



Estado actual del diagnóstico precoz de las infecciones invasoras causadas por *Aspergillus* y otros hongos filamentosos emergentes

Amalia del Palacio¹, Almudena Alhambra¹, M^a Soledad Cuétara² y José Pontón³

¹Servicio de Microbiología, Unidad de Micología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid; ²Servicio de Microbiología, Hospital Severo Ochoa, Leganés, Madrid; ³Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao

Resumen La utilidad de los marcadores serológicos en el diagnóstico de las infecciones fúngicas invasoras causadas por *Aspergillus* y otros hongos filamentosos emergentes se fundamenta en la capacidad de estos marcadores de detectar la infección causada por las distintas especies de hongos filamentosos. Los procedimientos microbiológicos tradicionales para el diagnóstico de la infección fúngica son lentos y poco sensibles. La detección de antígenos o de (1-3)- β -D-glucano en sangre han sido desarrollados y validados en laboratorios clínicos. Se revisan estas nuevas herramientas diagnósticas, así como su aplicación clínica e impacto.

Palabras clave Hongos filamentosos, Diagnóstico, (1-3)- β -D-glucano, Galactomanano, Infección fúngica invasora

Early diagnosis of invasive fungal infections of caused by *Aspergillus* and other emerging mycelial fungi

Summary The usefulness of surrogate markers in the diagnosis of invasive fungal infections caused by *Aspergillus* and other emerging mycelial fungi is based on the ability of surrogate markers to detect the infection caused by different species of mycelial fungi. Conventional microbiological methods for diagnosis of fungal disease are slow and insensitive. Antigen based assays or measurement of (1-3)- β -D-glucan in blood have been developed and validated in clinical laboratories. We review these diagnostic contemporary tools, their clinical application and impact.

Key words Mycelial fungi, Diagnosis, (1-3)- β -D-glucan, Galactomannan, Invasive fungal infection

Tradicionalmente el diagnóstico de infección fúngica invasora (IFI) ha requerido de la realización de procedimientos diagnósticos agresivos (obtención de tejidos profundos para la realización de estudio combinado de histopatología y cultivos). En la mayoría de los enfermos con IFI, por tratarse de pacientes inmunosuprimidos, mu-

chos de ellos con hipoxia y problemas de hemostasis, es imposible en la práctica recurrir a estos procedimientos diagnósticos. En los últimos 20 años la incidencia de IFI debida a hongos filamentosos ha aumentado de forma marcada, y se han desarrollado procedimientos diagnósticos menos invasores con la finalidad de mejorar el diagnóstico de IFI y reducir la mortalidad que conllevan las mismas. Estos marcadores serológicos o procedimientos diagnósticos independientes de los cultivos tradicionales permiten la detección de IFI y han sido validados prospectivamente en enfermos que tienen factores de riesgo para adquirir la infección fúngica. Una dificultad añadida es que los signos y síntomas clínicos de IFI son inespecíficos, de aparición tardía en el curso de la infección e incluso muchos enfermos son asintomáticos por la inmunosupresión, por lo que en un elevado número de casos las IFI se diagnostican post-mortem, especialmente las debidas a hongos filamentosos, como demuestra un reciente trabajo en enfermos con cáncer hematológico que abarca de 1989 a 2003 y realizado en un hospital terciario [6].

Dirección para correspondencia:

Dra. Amalia del Palacio
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Doce de Octubre
Avda. de Córdoba s/n
28041 Madrid, España
Tel.: (+34) 913908239
Fax: (+34) 915653765
E-mail: apalacioh.hdoc@salud.madrid.org

©2007 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 €

En esta revisión actualizaremos los conocimientos publicados desde 2005 a junio 2007, en un intento de actualizar las últimas novedades aparecidas en la literatura sobre el diagnóstico indirecto de la aspergilosis invasora (AI) e IFI causadas por hongos filamentosos. También se incluirán los factores de riesgo de AI e IFI, pues es importante que el conocimiento de aquellos permita la estratificación de los enfermos en relación a los factores de riesgo y la adquisición de IFI. La prevalencia de IFI depende de la estratificación y la utilidad de los marcadores mejora indudablemente si se tiene en cuenta este hecho [1].

IFI causadas por *Aspergillus* y otros hongos filamentosos. Aumento de prevalencia

Las IFI causadas por *Aspergillus* y otros hongos filamentosos han dado lugar en estos últimos años a importantes complicaciones infecciosas en receptores de trasplante de órganos sólidos y enfermos oncohematológicos. El agente más prevalente es *Aspergillus fumigatus*, seguido de otras especies de *Aspergillus* y zigomicetos [6,21,61]. La prevalencia de estas infecciones ha aumentado de forma significativa.

En un estudio necrópsico realizado entre 1989 y 2003 en pacientes oncohematológicos del Hospital Anderson Cancer Center, en Houston (Tejas, EE.UU.) las IFI documentadas alcanzaron una prevalencia del 31% (314/1017), siendo de destacar que se observó un aumento significativo de hongos filamentosos ($p < 0,05$), de zigomicetos ($p < 0,03$) mientras que la prevalencia de AI era estable [6]. Es destacable que el 60% de las IFI por hongos filamentosos tenían un cultivo negativo. Esto plantea la necesidad de hacer tinciones fúngicas, de inmunohistoquímica o incluso PCR con los distintos tejidos, como se desprende de los datos de una reciente publicación [62]. En este estudio prospectivo multicéntrico con histopatología positiva de biopsias pulmonares (IFI pulmonar probada) en 27 pacientes (solo fueron positivos los cultivos de 17 casos de los 27), al realizar PCR con los tejidos, se llegó al diagnóstico etiológico de la especie en 26 casos de los 27 ($p = 0,006$), es decir con cultivo se identificó la especie en el 63% de los casos, ascendiendo al 96% cuando se utilizaba la PCR [62].

Otros hongos filamentosos emergentes como *Fusarium*, *Scedosporium* y zigomicetos han aumentado en incidencia posiblemente debido a la mayor inmunosupresión de los enfermos y a la selección de estas especies que son resistentes a la mayor parte de los antifúngicos como consecuencia de la profilaxis y tratamiento empírico antifúngico [48,63].

Definiciones de IFI (Consenso EORTC y NIAID). Sus limitaciones

El patrón de referencia (*gold standard*) que permite establecer de forma probada en enfermos oncohematológicos y receptores de trasplantes de precursores hematopoyéticos la existencia de IFI se basa en los criterios conjuntos de la EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) y el Mycoses Study Group del NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases de EE.UU.) [3]. En la IFI probada, la presencia histo/citopatológica de elementos fúngicos en tejidos y el cultivo positivo de hongos (de localizaciones profundas habitualmente estériles) conjuntamente con datos clínicos o radiológicos compatibles permite establecer esta categorización. En la IFI probable deben cumplirse al menos un

criterio de factor de riesgo, un criterio microbiológico y un criterio clínico mayor (o dos criterios clínicos menores) compatibles con infección [3].

