

Validación de la reacción de polimerasa en cadena en tiempo real como herramienta diagnóstica en la aspergilosis asociada a COVID-19 en pacientes hospitalizados en Clínica Dávila de Santiago, Chile, durante los años 2020 y 2021

Validation of real-time PCR as a diagnostic tool in aspergillosis associated with COVID-19 in patients hospitalized at Clínica Dávila at Santiago, Chile, during the years 2020 and 2021

Simone Fellay L.¹, Roberto Pino L.¹, Megan Hardy C.¹ y Cecilia Tapia P.^{2,3}

¹Universidad de Desarrollo.

²Clínica Dávila.

³Laboratorios Clínico Bionet.

Financiamiento: no hubo.

Los autores de esta investigación declaran no tener conflictos de interés.

Recibido: 3 de noviembre de 2022 (segunda versión: 10 de mayo de 2023) / Aceptado: 14 de junio de 2023

Resumen

Introducción: Desde el inicio de la pandemia por COVID-19 se han registrado casos de infecciones de aspergilosis pulmonar asociada a esta infección, la cual tiene características diferentes a la aspergilosis pulmonar clásica y, por lo tanto, han significado un desafío diagnóstico. **Objetivo:** Validar una reacción de polimerasa en cadena (RPC) en tiempo real (sigla en inglés RT-PCR) comercial, como herramienta diagnóstica alternativa a la técnica de galactomanano (GM) en el diagnóstico de aspergilosis pulmonar asociada a COVID-19 (sigla en inglés CAPA). **Pacientes y Método:** Se analizaron resultados de RT-PCR de *Aspergillus* spp y GM en lavado bronco-alveolar (LBA) de 72 pacientes, hospitalizados por COVID-19 de Clínica Dávila entre los años 2020 y 2021. De estos pacientes, 33 presentaron CAPA. **Resultados:** La RT-PCR de *Aspergillus* y GM presentaron una correlación positiva ($r = 0,6351$, valor $p < 0,0001$). La técnica de RT-PCR presentó una sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictor positivo (VPP) y valor predictor negativo (VPN) de 100, 44, 66 y 100%, respectivamente, mientras que en GM fueron de 64, 89, 84 y 73%, respectivamente para LBA. Al utilizar ambas técnicas en combinación se obtuvo una S, E, VPP y VPN de 100, 82, 88 y 100%, respectivamente. **Conclusión:** Este estudio concluyó que usar

Abstract

Background: Since the beginning of the COVID-19 pandemic, there have been cases of pulmonary aspergillosis infections associated with this infection, which has different characteristics from classical pulmonary aspergillosis and therefore, have been diagnostic challenges. **Aim:** To validate a commercial real-time PCR (RT-PCR) method as an alternative diagnostic tool to the galactomannan (GM) technique in the diagnosis of COVID-19-associated pulmonary aspergillosis (CAPA). **Methods:** Results of RT-PCR of *Aspergillus* spp and GM in broncho-alveolar lavage (BAL) of 72 patients hospitalized for COVID-19 at Clínica Dávila between 2020 and 2021 were analyzed. Of these patients, 33 presented CAPA. **Results:** The RT-PCR for *Aspergillus* and GM showed a positive correlation ($r = 0.6351$, $p\text{-value} < 0.0001$). The RT-PCR for *Aspergillus* technique presented a sensitivity (S), specificity (S), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of 100, 44, 66 and 100% respectively, while the GM technique presented 64, 89, 84 and 73%, respectively for BAL. Using both techniques in combination a S, E, PPV and NPV of 100, 82, 88 and 100% were obtained respectively. **Conclusion:** This study concluded that using RT-PCR and GM techniques in combination in BAL improved the performance parameters of both techniques

Correspondencia a:

Cecilia Tapia Paredes

cvtapia@gmail.com

una técnica de RT-PCR de *Aspergillus* y GM en conjunto en LBA mejoraron los parámetros de desempeño de ambas técnicas usadas de manera individual para diagnosticar CAPA. Se requieren más estudios para evaluar el desempeño de técnicas combinadas en otros tipos de aspergilosis.

