

Caracterización de los pacientes con sospecha de aspergilosis invasiva estudiados con prueba Platelia Aspergillus®

Characterization of patients with suspected invasive aspergillosis studied by Platelia test

Viviana Olaya¹, Clara Marcela Cadavid², Karen Arango³, Alejandra Zuluaga⁴, Gloria Elena Durango⁵, Juan David Uribe⁶, Juan David Ramirez⁷, Carlos Andrés Agudelo⁸.

RESUMEN

Objetivo: describir las características de los pacientes en los que se realizó prueba Platelia Aspergillus® por sospecha de AI, y los resultados de la prueba según las categorías diagnósticas.

Metodología: se revisaron retrospectivamente las historias clínicas de pacientes con sospecha de AI atendidos en instituciones de salud de Medellín a quienes se les realizó la prueba Platelia Aspergillus®. Se colectaron y analizaron de manera descriptiva los datos clínicos, imagenológicos, microbiológicos y los resultados de la prueba Platelia Aspergillus®.

Resultados: se incluyeron 78 pacientes atendidos entre 2006- 2008. Se diagnosticó AI en 21 (26.9%) pacientes, colonización en ocho (10.3%) pacientes. La forma pulmonar invasiva aguda se encontró en 17 (81.0%), forma diseminada en tres (14.3%). La fiebre y la disnea fueron la principal manifestación. En la tomografía de pulmón se observaron más frecuentemente nódulos pulmonares. La prueba fue positiva en 31 (39.7%) pacientes, en 50% de los pacientes colonizados. En 17 (47.2%) de los 36 pacientes recibieron antibióticos betalactámicos, la prueba fue positivo.

Conclusiones: la AI puede encontrarse hasta en la tercera parte de pacientes con sospecha clínica; sin embargo, el diagnóstico es difícil debido al cuadro clínico inespecífico, además de las dificultades para obtener muestras clínicas y al pobre rendimiento de las pruebas diagnósticas.

Palabras clave: *Aspergillus*; aspergilosis; galactomanan; aspergilosis pulmonar invasiva

ABSTRACT

Objective: to describe the characteristics of patients with suspected IA, who were studied with the platelia test as well as the results according to different diagnostic categories.

Methods: the medical records of patients with suspected IA treated at health facilities in Medellín who were tested with platelia were retrospectively reviewed. Clinical data, imaging, microbiology and the platelia test results were collected and descriptively analyzed.

Results: we included 78 patients treated from 2006 to 2008. IA was diagnosed in 21 (26.9%) patients and colonization was found in 8 (10.3%) patients. The acute invasive pulmonary form was found in 17 (81.0%), disseminated form in three (14.3%). Fever and dyspnea were the principal manifestation. Nodules were found more frequently in lung tomography. The tests were positive in 31 (39.7%) patients and in 50% of colonized patients. In 17 (47.2%) of 36 patients who received beta-lactam antibiotics, the test showed a positive result.

¹ Médica, Residente de la especialización en Medicina Interna. Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia.

² Médica, Residente de la especialización en Medicina Interna. Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia.

³ Analista de laboratorio Micología médica y experimental. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia.

⁴ Analista de laboratorio Micología médica y experimental. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia.

⁵ Bacterióloga especialista en Micología. Hospital Universitario San Vicente de Paúl. Medellín, Colombia.

⁶ Médico Intensivista. Clínica Cardiovascular Santa María. Medellín, Colombia.

⁷ Médico Internista. Clínica Universitaria Bolivariana y Hospital Universitario San Vicente de Paúl. Medellín, Colombia.

⁸ Médico Internista. Universidad Pontificia Bolivariana y Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia.

Correspondencia: Juan Guillermo Jiménez Jiménez. Correo electrónico: juang.jimenez@correo.upb.edu.co

Fecha de recibido: 30 de noviembre de 2009

Fecha de aprobado: 10 de mayo de 2010

Conclusions: IA can be found in up to one third of patients with clinical suspicion, but diagnosis remains difficult because of the nonspecific clinical picture, coupled with the difficulty for obtaining clinical samples and the poor performance of diagnostic tests.

Keywords: *Aspergillus*; Aspergillosis; galactomannan; invasive pulmonary aspergillosis

INTRODUCCIÓN

La Aspergilosis Invasiva (AI) se ha convertido en una de las causas infecciosas más importantes de morbimortalidad en los pacientes inmunocomprometidos, principalmente en aquellos trasplantados de médula ósea (TMO) y de órgano sólido (TOS), en los que puede alcanzar una incidencia del 13% y una mortalidad del 76.3%, según la serie y el tipo de trasplante realizado¹⁻³.