Estas definiciones son útiles para validar las pruebas microbiológicas, especialmente los marcadores serológicos (independientes de los procedimientos microbiológicos tradicionales) [19, 37, 69]. Incluso actualmente cuando se hacen estudios de profilaxis, tratamiento empírico y dirigido con antifúngicos en distintas poblaciones, se utilizan las definiciones de IFI probada y probable en las valoraciones de efectividad (*end-points*) de las distintas drogas antifúngicas [66].

Las propuestas de Ascoglu et al. [3] tienen serias limitaciones y su aplicación in vivo, por ser criterios poco sensibles, infravalora o infradiagnostica las IFI, como muestra la tabla 1, basada en estudios necrópsicos con IFI probada, pues si se hubiesen aplicado estos criterios pre-mórten solo se hubiesen diagnosticado como IFI probadas entre el 25% y el 47%.

Actualmente es necesaria la realización de amplios estudios prospectivos ya que las propuestas del grupo de expertos de la EORTC y del NIAID [3] no han sido validadas prospectivamente. Debe tenerse en cuenta además que no deben ser utilizadas para tomar decisiones clínicas o para evaluar a los pacientes en la práctica habitual con la finalidad de instaurar tratamiento.

Otra seria limitación es que son propuestas hechas para una subpoblación de pacientes (oncohematológicos y receptores de trasplantes de precursores hematopoyéticos) y no se pueden en rigor aplicar a subpoblaciones diferentes (por ejemplo enfermos críticos no neutropénicos, receptores de trasplante de órganos sólidos, pacientes con sida o con enfermedad granulomatosa crónica etc) [11].

Tabla 1. Limitaciones diagnósticas in vivo de los criterios Ascoglu et al. [3].

Acierto en diagnóstico premórten	Nº pacientes IFI probada necropsia	Referencia
36% API*	22	[65]
47% API	47	[18]
25% IFI**	314	[6]

*API: aspergilosis pulmonar invasora

**IFI: infección fúngica invasora

Tabla 2. Incidencia de AI y factores de riesgo en receptores trasplante de órgano sólido. (Modificado de [64])

Trasplante	Incidencia media (%)	Factores de riesgo
Riñón	0,7	Fallo injerto (necesario hemodiálisis) Corticoides (dosis altas y prolongadas)
Hígado	2	Cultivos respiratorios con <i>Aspergillus</i> Retrasplante Fallo renal (necesario hemodiálisis) Indicación de trasplante por fallo hepático fulminante
Corazón	5	Cultivos respiratorios con <i>Aspergillus</i> Reoperación Hemodiálisis postrasplante Infección por citomegalovirus
Pulmón	6	Trasplante de un solo pulmón Infección por citomegalovirus Bronquitis obliterante Rechazo (mayor inmunosupresión)

Factores de riesgo de IFI

Como los síntomas clínicos de IFI son inespecíficos y de aparición tardía (especialmente en inmunodeprimidos) es importante conocer los factores de riesgo de desarrollar IFI. El conocimiento de los factores de riesgo en distintas subpoblaciones permite definir el grupo de enfermos en los que la incidencia de IFI es más elevada. Así por ejemplo, en el caso de AI que es la IFI más frecuente en enfermos oncohematológicos neutropénicos y receptores de precursores hematopoyéticos es mayor según el riesgo de padecer IFI: hace unos años Prentice et al. [59] propusieron una estratificación de los enfermos como de alto, intermedio (alto y bajo) y bajo riesgo de padecer IFI. Estas propuestas han sido ulteriormente validadas por Mc Lintock et al. [38] mediante una PCR panfúngica a tiempo real en un estudio ciego, demostrando que las IFI y los resultados secuenciales positivos de PCR (al menos dos) se correlacionaban de forma directa con la estratificación del riesgo.

Nuestro grupo de trabajo [45] ha validado prospectivamente las propuestas de Prentice et al. [59] utilizando básicamente el galactomanano como herramienta diagnóstica, procedimientos microbiológicos tradicionales, lavados broncoalveolares y estudios radiológicos con tomografía computerizada de alta resolución (CT). La incidencia de IFI se correlacionó directa y significativamente ($p = 0,0229$) con el grupo de riesgo, con mayor incidencia en el grupo de riesgo alto, y disminución de la incidencia de forma significativa según descendía el grupo de riesgo.

Los marcadores fúngicos se pueden utilizar en forma de cribado (*screening*) o bien de forma puntual para confirmar la IFI. Cuando se hacen cribados es de gran importancia la incidencia de la enfermedad fúngica que se quiere diagnosticar, ya que esta es decisiva en el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo [13,45,51].

Singh y Paterson [64] estudian la incidencia y factores de riesgo de AI en receptores de trasplante de órgano sólido (tabla 2) y en la tabla 3 se recogen los correspondientes a receptores de progenitores hematopoyéticos.

En el paciente crítico no neutropénico la incidencia de AI está aumentando en estos últimos años, siendo los enfermos con exacerbaciones de EPOC y en tratamiento con corticoides (especialmente en administración intravenosa) un grupo de riesgo bien definido [70], así como enfermos con shock séptico en tratamiento con corticoides [70], pudiendo estar presentes además algunos factores predisponentes tales como malnutrición, diabetes, enfermedad previa pulmonar y fallo hepático [70]. Incluso es de destacar que la AI puede aparecer en el paciente crítico sin factores de riesgo [39].

Tabla 3. Factores de riesgo de AI en trasplante progenitores hematopoyéticos. (Modificado de [64])

Tipo de trasplante	Comienzo de la infección	Factores de riesgo
TPH*	Temprano (<40 días)	Enfermedad por citomegalovirus Retraso injerto neutrófilos Alentuzumab
TPH*	Tardío (>40 días)	Enfermedad por citomegalovirus Depleción de células T, selección células CD34 EICH** Corticoides dosis > 0,5 mg/kg/día

*TPH: trasplante progenitores hematopoyéticos

**EICH: enfermedad injerto contra huesped

Diagnóstico de AI mediante detección de galactomanano

El galactomanano (GM) es un antígeno del género *Aspergillus* que se encuentra en la pared celular y puede ser detectado en sangre. En Europa está introducido desde hace una década y la FDA lo aprobó en EE.UU. en 2003. El método comercial (Platelia *Aspergillus*, Bio-Rad, Francia,) utiliza el anticuerpo monoclonal EB-A2 como captor y detector del GM, siendo una técnica ELISA de doble *sandwich*, con la ventaja de ser reproducible entre laboratorios.

El GM puede ser utilizado como:

1. Técnica diagnóstica adyuvante para confirmar AI.
2. Herramienta diagnóstica prospectiva (de cribado) para detectar anticipadamente la aspergilosis durante el periodo de riesgo antes de que haga su aparición el primer signo o síntoma clínico de aspergilosis [52,54]
3. Herramienta para monitorizar la respuesta al tratamiento antifúngico [52,54]
4. Criterio de inclusión de pacientes en ensayos clínicos [2,7,8,66].
5. Como herramienta diagnóstica para instituir un tratamiento antifúngico adelantado [30,34].
6. Como herramienta diagnóstica para establecer formas clínicas de AI excepcionales [9,20].

