido detiene la reacción enzimática y cambia el color azul por amarillo.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología nº 1 a, 2ª edición. SEIMC. 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
- Manual de instrucciones de las técnicas aplicadas
- Manual de bioseguridad

4. MUESTRAS

PROCEDIMIENTOS PREANALÍTICOS

4.1. VOLANTE DE SOLICITUD

La solicitud que acompaña a cada muestra debe ser debidamente cumplimentada. Deberá constar la filiación, edad, número de historia, servicio de procedencia, tipo de muestra (de forma muy específica), localización anatómica de la muestra, tratamiento previo y diagnóstico del enfermo, así como el código del clínico que realiza la petición.

4.2. MUESTRAS ACEPTABLES: OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN

La prueba puede efectuarse sobre muestras de suero o de lavado broncoalveolar (LBA), procedentes de pacientes adultos. La prueba en suero se realiza sobre muestra sin diluir, extraída según las prácticas habituales. Hay que separar el suero del coágulo lo antes posible para evitar toda hemólisis. **NO se debe usar plasma.**

Los sueros no deben estar contaminados y deben ser transportados y conservados hasta su uso en tubos herméticamente cerrados.

Los resultados no se ven afectados en muestras de suero que contengan 20 mg/L de bilirrubina, muestras lipémicas que contengan el equivalente a 2g/L de trioleína (triglicérido) o hemolizadas que contengan 165 mg/L de hemoglobina. No se han estudiado las interferencias relacionadas con el exceso de albúmina.

Las muestras de LBA se obtienen mediante broncoscopia, por los procedimientos habituales en el hospital. Se debe hacer constar el volumen de suero instilado en el paciente.

Las muestras pueden almacenarse en nevera (2-8°C) cuando el procedimiento ELISA se realice en las 24-48 h siguientes. Para un almacenamiento más prolongado, hay que guardarlas a -20° C o temperatura inferior.

Las muestras pueden someterse a un máximo de 4 ciclos de congelación/descongelación.

Las muestras descongeladas deben mezclarse meticulosamente antes ser procesadas.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. REACTIVOS CONTENIDOS EN EL EQUIPO COMERCIAL

El sistema comercial Platelia™ *Aspergillus* EIA de BIO-RAD (Ref. 62796) contiene, en cantidad suficiente para realizar 96 determinaciones en un máximo de 9 lotes, los siguientes componentes y reactivos:

- **R1.** Pocillos sensibilizados con el anticuerpo monoclonal anti-galactomanano EBA-2 (12 tiras de 8 pocillos).
- **R2.** Solución de lavado, concentrada 10 veces. Tampón tris NaCl pH 7,4 que contiene 1% de Tween® 20 y 0,01% de Timerosal (1 x 100 mL).
- **R3.** Suero de control negativo liofilizado (humano). No contiene galactomanano, sin conservante (3 x csp 1 mL).

Servicio de Microbiología Hospital.....	Antígeno galactomanano (Platelia™ <i>Aspergillus</i> EIA)	PNT-MTX-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 7

- **R4.** Suero de control umbral liofilizado (humano). Contiene galactomanano, sin conservante (3 x csp 1 mL).
- **R5.** Suero de control positivo liofilizado (humano). Contiene galactomanano, sin conservante (3 x csp 1 mL).
- **R6.** Conjugado: anticuerpo monoclonal anti-galactomanano marcado con la peroxidasa (1 x 8 mL). Conservante: timerosal al 0,01%.
- **R7.** Solución para el tratamiento de los sueros. Solución ácida de EDTA, sin conservante (1 x 10,5 mL).
- **R8.** Tampón de sustrato de la peroxidasa. Solución de ácido cítrico y de acetato de sodio pH 5,2 que contiene 0,009% de H₂O₂ y 4% de dimetilsulfoxido (DMSO) (1 x 60 mL).
- **R9.** Solución de cromógeno concentrada: tetrametilbenzidina (TMB) al 0,6% en una solución de DMSO al 90% (1 x 1 mL).
- **R10.** Solución de parada: ácido sulfúrico 1,5 N (1 x 12 mL).
- Hojas adhesivas para microplacas (8 unidades).

Importante: el equipo comercial debe conservarse en nevera, entre 2-8°C.

5.2. OTROS PRODUCTOS (NECESARIOS Y NO SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO COMERCIAL)

- Agua destilada o desmineralizada para la solución de lavado.
- Agua destilada apirógena estéril para reconstituir los sueros de control.

