



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES  
RESPIRATORIAS  
“ISMAEL COSÍO VILLEGAS”**

**DETECCIÓN RÁPIDA DE ASPERGILLUS MEDIANTE PCR EN  
COMPARACIÓN CON DEFINICIONES COMPUESTAS DE  
ENFERMEDADES FÚNGICAS INVASIVAS DEL EORTC/MSG  
EN PACIENTES ATENDIDOS EN EL INER**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**ESPECIALISTA EN NEUMOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**DR. RAMÓN ALEJANDRO AVILEZ FÉLIX**

**TUTOR:**

**DR. EDUARDO BECERRIL VARGAS**



**CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**SECRETARÍA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"  
DIRECCION DE ENSEÑANZA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

---

**DR. JUAN CARLOS VAZQUEZ GARCIA**  
Director Del Departamento De Enseñanza  
Profesor Titular De La Especialidad De Neumología

---

**DRA. DAYANNA LORELLY ALVAREZ MONTER**  
Jefa Del Departamento De Formación De Posgrado

---

**DR. EDUARDO BECERRIL VARGAS**  
Servicio De Microbiología Clínica  
Tutor De Tesis De Posgrado

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres, hermanos y familia por su constante apoyo en el largo proceso de formación como médico y especialista. Gracias por estar ahí en los logros y en los momentos difíciles.

Así mismo, agradezco a mi tutor el Dr. Eduardo Becerril Vargas, por su apoyo y tutoría en la elaboración de esta tesis.

Por último agradezco a todos mis profesores, compañeros y amigos que me acompañaron a lo largo de a carrera. Les deseo el mejor de los éxitos a cada uno de ellos en el camino emprendan.

## CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>15</b>
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
General .....	<b>18</b>
Específicos .....	<b>18</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>18</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>30</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>31</b>

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades fúngicas invasivas (EFI) afectan habitualmente a tejidos, órganos y a líquidos orgánicos estériles. Pueden agruparse en dos categorías clínico-micológicas: las EFI oportunistas y las EFI endémicas. Aunque la lista de microorganismos patógenos causales de EFI oportunista aumenta día a día, *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jiroveci* y *Aspergillus spp.*, son los patógenos más frecuentemente implicados.

Además de las principales causas de EFI oportunistas, otros patógenos emergentes se aíslan cada vez con más frecuencia, bien sean hongos levaduriformes (*Trichosporon spp.*, *Sacharomyces spp.*, *Rhodotorula spp.*), hongos hialinos (*Fusarium spp.*, *Acremonium spp.*, *Scedosporium spp.*), hongos dematiáceos (*Alternaria spp.*, *Bipolaris spp.*, *Curvularia spp.*, *Cladophialophora spp.*, *Exophiala spp.* o *Exserohilum spp.*) o zigomicetos (*Rhizopus spp.*, *Mucor spp.*, *Rhizomucor spp.*, *Absidia spp.* o *Cunninghamella spp.*).

La distribución de los agentes patógenos causantes de EFI oportunista varía en función de las condiciones previas de los pacientes y de la unidad de hospitalización, tal y como se ha observado en un reciente estudio multicéntrico en el que han participado 23 hospitales americanos [35]. En este estudio, las infecciones por *Candida spp.* fueron las más frecuentes en la mayoría de unidades de hospitalización y en los distintos tipos de pacientes; tan solo las EFI causadas por *Aspergillus spp.* (50,7%) fueron mayoritarias en receptores de trasplante de células hematopoyéticas y las de *Cryptococcus spp.* (48,7%) en pacientes infectados por VIH. Pero como refleja este estudio, y la mayoría de los publicados hasta la fecha, la infección sistémica por *Candida spp.*, con o sin candidemia asociada, es la EFI más frecuente en todas las latitudes geográficas, seguido por *Aspergillus spp.* que causa desde enfermedades fúngicas leves hasta enfermedades invasivas graves con una alta mortalidad.

### ***Aspergilosis invasiva***

La aspergilosis invasiva (AI) es una enfermedad fúngica grave causada por *Aspergillus spp.*, que ha ido en aumento en los últimos años, su incidencia es cada vez más frecuente en pacientes con enfermedades críticas que se encuentran hospitalizados en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) sobre todo en su presentación de aspergilosis pulmonar invasiva. Existen más de 200 especies de *Aspergillus*, la mayor parte de las infecciones son producidas por *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger*. La frecuencia de una especie sobre otra depende de distintos factores pudiendo variar en diferentes centros hospitalarios, aunque *A. fumigatus* es el más frecuentemente identificado.

La AI puede afectar a cualquier órgano; sin embargo, como el mecanismo más frecuente de adquisición de la infección es inhalatorio, lo más frecuente es la aspergilosis pulmonar invasiva (API), seguido de rinosinusal. Menos usual es el compromiso cerebral e infrecuentes son la enfermedad gastrointestinal, cutánea, cardíaca, ocular y osteo-articular. En general, la vía cutánea está asociada a uso de catéteres o contacto prolongado con material adhesivo o quemaduras. Las otras localizaciones mencionadas pueden presentarse en el contexto de una infección diseminada por vía hematógena, exposición ambiental o durante procedimientos por contaminación de insumos o dispositivos.

Los factores de riesgo para AI (*Tabla 1*) en pacientes en la UCI incluyen alta dosis de corticoesteroides, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad hepática, malnutrición, quemaduras y diabetes [1-3]. Además se ha reportado asociación con pacientes internados en la UCI por insuficiencia respiratoria secundaria a neumonía viral por influenza y SARS-CoV-2 [1-3].

En las últimas décadas, la población de pacientes susceptibles a desarrollar AI se ha expandido significativamente y se reconoce cada vez más como una enfermedad emergente en pacientes no neutropénicos con una incidencia que varía entre 0,33 y 5,8% [3]. En este grupo de pacientes, el diagnóstico de AI puede ser un desafío

debido a la falta de especificidad de los síntomas, la dificultad para discriminar la colonización de la infección, y la menor sensibilidad de las pruebas microbiológicas y radiológicas en comparación con los pacientes inmunocomprometidos.

La aspergilosis pulmonar invasiva puede cursar con una sintomatología inespecífica. La clásica triada descrita en pacientes neutropénicos asocia: fiebre, dolor pleurítico y hemoptisis. No obstante, en cualquier paciente con factores de riesgo la presencia de síntomas respiratorios junto a la presencia de nódulos o infiltrados pulmonares deben hacer pensar en una aspergilosis pulmonar. La radiografía de tórax no es específica, pero la tomografía computarizada (TC) puede mostrar lesiones focales características. La aspergilosis pulmonar suele presentar uno o múltiples nódulos, con o sin cavitación, con consolidación segmentaria o infiltrado peribronquial o derrame pleural en raras ocasiones. Al igual que las manifestaciones clínicas, los hallazgos radiológicos dependen de las características del huésped.

La presentación clínica inespecífica y dificultades técnicas de los métodos diagnósticos, conllevan un desafío en su diagnóstico, con un consecuente retraso en el inicio del tratamiento, lo que explica su elevada mortalidad [1–3].

La aspergilosis invasiva en pacientes no neutropénicos se asocia con mal pronóstico, con tasas de mortalidad superiores al 80%, principalmente debido al diagnóstico tardío [3].