El diagnóstico de la AI es difícil en la práctica clínica debido a la necesidad de demostrar por histopatología la invasión tisular, a la vez que se descarta colonización o contaminación. La obtención de muestras de tejido requiere procedimientos invasivos que frecuentemente no pueden realizarse en la población afectada por esta micosis, por ende, en la mayoría de los casos, el diagnóstico depende de la combinación de signos clínicos y radiológicos, así como de estudios micológicos²⁻⁵.

La prueba Platelia es una prueba de Elisa que ha sido desarrollada para la detección de galactomannan (GM), el mayor constituyente de la pared del *Aspergillus*, en muestras de suero, líquido cefalorraquídeo y lavado broncoalveolar. Se ha utilizado como criterio para el diagnóstico de la AI probable, según las categorías definidas por el consenso Eortc/MSG y de forma seriada para detectar tempranamente la micosis invasiva, incluso antes de que aparezcan los signos y síntomas o las alteraciones radiológicas^{2,4-7}. Desafortunadamente el rendimiento de la prueba varía de acuerdo con los diferentes puntos de corte publicados y es influenciado por el uso simultáneo de antibióticos betalactámicos o por otras infecciones fúngicas⁷⁻⁹. En Colombia no se ha evaluado el desempeño de la prueba Platelia, a pesar de su uso extendido y del creciente

número de pacientes inmunocomprometidos. El conocimiento del desempeño diagnóstico de la prueba permitiría determinar la pertinencia de su uso o la búsqueda de alternativas diagnósticas con un mejor rendimiento.

El presente estudio pretende describir las características de pacientes en quienes se realizó la prueba Platelia para la detección de galactomannan, debido a la sospecha clínica de AI, así como los resultados de la prueba, según las diferentes categorías diagnósticas, con el objeto de definir la población en la que la AI se está sospechando y realizar una evaluación preliminar de la prueba Platelia.

METODOLOGÍA

Diseño del estudio y población incluida

Se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo en el que se evaluaron pacientes con sospecha de AI, atendidos en instituciones de salud de alta complejidad de la ciudad de Medellín-Colombia. Se incluyeron los pacientes mayores de 18 años, en los que se realizó prueba Platelia para la detección de galactomannan en suero entre los años 2006 y 2008, que tuvieran estudios microbiológicos y/o de histopatología orientados a la detección del hongo y contaran con adecuada información en la historia clínica.

Definiciones

Para la realización de esta investigación se adoptaron las categorías diagnósticas definidas por la Eortc/MSG⁴, sin tener en cuenta el resultado de la prueba Platelia como criterio.

Aspergilosis probada: requiere documentación histopatológica de invasión tisular por el hongo o un cultivo positivo de una muestra proveniente de un sitio normalmente estéril.

Aspergilosis probable: debe cumplir un criterio en cada una de 3 categorías: factores del hospedero, criterio clínico (consistentes con los hallazgos micológicos y relacionada cronológicamente con el episodio), y criterio micológico (incluye pruebas indirectas).

Aspergilosis posible: paciente con factores de riesgo para aspergilosis invasora y presentación clínica compatible, sin evidencia microbiológica o histopatológica y cuando se ha descartado otro diagnóstico que explique el cuadro.

Colonización: documentación microbiológica de la presencia de *Aspergillus spp* en uno o más órganos en ausencia de signos o síntomas de enfermedad o invasión tisular.

Procedimientos de inmunodiagnóstico

Estos procedimientos fueron realizados en el laboratorio de Micología de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) y del Hospital Universitario San Vicente de Paúl. Para la búsqueda de antígenos de *Aspergillus* en suero se utilizó la prueba Platelia™ *Aspergillus* EIA, que se define como una técnica inmunoenzimática de tipo sándwich realizada en microplaca, que permite la detección semicuantitativa del antígeno circulante galactomanan en sueros humanos. Para esta técnica se utiliza un anticuerpo monoclonal (Acm) de rata EBA-2, dirigido contra el galactomanan de *Aspergillus*. La técnica consiste en sensibilizar los pocillos de la microplaca y captar el antígeno galactomanan presentes en la muestra, posteriormente, el antígeno fijado se detecta con el anticuerpo monoclonal acoplado a la peroxidasa, la cual da una reacción de color que luego va a ser leída por un lector de Elisa a dos longitudes de onda (450-620 nm). La absorbancia obtenida en la prueba permite calcular un índice que es la relación entre la densidad óptica de la muestra/media de la densidad óptica del calibrador. Se considera un paciente positivo cuando presenta un índice >0.5 y negativo cuando presenta un índice <0.5.