5.3. SEGURIDAD E HIGIENE

- Todas las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas.
- Los sueros de control han sido inactivados por calor y han resultado ser negativos para los anticuerpos anti-VIH1, anti-VIH2, anti VHC y antígeno HBs. Sin embargo, como ningún método puede garantizar de forma absoluta estas ausencias o las de otros agentes infecciosos, estos sueros deben ser tratados como muestras potencialmente infecciosas.
- Es obligado el uso de guantes al realizar esta prueba.
- Se debe evitar todo contacto del tampón sustrato, del cromógeno o de la solución de parada con los ojos, la piel y las mucosas (riesgo de toxicidad, irritación o quemaduras).
- **ATENCIÓN:** Ácido sulfúrico 1,5 N (solución de parada) y DMSO al 90% (R9). Son productos irritantes para los ojos y la piel (R36/38). En caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua y solicitar atención médica. **NO se debe añadir agua** directamente sobre estos productos (reacción muy exotérmica), pues puede originar fuertes salpicaduras.
- La tetrametilbenzidina (TMB) del R9 es un cromógeno de peroxidasa no cancerígeno y no mutágeno.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Gradilla metálica para tubos de 1,5 mL.
- Puntas de pipeta con filtro adaptadas al volumen necesario.
- Tubos de polipropileno, cónicos y estériles de 1,5 mL con tapón de rosca (que soporten 100-120°C).
- Material volumétrico (probetas para preparar solución de lavado).
- Agitador tipo *vortex*.
- Baño en ebullición a 100°C.
- Baño, estufa o incubador de microplacas a 37°C ± 1°C.
- Dispositivo de lavado para microplacas, manual o automático.
- Espectrofotómetro para microplacas con filtros a 450/650 nm.
- Microcentrífuga (10.000 x g).
- Pipetas o multipipetas para dosificar volúmenes de 1000 µL, 200 µL, 150 µL, 100 µL y 50 µL.

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y REACTIVOS

Precauciones comunes para las pruebas inmunoenzimáticas:

- No utilizar reactivos después de la fecha de caducidad ni mezclar o asociar en una misma serie reactivos que procedan de *kits* con número de lote diferentes.
- Reconstituir cuidadosamente los reactivos evitando toda contaminación. Utilizar preferentemente material de uso único durante toda la prueba.
- No realizar la prueba en presencia de reactivos que produzcan vapores (ácidos, alcalinos, aldehídos) o polvos que puedan alterar la actividad enzimática del conjugado.
- El lavado de los pocillos es una etapa esencial de la manipulación: hay que respetar el número de ciclos de lavado prescrito y comprobar que todos los pocillos están completamente llenos y después completamente vacíos.
- No utilizar nunca el mismo recipiente para distribuir el conjugado y la solución de revelado.
- La reacción enzimática es muy sensible a todos los metales o iones metálicos. **Ningún elemento metálico** debe entrar en contacto con las diferentes soluciones que contienen el conjugado o la solución sustrato.
- La solución de revelado (tampón sustrato + cromógeno) debe ser incolora. La aparición de una coloración azul en los minutos siguientes a la reconstitución indica que el reactivo es inutilizable y se debe sustituir.

Precauciones específicas para la prueba Platelia™ *Aspergillus* EIA:

- Dada la alta sensibilidad de la prueba y la frecuente presencia de esporas de *Aspergillus* spp. en el aire, se debe evitar toda contaminación ambiental que origine falsos positivos. Se recomienda realizar la prueba en una habitación distinta a las que se empleen para obtención de muestras, siembra y cultivo micológicos.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Antígeno galactomanano (Platelia™ Aspergillus EIA)	PNT-MTX-01	
		Edición Nº 01	Página 4 de 7

- Se debe utilizar material limpio y exento de polvo. Lo ideal es el uso de material apirógeno, pues el galactomanano es termoestable y la esterilización del material no garantiza su ausencia. Sin embargo, con un mínimo de precauciones, es posible utilizar material sometido a limpieza estándar.
- Hay que limitar al máximo la exposición al aire libre de las distintas soluciones y contenedores abiertos (placa, tubos, probetas, etc.).
- No verter nunca el excedente de conjugado no distribuido sobre el frasco de origen: utilizar la cantidad necesaria para cada serie.

7.2. PROCEDIMIENTOS PREVIOS

- Atemperar los sueros a temperatura ambiente, durante 15 min.
- Reconstituir los reactivos cuidadosamente evitando toda contaminación. **Antes de su utilización, dejarlos atemperar 15 min a temperatura ambiente:**
 - **R1.** Pocillos sensibilizados. Cortar la bolsa de aluminio 0,5-1 cm por encima del cierre *zip* y sacar las tiras necesarias (muestras + 4 controles). Volver a introducir inmediatamente en la bolsa las tiras no utilizadas, cerrarla y guardarla entre 2-8°C.
 - **Caducidad:** Después de abrir la bolsa al vacío, las tiras conservadas entre 2-8°C en su bolsa de origen bien cerrada, son estables durante 5 semanas.
 - **R2.** Solución de lavado, concentrada 10X. **Preparar una dilución 1/10.** Si se utiliza el sistema de lavado automático, preparar 1 L para 12 tiras ó 0,5 L para 6 tiras (1 L: 100 mL solución de lavado R2 y 900 mL de agua destilada; 0,5 L: 50 mL de R2 y 450 mL de agua destilada). Si se hace lavado manual, calcular, el volumen en función de las tiras a montar (son un total de 5 lavados con 370 µl para cada pocillo):
 - de 1-3 tiras: 50 mL (5 mL de R2 y 45 mL de agua destilada).
 - de 4-6 tiras: 100 mL (10 mL de R2 y 90 mL de agua destilada).
 - de 7-9 tiras: 150 mL (15 mL de R2 y 135 mL de agua destilada).
 - de 10-12 tiras: 200 mL (20 mL de R2 y 180 mL de agua destilada).
 - **Caducidad:** Después de su dilución, la solución de lavado se conserva durante 15 días en nevera entre 2-8°C.
 - **R3.** Suero de control negativo. Reconstituir un frasco con 1 mL de agua destilada apirógena. Esperar 2-3 min para la rehidratación del suero y después mezclar bien. Repartir en 3 x 300 µl en tubos tipo *ependorf* y congelar a -20°C los dos no utilizados el mismo día. **Debe prepararse inmediatamente antes de la realización del ELISA.**
 - **R4.** Suero de control umbral (preparar igual que R3).