Si bien las biopsias transbronquiales se consideran seguras en pacientes no inmunodeprimidos con un sistema de coagulación normal [5,6], las disminuciones en la función o el número de plaquetas están relacionadas con un aumento considerable del sangrado parenquimatoso periintervencionista [7]. La biopsia quirúrgica permite detectar de forma fiable la EFI pulmonar en un enfoque diagnóstico y terapéutico [8,9]. Sin embargo, ambos procedimientos requieren médicos e instituciones especializadas y con experiencia. Por tanto, el desarrollo de



un método fiable y sensible para confirmar la presencia de aspergilosis pulmonar invasiva representaría un avance deseable para el tratamiento adecuado de los pacientes de riesgo [4].

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de *Aspergillus* en sangre y muestras de LBA se ha aceptado recientemente como un criterio micológico para AI probable en guías de consenso [10]. La base para su inclusión fue el progreso significativo que se ha logrado en la estandarización de la metodología, la disponibilidad de ensayos comerciales y una mayor confianza en el rendimiento, como se destaca en una revisión Cochrane, varios metanálisis y ensayos controlados aleatorios que incorporan esta tecnología [12–18].

La mayoría de la información y ensayos clínicos reportados en la literatura médica relacionados con métodos de diagnóstico indirectos para enfermedad invasiva por *Aspergillus* se han generado en poblaciones de pacientes inmunocomprometidos, principalmente en pacientes neutropénicos, con trasplante de células hematopoyéticas y enfermedades hematológicas malignas. Por lo tanto, la evidencia del rendimiento diagnóstico de PCR para *Aspergillus* en pacientes no neutropénicos, con factores de riesgo no típicos, como lo son los pacientes que son atendidos en nuestro hospital de tercer nivel es limitada, sin embargo, la necesidad de dicha evidencia es cada vez mayor, con una frecuencia de AI en aumento, sobre todo en el entorno de cuidados intensivos [19, 20].

En nuestro hospital, que es un centro de referencia para enfermedades respiratorias en la Ciudad de México, hay una alta incidencia de pacientes críticos en la Unidad de Cuidados Intensivos y un elevado número de casos posibles y probables de AI, por lo que es de gran interés conocer el rendimiento diagnóstico de pruebas indirectas como la PCR para *Aspergillus* en nuestro medio.

#### FACTORES DE RIESGO ALTO

- Neutropenia (< 500 neutrófilos/mm<sup>3</sup>)
- Enfermedad hematológica maligna (trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos)
- Receptores de trasplante de órgano sólido (hepático y pulmonar)

#### FACTORES RIESGO INTERMEDIO

- Tratamiento con corticoides
- EPOC
- Hepatopatía crónica
- VIH
- Enfermedades autoinmunes (fármacos inmunosupresores)

#### FACTORES RIESGO BAJO

- Estancia prolongada en UCI (>21 días)
- Quemados
- Trasplante hepático
- Tratamiento esteroide (<7 días)
- Desnutrición
- Disfunción multiorgánica
- Neumonía viral grave (AH1N1/COVID 19).

Tabla 1. Factores de riesgo para Aspergilosis Invasiva

## ANTECEDENTES

Desde un punto de vista clínico, el término aspergilosis incluye enfermedades de diferente patogenia, como son la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), las formas pulmonares crónicas no invasivas o semi-invasivas, las formas invasivas de la vía aérea, las formas cutáneas y las formas extrapulmonares y/o diseminadas. Todas ellas producidas por diferentes especies de *Aspergillus*, mayoritariamente *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. terreus*. *Aspergillus* es ubicuo en la naturaleza y la inhalación de conidias es un fenómeno habitual. Sin embargo, la invasión tisular es infrecuente y ocurre fundamentalmente en pacientes neutropénicos o sometidos a algún grado de inmunosupresión celular. La mortalidad de las formas invasivas depende de la forma clínica y el tipo de huésped, pero suele ser superior al 50%.

## **Formas clínicas**

### *Aspergilosis broncopulmonar alérgica*

La sintomatología clínica de la ABPA conlleva episodios recurrentes de obstrucción bronquial en pacientes asmáticos, con fiebre, malestar, expectoración de moldes mucosos oscuros, eosinofilia y en ocasiones hemoptisis. Los hallazgos radiológicos suelen mostrar infiltrados parenquimatosos (habitualmente en lóbulos superiores), atelectasias por impacto mucoso y signos característicos de bronquiectasias. Los pacientes muestran signos de obstrucción de la vía aérea, con atrapamiento aéreo y disminución de FEV1 e incremento del volumen residual.

### *Aspergilosis pulmonar crónica*

La aspergilosis pulmonar crónica incluye varios cuadros clínicos, como el aspergiloma, la aspergilosis crónica cavitada, la aspergilosis crónica fibrosante y la aspergilosis crónica necrotizante. La duración de los síntomas en estos cuadros es, a diferencia de la aspergilosis pulmonar aguda, superior a tres meses. Suelen afectar a pacientes inmunocompetentes o con inmunosupresión débil, por lo que es bastante característico que presentan en suero precipitinas positivas frente a *Aspergillus* spp., a diferencia de los pacientes con aspergilosis invasiva, severamente inmunodeprimidos. El aspergiloma es una pelota fúngica compuesta por hifas, fibrina, moco y detritus celulares que anidan o colonizan una cavidad pulmonar previa. La aspergilosis crónica cavitada afecta a pacientes inmunocompetentes que desarrollan una o más cavidades durante varios meses, habitualmente en lóbulos superiores y si progresan pueden llegar a desarrollar formas crónicas fibrosantes. Estas formas clínicas de aspergilosis se suelen observar en pacientes con tuberculosis, ABPA, cáncer de pulmón resuelto, neumotórax con formación de bullas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y sarcoidosis fibro-cavitada. La aspergilosis crónica necrotizante suele afectar a pacientes con algún grado de compromiso inmunológico, como diabetes, alcoholismo, corticoterapia y algunos pacientes con SIDA.

### *Aspergilosis invasiva*

Las formas clínicas locales más frecuentes de aspergilosis invasiva (AI) tienen lugar a nivel pulmonar y en los senos paranasales, aunque también pueden afectar al tracto gastrointestinal o a la piel, por inoculación directa.

La aspergilosis pulmonar invasiva puede cursar con una sintomatología inespecífica. La clásica triada descrita en pacientes neutropénicos asocia: fiebre, dolor pleurítico y hemoptisis. No obstante, en cualquier paciente con factores de riesgo presencia de síntomas respiratorios junto a la presencia de nódulos o lesiones pulmonares deben hacer pensar en una aspergilosis pulmonar. La radiografía de tórax no es específica, pero la tomografía computarizada (TC) puede mostrar lesiones focales características. La aspergilosis pulmonar suele presentar uno o múltiples nódulos, con o sin cavitación, con consolidación segmentaria o infiltrado peribronquial o derrame pleural. Al igual que las manifestaciones clínicas, los hallazgos radiológicos dependen de las características del huésped. La progresión radiológica en la aspergilosis pulmonar ha sido más estudiada en pacientes neutropénicos. En estos pacientes, los hallazgos iniciales suelen incluir nódulos con un contorno atenuado a su alrededor (signo del halo), que refleja hemorragia y edema circundante a la lesión. Con el tratamiento y evolución favorable estos nódulos aumentan, pueden necrosarse en su parte central, lo cual hace disminuir su densidad y favorecer el atrapamiento aéreo (signo del menisco aéreo o media luna).