Manejo de datos y análisis estadístico

Los datos microbiológicos, obtenidos de los registros de los laboratorios de Micología de la CIB y del Hospital Universitario San Vicente de Paúl y los datos clínicos, extraídos de las historias clínicas en las instituciones hospitalarias participantes, fueron consignados en un formulario elaborado para tal fin e ingresados en una base de datos diseñada en Microsoft Excel® (Microsoft, Redmond, WA).

En el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS® versión 16.0 (SPS Inc., Chicago, Illinois); para el análisis descriptivo se calcularon las medidas de frecuencia absoluta y relativa para las variables cualitativas, para las variables cuantitativas, el promedio y la desviación estándar.

Consideraciones éticas

Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad Pontificia Bolivariana, el comité de investigaciones de las instituciones hospitalarias participantes: Hospital La María, Hospital Pablo Tobón Uribe, Clínica Universitaria Bolivariana, Clínica Cardiovascular Santa María y Hospital Universitario San Vicente de Paúl. Su realización estuvo sujeta a los principios de la declaración de Helsinki. Por su carácter retrospectivo no se obtuvo consentimiento informado.

RESULTADOS

Se incluyeron 78 pacientes con sospecha de AI en los que se realizó la prueba Platelia entre los años 2006 y 2008, de los cuales 47 (60.3%) eran de sexo masculino y 31 (39.7%) de sexo femenino. La edad promedio era 43.5 (DE±15.8). En la tabla 1 se presentan los factores de riesgo para AI en la población estudiada.

Se diagnosticó AI en 21 (26.9%) pacientes y se encontró colonización en 8 (10.3%) pacientes más. Según el síndrome clínico, 17 (81.0%) pacientes correspondían a una forma

Tabla 1. Características basales de los pacientes con sospecha clínica de aspergilosis invasora en quienes se solicitó prueba Platelia (N=78)

Factores de riesgo	n (%)
Trasplante	37 (47.4)
Uso de esteroides > 15 mg/día	25 (32.1)
Neutropenia < 500 cel/ml	18 (23.1)
Neoplasia hematológica	16 (20.5)
Enfermedad pulmonar crónica	13 (16.7)
Infección por VIH	8 (10.3)
DM no controlada	6 (7.7)
Otra enfermedad hematológica	4 (5.1)
Tumor sólido	1 (1.3)
Uso antiTNF	1 (1.3)

*Algunos pacientes tenían más de un factor de riesgo simultáneamente.

Tabla 2. Diagnósticos definitivos de los pacientes con sospecha clínica de aspergilosis invasora en quienes se realizó la prueba Platelia (N=78)*

Diagnóstico	n (%)
Aspergilosis	21 (26.9)
Probada	11 (14.1)
Probable	3 (3.8)
Posible	7 (9)
Colonización	8 (10.3)
Otro diagnóstico [†]	65 (83.3)
Neumonía	23 (29.5%)
Bacteremia/sepsis	11 (14.1)
Tuberculosis	10 (12.8)
Infección por CMV	8 (10.3)
Enfermedad pulmonar no infecciosa [‡]	4 (5.1)
Neutropenia febril sin foco	3 (3.8)
Neoplasia hematológica	2 (2.6)
Criptococosis	1 (1.3)
Rechazo del injerto	1 (1.3)
Sinusitis	1 (1.3)
Absceso hepático	1 (1.3)

*Algunos pacientes presentaron más de un diagnóstico simultáneamente.

[†]Algunos pacientes tuvieron Aspergilosis y otro diagnóstico adicional.

[‡]TEP, exacerbación EPOC.

pulmonar invasora aguda, 3 (14.3%) a una forma diseminada y 1 (1.3%) a sinusitis crónica. No se encontraron casos de aspergilosis pulmonar crónica, traqueobronquitis, osteomielitis o compromiso cutáneo. En la tabla 2 se presentan las categorías diagnósticas de los pacientes estudiados de acuerdo con las definiciones de la Eortc/MSG y los diagnósticos definitivos de los pacientes sin AI.