Palabras clave: COVID-19; aspergilosis; galactomanano; reacción de polimerasa en cadena; infección por coronavirus.

from those used individually to diagnose CAPA. Further studies are required to evaluate the performance of combined techniques in other aspergillosis focus.

Keywords: COVID-19; aspergillosis; galactomannan; real-time polymerase chain reaction; coronavirus infection.

Introducción

La aspergilosis pulmonar es una infección producida por especies de *Aspergillus*. La pandemia que comenzó el año 2020, en Wuhan, China, causada por el virus SARS-CoV-2, incrementó los casos de aspergilosis pulmonar en pacientes hospitalizados a causa de este virus¹⁻³, asociado a un aumento en la letalidad de los pacientes que padecen síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) por COVID-19⁴. La mayoría de los casos notificados de *aspergilosis pulmonar asociada a COVID-19* (sigla en inglés: CAPA) se produjeron en pacientes inmunocompetentes, sin evidencia histológica de enfermedad fúngica invasora, por lo que no podían cumplir las definiciones clásicas de investigación del Consorcio de Educación e Investigación del Grupo de Estudio de la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento de las Micosis Cancerosas (EORTC-MSGERC) para la aspergilosis probable. A raíz de esto, se propuso una definición alternativa, para este cuadro, con la denominación denominada de aspergilosis pulmonar asociada a COVID-19 (CAPA). Uno de los problemas de este cuadro es la dificultad en diferenciar el cuadro de COVID-19 propiamente tal, de aquel producido por *Aspergillus* spp, dado que ambos se manifiestan como neumonía³. Cabe señalar que, en los pacientes con CAPA, el foco es primariamente pulmonar y que, a diferencia de la *aspergilosis pulmonar invasora* (API) en hospederos inmunocomprometidos, tanto la técnica de galactomanano (GM) como la de reacción de polimerasa en cadena-RPC en tiempo real (sigla en inglés: RT-PCR) de *Aspergillus* spp se encuentran positivas principalmente en lavado bronco-alveolar (LBA)^{5,6}.

Las técnicas tradicionales de cultivo e histología para aspergilosis no permiten realizar un diagnóstico rápido y por ello, los biomarcadores han emergido como alternativas diagnósticas oportunas. Dentro de ellas se encuentra el antígeno GM ampliamente estudiado y que se considera criterio diagnóstico reconocido y la RT-PCR para *Aspergillus* spp⁷.

El galactomanano es un polisacárido que se encuentra en la pared celular de los hongos *Aspergillus* spp., es útil como diagnóstico, ya que en infecciones invasoras el hongo inicia una invasión titular liberando este componente de pared celular que puede ser detectado a través de la técnica ELISA, de técnicas inmunocromatográficas^{8,9} y recientemente, técnicas basadas en quimioluminiscencia (CLIA), las dos últimas con algunas experiencias en Chile¹⁰. Sin embargo, presenta algunas limitaciones, como la necesidad de procesar un volumen de muestras óptimo

para mejorar su eficiencia. La RT-PCR para *Aspergillus*, por otra parte, ha emergido en los últimos años como apoyo diagnóstico más rápido, pudiendo realizarse diariamente y, además, permite específicamente detectar hongos de este género¹¹.

En el año 2020 y a raíz del COVID-19 se establecieron criterios de consenso de la Confederación Europea de Micología Médica y de la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal (siglas en inglés, ECOMM/ISHAM) para la investigación y la orientación clínica de CAPA. En este consenso, se hace alusión a la RPC en tiempo real de *Aspergillus* spp en LBA como elemento diagnóstico y establece un punto de corte para diferenciar colonización de infección, basado en el valor de Ct de la RPC⁵.

El objetivo de este trabajo fue validar la RT-PCR como herramienta diagnóstica alternativa y/o complementaria al GM en el diagnóstico de aspergilosis asociada a COVID-19 en pacientes hospitalizados en Clínica Dávila de Santiago, Chile.

Pacientes y Métodos

Se estudiaron 72 pacientes con COVID-19 hospitalizados en Clínica Dávila con solicitud de GM y RPC de *Aspergillus* spp. durante los años 2020 y 2021. De los 72 pacientes, 33 fueron diagnosticados con CAPA probable, en base a los criterios diagnósticos para CAPA².