### **Métodos diagnósticos**

Ante un paciente con factores de riesgo para enfermedad fúngica invasiva y presencia de lesiones pulmonares por estudios de imagen con sospecha de aspergilosis pulmonar invasiva, se recomienda obtener una muestra respiratoria, ya sea de: lavado bronquiolo alveolar, aspirado traqueal, esputo inducido o biopsia pulmonar. Actualmente contamos con estudios de micología directos e indirectos para analizar estas muestras.

### *Estudios de micología directos*

El cultivo de hongos en agar Sabouraud se realiza en muestras de LBA, aspirado bronquial y biopsia, este tiene una sensibilidad reportada que varía desde el 11 al 80% en pacientes neutropénicos (depende de tipo de muestra, enfermedad base y momento del diagnóstico), sin embargo, en pacientes críticos hospitalizados en UCI, se ha reportado una sensibilidad < 30% con técnicas estándar. Tiene algunas desventajas como lo son la duración del tiempo de incubación que usualmente es de 3 días, no siempre es posible tomar muestras (LBA/biopsias), no es útil para excluir infección.

La microscopía directa consiste en la observación de hifas septadas hialinas en las muestras obtenidas, tiene una sensibilidad del 10%, utiliza tinciones como: yoduro de potasio, Gomori-Grocott, hematoxilina eosina, ácido peryódico de Schiff (PAS), así como la microscopía fluorescente.

### *Estudios de micología indirectos*

El galactomanano en LBA y sérico, esta disponible desde hace más de 25 años, consiste en un ensayo de inmunoabsorción de antígenos ligado a enzimas (ELISA), se ha reportado una sensibilidad y especificidad de GM ELISA de un 80-90% para AI. La aspiración traqueal en UCI no ha sido bien estudiada. Los valores para positividad dependen de la muestra obtenida, en LBA es > 0.7 (Sensibilidad >80%) y en sangre > 0.5 (Sensibilidad 82%/Especificidad 81%). Sus desventajas es la posibilidad de falsos positivos por: *Penicillium*, *Alternaria*, *Histoplasma*, uso de piperacilina/tazobactam por más de 5 días, consumo de productos lácteos o cereales con galactofuranosa. Respecto a los falsos negativos, se han reportado por la presencia de enfermedad granulomatosa crónica, aspergilosis localizadas (traqueobronquitis), profilaxis/uso empírico de antifungicos activos.

Otro método disponible actualmente es la PCR para *Aspergillus*, el cual se utiliza principalmente para confirmar el diagnóstico en pacientes con sospecha o de AI o

para evaluar a las personas con factores de riesgo, con el fin de facilitar el diagnóstico temprano.

Las estrategias de detección se aplican mejor en pacientes con riesgo moderado a alto de IA ya que la probabilidad pre prueba determina qué tan bien funciona la prueba. Sin embargo, dada la creciente incidencia de AI en ciertas cohortes de unidades de cuidados intensivos (19 % en pacientes posterior a influenza y 33 % en pacientes posterior a COVID-19), las estrategias de detección son de alta prioridad [21, 22]. Usando una PCR comercial de *Aspergillus*, la sensibilidad fue del 100% y la especificidad fue del 99% al 100% en LBA de pacientes de la UCI [23, 24].

Chong y sus colegas demostraron que el rendimiento del ensayo Pathonostics AsperGenius en muestras de LBA fue idéntico para las poblaciones de cuidados críticos y hematológicos, generando una sensibilidad y especificidad del 80 % y el 91 %, respectivamente, para la población de la UCI [25].

**PCR en muestra de LBA vs PCR sérico.** Las muestras del sitio de infección confieren ciertas ventajas sobre las muestras séricas en cuanto a la confirmación de AI en pacientes con sospecha de la enfermedad. En un estudio multicéntrico retrospectivo que comparó PCR en muestras de LBA vs PCR sérico tomadas al mismo tiempo, la sensibilidad de la PCR fue significativamente mayor en LBA (63 %) que en sangre (8 %). Además, aunque el 75% de las muestras se tomaron durante la terapia antimicótica, esto no tuvo un impacto importante en el rendimiento de LBA [26].

El rendimiento metaanalítico de la prueba PCR en muestra de LBA es comparable al de GM con sensibilidades y especificidades comparables que van desde 76,8 a 79,65 y 93,7 a 94,5, respectivamente [27, 28, 29].

**Combinación de PCR y detección de antígenos.** Es probable que el uso óptimo de la prueba PCR sea en combinación con la detección de antígenos [26]. En un

estudio que utilizó muestras de LBA, la combinación de PCR con GM ( $I > 1.0$ ) generó una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 98 % [27]. Este enfoque se confirmó mediante el ensayo comercial Pathonostics AsperGenius, en el que la PCR combinada con GM ( $I > 1.0$ ) generó una sensibilidad del 96 % y una especificidad del 100 % [28]. Estos hallazgos proporcionan cierta validación clínica de una estrategia combinada de uso de PCR comerciales y ensayos de antígenos.

Un metanálisis de pruebas de antígeno/PCR de LBA generó una sensibilidad y especificidad del 84 % y el 94 %. Si bien las pruebas combinadas de LBA aumentaron la sensibilidad entre un 5 % y un 9 %, la especificidad siguió siendo suficiente para confirmar la AI (razón de probabilidad positiva, 14) [29]. Varios ensayos controlados aleatorios y estudios prospectivos de cohortes han destacado el beneficio de las pruebas combinadas de antígeno/PCR en sangre para el tratamiento de la AI [30, 31, 32, 33].

Un metanálisis confirmó que si ambos eran negativos de forma constante, la sensibilidad (99 %) sería suficiente para excluir la AI, mientras que la especificidad cuando ambos ensayos eran positivos era del 98 % [34]. La especificidad lograda a través de pruebas combinadas de prueba de PCR sérica y LBA puede aumentar la certeza de un caso de AI probable cuando ambas pruebas son positivas. Por el contrario, si ambas pruebas son negativas, la enfermedad puede excluirse con confianza, lo cual es fundamental al momento de tomar decisiones respecto al inicio o suspensión del tratamiento.

Debido a las limitaciones y desafíos para el diagnóstico de Aspergilosis Invasiva, la *European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education (EORTC/MSG)* ha desarrollado criterios diagnósticos para clasificar las Enfermedades Fúngicas Invasivas tomando en cuenta factores de riesgo (tabla 2), hallazgos clínicos (tabla 3) y evidencia micológica (tabla 4) en posible, probable y probada (tabla 5).

<b>Factores del hospedero</b>	Neutropenia (< 500 cels/mm <sup>3</sup> ) > 10 días
<b>(Al menos 1)</b>	Receptor de trasplante de células hematopoyéticas / Cáncer hematológico
	Corticoesteroides (más de 20 mg de prednisona o equivalente) por más de tres semanas
	Anormalidad crónica de las vías respiratorias (EPOC, Bronquiectasias)
	Cirrosis descompensada
	Uso de inmunosupresores
	Trasplante de órgano sólido
	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
	Neumonía viral grave (Influenza, COVID 19)

Tabla 2. Factores de riesgo para Aspergilosis Invasiva en pacientes críticos.