La fiebre y la disnea fueron las principales manifestaciones clínicas de los pacientes con AI; en la tomografía de pulmón se observaron más frecuentemente nódulos pulmonares. Los signos tomográficos asociados con aspergilosis, signo del halo y signo del aire creciente, solo

estuvieron presentes en un paciente cada uno. La tabla 3 muestra las características clínicas y tomográficas de los pacientes incluidos.

La prueba Platelia fue positiva en 31 (39.7%) pacientes, de los cuales 22 usaban betalactámicos simultáneamente o los habían usado en los 5 días previos. En 4 (50%) de los 8 pacientes colonizados con *Aspergillus spp.*, la prueba Platelia arrojó un resultado positivo. En la tabla 4 se muestra el resultado de la prueba Platelia, según la categoría diagnóstica de la Eortc/MSG.

La prueba Platelia fue positiva en 17 (47.2%) de los 36 pacientes a los que se les administró tratamiento antifúngico, de ellos 9 (25.05)

Tabla 3. Características clínicas y tomográficas de los pacientes con aspergilosis invasora estudiados con la prueba Platelia (N=21)

Manifestación clínica	n (%)
Fiebre	19 (90.5)
Tos	17 (81.0)
Disnea	12 (57.1)
Expectoración	6 (28.6)
Hepatomegalia	6 (28.6)
Dolor torácico	3 (14.3)
Esplenomegalia	2 (9.5)
Dolor facial	1 (4.8)
Rinorrea	1 (4.8)
Epistaxis	1 (4.8)
Hemoptisis	1 (4.8)
Derrame pericárdico	1 (4.8)
Compromiso retina	1 (4.8)
Hallazgos tomográficos	
Nódulos	12 (57.1)
Infiltrados alveolares	9 (42.9)
Derrame pleural	8 (38.1)
Cavitaciones	5 (23.8)
Infiltrados intersticiales	4 (19.0)
Signo del halo	1 (4.8)
Signo del aire creciente	1 (4.8)
Sinusitis	1 (4.8)

Tabla 4. Resultados de la prueba Platelia, de acuerdo con el diagnóstico definitivo (N=78)

	Prueba Platelia	
	Positiva	Negativa
Aspergilosis – n (%)	10 (47.6)	11 (52.4)
Probada – n (%)	6 (54.5)	5 (45.5)
Probable – n (%)	0 (0)	3 (100)
Posible – n (%)	4 (57.1)	3 (42.9)
Colonización* – n (%)	4 (50)	4 (50)
Otro diagnóstico – n (%)	21 (36.8)	36 (63.2)

*Pacientes con otro diagnóstico colonizados por *Aspergillus spp.*

respondieron al tratamiento. Solo 9 (52.%) de estos 17 pacientes tenía AI definida, según categorías de la Eortc/MSG, de los cuales 5 respondieron a la terapia antifúngica.

DISCUSIÓN

Hasta 1990 la candidiasis fue la infección fúngica diseminada más común en pacientes inmunocomprometidos, pero desde entonces se ha dado un cambio notable en la epidemiología, con un aumento considerable de la incidencia de AI, que puede alcanzar, en algunos casos, hasta un 7%^{10,11}.

Las elevadas tasas de mortalidad de la AI, que para el caso de los pacientes transplantados de médula ósea alcanza el 76.3%¹, pueden ser explicadas por el estado de inmunosupresión del hospedero y de los factores de virulencia del hongo, pero, además, por el elevado número de patologías incluidas en el diagnóstico diferencial, las dificultades para confirmar la AI y las limitaciones terapéuticas actuales. Varios esfuerzos se han hecho para mejorar el rendimiento y la oportunidad del diagnóstico de la AI, especialmente los esfuerzos de consenso para definir los criterios diagnósticos y el desarrollo de pruebas micológicas no invasivas, por ejemplo, la detección del galactomanan circulante o prueba Platelia^{4,9}. A pesar del amplio uso de esta prueba, aún existen dudas sobre su rendimiento diagnóstico, potenciadas por la variabilidad de sus resultados en función del tipo de Aspergilosis y del uso simultáneo de otros

medicamentos, específicamente antibióticos betalactámicos.