GM como herramienta diagnóstica

La detección de GM en suero, lavado brocoalveolar (BAL) y en otros líquidos corporales es considerada como criterio microbiológico según las definiciones de consenso de la EORTC/NIAID [3], debido fundamentalmente a su buena precisión diagnóstica en enfermos neutropénicos oncohematológicos adultos. Pfeiffer et al. [55] realizan un metaanálisis basándose en datos de 27 publicaciones. En este metaanálisis la sensibilidad media era de 61-71% con una especificidad del 89-93% y un valor predictivo negativo del 95-98% y un valor predictivo positivo bajo (26-53%) en casos de AI probada y probable. El análisis de subgrupos muestra que la prueba es muy sensible en adultos con cáncer hematológico o receptores de trasplante alogénico, mientras que en receptores de trasplante de órgano sólido hay poca experiencia y los estudios existentes no parecen demostrar que el GM sea una herramienta sensible. Es de destacar que en los estudios más estrictos y basados en datos necropsícos y biopsias la sensibilidad se sitúa entre el 90 y el 93% como sucede en los pacientes neutropénicos [32, 35, 60]. Es de destacar sin embargo que en el metaanálisis de Pfeiffer et al. [55], de los 27 estudios incluidos, excepto dos estudios que utilizaban un punto de corte de 0,5, el resto (25 estudios) utilizaban puntos de corte más alto (1,5 a 1) con lo que obviamente la sensibilidad de la prueba es lógicamente menor, siendo la especificidad más elevada.

Cuando el GM fue introducido en Europa, la casa comercial aconsejaba un punto de corte de 1,5 (en dos sueros distintos), mientras que cuando se comercializó en EE.UU., la misma casa comercial aconsejaba un punto de corte inferior, de 0,5 (en dos sueros), aunque ya distintos microbiólogos europeos utilizaban 1 como punto de corte [1,2,19,30,32,34,35,37,45,52,54,55,60,71]. Así en el estudio de Maertens et al. [35], al bajar la positividad de 1,5 a 0,5 aumentó significativamente la sensibilidad un 21% (de 76,3% a 97,4%), a expensas de un descenso de la especificidad del 7% (de 97,5% a 90,5%). Es destacable además, que en el 65% de los enfermos con AI el GM se

positiviza una semana antes de establecer el diagnóstico de AI y en la misma semana en el 79,5% de los casos. Es destacable que en este estudio si se define como positividad dos sueros consecutivos, el rendimiento global de la prueba aumenta (especificidad y valor predictivo positivo), ver tabla 4. Este estudio [35] y otro previo [34] dejan establecido que cuando el GM se estudia en pacientes neutropénicos oncológicos adultos, con riesgo de AI, solo son necesarios dos determinaciones semanales de GM.

GM para monitorizar la respuesta al tratamiento antifúngico

Es conocido que los índices cuantitativos de GM (IGM) se correlacionan con la respuesta al tratamiento [2,43,52,54,74] (Figuras 1-3) y hay datos de que cuando hay reconstitución de la inmunidad y recuperación del número de neutrófilos puede haber un deterioro transitorio clínico y en esta situación el IGM permite según demuestran recientes estudios anticipar y correlacionarlos con respuesta favorable [2,43,74].

GM como criterio de inclusión de pacientes en estudios clínicos

En estudios clínicos publicados en el presente año [2,7,66] con posaconazol y anfotericina B liposómica, la FDA ha autorizado la inclusión del IGM como criterio de reclutamiento ya que aproximadamente el 60% de los pacientes que potencialmente se podrían incluir, se perderían [6,18,65] (ver tabla 1) y dada la utilidad del IGM en pacientes neutropénicos adultos [30,32,35,43,52,54,71,74] se podrían “capturar” o incluir la gran mayoría de los pacientes [6,18,65]. Además con los datos que previamente hemos mencionado sobre su utilidad en la respuesta al tratamiento y monitorización terapéutica, el IGM puede ser también utilizado como un parámetro para medir la respuesta terapéutica de AI así como en estudios de terapia dirigida, empírica y profilaxis [2,7,34,43,52,54,66,74]. Aunque ha sido mantenido [27] que después del tratamiento con caspofungina puede haber un aumento paradójico del IGM en pacientes con AI, este hecho, común en modelos animales con AI tratados con caspofungina, no ha sido observado en humanos de forma determinante [31,44].

Es destacable que en el hombre existe una alta concordancia (cuantitativa y cualitativa) entre el IGM y la supervivencia [12,30,31,34,35,43,52,54,74], con la ventaja añadida de que el IGM baja con rapidez cuando el tratamiento es eficaz [34,35,43,52,54,74]. Por otro lado hay que resaltar que los IGM aumentan en las infecciones debidas a las distintas especies de *Aspergillus*, así como en las diversas localizaciones anatómicas de la AI [34,35,43,52,54,74].

GM como herramienta diagnóstica para instituir tratamiento antifúngico adelantado

Actualmente se cuestiona el tratamiento empírico en los pacientes neutropénicos febriles: sería tratar a muchos sin IFI o AI y solo unos pocos con micosis profun-

Tabla 4. Punto de corte (0,5) de GM según [35], estudio conjunto Europeo (239 episodios, 203 enfermos)

Suero	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
1 GM (+)	97,4	90,5	66	99,4
2 GM (+)	92,1	97,5	87,5	98,5

S: sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo

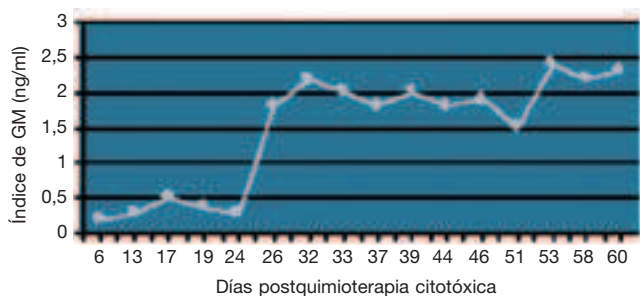


Figura 1. Cinética de la antigenemia de galactomanano en un paciente neutropénico que presentó mortalidad atribuible a aspergilosis invasora y no respondió al tratamiento con anfotericina B. Reproducido de [57].

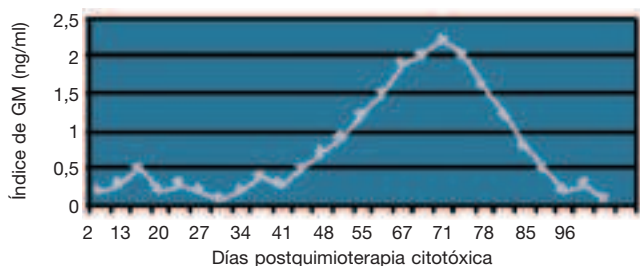


Figura 2. Cinética de la antigenemia de galactomanano en un paciente neutropénico con aspergilosis invasora con respuesta satisfactoria clínico-radiológica tras el tratamiento con anfotericina B. Reproducido de [57].