<b>Clínicos/ Radiológicos</b>	Aspergilosis pulmonar: Nódulos con/sin halo, aire creciente o cavidad, consolidación (cuña, lobar, segmentaria)
<b>(Al menos 1)</b>	Rinosinusitis
	Infección de sistema nervioso central
	Traqueobronquitis (ulceración, pseudomembranas)

Tabla 3. Hallazgos clínico radiológicos sugerentes de Aspergilosis Invasiva

<b>Criterios micológicos</b>	Directos: citología, microscopía y/o cultivo <i>Aspergillus</i> en muestra del tracto respiratorio inferior
	Indirectos: Galactomanano sérico >0.5 y/o galactomanano LBA >0.7

Tabla 4. Criterios micológicos para Aspergilosis Pulmonar Invasiva. LBA = Lavado bronquioloalveolar

<b>Posible</b>	Factores del hospedero + criterios clínicos
<b>Probable</b>	Factores del hospedero + criterios clínicos + micológicos
<b>Probada</b>	<i>Aspergillus</i> en cultivos de cavidad estéril o sangre o estudio histológico que demuestre invasión fúngica

Tabla 5. Definición de infección fúngica invasiva según European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education (EORTC/MSG).



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La aspergilosis pulmonar invasiva (API) es una enfermedad grave, con una alta tasa de mortalidad y una incidencia al alza, esto debido al aumento de pacientes críticos que requieren manejo en la UCI, por lo tanto, la mortalidad asociada a esta enfermedad fúngica ha ido también en aumento, con reportes que van desde el 30% hasta el 80% de mortalidad en los casos en los que no se inicia un tratamiento oportuno.

Además de la morbimortalidad asociada a la API, esta conlleva un alto costo hospitalario, con costos reportados en 2000 y 2006 de hasta \$52 803 dolares en los EE.UU. [2]. Por lo anterior, es de gran importancia diagnosticar la API de manera rápida, precisa y de una manera no invasiva.

Nuestro hospital se enfoca a la atención de enfermedades respiratorias y enfermos críticos, atendemos a pacientes con factores de riesgo como: EPOC, asma, uso crónico de esteroides (asociado sobre todo a enfermedades reumatológicas), VIH, estancia prolongada en la UCI, desnutrición y neumonías virales por COVID-19. Lo anterior es de relevancia, ya que estos pacientes, en su mayoría inmunocompetentes, cursan con una presentación clínica y radiológica menos específica que los pacientes inmunocomprometidos reportados en la literatura, además, la biopsia es difícil de realizar debido a los posibles efectos adversos, es difícil discriminar entre infección y colonización, y por último, la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores para el diagnóstico de API es muy variable, especialmente en los pacientes de UCI no neutropénicos. Esto puede retrasar el diagnóstico preciso, llevar al diagnóstico erróneo de neumonía bacteriana o incluso de enfermedades no infecciosas.

Actualmente, el gold standard para el diagnóstico de la aspergilosis pulmonar invasiva sigue siendo el examen directo o el cultivo del tejido pulmonar obtenido mediante biopsia transbronquial o pulmonar abierta. Desafortunadamente, estos procedimientos pueden estar asociados con una morbilidad y mortalidad en

pacientes críticos. Actualmente, con el desarrollo de las tecnologías de detección, las metodologías no basadas en el cultivo se utilizan ampliamente en el diagnóstico de la API, dada la ventaja de ser menos invasivas que la toma de biopsia.

El rendimiento de la de PCR en LBA/sérico es prometedor, pero la experiencia comparativa/combinada con otras pruebas y contra referencias confiables en pacientes atendidos en UCI aún es limitada.

A pesar de los beneficios y el alto rendimiento reportado en la literatura, su estandarización en los diferentes laboratorios de infectología, así como la variedad de PCR en el mercado han dificultado su inclusión como método diagnóstico para AI en nuestro hospital.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la sensibilidad y especificidad de la PCR para la detección de *Aspergillus* en pacientes atendidos en el INER con sospecha de Aspergilosis Invasiva?

## **JUSTIFICACIÓN**

El diagnóstico de AI en nuestro medio es complicado por distintas razones. El principal motivo es la dificultad para obtener biopsias en pacientes críticos debido a la presencia de inestabilidad hemodinámica, trombocitopenia o alteraciones de la coagulación que usualmente presenta esta población de pacientes. Además, el rendimiento de los cultivos es frecuentemente subóptimo en términos de sensibilidad. Otras consideraciones que hacen difícil del diagnóstico de AI: (1) los signos radiográficos clásicos de AI están generalmente ausentes en poblaciones que no tienen los factores de riesgo habituales; (2) es complicado obtener tomografía computarizada (TC) debido a la dificultad del traslado de pacientes críticos; (3) discriminar entre colonización e infección de *Aspergillus* es difícil.

Tomando en cuenta estas consideraciones, el diagnóstico de AI es con frecuencia presuntivo; siendo de gran interés el uso de pruebas diagnósticas indirectas para mejorar la precisión diagnóstica en lo posible.

Es importante diagnosticar API de manera rápida, precisa y de una manera no invasiva, lo cual es posible mediante el uso de pruebas de micología indirectas como PCR para *Aspergillus*, que ha demostrado en estudios previos grandes ventajas, pero la experiencia comparativa/combinada con otras pruebas y contra referencias confiables en pacientes atendidos en UCI aún es limitada.

Es necesario evaluar el rendimiento diagnóstico de la PCR para *Aspergillus* en nuestro medio, con el objetivo de lograr un diagnóstico oportuno para iniciar un tratamiento dirigido de manera temprana y así disminuir la morbimortalidad que causa esta enfermedad, así como evitar un tratamiento antimicótico innecesario, que a menudo se acompaña de efectos secundarios, riesgo acumulativo de resistencia y altos costos hospitalarios.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Comparar el rendimiento diagnóstico de la PCR para la detección *Aspergillus* con las definiciones diagnósticas de la EORTC/MSG en pacientes con sospecha clínica de aspergilosis invasiva en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

### **Específicos**

1. Identificar la sensibilidad y especificidad de la PCR para la detección de Aspergilosis Invasiva posible.
2. Identificar la sensibilidad y especificidad de la PCR para la detección de Aspergilosis Invasiva probable.
3. Identificar la sensibilidad y especificidad de la PCR para la detección de Aspergilosis Invasiva probada.

## **HIPÓTESIS**

La sensibilidad de la PCR para la detección de *Aspergillus* será mayor del 80% comparado con las definiciones clínicas de la EORTC/MSG para el diagnóstico de aspergilosis invasiva.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño**

**Tipo de investigación:** Investigación clínica

**Tipo de estudio:** Estudio de prueba diagnóstica.

**Lugar del estudio:** Servicio de Microbiología Clínica, Instituto Nacional de Enfermedades respiratorias.

## **POBLACIÓN DE ESTUDIO**

### **Criterios de inclusión**

- Se incluirán todas las muestras de lavado bronquiolo-alveolar o aspirado bronquial que fueron enviadas al laboratorio clínico de enero de 2021 a Julio del 2022 y a las que se les solicito una prueba de cultivo para hongos y un estudios de galactomanano.