La falta de estudios sobre AI en Colombia estimuló la realización de esta investigación, que busca mejorar el conocimiento local sobre el comportamiento clínico de la AI y del papel de las pruebas diagnósticas como un paso necesario para mejorar la oportunidad en el diagnóstico de la AI e impactar la morbimortalidad, especialmente en pacientes inmunosuprimidos.

Los factores de riesgo encontrados, y los más comunes para el desarrollo de AI, fueron el trasplante (47.7%), seguido del uso de esteroides (32.1%) y la neutropenia (23.1%); lo que contrasta con hallazgos reportados previamente en los que las neoplasias hematológicas y la neutropenia prolongada se asociaron con el desarrollo de la AI¹¹⁻¹⁵. Esto se explica, probablemente, porque este estudio exigió como criterio de inclusión la realización de la prueba Platelia, prueba que frecuentemente es realizada en pacientes transplantados con el fin de detectar tempranamente la aparición de AI. Igualmente, pudo influir el hecho de no discriminar entre trasplantes hematológicos y no hematológicos en nuestra serie.

La AI es la forma más severa y más frecuente del amplio espectro de presentación clínica de la Aspergilosis, porque ocurre en el 50-70% de los casos de Aspergilosis^{2,13,20,21}. La frecuencia de AI encontrada en nuestro estudio (26.9%) es muy superior a las incidencias usualmente

conocidas^{1,13} y está relacionada con el hecho de incluir únicamente pacientes con una sospecha de AI.

La presentación clínica de los pacientes con AI evaluados en esta serie fue semejante a lo descrito en estudios previos², es decir, la fiebre (90.5%), la tos (81%) y la disnea (87.2%). La sinusitis es otra manifestación descrita principalmente en pacientes con malignidades hematológicas y, en menor número, en pacientes inmunocompetentes^{23,24}. En este estudio solo se encontró un paciente con sinusitis por *Aspergillus spp.* Sus manifestaciones clínicas no difieren de las encontradas en otros tipos de sinusitis. Sospecha que permite concluir que se da gracias a un factor de riesgo usualmente evidente²⁴.

Otras formas menos usuales de presentación como el compromiso traqueobronquial, cutáneo, óseo y cerebral, han sido reportadas en la literatura en forma de casos clínicos y no fueron observadas en este estudio²⁸⁻³². Esta variedad de formas clínicas, que incluyen un amplio espectro de posibles diagnósticos diferenciales, afectan la oportunidad del diagnóstico e inicio del tratamiento. Las formas crónicas de la enfermedad tampoco fueron observadas en este estudio; estas formas se presentan en pacientes con enfermedad pulmonar de base o como aspergilosis broncopulmonar alérgica¹⁴. La inclusión predominante de pacientes inmunosuprimidos y el poco número de pacientes con cuadros respiratorios crónicos explican nuestros hallazgos.

Las imágenes pulmonares son otra herramienta útil en el diagnóstico de AI; el signo del halo y el signo del aire creciente han sido descritos como característicos de la enfermedad. El signo del aire creciente tiene una especificidad reportada del 93% y una sensibilidad que oscila entre el 10 y el 94%, de acuerdo con el momento de la evolución en el que se haga el estudio y de la experiencia del radiólogo. El signo del halo puede ser leído como nódulo por radiólogos no experimentados. Otros hallazgos son la consolidación, nódulos pulmonares, infartos en cuña y cavitaciones, además de derrames

pleurales^{20,35-38}. En el presente estudio los hallazgos imagiológicos más frecuentemente encontrados en la tomografía de tórax fueron los nódulos (57.1%), el compromiso alveolar (9%), y derrame pleural (8%); el signo del halo y el signo del aire creciente solo fueron observados en un paciente cada uno, debido, probablemente, a la realización de estudios tomográficos tardíamente en el curso de la enfermedad.

El diagnóstico de la AI continúa siendo un gran desafío por lo inespecífico de su cuadro clínico, por la dificultad para la obtención de las muestras necesarias para hacer el diagnóstico microbiológico o histopatológico, por la baja sensibilidad de los estudios micológicos y por sus limitaciones para diferenciar colonización de infección [8]. El desarrollo de pruebas micológicas no invasivas como la detección de galactomanan circulante ha intentado mejorar este panorama; sin embargo, el resultado de la prueba puede ser afectada por diversas circunstancias, entre ellas el punto de corte elegido, la forma clínica de Aspergilosis y el uso concomitante de antibióticos betalactámicos³³. Las sensibilidades reportadas varían de manera significativa entre el 25 y el 100%^{8,39}. Nuestro estudio encontró 6 (54.5%) pacientes con AI y en 10 (47.6%) pacientes con aspergilosis probada, probable o posible. Sin embargo, la prueba también fue positiva en un número significativo de individuos colonizados con *Aspergillus spp.* (50%).