- **R5.** Suero de control positivo (preparar igual que R3 y R4).
- **Caducidad:** Después de la reconstitución, los volúmenes de los sueros **R3, R4 y R5** no utilizados **deben ser congelados inmediatamente a -20°C durante un máximo de 5 semanas.**
- **R6.** Conjugado. Homogeneizar por inversión antes de su uso. Extraer únicamente la cantidad necesaria según el número de muestras (para 6 tiras: 4ml; para 12 tiras: 8 mL).
- **R7.** Solución de tratamiento. Lista para su uso.
- **R8.** Tampón sustrato. Listo para su uso.
- **R9.** Solución de cromógeno concentrada. Diluir 50 veces la solución en el tampón sustrato (**R8**) calculando un mínimo de 2 mL por tira (máx. 4ml/tira). **Estabilidad:** 6 h cuando se almacena en oscuridad a temperatura ambiente (18-25° C)
 - Para 2 tiras: 100 µl de R9 + 5 mL de R8.
 - Para 6 tiras: 400 µl de R9 + 20 mL de R8 ó 500 µl de R9 + 25 mL de R8
 - Para 12 tiras: 1ml de R9 + 50 mL de R8.
- **R10.** Solución de parada. Lista para su uso.

7.3. DETECCIÓN DEL ANTÍGENO GALACTOMANANO: INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

- Encender el baño de agua y graduarlo a 100°C.
- Tratamiento de las muestras (sueros y LBA):**
- Preparar y rotular, en gradilla metálica, tantos tubos cónicos de 1,5 mL (estériles y con tapón de rosca) como número de muestras a analizar, más 4 para los controles.
 - Dosificar, en los tubos correspondientes, 300 µL de cada suero problema y de los controles.
 - Añadir 100 µL de la solución de tratamiento (R7) a todos los tubos. Con la pipeta repetidora y utilizando la misma punta sin tocar la preparación.
 - Tapar los tubos y agitar **sin invertirlos**.
 - Colocar la gradilla con los tubos en el baño a 100°C durante 3 min. Debido a que la temperatura, el tiempo de espera y el uso del material recomendados son esenciales para el éxito del análisis, conviene validar la temperatura indicada por el aparato comprobando la temperatura real. Para ello, hay que colocar un termómetro calibrado encajado en un tubo con aceite mineral: dentro del tubo se deben alcanzar los 100° C en el baño de agua hirviendo.
 - Centrifugar los tubos en la microcentrífuga durante 10 min a 10.000 x g y a temperatura ambiente. Se utiliza el sobrenadante para continuar la prueba.
 - Una vez tratada la muestra, la prueba debe realizarse lo antes posible (en la jornada). El sobrenadante se puede extraer y almacenar a 2-8°C hasta un máximo de 48 h antes de su estudio. Si después de analizar los resultados se decide volver a probar el suero, se debe iniciar la repetición desde el suero puro y no con el suero tratado.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Antígeno galactomanano (Platelia™ Aspergillus EIA)	PNT-MTX-01	
		Edición Nº 01	Página 5 de 7

Procedimiento de ELISA:

- i) Establecer cuidadosamente el plan de distribución y de identificación de las muestras.
- j) Sacar las tiras de pocillos (R1) necesarias del embalaje protector y prepararlas en el soporte de plástico: número de muestras más 4 controles (1 control positivo, 2 controles umbral y 1 control negativo).
- k) Verter el conjugado (R6), homogeneizándolo por inversión antes de su uso, en una cubeta especial, calculando el volumen necesario según el número de muestras a procesar (para 6 tiras: 4 mL; para 12 tiras: 8 mL).
- l) Dispensar 50 µL del conjugado (azul) con pipeta multicanal de 8 (amarilla).
- m) Añadir 50 µL de los sobrenadantes de las muestras tratadas y de los controles, utilizando una punta para cada uno de ellos, y mezclar pipeteando varias veces.
- n) Tapar la microplaca con película adhesiva, apretando bien toda la superficie para asegurar la estanqueidad, e incubarla durante 90 min (±5 min) a 37°C (±1°C) [**Atención:** en una estufa en la que no haya placas con cultivos bacterianos ni fúngicos].
- o) Retirar la película adhesiva y proceder a la aspiración (±100 µL) y al lavado con la solución de lavado (R2 diluida), bien de forma automática o manual. Son un total de 5 lavados con 370 µl de solución de lavado cada uno. Al finalizar, **secar bien las tiras** dándoles la vuelta y golpeando suavemente sobre una hoja de papel absorbente para garantizar que se elimina todo el líquido.
- p) Añadir rápidamente a cada pocillo, a cubierto de la luz directa y con pipeta multicanal, 200 µl de la solución de revelado (R9:R8 1:50), que debe ser incolora. Sin tapar la microplaca, dejar que la reacción se revele **en la oscuridad** (caja de *porespan* o similar) durante 30±5 min, a temperatura ambiente (18-25°C).
Comprobar el estado de funcionamiento del espectrofotómetro para ponerlo en marcha y estabilizarlo en caso de que no esté en uso.
- q) Parar la reacción enzimática añadiendo 100 µl de solución de parada (R10), mediante una pipeta multicanal y las mismas puntas, en cada pocillo. Adoptar la misma frecuencia y el mismo ritmo de distribución que para la solución de revelado.
- r) Limpiar cuidadosamente la parte inferior de las tiras y proceder a su lectura en un lector de placas de ELISA en los 30 min siguientes a la parada de la reacción (las tiras siempre deben conservarse a cubierto de la luz antes de la lectura). Leer la densidad óptica (DO) a 450 nm según el procedimiento instrumental apropiado.
- s) Finalizada la lectura, imprimir los resultados. Antes de transcribir los resultados, comprobar la concordancia entre la lectura y el plan de distribución e identificación de las placas, muestras y controles. Una absorbancia con una DO menor de

0,000 indica un error del procedimiento o del instrumento, que debería evaluarse. El resultado se considera no válido y la muestra debe volverse a analizar.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Cálculos, expresión y validación del ensayo:

- **Cálculo del valor umbral.** El valor umbral (VU) o *cut-off* corresponderá a la media de las absorbancias (DO) de los pocillos que contienen el suero umbral (R4).
- **Cálculo de un índice (I) para cada suero analizado.** Para cada suero analizado, hay que calcular la relación entre las densidades ópticas (DO):

$$I = \frac{\text{DO muestra}}{\text{DO suero umbral (cut-off)}}$$

Este cálculo permite limitar las variaciones de DO interensayo e interlaboratorio, debidas a las diferentes condiciones de realización del procedimiento (temperatura ambiental, modos de lavado, etc.)

- **Validación del ensayo.** En las condiciones normales de utilización de la prueba, los sueros control dan los siguientes resultados:
 - DO del suero de control umbral o *cut-off* (R4) entre 0,3 y 0,8 ($\geq 0,3$ y $\leq 0,8$)
 - El índice (I) del suero de control positivo (R5) debe ser superior a 2,0 ($>2,0$)
 - El índice (I) del suero de control negativo (R3) debe ser inferior a 0,4 ($<0,4$)

En relación con el punto de corte, actualmente se considera que la técnica puede interpretarse de forma dinámica (índices $\geq 0,5$ ng/mL en muestras consecutivas), o estática (índice $\geq 0,7$ ng/mL) en una muestra de suero.

9. RESPONSABILIDADES

Las normas de este documento deben ser tenidas en cuenta por todos los miembros del Servicio que realicen esta técnica, en las diferentes etapas del procedimiento.

- El proceso de obtención de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante, o del laboratorio de microbiología si se realiza en él la toma de la muestra.
- La realización de la prueba, incluyendo los procesos preanalíticos distintos del registro de las muestras, el cálculo de los resultados, su registro en el sistema informático y el archivo de hojas de trabajo son responsabilidad del personal técnico adscrito al laboratorio de Micología.
- La supervisión de todo el proceso y del personal, la interpretación de los resultados y su validación, la comunicación de resultados clínicamente relevantes a los facultativos que atiendan al paciente y el proceso de asesoría clínica son

Servicio de Microbiología Hospital.....	Antígeno galactomanano (Platelia™ <i>Aspergillus</i> EIA)	PNT-MTX-01	
		Edición Nº 01	Página 6 de 7

responsabilidad del facultativo a cargo del laboratorio de Micología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El ensayo se ha validado especialmente en muestras de sueros procedentes de pacientes neutropénicos con riesgo de aspergilosis invasiva. Los parámetros siguientes se refieren a esta población de pacientes y con esta muestra clínica, no siendo extrapolables a otros tipos de enfermos ni a la muestra de LBA. Sin embargo, esto no es obstáculo para utilizar la prueba fuera de la situación validada, dado que la detección de galactomanano puede ser útil en el contexto de una enfermedad grave y de difícil diagnóstico clínico como la aspergilosis.

- **Sensibilidad.** El estudio de sensibilidad, realizado en dos centros con un número total de 38 episodios de 35 pacientes con trasplante de precursores hematopoyéticos y pacientes con leucemia diagnosticados de aspergilosis demostrada o invasiva probable mostró los siguientes resultados:

- Aspergilosis demostrada, N=19 episodios en 16 pacientes: Sensibilidad del 100% (19/19).
- Aspergilosis probable, N=19 episodios en 19 pacientes: Sensibilidad del 94,7% (18/19).
- Aspergilosis demostrada y probable combinadas, N=38 episodios en 35 pacientes: Sensibilidad del 97,4% (37/38). El intervalo de confianza del 95% es del 86,2%-99,9%.