- Muestras de paciente que tenían un expediente clínico completo en el INER

### **Descripción de la población de estudio**

Pacientes con sospecha de aspergilosis invasiva hospitalizados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) durante el periodo de Enero del 2021 a Julio del 2022.

### **Procedimiento del estudio**

Se incluyeron resultados de las muestras de aspirados y lavados bronquiolo-alveolares procesadas en el laboratorio de microbiología clínica del INER, de pacientes a los cuales se les solicitó cultivo y galactomanano. Se realizó de manera retrospectiva la búsqueda de los datos demográficos y clínicos, datos con los cuales se realizó la clasificación de los pacientes en aspergilosis posible, probada y probable.

Al remanente de muestra del LBA o aspirado bronquial, se sometió a un proceso de purificación de ácidos nucleicos y posteriormente, se le realizó el PCR con base a las especificaciones del fabricante.

El kit utilizado fue el Aspergillus spp. ELITE MGB® comercializado por la empresa ELITech Group, la cual es una prueba para amplificación cuantitativa y cualitativa de ácidos nucleicos para la detección y cuantificación de DNA de especies de Aspergillus. Este kit en conjunto con el instrumento ELITE InGenius identifica el gen rDNA 18S de Aspergillus spp. en muestras de sangre y LBA.

Para la extracción manual de ADN de las muestras que van a analizarse, se ha validado el uso de los siguientes productos genéricos: «EXTRAblood prelysis» (ELITechGroup S.p.A., código EXTB02), reactivos para el pretratamiento de muestras para la extracción de ADN de bacterias, hongos y otras células y «EXTRAblood» (ELITechGroup S.p.A., código EXTB01), un kit para la extracción de ADN de muestras celulares y no celulares.

El ensayo consiste en la realización de una reacción de amplificación en tiempo real en una microplaca con un termostato programable que se suministra con un sistema óptico de detección de fluorescencia (termociclador de amplificación en tiempo real). En cada pocillo, se realizan dos reacciones de amplificación, comenzando con el ADN extraído de las muestras que van a analizarse: una reacción específica de la región del gen de ADN ribosómico 18S de *Aspergillus* spp. (presente en múltiples copias del genoma del hongo) y una reacción específica de la región del gen de la beta-globina humana (control interno de inhibición). La sonda específica de *Aspergillus* spp. con la tecnología ELITe MGB®, marcada con el fluoróforo FAM, se activa cuando se hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación de *Aspergillus* spp. La sonda específica del control interno con la tecnología ELITe MGB®, marcada con el fluoróforo AP525 (análogo al VIC), se activa cuando se hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación del control interno. A medida que aumenta el producto específico de la reacción de amplificación, la emisión de fluorescencia también aumenta y el instrumento la mide y la registra. El procesamiento de los datos permite detectar la presencia y el título de ADN de *Aspergillus* spp. en la muestra inicial.

#### Variables

Se realizó una búsqueda en el expediente clínico identificando las siguientes variables: edad, sexo, presencia de factores de riesgo para aspergilosis invasiva, criterios clínicos, diagnóstico clínico, tipo de muestra (aspirado bronquial/LBA), resultado de galactomanano (OD), resultado cultivo de hongos, número de copias en el qPCR, presencia de fiebre, cambios radiográficos, estudios de laboratorio (hemoglobina, leucocitos totales, neutrófilos totales, creatinina, procalcitonina, plaquetas). Posteriormente se clasificó a los pacientes con la definición clínica de la EORT/MSG de Enfermedad Fúngica Invasora posible, probable y probada.

## Cálculo del tamaño de muestra

Para el cálculo de tamaño de muestra se realizó con la fórmula para comparar la sensibilidad entre dos pruebas diagnósticas:

$$n = \frac{\left\{ Z\alpha\sqrt{(1+C)\bar{\Pi}(1-\bar{\Pi})} + Z\beta\sqrt{(Cp_1q_1 + p_2q_2)} \right\}^2}{(C)IC^2}$$

En donde:

- $Z\alpha$  (desviación normal estandarizada para el nivel establecido) = 1.64
- $Z\beta$  (desviación normal estandarizada para el nivel establecido) = 0.84
- $C$  = Relación entre los componentes de ambos grupos = 1:1
- $\bar{\Pi}$  ( $p_1+p_2/2$ ) =  $0.80 + 0.90 / 2 = 0.85$
- $p_1$  (sensibilidad del grupo 1) = 0.80,  $q_1 = 1 - 0.80 = 0.20$ .
- $p_2$  (sensibilidad del grupo 2) = 0.80,  $q_2 = 1 - 0.80 = 0.20$ .
- $IC = 0.1$

El cálculo con la forma anterior fue de 156 sujetos, si la sensibilidad de la prueba conocida es de 0.80, y se espera que la sensibilidad de la nueva prueba sea de 0.8 con IC del 95% 0.75 a 85%, a un nivel de confianza del 95% y poder del 80%, con una relación 1:1.

## Análisis estadístico

Con la información recabada se realizará una base de datos, la cual permitirá realizar el procesamiento de la información. El análisis estadístico se realizará utilizando el paquete estadístico SPSS 27. Se calculará:

- Sensibilidad
- Especificidad
- Valor predictivo negativo
- Valor predictivo positivo

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

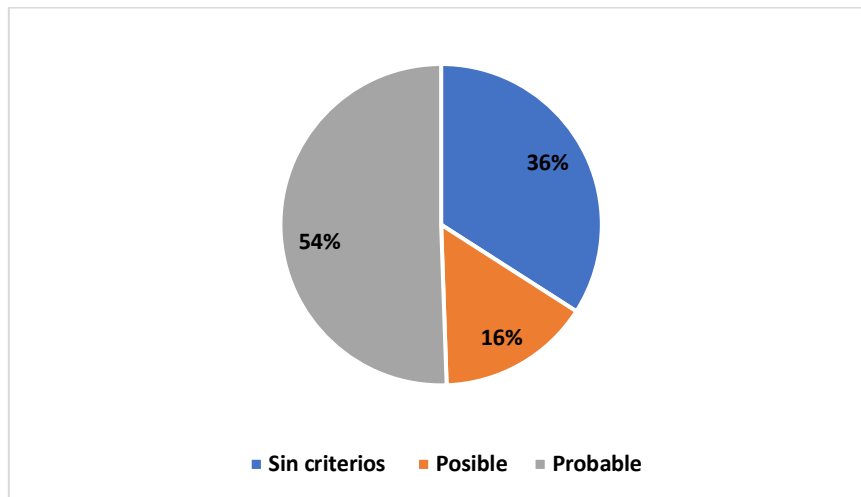
De acuerdo con el artículo de la Ley General de la Salud de los Estados Unidos Mexicanos en materia de investigación para la salud y su reglamento, se considera una investigación sin riesgo.



## RESULTADOS

### ***Características de la población***

Se incluyeron un total de 91 pacientes con galactomanano positivo y sospecha clínica de aspergilosis pulmonar invasiva por parte del médico tratante, posteriormente se les solicitó cultivo para hongos, se encontró que 36% (31/91) de los pacientes a los que se les solicitaron las pruebas para descartar una infección fúngica invasiva (IFI) no tenían criterios clínicos ni radiográficos para sospechar de una aspergilosis pulmonar invasiva. El 54% de los pacientes se clasificó como enfermedad fúngica invasiva probable por contar con factores de riesgo, hallazgos clínico radiológicos y un estudio micológico positivo. Un 16% de los pacientes se clasificó como IFI posible.