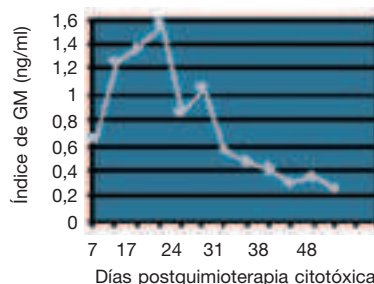


Figura 3. Cinética de la antigenemia de galactomanano en un paciente neutropénico con síndrome mielodisplásico y aspergilosis invasora que mostró buena respuesta clínico-radiológica tras el tratamiento con voriconazol. Reproducido de [57].

das [12,30,34]. Basándose en el conocimiento clínico de que pacientes tienen riesgo de IFI y monitorizándolos estrechamente de forma prospectiva mediante GM en conjunción con tomografía computerizada (CT) es posible en la práctica clínica mejorar el diagnóstico de AI mediante la institución de un tratamiento adelantado [30,34]. Dado el alto rendimiento diagnóstico del GM en enfermos adultos con neutropenia y malignidad hematológica como demuestran un gran número de estudios realizados en Europa en la última década, Maertens et al. [34], en 136 episodios han realizado un estudio prospectivo consiguiendo reducir el tratamiento antifúngico empírico de forma significativa (del 35% al 7,7%), es decir una reducción del 78% y además permitió en 10 episodios de AI (7,3%) instaurar tratamiento antifúngico adelantado. Con esta estrategia consiguió diagnosticar todos los casos de AI (19 casos), siendo la supervivencia de los enfermos a las 12 semanas con IFI del 63,6% y del 63,1% en los enfermos que tenían AI.

GM como herramienta diagnóstica para establecer formas clínicas de AI excepcionales

Hope et al. [20] han acuñado un nuevo término: "AI con localización desconocida". Se trataría de casos clínicos en que el diagnóstico ante-mortem de AI se basaría en la positividad del GM en sangre, pero en los que a pesar de investigarlos adecuadamente, con CT y diversas exploraciones radiológicas, no sería posible localizar el lugar anatómico donde se localizaría la infección. Esta llamada "aspergilosis serológica", podría asentar en el intestino, miocardio, bazo, hígado e incluso en el pulmón pero clínicamente podría no ser aparente porque las técnicas de imagen no serían suficientemente sensibles para detectarlas o podría ser debido a que los pacientes recuperasen el número y función de los neutrófilos quedando limitados los focos infectivos, o incluso como consecuencia de la administración de tratamiento antifúngico. La conjunción positiva de otros marcadores de *Aspergillus* tales como BG y PCR reforzarían esta propuesta de Hope et al. [20]. Un punto de vista que apoyaría la definición de Hope et al. [20] es compartido también por Anaissie [2], pues para él, la mayoría de los GM calificados como falsos positivos representarían verdadera antigenemia como consecuencia de evaluación diagnóstica incompleta, que requeriría comparar con la prueba patrón (estudios necrópsicos).

Cúetara et al. [9] han descrito un caso de onicomicosis de mano con intensa afectación del tejido subcutáneo de la tercera falange debida a *A. fumigatus* en una enferma con linfoma no-Hodgkin (Figura 4) y antecedente traumático (manicura con retirada de cutícula del dedo) el día previo al autotrasplante. El IGM fue positivo, siendo este caso por consiguiente una nueva forma de AI.

Limitaciones del GM en el diagnóstico de AI

Los resultados falsos positivos de GM pueden aparecer como consecuencia del tratamiento antibiótico con piperacilina-tazobactam [4] y amoxicilina-clavulánico [5,42]. Los IGM bajan al parar el tratamiento antibiótico, pero en enfermos con insuficiencia renal pueden continuar elevados durante varios días [16]. Otra causa de falsa reactividad puede ser debida a alimentación parenteral con Racol, que contiene proteínas de soja [46], así como a la colonización gastrointestinal frecuente en niños pequeños con *Bifidobacterium* [40] y a infección con *Cryptococcus neoformans* [10] que contiene epítomos con reacciones cruzadas con el GM de *Aspergillus*.

Otra posible fuente de falsa reactividad es la ingestión alimentaria de cereales y derivados ricos en galactofurana y de leches maternizadas. Los pacientes con alteración de la barrera intestinal, situación común en los enfermos neutropénicos con mucositis intensa debida a la quimioterapia pueden presentar falsa reactividad.

Otros hongos que dan lugar a IFI como *Penicillium*, *Alternaria* y *Paecilomyces* tienen reactividad con los anticuerpos monoclonales EB-A2 utilizados en la prueba comercial de Platelia *Aspergillus*. Es de destacar que estas especies se implican con poca frecuencia en la infección fúngica en el hombre.

Utilizando como punto de corte $\geq 0,5$ la tasa de falsos negativos es baja y como han demostrado Marr et al. [36] en un reciente estudio, la administración profiláctica o empírica de antifúngicos con actividad anti-*Aspergillus* es en la práctica clínica el factor más importante que determina la falsa reactividad, teniendo un enorme impacto sobre la sensibilidad del GM, por consiguiente la utilidad diagnóstica se minimiza.

También es bien sabido que cuando la carga fúngica es limitada como sucede en pacientes con infección aspergilar restringida a las vías aéreas (traqueobronquitis en receptores de trasplante de pulmón y pacientes con sida) la determinación de IGM es de poca utilidad [37].

En una reciente publicación Weisser et al. [72] afirman que la monitorización prospectiva de GM no facilita el diagnóstico adelantado de AI, pero en este estudio es de destacar que la metodología no es adecuada (incluyen enfermos con bajo riesgo, el 17% fue tratado con piperacilina-tazobactam o tratamiento antifúngico con actividad frente a *Aspergillus* 36% y el número de pacientes con AI probada o probable era bajo).

Una ventaja del Platelia *Aspergillus*, es que tiene una excelente reproducibilidad entre laboratorios [67].

Recapitulación e incógnitas por resolver con galactomanano

- La tasa de GM falsos positivos es baja, siendo factores importantes la encapsulación de la infección, traqueobronquitis (receptores de trasplante pulmón y sida), poblaciones no seleccionadas, pero con mucho, el tratamiento empírico y profiláctico con drogas activas frente a *Aspergillus* es el factor más importante.
- Los falsos positivos oscilan entre el 8% y el 14%, siendo más frecuentes en la población pediátrica, en receptores de trasplante de médula ósea, enfermedad de injerto contra huésped, pacientes con mucositis (especialmente con ingesta de cereales, leche maternizada) existiendo reactividad cruzada con *Penicillium*, *Alternaria*, *Paecilomyces lilacinus*, *C. neoformans* y asociándose también a bacteriemias y a la administración de amoxicilina-clavulánico y piperacilina-tazobactam.
- En la insuficiencia renal y en pacientes sometidos a hemodiálisis puede haber aumento paradójico de GM a pesar de existir una respuesta clínica favorable.