- **Especificidad.** El estudio de especificidad, realizado en dos centros con un número total de 3691 muestras combinadas obtenidas en 201 episodios (168 pacientes) sin signos de aspergilosis invasiva (pacientes de control).

- Centro 1, N=3060 muestras de 103 episodios (70 pacientes): Especificidad del 92,2% (95/103). Intervalo de confianza 85,3%-96,6%.
- Centro 2, N=631 muestras de 98 episodios (98 pacientes): Especificidad del 88,8% (87/98). Intervalo de confianza 80,8%-94,3%.
- Centros combinados, N=3691 muestras de 201 episodios (168 pacientes): Especificidad del 90,5% (182/201). El intervalo de confianza al 95% es del 85,6%-94,2%.

- **Valores predictivos.** Analizados los valores predictivos positivo y negativo (VPP y VPN) en la población de pacientes de este estudio, basados en la prevalencia actual del 16% observada en este estudio y teniendo en cuenta los resultados positivos cuando 2 muestras consecutivas tuvieron un índice mayor o igual a 0,5.

VPP=66,1% (37/56) y VPN=99,4% (182/183)

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

a) Un resultado negativo del análisis no descarta el diagnóstico de aspergilosis invasiva. Los pacientes en riesgo de aspergilosis invasiva se deben estudiar dos veces por semana.

- Debe seguirse estrictamente el procedimiento y la interpretación de los resultados, en caso contrario pueden obtenerse falsos negativos.
- Se pueden obtener falsos positivos cuando, por una manipulación brusca de la microplaca o una mala técnica de pipeteado al añadir los reactivos, se produzca la contaminación de pocillos de muestras negativas por el contenido de un pocillo control o de muestras positivas.
- No se ha validado el rendimiento del Platelia™ *Aspergillus* EIA en muestras de pacientes neonatos o pediátricos.
- La detección de galactomanano en pacientes con enfermedades granulomatosas crónicas o síndrome de Job puede ser menor al usar el Platelia™ *Aspergillus* EIA.
- El uso concomitante de un tratamiento antimicótico activo en algunos pacientes con aspergilosis invasiva disminuye la sensibilidad del Platelia™ *Aspergillus* EIA.
- No se ha evaluado el uso del Platelia™ *Aspergillus* EIA con plasma u otras muestras como orina o líquido cefalorraquídeo.
- Tampoco existe una experiencia amplia con muestras de LBA, por lo que el ensayo no se ha validado completamente y los valores umbrales se desconocen. De cualquier forma, algunos estudios sugieren su utilidad, por lo que puede utilizarse valorando los resultados en función de las características clínicas y otros datos auxiliares del paciente.
- No se ha establecido el rendimiento del Platelia™ *Aspergillus* EIA en la lectura manual o la determinación visual de los resultados.
- Reacciones cruzadas con hongos filamentosos distintos de *Aspergillus*:** se ha demostrado que otros géneros de hongos como *Penicillium*, *Alternaria* y *Paecilomyces* reaccionan con los anticuerpos monoclonales EBA-2 de rata que se usan en la detección del galactomanano de *Aspergillus*. Estas especies raramente participan en una infección micótica invasiva.
- Reacciones positivas sin signos clínicos:**
 - Teniendo en cuenta la detección precoz del antígeno galactomanano en el suero, incluso antes de la aparición de las características clínicas o radiológicas, es posible observar reacciones positivas sin signos clínicos: corresponden a pruebas "verdaderos positivos" de pacientes en los que el diagnóstico de aspergilosis demostrada o probable se establecerá más adelante.
 - Sin embargo, en algunos casos concretos, se deberán tener en cuenta varios factores cuando se interprete la prueba:
 - **Edad del paciente:** se han descrito reacciones positivas sin signos clínicos, especialmente en niños pequeños. Aunque algunos de estos casos podrían estar relacionados con la circulación real de

Servicio de Microbiología Hospital.....	Antígeno galactomanano (Platelia™ <i>Aspergillus</i> EIA)	PNT-MTX-01	
		Edición N° 01	Página 7 de 7

antígenos de *Aspergillus*, la mayoría se consideran falsos positivos.