*Figura 1. Clasificación inicial del paciente con base a criterio EORTC/MSG*

La edad promedio de las personas incluidas en el estudio fue de  $51.92 \pm 11.99$  años. El 63% (57/91) de las personas a las que se realizó la prueba fueron hombres (figura 2).

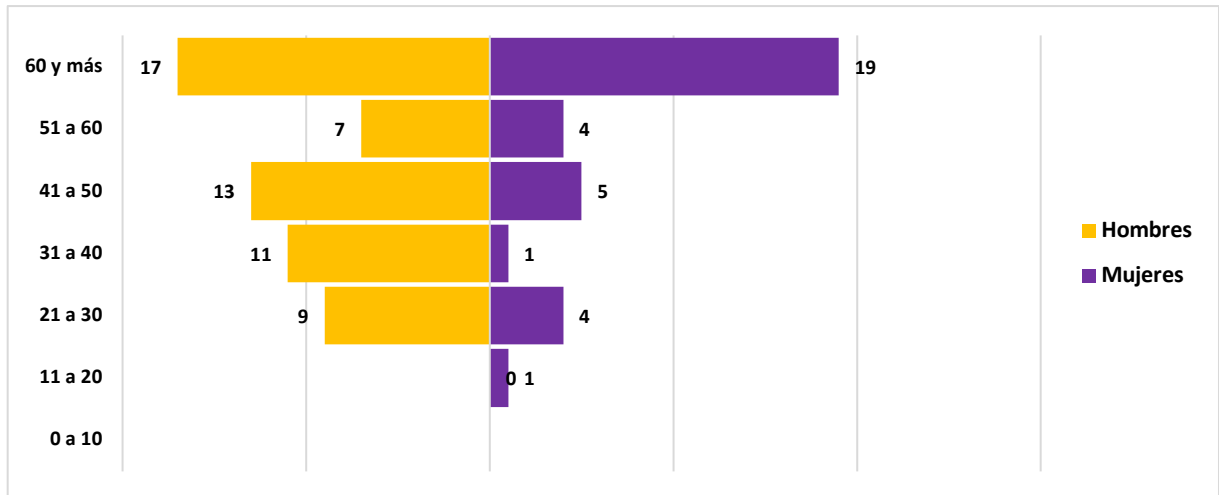


Figura 2. Distribución por sexo y edad.

La enfermedad pulmonar multinodular en estudio y neumonía por COVID-19 fueron los diagnósticos más frecuentes por los cuales se solicitó un estudio serológico y cultivo para descartar una IFI por *Aspergillus spp.* (Tabla 1).

	Sin Criterios EORTC	Posible IFI	Probable IFI	Total
Enfermedad pulmonar multinodular	8	1	12	21 (23%)
COVID - 19	4	0	17	21 (23%)
Neumonía paciente VIH	0	10	5	15 (16%)
NAC	4	0	5	9 (10%)
Otros	6	0	1	7 (8%)
Absceso pulmonar	2	0	0	2 (2%)
Tumor pulmonar	1	0	1	2 (2%)
Tuberculosis pulmonar	1	0	1	2 (2%)
Neumonía atípica	0	1	1	2 (2%)
Tumor Mediastinal	1	0	0	1 (1%)
Neumonía Post-obstructiva	1	0	0	1 (1%)
Neumonía Broncoaspiración	1	0	0	1 (1%)
Enfermedad pulmonar quística	1	0	0	1 (1%)
Cáncer Pulmonar	1	0	0	1 (1%)
Sepsis abdominal	0	0	1	1 (1%)
Neumonía Nosocomial	0	0	1	1 (1%)
Exacerbación EPOC	0	1	0	1 (1%)
Derrame pleural en estudio	0	1	0	1 (1%)
Bronquiectasias	0	0	1	1 (1%)
	31	14	46	91

Tabla 1. Diagnósticos de las personas incluidas en el estudio.

## Rendimiento diagnóstico de PCR para *Aspergillus*

De las 91 muestras analizadas en total, 16 muestras se reportaron positivas por PCR-RT y el resto fueron negativas para *Aspergillus spp.* Para la detección de *Aspergillus spp.*, la sensibilidad por medio de la prueba molecular fue del 27% y la especificidad encontrada fue del 100% (Tabla 2).

Aspergillus spp ELITE MGB.	CRITERIOS EORTC		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	LR (-)
	(método de referencia)						
	Con	Sin					
Positivo	16	0					
Negativo	44	31	27	100	100	41	0.73

**Tabla 2.** Comparación entre el rendimiento clasificación por criterios EORTC y *Aspergillus spp ELITE MGB* RT-PCR. VPN: Valor predictivo negativo; VPP: Valor predictivo positivo; LR(-): Cociente de Probabilidad para un test negativo

En las personas con factores de riesgo, criterios clínicos y micológicos clasificados como infección fúngica probable, la sensibilidad del *Aspergillus spp ELITE MGB* fue del 30%, con una especificidad del 100 %, el valor predictivo positivo es del 100% con un LR de 0.7 (Tabla 3).

Aspergillus spp ELITE MGB.	CRITERIOS EORTC (Probable)		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	LR (-)
	(método de referencia)						
	Con	Sin					
Positivo	14	0					
Negativo	32	31	30	100	100	49	0.7

**Tabla 3.** Comparación entre el rendimiento clasificación por criterios EORCT y *Aspergillus spp ELITE MGB* RT-PCR. VPN: Valor predictivo negativo; VPP: Valor predictivo positivo; LR(-): Cociente de Probabilidad para un test negativo

En los pacientes con criterios clínicos de EFI posible según los criterios EORTC/MSG, la sensibilidad del *Aspergillus spp ELITE MGB* fue del 14%, con una especificidad del 100 %, el valor predictivo positivo es del 100% con un LR de 0.86.

Aspergillus spp ELITE MGB.	CRITERIOS EORTC (Posible)		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	LR (-)
	(método de referencia)						
	Con	Sin					
Positivo	2	0					
Negativo	12	31	14	100	100	72	0.86

**Tabla 4.** Comparación entre el rendimiento clasificación por criterios EORCT y *Aspergillus spp ELITE MGB* RT-PCR. VPN: Valor predictivo negativo; VPP: Valor predictivo positivo; LR(-): Cociente de Probabilidad para un test negativo

## DISCUSIÓN

La aspergilosis pulmonar invasiva es una enfermedad con una incidencia al alza en los últimos años, conlleva una elevada mortalidad en pacientes neutropénicos y no neutropénicos, así como un alto costo en servicios hospitalarios. Su presentación clínica y sus hallazgos clínico radiológicos inespecíficos, sobre todo en pacientes no neutropénicos como los que se atienden en el INER, representan un desafío diagnóstico con un consecuente diagnóstico tardío y un retraso en el inicio del tratamiento antifúngico.

En los últimos años ha habido un creciente interés en métodos diagnósticos indirectos que confieran un diagnóstico preciso, rápido y no invasivo, como lo es la PCR.