Para el análisis de los casos, se utilizó la base de datos de Clínica Dávila (Medisyn[®]) y para los análisis estadísticos de los resultados, la aplicación GraphPad Prism[™] versión 9. El estudio fue aprobado por el Comité de Ético-Asistencial de Clínica Dávila.

Para la técnica de GM, se utilizó la técnica de ELISA *sandwich* Platelia[™] *Aspergillus* Ag y para la RT-PCR de *aspergillus* el kit *Aspergillus* spp ELITE MGB[®] Kit que es un ensayo de RPC para la detección y cuantificación de ADN del género *Aspergillus* incluyendo las especies: *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor* y *Aspergillus glaucus*. Ambas técnicas para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

Para el diagnóstico de CAPA, se utilizó el punto de corte de un índice de 1, para el kit Platelia y de > 500 copias/mL para RT-PCR de *Aspergillus*. En un estudio previo en el laboratorio, se estableció este punto de corte en RT-PCR de *Aspergillus* en base a una conversión del valor de Ct < 36, con la ayuda de la empresa proveedora^{5,12}.

Los valores de RT-PCR de *Aspergillus* y GM se ordenaron por tipo de muestra y se analizaron con test de correlación de Spearman. Se

Tabla 1. Datos demográficos y antecedentes mórbidos de los pacientes estudiados con COVID-19

Edades por sexo	Femenino	Masculino
Total	25	47
Mínimo	15	23
Percentil 25%	44,5	44
Mediana	64	56
Percentil 75%	74,5	64
Máximo	88	80
Promedio	59,24	54,43
Rango de edades total	15	88

Antecedentes mórbidos	Frecuencia	%
Hipertensión arterial	36	27,91
Obesidad	22	17,05
Enfermedad pulmonar	20	15,5
Diabetes mellitus	19	14,73
Cáncer	8	6,2
Enfermedad autoinmune	6	4,65
Enfermedad cardíaca	4	3,1
Hipotiroidismo	4	3,1
Receptor de trasplante	3	2,33
Infección por VIH	3	2,33
Sepsis	2	1,55
Infarto miocárdico	1	0,78
Meningitis bacteriana aguda	1	0,78

realizaron unas tablas de contingencia: 1) comparando la positividad de RT-PCR y GM en muestras de LBA 2) comparando la positividad de RT-PCR y GM por separados con el diagnóstico de CAPA y 3) comparando la positividad de RT-PCR y GM en conjunto frente al diagnóstico de CAPA (Tablas 2, 3 y 4, respectivamente). Los resultados se analizaron mediante la prueba de Fisher. Debido a la fisiopatología de CAPA, no se estudiaron muestras de suero pues hubo muy poca solicitud de GM y RT-PCR de *Aspergillus*, en este tipo de muestra y los resultados fueron negativos (datos no mostrados).

Resultados

Las edades de los pacientes estudiados se encontraban entre 15 y 88 años, con una mediana de 64 y 56 años, para mujeres y hombres, respectivamente, observándose un predominio del sexo masculino (Tabla 1). La Tabla 1, muestra, además, los antecedentes mórbidos de los pacientes con COVID-19, hospitalizados en Clínica Dávila.

Dentro de los antecedentes, con mayor frecuencia en los pacientes con COVID-19 se observó la hipertensión arterial con una prevalencia de 27,9%, seguido por la obesidad (17,0%), las enfermedades pulmonares distintas a COVID-19 (15,5%) y diabetes mellitus (14,7%), entre otras (Tabla 1).

Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,6351, que resultó en una correlación positiva significativa (valor $p < 0,0001$) entre las técnicas de GM y RT-PCR de *Aspergillus* spp. en muestras de LBA, indicando que los valores de ambas técnicas se relacionan positivamente (Figura 1).

En los pacientes con CAPA probable, el RT-PCR para *Aspergillus* spp. en muestras de LBA mostró un porcentaje de positividad de 100% (29/29). En cuanto a los pacientes sin aspergilosis, en muestras de LBA, se obtuvo un porcentaje de positividad de 55,6% (15/27). Los parámetros de desempeño de la técnica se muestran en la Tabla 2 (A y B).