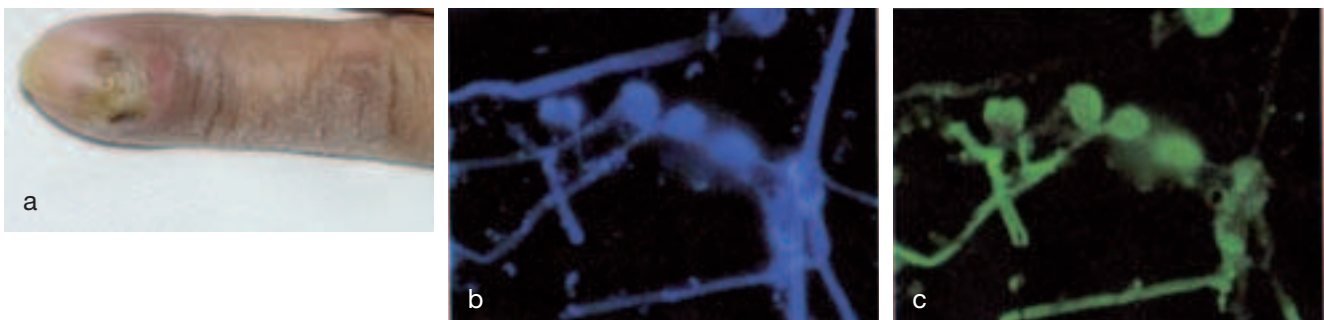


Figura 4. a) Onicomicosis subungueal de dedo meñique debida a *Aspergillus fumigatus*. b) Examen directo del pus del pliegue ungueal con KOH y tinción de calcofluor. c) Examen con inmunofluorescencia con un anticuerpo comercial monoclonal frente a *Aspergillus* del pus del pliegue ungueal.

- Actualmente el punto de corte que se debe elegir es de 0,5, siendo la especificidad mayor cuando se requieren dos sueros positivos, aumentando también el valor predictivo de la prueba positiva y manteniéndose el valor predictivo de la prueba negativa, bajando la sensibilidad poco.
- El GM es un buen marcador terapéutico y diagnóstico y actualmente se incluye en los ensayos clínicos como un criterio más de inclusión y validación de la actividad terapéutica.
- Se acepta que cuando se hace un cribado prospectivo de GM en sangre en enfermos oncohematológicos neutropénicos con riesgo de AI, basta con hacer la determinación en suero dos veces por semana.
- Actualmente está todavía sin definir la utilidad del GM en poblaciones no neutropénicas (receptores de trasplante de órganos sólidos, enfermedad granulomatosa crónica, pacientes críticos no neutropénicos, población pediátrica, sida, etc)
- De cara al futuro son necesarios estudios sobre la relación entre el coste y efectividad cuando se monitoriza prospectivamente el GM.
- En enfermos con traqueobronquitis aspergilar es necesario realizar estudios prospectivos sobre la utilidad de la detección de GM en el lavado broncoalveolar.
- Recordar que en el hombre existe una fuerte concordancia (cuantitativa y cualitativa) entre el IGM y la supervivencia y los valores de IGM se correlacionan con la carga fúngica.
- La positividad del IGM antecede a los hallazgos clínicos y radiológicos, permitiendo establecer un tratamiento antifúngico adelantado.
- Como síntesis puede afirmarse que el IGM es un procedimiento no invasivo, barato, estandarizado, reproducible y los valores de IGM se correlacionan con la carga fúngica, siendo un procedimiento diagnóstico que puede calificarse de excelente en pacientes neutropénicos adultos.
- La mortalidad de los pacientes con AI es muy elevada, habiéndose observado que a partir del año 2002, la supervivencia es significativamente mayor. Entre los factores asociados a un menor riesgo de mortalidad se citan como muy relevantes el diagnóstico más temprano por la utilización conjunta de GM y CT, así como el tratamiento con voriconazol [68].

Diagnóstico de IFI mediante (1-3)- β -D-glucano: marcador panfúngico

La utilización del marcador panfúngico (1-3)- β -D-glucano (BG) permite cuando se determina en suero (suero) hacer un diagnóstico de IFI. El BG es un polisacárido de la pared celular de los hongos excepto de *Cryptococcus neoformans* y los mucorales. La presencia en suero y otros líquidos corporales de BG indica la existencia de IFI. Los procariontes, virus y las células de los mamíferos están desprovistos de BG. EL BG reacciona con un sustrato cromógeno y se realiza una lectura colorimétrica.

La detección de BG es posible por la existencia de pruebas comerciales: Wako Pure Chemical Industries (Japón), Seikagaku Kogyo Corporation (Japón), Maruha Corporation (Japón) y Asociados de Cape Code (EE.UU.). La prueba desarrollada por los Asociados de Cape Code (Fungitell, previamente conocida como Glucatell) ha sido aprobada recientemente por la FDA para el diagnóstico clínico

de IFI y es posible su adquisición en España a través de un distribuidor.

El BG es un marcador panfúngico y puede detectar la presencia de IFI causadas por *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Scedosporium*, *Pneumocystis jiroveci*, etc, aunque actualmente faltan estudios prospectivos sobre el papel del BG en el establecimiento de diagnóstico del IFI en las distintas subpoblaciones de enfermos con riesgo.

Hay que resaltar que la molécula de BG es ubicua en el entorno, por lo que las contaminaciones de laboratorio son frecuentes y el BG ha sido utilizado como un marcador de biomasa fúngica [15]. El BG es insoluble en agua y diversas bacterias, la mayoría de las plantas superiores y muchas plantas inferiores contienen BG.

Hay que tener en cuenta que es necesario utilizar material (tubos, pipetas, jeringas, etc) libres de BG (endotoxinas de bacterias y BG de hongos) que pueden dar lugar a falsos positivos.

En la actualidad la cinética de BG en el hombre es todavía poco conocida; no hay datos sobre su producción, paso al torrente circulatorio, metabolismo y vías de excreción. La presencia o ascenso de niveles de BG en sangre, a pesar del tratamiento antifúngico, parece indicar según datos preliminares, la falta de respuesta al tratamiento en casos de AI y candidiasis invasora [53,54]. Así mismo, valores descendentes de BG también se correlacionan con una mejoría o curación clínica [53,54]. Estos datos parecerían indicar que el BG es un marcador útil para monitorizar el tratamiento antifúngico, aunque es necesario ampliar la experiencia clínica disponible.

Limitaciones del BG en el diagnóstico de IFI

BG falsos positivos pueden aparecer en enfermos en hemodiálisis con membranas de celulosa [24], o tratados con inmunoglobulinas humanas intravenosas [22], polisacáridos antitumorales [23], enfermos quirúrgicos curados con gasas o esponjas que contengan glucano [47], inhalación de glucano fúngico del aire [15], así como en los tratamientos con albúmina, factores de coagulación y proteínas plasmáticas [22]. La mucositis debida a quimio o radioterapia puede permitir el paso a la sangre de BG de origen alimentario, así como de *Candida* que colonizan el tracto gastrointestinal.

Así mismo los enfermos con bacteriemias y los tratados con amoxicilina-clavulánico pueden dar también falsos positivos [41,53,54,56]. La presencia de hemólisis en los sueros ocasiona BG falsos positivos y los niveles altos de bilirrubina y triglicéridos dan lugar a BG falsos negativos con Fungitell [56]. Hay que tener en cuenta que la manipulación sucesiva con tubos y material de laboratorio no libres de BG pueden dar lugar a contaminaciones y por consiguiente a una falsa positividad [56].