Debido a que se utiliza con frecuencia en el diagnóstico de otras enfermedades infecciosas, la detección de *Aspergillus spp.* basada en PCR ha sido propuesta como un método novedoso para diagnosticar la API. Las estrategias basadas en PCR permiten la detección de un número muy bajo de copias del ADN objetivo; los cebadores de oligonucleótidos confieren alta especificidad; y el uso de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) facilita la cuantificación de la carga de patógenos y el establecimiento de valores umbral para diagnosticar infecciones [36, 37].

El conocimiento sobre la validez y el rendimiento diagnóstico de los biomarcadores de API como PCR en el ámbito de la UCI es escaso. La importancia de API se reconoció por primera vez en pacientes hematológicos y, por lo tanto, la mayoría de los estudios se basan en pacientes inmunocomprometidos, típicamente neutropénicos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el rendimiento diagnóstico de los biomarcadores de *Aspergillus* en LBA y aspirado bronquial en una población de pacientes con factores de riesgo distintos a los comúnmente descritos, caracterizados por ser en su mayoría pacientes no neutropénicos con sintomatología y hallazgos clínico - radiológicos muy inespecíficos.

En este estudio encontramos que el 36% de los pacientes a los cuales se les solicitó galactomanano en lavado bronquioloalveolar o aspirado bronquial por sospecha clínica de aspergilosis pulmonar invasiva, no cumplían criterios diagnósticos de la EORTC/MSG para enfermedad fúngica invasiva posible ni probable. La mayoría de los pacientes ingresó con diagnóstico de enfermedad pulmonar multinodular en estudio y COVID 19 en segundo lugar.

Además de los pacientes con factores clásicos del huésped según los criterios EORTC/MSG, la mayoría de los pacientes en este estudio no padecían enfermedades hematológicas u oncológicas y la susceptibilidad a los patógenos fúngicos se basó en otros criterios de inclusión subyacentes, como EPOC, bronquiectasias, COVID 19 y duración prolongada de la ventilación mecánica invasiva, factores que han sido identificados para pacientes de la UCI por *Blot et al.* [38], quienes pudieron demostrar que en la UCI aproximadamente el 30% de los casos comprobados de API carecían de factores del huésped [38].

En nuestro estudio, la PCR tuvo un rendimiento diagnóstico muy bajo en muestras de LBA con una sensibilidad tan baja como 27%, la cual es muy baja comparado con evidencia de tres metanálisis [39–41] de muestras derivadas de LBA, que incorporaron datos de 1872 pacientes únicos. El metanálisis de *Avni et al.* [39] analizó datos de estudios que evaluaron el rendimiento de PCR para *Aspergillus* en LBA en relación con galactomanano, este grupo encontró que la especificidad fue uniformemente alta con una media de 96,4 % (IC 95 %, 93,3–98,1), aunque la sensibilidad reveló una mayor variabilidad entre los estudios con una media de 90,2 % (IC 95 %, 77,2–96,1). El metanálisis de *Sun et al.* [40] encontró que la sensibilidad media de la PCR de LBA fue del 91 % (IC 95 %, 79–96) y la especificidad media fue del 92 % (IC 95 %, 87–96). El metanálisis de *Tuon* [41] también informó una especificidad de PCR de BAL uniformemente alta (media, 94 %) con una sensibilidad menor y más variable (media, 79 %). Esto se puede deber principalmente a la diferencia de la población estudiada, ya que nuestros pacientes

no se encontraban neutropénicos, y presentaban factores de riesgo diferentes a los de las poblaciones de los estudios reportados.

Una de las debilidades de nuestro estudio es que no fue un estudio prospectivo, por lo que en un futuro sería interesante realizar un estudio similar pero de tipo prospectivo para estudiar la rentabilidad diagnóstica de PCR para *Aspergillus*. Otra de las debilidades que encontramos en nuestro estudio; es que como reporta la literatura, la mayoría de los pacientes se encontraba en la categoría de EFI posible y probable, no contamos con ningún paciente que contará con la categoría de EFI probada, ya que ninguno de nuestros estudios fue en biopsia, la mayoría fue analizando muestras de LBA. Dentro de las fortalezas de este estudio, se puede mencionar que se realizó en pacientes sin neutropenia, de los cuales hay muy poca información al respecto del rendimiento diagnóstico de PCR.

Los hallazgos de este estudio, sugieren que el rendimiento diagnóstico de PCR para *Aspergillus* spp. en población atendida en el INER sin los factores de riesgo típicos es muy bajo, por lo que valdría la pena valorar la combinación de dos métodos diagnósticos como galactomanano y PCR, ya que se ha demostrado en estudios previos que su combinación aumenta de manera efectiva el rendimiento diagnóstico.

## CONCLUSIONES

El diagnóstico de aspergilosis pulmonar invasiva debe ser preciso, rápido y preferentemente no invasivo, para el inicio de un tratamiento oportuno y disminuir las altas tasas de mortalidad.

Los marcadores moleculares son cada vez más usados para este fin, sin embargo, no hay suficiente evidencia que respalde el uso de PCR en LBA en pacientes no neutropénicos con factores de riesgo distintos a los publicados de pacientes con enfermedades hematológicas. Por lo que este estudio evaluó la rentabilidad diagnóstica de un kit de PCR comercial para valorar su implementación en un hospital de tercer nivel que se centra en la atención de pacientes con enfermedades respiratorias y enfermos críticos.

La sensibilidad y especificidad de PCR en LBA y aspirado bronquial para *Aspergillus* spp. en pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias con sospecha clínica de aspergilosis invasiva comparado con las definiciones de la EORTC/MSG fue del 27% y el 100% respectivamente. Resalta la baja sensibilidad del método diagnóstico en pacientes no neutropénicos. Cabe destacar que hay poca evidencia referente al rendimiento diagnóstico de PCR para *Aspergillus* en esta población de pacientes, por lo que se necesita de más estudios, de preferencia de tipo prospectivos para valorar el rendimiento diagnóstico de esta prueba en combinación con otros marcadores como galactomanano.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Baddley JW, Stephens JM, et al. Aspergillosis in intensive care unit (ICU) patients: epidemiology and economic outcomes. *BMC Infect Dis* 2013; 13:29.
2. Bassetti M, Bouza E. Invasive mould infections in the ICU setting: complexities and solutions. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72:i39–47.
3. Meersseman W, Vandecasteele SJ, et al. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:621–5.
4. Asciglu S, Rex JH, et al: Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002, 34(1):7–14.
5. Hernandez Blasco L, Sanchez Hernandez IM, et al.: Safety of the transbronchial biopsy in outpatients. *Chest* 1991, 99(3):562–565.
6. Ahmad M, Livingston DR, et al: The safety of outpatient transbronchial biopsy. *Chest* 1986, 90(3):403–405.
7. Ernst A, Eberhardt R, Wahidi M, et al: Effect of routine clopidogrel use on bleeding complications after transbronchial biopsy in humans. *Chest* 2006, 129(3):734–737.
8. Reichenberger F, Habicht J, Kaim A, et al: Lung resection for invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients with hematologic diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 158(3):885–890.
9. Nebiker C, Lardinois D, Junker L, Gambazzi F, Matt P, Habicht J, Halter J, Heim D, Stern M, Buser A, et al: Lung resection in hematologic patients with pulmonary invasive fungal disease. *Chest* 2012, in press.
10. Bassetti M, Giacobbe DR, et al; FUNDICU Investigators. Performance of existing definitions and tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in critically ill, adult patients: a systematic review with qualitative evidence synthesis. *J Infect* 2020; 81:131–46.
11. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis* 2020; 71:1367–76. doi: 10.1093/cid/ciz1008.
12. Blot SI, Taccone FS, Van den Abeele AM, et al.; AspICU Study Investigators. A clinical algorithm to diagnose invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186:56–64.
13. Cruciani M, Mengoli C, Barnes R, et al. Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people. *Cochrane Database Syst Rev* 2019; 9:CD009551.
14. Arvanitis M, Ziakas PD, Zacharioudakis IM, et al. PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance. *J Clin Microbiol* 2014; 52:3731–42.
15. Avni T, Levy I, Sprecher H, Yahav D, Leibovici L, Paul M. Diagnostic accuracy of PCR alone compared to galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a systematic review. *J Clin Microbiol* 2012; 50:3652–8.
16. Morrissey CO, Chen SC, Sorrell TC, et al; Australasian Leukaemia Lymphoma Group and the Australia and New Zealand Mycology Interest Group. Galactomannan and PCR versus culture and histology for directing use of antifungal treatment for invasive aspergillosis in high-risk haematology patients: a randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* 2013; 13:519–28.
17. Aguado JM, Vázquez L, Fernández-Ruiz M, et al; PCRAGA Study Group; Spanish Stem Cell Transplantation Group; Study Group of Medical Mycology of the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; Spanish Network for Research in Infectious Diseases. Serum galactomannan versus a combination