Con respecto a la prueba de GM, en muestras de LBA mostró una positividad de 64% (16/25) para pacientes con CAPA probable. Por otro lado, en los pacientes sin CAPA el GM mostró una positividad de 11% (3/27). Los parámetros de desempeño de esta técnica se muestran en la Tabla 3 (A y B).

Cuando el GM y el RT-PCR para *Aspergillus* spp. se analizaron en conjunto en muestras de LBA, se obtuvo una positividad de 100% (15/15) en pacientes con CAPA probable; en cambio, en los pacientes que no tenían esta enfermedad la positividad disminuyó a 12% (2/11). El desempeño analítico de ambas pruebas utilizados en conjunto mejoró respecto a las determinaciones individuales de RPC de *Aspergillus* y GM (Tabla 4, A y B).

Tabla 2. Análisis de contingencia (A) y desempeño analítico (B) de RT-PCR para *Aspergillus* spp. en muestras de LBA

A)		
n	Resultado RT-PCR+	Resultado RT-PCR -
Pacientes con aspergilosis	29	0
Pacientes sin aspergilosis	15	12

B)	
Parámetros	Desempeño (%)
Sensibilidad	100
Especificidad	44
Valor predictor positivo	66
Valor predictor negativo	100

*Valor $p < 0,0001$.

Discusión

El objetivo de este trabajo era conocer el desempeño de la RPC en tiempo real como complemento diagnóstico de laboratorio al GM en pacientes con CAPA; sin embargo, esta investigación demostró, además, a partir de los datos demográficos de los pacientes, que la aspergilosis pulmonar asociada a COVID-19 predominó en hombres (65%, 47/72) por sobre mujeres (35%, 25/72) y la mediana de edad fue de 64 años en mujeres y 56 años en hombres (Tabla 1).

Desde el punto de vista clínico, destaca que la patología de base más frecuente en pacientes con COVID-19 fue la hipertensión arterial, lo cual podría considerarse un factor de riesgo en los pacientes para contraer CAPA. Un estudio realizado en la Universidad de París denominado “Prevalencia de posible aspergilosis pulmonar invasiva en pacientes con COVID-19 muy grave”¹ detectó la hipertensión arterial como el factor de riesgo más frecuente entre los pacientes que tenían API. Además, en otra investigación del Hospital Universitario Pesent en Valencia¹³ se observó la presencia de uno o más factores de riesgo cardiovasculares en 75% de los estudiados, que fueron pacientes internados por COVID-19 y con sospecha de aspergilosis, siendo el más frecuente la hipertensión arterial mientras que 25% de los estudiados no presentaron factores de riesgo cardiovasculares. Esto indica que la hipertensión arterial es un factor de riesgo importante en los casos de hospitalización por COVID-19 que requiere más estudio para comprobar su rol en CAPA.

La solicitud de sueros para GM y/o RT-PCR para *Aspergillus* spp fue poco frecuente en pacientes con CAPA, pues, como se describió previamente, en este cuadro, la infección se concentra en la vía aérea, más que en torrente sanguíneo; por lo tanto, estas muestras no se compararon por su bajo número. A diferencia de la aspergilosis clásica, los pacientes con CAPA, no presentaron neutropenia. La neutropenia favorece la disrupción tisular e invasión vascular de *Aspergillus* spp. donde se libera antígeno GM en el torrente sanguíneo¹¹. Según diversos estudios, un valor de índice de suero mayor o igual a 0,5 se considera positivo con una sensibilidad de hasta 97,4% y especificidad de 90,5% en pacientes neutropénicos y receptores de trasplantes alogénicos. En el caso de los pacientes con neumonía asociada a COVID-19, generalmente se presentan recuentos normales o elevados de leucocitos y neutrofilia¹⁴. En otra investigación de aspergilosis en pacientes en unidades de Cuidados Intensivos (UCI), la especificidad de la detección de GM en suero fue de 42% y la especificidad de la detección de GM en muestra de LBA fue de 87% con una sensibilidad de 87%¹⁵.