Utilidad diagnóstica del BG en AI

La experiencia acumulada con los distintos equipos comercializados de BG en el diagnóstico de IFI es limitada [49].

Las pruebas comercializadas en Japón de BG (por Wako, Seikagoku y Maruha) son de difícil adquisición fuera de este país, mientras que el Fungitell está comercializado y se puede adquirir con facilidad en España desde el año 2005 y nos referiremos en adelante a esta prueba comercial. En el diagnóstico de IFI mediante BG se tienen más datos disponibles en el diagnóstico de candidiasis invasora (CI), seguido de AI. La experiencia diagnóstica con otras micosis profundas causadas por hongos filamentosos es verdaderamente anecdótica: cuatro casos causados

Tabla 5. Comparación temporal de BG y GM en el diagnóstico de AI, según referencia [54] en pacientes con AI probada y AI probable.

Antigenemia con BG			
Evento	Pacientes evaluados (n)	n (%) con BG(+)	Días entre la detección BG y el evento (rango)
Primer día de fiebre	7	2 (28,2)	5 (4-6)
Primer día con signos clínicos	7*	4 (57,1)	10,7 (4-21)
CT pulmonar	7	7 (100)	9,3 (1-21)
Inicio del tratamiento antifúngico	7	5 (71,4)	14 (4-25)
Antigenemia con GM			
Primer día de fiebre	7	1 (14,3)	4 (4)
Primer día con signos clínicos	7*	3 (42,8)	9 (4-15)
CT pulmonar	7	6 (85,7)	7,2 (1-15)
Inicio del tratamiento antifúngico	7	4 (57,1)	12,5 (1-23)

*Tos y/o disnea y/o hemoptisis y/o dolor torácico.

por *Fusarium* (probados) [49] y tres casos de fusariosis probada estudiadas por Ostrosky-Zeichner et al. [50]. En estos siete casos de fusariosis probadas el BG fue positivo, siendo destacable que antecedía su positividad en 10 días a la aparición del primer signo o síntoma clínico en la publicación de Odabasi [49], y en el caso de las tres fusariosis probadas por Ostrosky-Zeichner et al. [50] como todo el estudio se basaba en la obtención de una sola muestra de suero una vez establecido por diversos procedimientos el diagnóstico de IFI, la secuencia temporal era imposible de establecer.

En el diagnóstico de AI, Pazos et al. [54] han comparado la utilidad diagnóstica de BG y GM en 40 pacientes (episodios) neutropénicos adultos de alto riesgo. En esta población hubo cinco AI probadas, tres AI probables y tres AI posibles y se obtuvieron muestras de suero bisemanalmente durante todo el periodo de riesgo, utilizando como punto de corte positivo 120 pg/ml (ver tabla 5).

Este estudio sugiere que la detección de BG (Fungitell) es una herramienta diagnóstica de AI (con una sensibilidad del 87,5%, especificidad 89,6%, valor predictivo de la prueba positiva 70% y valor predictivo de la prueba negativa 96,3%) [54] siendo la tasa de falsos positivos del 10,3%. Cuando se comparan estos datos con los disponibles por la FDA para el diagnóstico de AI, la S era más baja (del 80%) y la especificidad era también inferior (del 81%) [17]. Así por ejemplo en un estudio prospectivo realizado por Kawazu et al. [25] utilizando el equipo comercial de Wako, la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo de la prueba positiva y el valor predictivo de la prueba negativa del BG era del 55%, 93%, 40% y 96% respectivamente. Esta alta sensibilidad del Fungitell podría ser inherente a la técnica comercial, a la frecuencia de la obtención de sueros (bisemanalmente en el estudio de Pazos et al.) [54] y a los diferentes puntos de corte utilizados en los distintos trabajos publicados [25,49,50,54,56]. Un hecho importante es que en el trabajo de Pazos et al. [54] la positividad temporal del BG era significativamente más temprana con BG que con GM en relación a la aparición de fiebre, signos clínicos, imágenes radiológicas con CT etc., como muestra la tabla 5.

Utilidad diagnóstica conjunta de GM y BG en el diagnóstico de AI

Datos iniciales [9,54] en el diagnóstico microbiológicos de AI parecen indicar que tanto el GM, como el BG son positivos en los casos de AI probada y AI probable. Es también destacable que la cinética de ambos marcadores es

bastante similar, aunque como muestra la tabla 5 la antigenemia positiva con BG se positiviza temporalmente antes que con GM.

Es destacable que hay discrepancias en los enfermos con resultados falsos positivos ya que los enfermos sin AI pero con BG falsos positivos, son negativos con GM y los enfermos con GM falsos positivos son negativos con BG (ver tabla 6). La utilización conjunta de ambos marcadores permite según estos datos aumentar la especificidad y el valor predictivo de la prueba positiva al 100%, y por consiguiente aumentar la rentabilidad diagnóstica. La monitorización de BG y GM en el suero es concordante y predice la evolución en los enfermos con AI (ver figura 5).

Recapitulación e incógnitas por resolver con (1-3)- β -D glucano en el diagnóstico de AI

Dada la escasez de datos publicados, actualmente no es bien conocida la tasa de BG falsos negativos en las distintas poblaciones con riesgo de AI aunque es conocido el hecho de que las concentraciones altas de bilirrubina y triglicéridos ocasionan falsos negativos.

- En un primer estudio retrospectivo [49] en pacientes con leucemia mieloide aguda y síndrome mielodisplásico (Glucatell: punto de corte 60 pg/ml) la eficacia diagnóstica de BG al parecer no se vería influida (disminuida) por el tratamiento antifúngico profiláctico o empírico, aunque como en este estudio el número de enfermos con AI era muy bajo (una AI probada y tres AI probables) es una afirmación que no puede generalizarse a los enfermos con AI. Es decir, el efecto del tratamiento antifúngico sobre el BG está sin determinar.

Actualmente hay datos limitados sobre los BG fal-

Tabla 6. Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo de la prueba positiva, valor predictivo de la prueba negativa comprando BG y GM, según referencia [54] en pacientes con AI probada y AI probable.

	*BG	**GM	BG y GM
S (%)	87,5	87,5	87,5
E (%)	89,6	89,6	100
VPP (%)	70	70	100
VPN (%)	96,3	96,3	96,3

*y** El porcentaje de falsos positivos era del 10,3% con cada marcador, siendo los enfermos falsos positivos diferentes con cada prueba diagnóstica.