Una proporción importante de los pacientes con el resultado de la prueba positivo recibía antibióticos betalactámicos (22/31). Se ha sugerido que los antibióticos derivados de componentes naturales del hongo *penicillium sp.*, pueden tener reacciones cruzadas con la prueba Platelia debido a la presencia en el compuesto del antígeno galactomanan proveniente de la pared celular del hongo^{8,34}.

El presente estudio tiene las limitaciones propias de los estudios descriptivos y retrospectivos, relacionadas especialmente con las dificultades para obtener toda la información requerida a partir de los registros clínicos. Tampoco permite evaluar el desempeño diagnóstico de

la prueba Platelia. Sin, embargo, es el primer estudio en Colombia en el que se describen las características epidemiológicas, clínicas, radiológicas y resultado de la prueba Platelia en pacientes con sospecha de AI.

En conclusión, la AI puede encontrarse hasta en la tercera parte de los pacientes con sospecha clínica, aunque el diagnóstico continúa siendo difícil debido a su cuadro clínico inespecífico, asociado a la dificultad para obtener las muestras clínicas y al pobre rendimiento de las pruebas diagnósticas. El bajo número de resultados positivos de la prueba Platelia en pacientes con AI probada y el elevado número de resultados positivos encontrado en pacientes colonizados o que recibieron antibióticos betalactámicos, sugieren un regular comportamiento de la prueba. Deben realizarse estudios prospectivos diseñados para evaluar el desempeño de la prueba Platelia con el fin de aclarar su utilidad en los pacientes con sospecha de AI.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

FINANCIACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Los autores no recibieron ningún apoyo económico por parte de ninguna institución ni la casa comercial que fabrica la prueba Platelia.

REFERENCIAS

1. Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA, Hadley S, Kontoyiannis DP, Walsh TJ, *et al.* Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Med Mycol.* 2005 May; 43 Suppl 1:S49-58.
2. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, *et al.* Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2008 Feb 1;46(3):327-60.
3. Bergeron A, Belle A, Sulahian A, Lacroix C, Chevret S, Raffoux E, *et al.* Contribution of galactomannan antigen detection in BAL to the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies. *Chest.* 2010 Feb; 137(2):410-5.
4. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, *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 Jun 15; 46(12):1813-21.
5. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B, Waller J, Campos F, *et al.* Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol.* 2002 Apr 1; 20(7):1898-906.
6. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E, Lagrou K, Verhaegen J, Boogaerts M, *et al.* Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol.* 2004 Sep; 126(6):852-60.
7. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 2004 Jun; 4(6):349-57.
8. Quindós G. New microbiological techniques for the diagnosis of invasive mycoses caused by filamentous fungi. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12(Suppl 7):40-52.
9. Wheat LJ, Walsh TJ. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008 Apr; 27(4):245-51.
10. Koch S, Hohne FM, Tietz HJ. Incidence of systemic mycoses in autopsy material. *Mycoses.* 2004 Feb; 47(1-2):40-6.
11. Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses.* 2009 May; 52(3):197-205.