Desde el punto analítico, se observó que la RT-PCR presentó mejor sensibilidad clínica y valor predictor nega-

Tabla 3. Análisis de contingencia (A) y desempeño analítico (B) de galactomanano (GM) para *Aspergillus* spp. en muestras de LBA

A)		
n	Resultado de GM+	Resultado de GM -
Pacientes con aspergilosis	16	9
Pacientes sin aspergilosis	3	24

B)	
Parámetros	Desempeño (%)
Sensibilidad	64
Especificidad	89
Valor predictor positivo	84
Valor predictor negativo	73

*Valor p < 0,0001.

Tabla 4. Análisis de contingencia (A) y desempeño analítico (B) de galactomanano (GM) y RPC para *Aspergillus* spp. usados en conjunto en muestras de LBA

A)		
n	Resultado de RT-PCR+ y GM+	Resultado de RT-PCR+ o GM+
Pacientes con aspergilosis	15	26
Pacientes sin aspergilosis	2	12

B)	
Parámetros	Desempeño (%)
Sensibilidad	100
Especificidad	82
Valor predictor positivo	88
Valor predictor negativo	100

*Valor p < 0,0001.

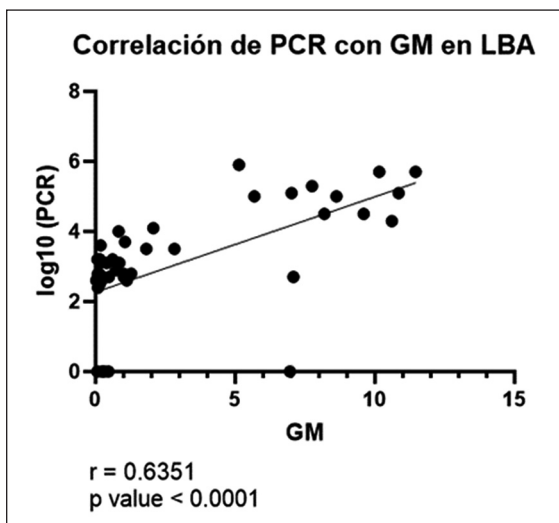


Figura 1. Correlación de RPC de *Aspergillus* spp. con galactomanano (GM) en muestras de lavado broncoalveolar (LBA). La figura representa la correlación del log en base 10 de las copias/mL de RPC (log₁₀ RPC) con el índice de GM en muestras de LBA.

tivo que GM en muestras de LBA (Tabla 2 A y B), mientras que la técnica de GM presentó mejor especificidad clínica y un valor predictor positivo más alto en muestras de LBA (Tabla 3 A y B). Esto se explica porque a diferencia del GM, la RT-PCR es un método de diagnóstico de biología molecular capaz de detectar material genético en concentraciones bajas y con mayor especificidad¹⁶; por ello la RT-PCR puede detectar como positivos a casos de colonización lo cual afecta su especificidad clínica. Por este motivo, las entidades European Confederation of Medical Mycology (ECMM) y la International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), sugieren hacer diagnóstico con dos RPC positivas y con un punto de corte con valor de Ct inferior a 36, indicando una carga fúngica más alta⁵. Esto implica que una RPC positiva tiene mayor probabilidad de detectar CAPA y un resultado negativo de GM tiene mayor capacidad de descartar la enfermedad en comparación con la RPC. En este estudio, se consideró significativa una positividad de la RT-PCR de *Aspergillus*

> 500 copias/mL¹² y un índice de GM de 1.

Con estos resultados, se hizo un análisis de contingencia de ambas técnicas utilizadas en conjunto y se observó que la combinación de técnicas mejora el desempeño general de ambas pruebas (Tabla 4, A y B). Dadas las dificultades diagnósticas de este cuadro y base a estos resultados, frente a casos de CAPA se recomienda solicitar ambos parámetros en combinación para obtener un diagnóstico más sensible y específico y/o para poder confirmar descartar la patología con mayor confiabilidad.

Para investigaciones futuras se sugiere observar el comportamiento de las técnicas utilizando casos probados de *Aspergillus* spp. Además, se podría ampliar el estudio a pacientes con aspergilosis no COVID-19, en UCI o con daño pulmonar crónico.

Agradecimientos. A la Universidad del Desarrollo y a Clínica Dávila, por su soporte institucional para realizar este trabajo que correspondió a una tesis de pregrado.