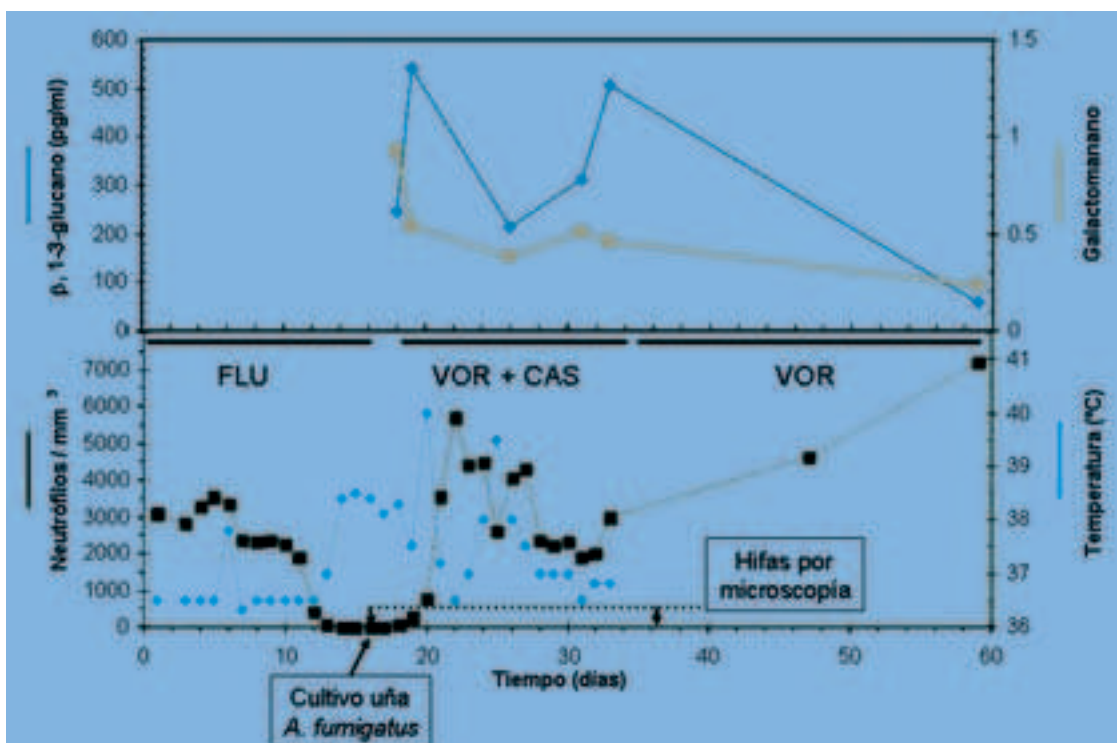


Figura 5. Cinética del GM y BG en un caso de onicomicosis por *Aspergillus fumigatus* en una enferma con linfoma no-Hodgkin [9]

pos positivos [15,22-24,41,47,53,54,56,61] en las poblaciones con riesgo alto de AI e IFI. Por otro lado faltan datos de estudios prospectivos y una cantidad no desdeñable de estudios publicados carecen de la metodología adecuada [49,50,56]. La falsa positividad aparece en enfermos en hemodiálisis con membranas de celulosa, en tratamiento con inmunoglobulinas humanas intravenosas, con polisacáridos antitumorales, pacientes expuestos a gasas o esponjas quirúrgicas, en tratamiento con albúmina, factores de coagulación y proteínas plasmáticas. Los enfermos con bacteriemias y los tratados con amoxicilina-clavulánico pueden tener falsa positividad. La mucositis intensa (por quimio o radioterapia) así como la colonización por *Candida* del tracto gastrointestinal pueden ocasionar falsa reactividad.

- Debe recordarse que la manipulación sucesiva de tubos y material de laboratorio son fuente frecuente de contaminaciones por lo que se recomienda manipulación mínima de las muestras para evitar contaminaciones. Se debe utilizar material exento de endotoxinas y glucano.
- La presencia de hemólisis da lugar también a una falsa reactividad.
- Está sin definir el punto de corte óptimo, ni si se deben utilizar distintos puntos de corte en las distintas subpoblaciones. Tampoco está definido si la positividad se debe basar en la positividad de un solo suero (punto de corte estático) o dos sueros consecutivos positivos (punto de corte dinámico).
- Tampoco está establecido con que periodicidad deben extraerse los sueros durante el periodo de riesgo para determinar el BG, pues se conoce poco la cinética, aunque según datos preliminares la extracción bisemanal sería de momento preferible.

- Se dispone de pocos datos clínicos y micológicos prospectivos sobre si el BG discrimina entre colonización e infección fúngica.
- El hecho de que en estudios publicados el valor predictivo de la prueba negativa es elevado serviría para excluirlos en enfermos con riesgo la existencia de IFI.
- Puesto que el BG es un marcador panfúngico, cuando se estudien pacientes con riesgo de IFI en los que aparezcan determinaciones positivas de BG es necesario realizar maniobras exploratorias (CT de alta resolución, ecografías, BAL, biopsias, etc.) para descartar o afirmar la existencia de IFI.

Consideraciones finales

Para que una técnica diagnóstica pueda ser validada se requiere que esté estandarizada, consiguiéndose este objetivo mediante la comercialización, que permite la validación externa multicéntrica, como recientemente comenta Donnelly en un artículo editorial [14].

Actualmente la detección del GM de *Aspergillus* y de BG (componente de la pared fúngica, excepto de *Cryptococcus* y mucorales) permiten hacer estudios multicéntricos, aunque estos estudios deben reunir unas características de diseño muy estrictas [69]. Estos estudios deben incluir un grupo control que debe estar constituido por la subpoblación en riesgo que se está estudiando pero no tiene IFI. Se deben además hacer cultivos semicuantitativos de *Candida* y levaduras. El análisis de los resultados en el caso del BG (por ser marcador panfúngico) debe hacerse en relación con las distintas especies etiológicas productoras de IFI. El desarrollo de marcadores diagnósticos serológicos es necesario puesto que las técnicas microbiológicas tradicionales son poco sensibles, se positivizan tardíamente y tienen un impacto muy limitado en el diagnóstico y manejo de IFI [33].

Es necesario estratificar a los enfermos cuando se validan las pruebas diagnósticas y describir detalladamente la subpoblación en estudio, así como sus características [58]. Se requiere además estudiar a los enfermos prospectivamente mientras dure el periodo de riesgo. Hay que tener en cuenta que para el clínico el valor predictivo (positivo y negativo) es más útil, pues indica la probabilidad de que el paciente esté o no esté infectado [14,33]. Puesto que los valores predictivos dependen de la prevalencia de IFI en la población que se va a estudiar [26] es deseable que ésta sea al menos superior al 10%.

La sensibilidad diagnóstica del GM y, al parecer según un estudio inicial [54], del BG en el diagnóstico de AI, es alta en una población definida: pacientes con riesgo alto con leucemia aguda, síndrome mielodisplásico y receptores de trasplante alogénico o en tratamiento por enfermedad del injerto contra huésped [54]. Los niveles de GM son muy altos cuando la carga fúngica y la angioinvasión es alta como sucede en los neutropénicos [6] mientras que en los pacientes tratados con corticoides el grado de inflamación es grande, hay poca carga fúngica y los niveles de GM son bajos [6].

Cada prueba diagnóstica de las aquí revisadas tiene limitaciones y discrepancias cuando se comparan entre sí, y por ello es útil emplear, conjuntamente el GM y el BG en el diagnóstico de AI (y en el caso de otras IFI incluyendo si es posible la detección de anticuerpos antimicelio de *C. albicans*, mananos e incluso PCR) para intentar superar las limitaciones inherentes de cada prueba diagnóstica.