12. Denning DW. Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet*. 2000 Feb 5; 355(9202):423-4.
13. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, Hiemenz JW, Wingard JR, Dupont B, *et al*. Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. I3 Aspergillus Study Group. *Medicine*. 2000 Jul; 79(4):250-60.
14. Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1998 Apr; 26(4):781-803; quiz 4-5.
15. Mikulska M, Raiola AM, Bruno B, Furfaro E, Van Lint MT, Bregante S, *et al*. Risk factors for invasive aspergillosis and related mortality in recipients of allogeneic SCT from alternative donors: an analysis of 306 patients. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Sep; 44(6):361-70.
16. Husain S. Unique characteristics of fungal infections in lung transplant recipients. *Clin Chest Med*. 2009 Jun; 30(2):307-13.
17. Rosenhagen M, Feldhues R, Schmidt J, Hoppe-Tichy T, Geiss HK. A risk profile for invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *Infection*. 2009 Aug; 37(4):313-9.
18. Judson MA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis after infliximab therapy for sarcoidosis: a potential mechanism related to T-helper cytokine balance. *Chest*. 2009 May; 135(5):1358-9.
19. Nedel WL, Kontoyiannis DP, Pasqualotto AC. Aspergillosis in patients treated with monoclonal antibodies. *Rev Iberoam Micol*. 2009 Sep 30; 26(3):175-83.
20. Segal BH. Aspergillosis. *N Engl J Med*. 2009 Apr 30; 360(18):1870-84.
21. Riscili BP, Wood KL. Noninvasive pulmonary Aspergillus infections. *Clin Chest Med*. 2009 Jun; 30(2):315-35.
22. Vonberg RP, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect*. 2006 Jul; 63(3):246-54.
23. Sivak-Callcott JA, Livesley N, Nugent RA, Rasmussen SL, Saeed P, Rootman J. Localised invasive sino-orbital aspergillosis: characteristic features. *Br J Ophthalmol*. 2004 May; 88(5):681-7.
24. Clancy CJ, Nguyen MH. Invasive sinus aspergillosis in apparently immunocompetent hosts. *J Infect*. 1998 Nov; 37(3):229-40.
25. Onozawa M, Takahashi S, Kanamori H, Kahata K, Kondo T, Hashino S, *et al*. Pseudomembranous tracheobronchial aspergillosis. *Intern Med J*. 2009 Jan; 39(1):65-6.
26. Routsis C, Kaltsas P, Bessis E, Rontogianni D, Kollias S, Roussos C. Airway obstruction and acute respiratory failure due to Aspergillus tracheobronchitis. *Crit Care Med*. 2004 Feb; 32(2):580-2.
27. Angelotti T, Krishna G, Scott J, Berry G, Weinacker A. Nodular invasive tracheobronchitis due to Aspergillus in a patient with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2002; 11(5):325-8.
28. Lambertucci JR, Fonseca P, Linares DB. Invasive aspergillosis of the orbit and cavernous sinus in a patient with Aids. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009 Dec; 42(6):734-5.
29. Gupta A, Khaira A, Lata S, Sharma A, Tiwari SC. Primary cutaneous aspergillosis in renal transplant recipient. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2009 Sep; 20(5):848-9.
30. Siddiqui AA, Shah AA, Bashir SH. Cranio-cerebral aspergillosis of sinonasal origin in immunocompetent patients: clinical spectrum and outcome in 25 cases. *Neurosurgery*. 2004 Sep; 55(3):602-11; discussion 11-3.
31. Almutairi BM, Nguyen TB, Jansen GH, Asseri AH. Invasive aspergillosis of the brain: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*. 2009 Mar-Apr; 29(2):375-9.
32. Sutton DA, Wickes BL, Romanelli AM, Rinaldi MG, Thompson EH, Fothergill AW, *et al*. Cerebral aspergillosis caused by Aspergillus granulosis. *J Clin Microbiol*. 2009 Oct; 47(10):3386-90.
33. Maertens J, Theunissen K, Lodewyck T, Lagrou K, Van Eldere J. Advances in the serological diagnosis of invasive Aspergillus infections in patients with haematological disorders. *Mycoses*. 2007; 50 Suppl 1:2-17.
34. Petraitiene R, Petraitis V, Groll AH, Sein T, Piscitelli S, Candelario M, *et al*. Antifungal activity and pharmacokinetics of posaconazole (SCH 56592) in treatment and prevention of experimental invasive pulmonary aspergillosis: correlation with galactomannan antigenemia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Mar; 45(3):857-69.
35. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW, Stark P, Durand C, Lortholary O, *et al*. Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. *Clin Infect Dis*. 2007 Feb 1; 44(3):373-9.
36. Weisser M, Rausch C, Droll A, Simcock M, Sendi P, Steffen I, *et al*. Galactomannan does not precede major signs on a pulmonary computerized tomographic scan suggestive of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis*. 2005 Oct 15; 41(8):1143-9.
37. Walsh TJ, Petraitis V, Petraitiene R, Solomon J, Bacher JD, Greene L, *et al*. Diagnostic imaging of experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*. 2009; 47 Suppl 1:S138-45.
38. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, *et al*. Voriconazole

versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. N Engl J Med. 2002 Aug 8; 347(6):408-15.

39. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. J Infect Dis. 2004 Aug 1; 190(3):641-9.