- **Factores de la dieta:** se ha demostrado la presencia de galactofuranosidos en algunos alimentos, en particular en los cereales y sus derivados, y en los postres lácteos. A diferencia de la leche materna, las leches humanizadas contienen concentraciones altas de galactomanano. Por lo tanto, se debe tener en cuenta este factor a la hora de interpretar la evolución de la antigenemia en los niños pequeños y también en aquellos casos con alteraciones en la barrera intestinal. La interpretación de un caso de antigenemia positiva que no se acompañe de signos clínicos debe ser aún más cauta en esta población de pacientes.
- **Tratamientos con β -lactámicos semisintéticos:** se han publicado casos aislados de resultados positivos en el análisis del galactomanano en pacientes tratados con piperacilina/tazobactam y, en menor medida, con soluciones parenterales de amoxicilina-clavulanato. También se ha descrito que algunos lotes o series de piperacilina/tazobactam son positivos al antígeno galactomanano. Por lo tanto, los resultados positivos del análisis de los pacientes tratados con estas combinaciones deben interpretarse con cautela y confirmarse con otros métodos diagnósticos. No obstante, no se puede descartar la aparición de una aspergilosis invasiva porque Platelia™ *Aspergillus* EIA puede detectar el antígeno galactomanano antes de que aparezcan los signos clínicos o radiológicos. En consecuencia, se vigilará más estrechamente a los pacientes tratados con piperacilina/tazobactam o amoxicilina-clavulanato y que muestren resultados positivos en el análisis.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Maertens J, Maertens V, Theunissen K, Meersseman W, Meersseman P, Meers S, et al. Bronchoalveolar lavage fluid galactomannan for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases. *Clin Infect Dis.* 2009; 49:1688-1693.
2. Miceli MH, Graziutti ML, Woods G, Zhao W, Kocoglu MH, Barlogie B, et al. Strong correlation between serum *Aspergillus* galactomannan index and outcome of aspergillosis in patients with haematological cancer: clinical and research implications. *Clin Infect Dis.* 2008; 46:1412-1422.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Procedimientos preanalíticos para el diagnóstico de los herpesvirus en los pacientes trasplantados	PNT-MTX-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir los aspectos preanalíticos para el diagnóstico de los herpesvirus en los pacientes trasplantados de órgano sólido y de precursores hematopoyéticos.

Estos procedimientos son aplicables a todos los laboratorios de Virología tanto con fines diagnósticos como pronóstico, y también para el seguimiento del tratamiento, cuando proceda.

Se describen los tipos de muestras, la forma de obtenerlas, transportarlas y conservarlas, así como los sustratos celulares apropiados para los métodos de cultivo.

2. FUNDAMENTO

Todos los virus humanos incluidos en la familia Herpesviridae son capaces de infectar y producir patología en los individuos trasplantados, aunque no todos tienen igual protagonismo desde el punto de vista de la frecuencia y gravedad de las complicaciones clínicas. Los herpesvirus poseen la capacidad biológica de la latencia en distintos tipos celulares. Como consecuencia de ello, muchas de las infecciones en los trasplantados se producen por reactivación de un virus latente, si bien las infecciones primarias suelen ser clínicamente más aparentes y graves. El diagnóstico de laboratorio es de crucial importancia para: a) distinguir entre primoinfección y reactivación, b) diferenciar las infecciones activas no responsables de patología de aquellas que sí lo son (enfermedad), c) ayudar en el pronóstico y en la instauración de medidas preventivas y terapéuticas, y d) monitorizar el tratamiento y vigilar la aparición de resistencias. Dado que no todas las pruebas están indicadas en todas las situaciones, y que en algunas de ellas el proceso diagnóstico de los herpesvirus puede tener una cierta complejidad técnica, los aspectos preanalíticos tienen una importancia capital, por lo que conviene conocerlos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología nº 1 a, 2ª edición. SEIMC. 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
- Manual de instrucciones de las técnicas aplicadas (en su caso)
- Manual de bioseguridad.

4. MUESTRAS

4.1. SEGURIDAD E HIGIENE

- Todas las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, no sólo por lo que se refiere a los herpesvirus, sino también para otros patógenos que pudieran estar presentes en ellas.
- Deben de seguirse las instrucciones contenidas en el manual de bioseguridad.

4.2. INSTRUCCIÓN DE TRABAJO

4.2.1. Volante de solicitud. La solicitud que acompaña a cada muestra debe ser debidamente cumplimentada, y en ella deberá constar la filiación, edad, número de historia, servicio de procedencia, tipo de muestra (de forma muy específica), localización anatómica de la muestra, tratamiento previo y diagnóstico del enfermo, así como el código del clínico que realiza la petición.

4.2.2. Muestras aceptables. Las muestras recomendables en función del tipo de herpesvirus y del proceso clínico se resumen en el anexo 1 de este documento.

4.2.3. Obtención y conservación de las muestras.

- a) Sangre con anticoagulante:
 - 5-10 mL en tubo con EDTA (tapón morado).
 - La sangre heparinizada es aceptable para los métodos de cultivo y de detección de antígenos; no obstante, dado que no está contraindicada para las técnicas moleculares, es preferible uniformizar la muestra sangre-EDTA para todos los propósitos.
 - Se conservará en nevera (2-8°C) durante un máximo de 24-48 h, a partir de las cuales hay que proceder a la separación de fracciones (ver más adelante). Algunas técnicas requieren un procesamiento más rápido.
- b) Médula ósea:
 - Recoger 2 mL de aspirado con anticoagulante (EDTA).
 - Sirven los mismos comentarios que para la sangre.
- c) Suero y plasma:
 - Se obtienen por los métodos habituales de laboratorio (en el caso del plasma, a partir de sangre anticoagulada con EDTA).
 - Se pueden conservar en nevera (2-8°C) durante diferentes períodos, según el fin al que estén destinados: sueros para determinaciones serológicas, hasta 7 días; sueros y plasmas para determinaciones moleculares, 24-48 h.
 - Para períodos de conservación más prolongados, se guardarán congelados a -20°C (sueros para Serología), o -70°C (sueros y plasmas para determinaciones moleculares).
- d) Fracciones celulares sanguíneas:
 - En el diagnóstico de las infecciones por herpesvirus se utilizan las fracciones mononucleares-linfocitarias y los polimorfonucleares, dependiendo del objetivo de cada técnica.
 - Para separar linfocitos y monocitos se suelen utilizar diversos polímeros de distinto peso molecular (Ficoll®, Lymphoprep®, etc.). Deben seguirse los protocolos especificados por el fabricante.
 - En la separación de polimorfonucleares se utilizan los polímeros de dextrano y el Polymorphoprep®, en este caso siguiendo las especificaciones del fabricante.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Procedimientos preanalíticos para el diagnóstico de los herpesvirus en los pacientes trasplantados	PNT-MTX-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