Referencias bibliográficas

- 1.- Alanio A, Dellièrre S, Fodil S, Bretagne S, Mégarbane B. Prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with COVID-19. *Lancet Respir Med* 2020; 8(6): e48-e49. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30237-X.
- 2.- Lai C C, Yu W L. COVID-19 associated with pulmonary aspergillosis: A literature review. *J Microbiol Immunol Infect* 2021; 54(1) 46-53. doi: 10.1016/j.jmii.2020.09.004.
- 3.- Kariyawasam R M, Dingle T C, Kula B E, Vandermeer B, Sligl W I, Schwartz I S. Defining COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2022; 28(7): 920-7. doi: 10.1016/j.cmi.2022.01.027.
- 4.- Araya-Rojas F, Lasso-Barreto M. COVID-19-associated pulmonary aspergillosis in critically ill patients: experience of a Chilean public hospital. *Rev Chilena Infectol* 2021; 38(6): 754-60. doi: 10.4067/s0716-10182021000600754.
- 5.- Koehler P, Bassetti M, Chakrabarti A, Chen S C A, Colombo A L, Hoenigl M, et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. *Lancet Infect Dis* 2020; 21: e149-e162. doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30847-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30847-1).
- 6.- Vergara-Maestre D A. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis: New consensus criteria for diagnosis. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 2023; 70(3): 178-9. doi: 10.1016/j.redare.2022.01.006.
- 7.- Bouza E, Almirante B, García Rodríguez J, Garnacho-Montero J, Salavert M, Muñoz P, et al. Biomarkers of fungal infection: Expert opinion on the current situation. *Rev Esp Quimioter* 2020; 33(1): 1-10. doi: 10.37201/req/2260.2019.
- 8.- Alvarez E. Utility of *Aspergillus*-LFD: first experience in Chile. *Rev Chilena Infectol* 2015; 32(1): 117-9. doi: 10.4067/S0716-10182015000200022.
- 9.- Delama I, Legarraga P, González T, García P, Rabagliati R. Evaluation of the lateral flow *Aspergillus* assay for the diagnosis of invasive aspergillosis, experience in a university hospital. *Rev Chilena Infectol* 2018; 35(5): 574-9. doi: 10.4067/s0716-10182018000500574.
- 10.- Troncoso C R, Sepúlveda C, Sepúlveda E, Guzmán C, Morales M, Tapia C. Evaluation of the *Aspergillus Galactomannan* Ag VircliaR Monotest test as an alternative to Platelia *Aspergillus* EIA kit. *Rev Chilena Infectol* 2022; 39(3): 248-53. doi: 10.4067/s0716-10182022000200248.
- 11.- Gonzalez-Vicent M, Ramos-Amador J T. Fungal infection in immunocompromised children. *Rev Iberoam Micol* 2021; 38(2): 75-83. doi: 10.1016/j.riam.2021.04.005.
- 12.- Tapia C, Campoa M, Mora I, Morales M. Establecimiento de punto de corte para positividad en LBA en la PCR en tiempo real para *Aspergillus* spp. *Revista Catálogo Expo LAB LATAM*. www.isoglobalsrl.com, 2021: 14-6.
- 13.- Sanchez Martin C, Madrid Martínez E, González Pellicer R, Armero Ibáñez R, Martínez González E, Llau Pitarch J V. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute respiratory syndrome by COVID-19. *Rev Esp Anesthesiol Reanim (Engl Ed)* 2022; 69(1): 48-53. doi: 10.1016/j.redar.2021.02.012.
- 14.- Del Carpio-Orantes L, García Méndez S, Contreras-Sánchez E R, González Segovia O, Ahumada-Zamudio A, Velasco-Caicero A R, et al. Clinical and hemogram characterization of patients with pneumonia due to COVID-19 in Veracruz, México. *Rev Hematol* 2020; 21(4): 205-9. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=97013>.
- 15.- Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177(1): 27-34. doi: 10.1164/rccm.200704-606OC.
- 16.- Kidd S E, Chen S C, Meyer W, Halliday C L. A new age in molecular diagnostics for invasive fungal disease: are we ready? *Front Microbiol* 2020; 10: 2903. doi: 10.3389/fmicb.2019.02903.