of galactomannan and polymerase chain reaction-based *Aspergillus* DNA detection for early therapy of invasive aspergillosis in high-risk hematological patients: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 2015; 60:405–14.

18. White PL, Wingard JR, Bretagne S, et al. *Aspergillus* polymerase chain reaction: systematic review of evidence for clinical use in comparison with antigen testing. *Clin Infect Dis* 2015; 61:1293–303.

19. Paiva JA, Mergulhão P, Pereira JM. *Aspergillus* and other respiratory fungal infections in the ICU: diagnosis and management. *Curr Opin Infect Dis* 2018; 31:187–93.

20. Armstrong-James D, Youngs J, Bicanic T, et al. Confronting and mitigating the risk of COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Eur Respir J* 2020; 56:2002554. doi:10.1183/13993003.02554-2020.

21. Armstrong-James D, Youngs J, Bicanic T, et al. Confronting and mitigating the risk of COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Eur Respir J* 2020; 56:2002554. doi:10.1183/13993003.02554-2020.

22. Schauwvlieghe AFAD, de Jonge N, van Dijk K, et al. The diagnosis and treatment of invasive aspergillosis in Dutch haematology units facing a rapidly increasing prevalence of azole-resistance. A nationwide survey and rationale for the DB-MSG 002 study protocol. *Mycoses* 2018; 61:656–64.

23. Torelli R, Sanguinetti M, Moody A, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis by a commercial real-time PCR assay for *Aspergillus* DNA in bronchoalveolar lavage fluid samples from high-risk patients compared to a galactomannan enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 2011; 49:4273–78.

24. Orsi CF, Gennari W, Venturelli C, et al. Performance of 2 commercial real-time polymerase chain reaction assays for the detection of *Aspergillus* and *Pneumocystis* DNA in bronchoalveolar lavage fluid samples from critical care patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73:138–43.

25. Chong GL, van de Sande WW, Dingemans GJ, et al. Validation of a new *Aspergillus* real-time PCR assay for direct detection of *Aspergillus* and azole resistance of *Aspergillus fumigatus* on bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 2015; 53:868–74.

26. Springer, J.; Morton, C.O.; Perry, M.; Heinz, W.J.; Paholcsek, M.; Alzheimer, M.; Rogers, T.R.; Barnes, R.A.; Einsele, H.; Loeffler, J.; et al. Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA in high-risk hematological patients. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51, 1445–1450.

27. Drgona, L.; Colita, A.; Klimko, N.; Rahav, G.; Ozcan, M.A.; Donnelly, J.P. Triggers for driving treatment of at-risk patients with invasive fungal disease. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013, 68, iii17–iii24.

28. Springer, J.; White, P.L.; Hamilton, S.; Michel, D.; Barnes, R.A.; Einsele, H.; Loeffler, J. Comparison of performance characteristics of *Aspergillus* PCR in testing a range of blood-based samples in accordance with International methodological recommendations. *J. Clin. Microbiol.* 2016, 54, 705–711.

29. White, P.L.; Barnes, R.A.; Springer, J.; Klingspor, L.; Cuenca-Estrella, M.; Morton, C.O.; Lagrou, K.; Bretagne, S.; Melchers, W.J.; Mengoli, C.; et al. Clinical performance of *Aspergillus* PCR for testing serum and plasma: A study by the European *Aspergillus* PCR initiative. *J. Clin. Microbiol.* 2015, 53, 2832–2837.

30. Marchetti, O.; Lamothe, F.; Mikulska, M.; Viscoli, C.; Verweij, P.; Bretagne, S. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2012, 47, 846–854.

31. De Pauw, B.; Walsh, T.J.; Donnelly, J.P.; Stevens, D.A.; Edwards, J.E.; Calandra, T.; Pappas, P.G.; Maertens, J.; Lortholary, O.; Kauffman, C.A.; et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin. Infect. Dis.* 2008, 46, 1813–1821.

32. Cruciani, M.; Mengoli, C.; Loeffler, J.; Donnelly, P.; Barnes, R.; Jones, B.L.; Klingspor, L.; Morton, O.; Maertens, J. Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive Aspergillosis in immunocompromised people. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015.
33. Mengoli, C.; Cruciani, M.; Barnes, R.A.; Loeffler, J.; Donnelly, P. Use of PCR for diagnosis of invasive Aspergillosis: Systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2009, 9, 89–96.
34. Perry, M.D.; White, P.L.; Barnes, R.A. Comparison of four automated nucleic acid extraction platforms for the recovery of DNA from *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 2014, 63, 1160–1166.
35. D. Neofytos, D. Horn, E. Anaissie, W. Steinbach, A. Olyaei, J. Fishman, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin Infect Dis*, 48 (2009), pp. 265-273
36. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol* 2017;8:108.
37. Kourkoumpetis TK, Fuchs BB, Coleman JJ, Desalermos A, Mylonakis E. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Infect Dis* 2012;54:1322–1331.
38. Blot SI, Taccone FS, Van den Abeele AM, Bulpa P, Meersseman W, Brusselaers N, et al. A clinical algorithm to diagnose invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(1):56-64.
39. Avni T, Levy I, Sprecher H, Yahav D, Leibovici L, Paul M. Diagnostic accuracy of PCR alone compared to galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a systematic review. *J Clin Microbiol* 2012;50:3652–3658.
40. Sun W, Wang K, Gao W, Su X, Qian Q, Lu X, et al. Evaluation of PCR on bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. *PLoS One* 2011;6: e28467.
41. Tuon FF. A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. *Rev Iberoam Micol* 2007;24: 89–94.