- Una vez separadas las células, deben emplearse inmediatamente para el fin diagnóstico concreto, especialmente si se trata de detección de antígenos virales. Para las técnicas moleculares, es posible conservarlas en nevera 24 h y, para períodos más prolongados, debe recurrirse a la congelación a temperaturas inferiores a -70°C .
- e) Hisopos faríngeos o nasales:
 - Introducir la torunda en medio de transporte de virus previamente a realizar la toma, que ha de hacerse frotando vigorosamente.
 - Las muestras se conservan en nevera ($2-8^{\circ}\text{C}$) durante un máximo de 48 h. Si el tiempo es más prolongado, deben congelarse a -70°C . No se recomienda la congelación en congeladores domésticos (-20°C).
- f) Aspirados nasales:
 - Usando un aparato para recoger moco, insertar un catéter del calibre apropiado en la nasofaringe (a través de fosas nasales). Aplicar succión y al retirar el catéter aplicar la succión intermitentemente. Recoger este aspirado con 5 mL de medio de transporte de virus y transferir el material a un tubo estéril.
 - Si no se dispone de aparato de succión, se puede realizar un lavado nasofaríngeo con agua destilada estéril con ayuda de una jeringa y una cánula, aspirar a continuación el líquido introducido y ponerlo en un tubo estéril.
 - Se conservan en nevera ($2-8^{\circ}\text{C}$) durante 24-48 h. Si se ha de prolongar la conservación, se recomienda disponerlos en alícuotas sobre medio de transporte de virus y congelarlos a -70°C o inferior.
- g) Lavados nasales en niños:
 - Introducir suero salino, agua destilada estéril o medio de transporte de virus a través de una jeringa y una cánula pequeña por la fosa nasal y aspirar a continuación el líquido, introduciéndolo luego en un tubo estéril.
 - Se conservan de forma similar a los aspirados nasales.
- h) Exudados de vesículas:
 - Igual que los exudados faríngeos, se introduce la torunda previamente en el medio y presionando sobre los bordes de la lesión. Si hay una vesícula, debe romperse previamente y aspirar el contenido (suele ser muy rica en viriones completos, por lo que es más adecuada para métodos de cultivo).
 - Si la técnica que se quiere hacer es una detección de antígeno de los virus herpes simple y varicela-zóster, se debe presionar y frotar vigorosamente la base de la lesión con el hisopo.
 - El hisopo se introducirá en un tubo de medio de transporte de virus y se agitará vigorosamente para desprender los restos celulares del material del hisopo.
- Se conservara según lo indicado para otros exudados.
- i) Exudados conjuntivales:
 - Realizar la toma en la conjuntiva inferior, mojando previamente la torunda en suero salino, ponerla a continuación en medio de transporte de virus.
 - Se conservan como otros exudados.
- j) Exudados endocervicales y uretrales:
 - Se deben recoger en medio de transporte de virus, como todos los exudados para cultivo vírico.
 - Se conservan de forma similar.
- k) Exudados rectales:
 - Introducir la torunda (previamente humedecida en el medio de transporte de virus) 4-6 cm en el recto y realizar la toma girándola.
 - Las torundas se introducen en medio de transporte de virus (que contiene antibióticos) y se conservan como el resto de exudados.
- l) Lavado broncoalveolar:
 - Se obtendrá de mediante broncoscopia, según los procedimientos habituales para otros patógenos bacterianos y fúngicos, pero el procesamiento debe ser inmediato.
 - La conservación debe hacerse mediante congelación a temperatura de -70°C o inferior.
- m) Biopsias:
 - Igual que para cultivos bacterianos y fúngicos, pero es necesario procesarlas inmediatamente.
 - Se pueden introducir en suero salino o, si sólo están destinadas al diagnóstico de herpesvirus, mantenerlas en medio de transporte de virus.
 - Las biopsias mantenidas en medio de transporte de virus se pueden conservar en nevera ($2-8^{\circ}\text{C}$) durante 24-48 h. Para períodos más prolongados, se deben congelar a una temperatura inferior a -70°C .
- n) LCR, orinas y heces:
 - Se deben obtener por los métodos comunes a otras áreas del laboratorio de microbiología.
 - La muestra de heces no se recomienda con carácter general para los herpesvirus, reservándose tan sólo para situaciones clínicas especiales.
 - La conservación a largo plazo se hará por congelación a -70°C .
- o) Líquido pericárdico, amniótico y otros líquidos estériles:
 - Se obtendrá 1- 2 mL en un contenedor estéril.
 - Estas muestras se conservarán en nevera a $2-8^{\circ}\text{C}$. La conservación a largo plazo se hará por congelación a -70°C .

5. SUSTRATOS CELULARES Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN APROPIADOS PARA EL CULTIVO DE LOS HERPESVIRUS

En función del tipo de patología producida y la localización de las lesiones el diagnóstico se realizará por métodos distintos.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Procedimientos preanalíticos para el diagnóstico de los herpesvirus en los pacientes trasplantados	PNT-MTX-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

Virus del herpes simple (VHS):

- Los VHS 1 y 2 crecen en varias líneas celulares:
 - Vero, la más utilizada.
 - Fibroblastos MRC-5 y otras línea de celulares de fibroblastos.
 - A549.
 - Hep-2.
- Los cultivos celulares convencionales (en tubo o en frasco) se incuban a 37°C durante 7 días, a la búsqueda del efecto citopático característico, si bien se suelen presentar en las primeras 48 h en el 80% de las ocasiones en que son positivos. El sustrato celular restante es adecuado para la tipificación del virus mediante inmunofluorescencia o por métodos moleculares.
- Para los cultivos celulares en shell-vial se inoculan dos viales, que se incuban durante 24 y 48 h, respectivamente. Si se pretende distinguir entre ambos tipos de VHS, deberá inocularse una pareja de viales para cada uno de ellos.

Virus varicela-zóster (VVZ):

- El VVZ crece en células MRC-5 o en otras líneas de fibroblastos. El cultivo vírico de VVZ es menos sensible que el de VHS por ser un virus más lábil y que permanece menos tiempo viable dentro de las vesículas.
- El cultivo convencional se incubará un mínimo de 10 días y no suele producir efecto citopático, o ser muy poco manifiesto, por lo que el diagnóstico debe hacerse mediante tinción de las células con anticuerpos monoclonales específicos.
- Los cultivos *shell-vial* tardan 2-3 días en crecer y también se diagnostica mediante tinción con anticuerpos monoclonales.

7. ANEXOS

Anexo 1. Muestras adecuadas para el diagnóstico de las infecciones por herpesvirus.

Virus ^a	Situación clínica ^b	Muestras recomendadas ^c
VHS 1 y 2	Herpes orofacial	Ex de vesícula, faríngeo, nasal
	Herpes genital	Ex de vesícula, endocervical, uretral, rectal
	Herpes ocular	Ex conjuntival, lágrimas
	Panadizo herpético	Ex de vesícula
	Infección del SNC	LCR, biopsia
	Infección diseminada	Ex de vesícula, LCR, biopsias, LBA
VVZ	Infección mucoepitelial	Ex de vesícula, faríngeo, LBA
	Infección del SNC	LCR
CMV	Pretrasplante	Suero
	Posttrasplante	Leucocitos, plasma, suero, orina
	Sospecha de infección/enfermedad	Leucocitos, plasma, biopsias, LCR
VHH 6 y 7	Sospecha de infección/enfermedad	Leucocitos, plasma, biopsias, LCR, suero
VEB	ELPT	Leucocitos, plasma, suero
VHH 8	Sarcoma de Kaposi	Leucocitos, plasma, biopsias

^aVHS: virus herpes simple; VVZ: virus varicela-zóster; CMV: citomegalovirus; VEB: virus de Epstein-Barr; VHH: herpesvirus humanos (6, 7 y 8).

^bSNC: sistema nervioso central; ELPT: enfermedad linfoproliferativa posttrasplante.

^cEx: exudado; LCR: líquido cefalorraquídeo; LBA: lavado broncoalveolar.

Citomegalovirus (CMV):

- EL CMV crece en MRC-5 u otras líneas de fibroblastos.
- El cultivo convencional tarda de 7 a 21 días en crecer. Produce un efecto citopático característico con focos de células hinchadas en los que se respeta la monocapa.
- Los cultivos en *shell-vial* tardan 24-48 h en crecer. Se recomienda inocular dos viales por muestra, y revelarlos a las 24 h (diagnóstico rápido) y a las 48 h (diagnóstico de soporte), respectivamente.

Virus de Epstein-Barr y herpesvirus humanos 6, 7 y 8:

- Los métodos de cultivo no se recomiendan como métodos diagnósticos para los trasplantados.

6. RESPONSABILIDADES

Las normas y contenidos de este documento deben ser tenidas en cuenta por todos los miembros del Servicio que realicen los procesos preanalíticos aquí descritos.

- El proceso de obtención de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante, o del laboratorio de microbiología si se realiza en él la toma de la muestra.
- El personal técnico y facultativo de Microbiología deberá atender y aclarar las consultas que se le hagan desde otros servicios en relación con la obtención y transporte de las muestras para el diagnóstico de los herpesvirus.
- La supervisión de todo el proceso y del personal técnico, así como la asesoría clínica son responsabilidad del facultativo a cargo del laboratorio de Virología.