Otras posibilidades de diagnóstico de AI de cara al futuro están en fases de desarrollo preliminares, como por ejemplo la detección de gliotoxina en las AI debidas a *A. fumigatus* y *Aspergillus niger* [28,29].

El impacto que pueden tener en el futuro los distintos marcadores de AI y de IFI está en desarrollo: se requieren amplios estudios para detectar el coste-efectividad, impacto sobre la supervivencia, diagnóstico (adelantado), sobre el tratamiento antifúngico (profilaxis, tratamiento empírico) en las distintas subpoblaciones con riesgo de IFI. Todavía el diagnóstico de AI y de otras IFI es un reto para el clínico y el microbiólogo, como muestran los datos necrópsicos de enfermos con cáncer hematológico: el 75% de las IFI no fueron diagnosticadas en vida del enfermo [6]. Esto refleja las limitaciones actuales de las pruebas diagnósticas.

Los estudios necrópsicos permiten establecer la calidad médica en los hospitales y, sin embargo, el porcentaje de necropsias descende en todos los hospitales del mundo [73]. En el caso de las enfermedades infecciosas hasta el 30% de las mismas son detectadas post-mortem [73], aunque esta tasa es más elevada en el caso de IFI [6].

Una dificultad añadida en la validación clínica de los marcadores es que deben basarse en la obtención de biopsias profundas y datos necrópsicos; por ello se comprende que en la validación del GM, los estudios realizados por Maertens [30-35] reúnen todos estos requerimientos y resultan irrefutables, siendo todavía el GM el único marcador validado e incluido como criterio microbiológico por el grupo de expertos de la EORTC y del NIAID [3].

Una dificultad añadida es que incluso los cultivos de biopsias con invasión fúngica son negativos en el 38% de los casos según se sugiere en una reciente publicación [62] por lo que es posible según estos datos que haya que realizar además PCR con los tejidos en lugar de únicamente el cultivo pues la PCR permite aumentar de forma significativa el diagnóstico de la especie fúngica infectante (del 63% al 96%) cuando se compara con el cultivo microbiológico tradicional [62].

Los autores agradecen a la Dra. María Dolores Moragues la realización de la figura 5. Los autores de este trabajo tienen concedidas las siguientes becas: Becas PI040776 (a AdP) y PI040556 (a JP) del Fondo de Investigación Sanitaria, de la Fundación Mutua Madrileña Automovilística (a AdP) y una beca concedida por Pfizer España (a AdP).

Bibliografía

1. Alexander BD, Pfaller MA. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. *Clin Infect Dis* 2006; 43: S15-S27.
2. Anaissie EJ. Trial design for mold-active agents: time to break the mold-aspergillosis in neutropenic adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1298-1306.
3. Ascioğlu SJ, Rex JH, de Pauw B, Bennet JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and haematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 7-14.
4. Aubry A, Porcher R, Bottero J, Touratier S, Leblanc T, Brethon B, Rousselot P, Raffoux E, Menotti J, Derouin F, Ribaud P, Sulahian A. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with β -Lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 389-394.
5. Bart-Delabasse E, Basile M, Al Jijakli A, Souville D, Gay F, Philippe B, Bossi P, Danis M, Vernant JP, Detry A. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigenemia to determine biological and clinical implications of beta-lactam treatments. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5214-5220.
6. Chamilos G, Luna M, Lewis RE, Bodey GP, Chemaly R, Tarrand JJ, Safdar A, Raad II, Kontoyannis DP. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy over a 15 year period (1989-2003). *Haematologica* 2006; 91: 986-989.
7. Cornely OA, Maertens J, Bresnik M, Ebrahimi R, Ullmann AJ, Bouza E, Heussel CP, Lortholary O, Rieger C, Boehme A, Aoun M, Horst HA, Thiebaut A, Ruhnkne M, Reichert D, Vianelli N, Krause SW, Olavarria E, Herbrecht R; AmBiLoad Trial Study Group. Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high loading dose regimen with standard dosing (ambload trial). *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1289-1297.
8. Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, Perfect J, Ullmann AJ, Walsh TJ, Heygott D, Holowiecki J, Stockellberg D, Goh YT, Petrini M, Hardalo C, Suresh R, Angulo-Gonzalez D. Posaconazole vs fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 2007; 356: 348-359.
9. Cuétara MS, Alhambra A, Moreno JM, Postigo C, Moragues MD, Pontón J, del Palacio A. Invasive aspergillosis due to subungueal onychomycosis during treatment for non-Hodgkin lymphoma. *Br J Dermatol* 2006; 154: 1199-1219.
10. Dalle F, Charles PE, Blanc K, Caillot D, Chavanet P, Dromer F, Bonnin A. *Cryptococcus neoformans* galactotoxylomannan contains an epitope(s) that is cross-reactive with *Aspergillus* galactomannan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2929-2931.
11. de Pauw BE, Patterson TF. Should consensus guidelines specific criteria for the diagnosis of invasive fungal infection be changed? *Clin Infect Dis* 2005; 4: S377-S380.
12. de Pauw B. Between over and undertreatment of invasive fungal disease. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1251-1253.
13. del Palacio A, Alhambra A, Cuétara MS. Factores de riesgo de la candidiasis invasora: estratificación. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 29-31.
14. Donnelly JP. Polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis: getting closer but still a way to go. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 487-489.
15. Douwes J. (1-3)-beta-D glucans and respiratory health: a review of the scientific evidence. *Indoor Air* 2005; 15: 160-169.
16. El Saleeby C, Allison K, Knapp K, Walsh T, Hayden R. Discordant rise in galactomannan antigenemia in a patient with resolving aspergillosis, renal failure, and ongoing hemodialysis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3560-3563.
17. Food and Drug Administration. Medical devices, immunology and microbiology devices; classification of the beta-glucan serological assay. Final rule. *Fed Regist* 2004; 69: 56934-56936.
18. Hachem R, Sumoza D, Hanna H, Girgawy E, Munsell M, Raad I. Clinical and radiologic predictors of invasive pulmonary aspergillosis in cancer patients. Should the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group (EORTC/MSG) criteria be revised? *Cancer* 2006; 106: 1581-1586.
19. Hope W, Walsh T, Denning D. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 609-622.
20. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. *Med Mycol* 2005; 43: S207-S238.
21. Husain S, Alexander BD, Muñoz P, Avery RK, Houston S, Prueett T, Jacobs R, Dominguez EA, Tollemer JG, Baumgarten K, Yu CM, Wagener MM, Linden P, Kusne S, Singh N. Opportunistic mycelial fungal infections in organ transplant recipients: emerging importance of non *Aspergillus* mycelial fungi. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 221-229.
22. Ikemura K, Ikegami K, Shimazu T, Yoshioka T, Sugimoto T. False positive result in *Limulus* test caused by *Limulus amoebocyte* lysate reactive material in immunoglobulin products. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1965-1968.
23. Kakinuma A, Asano T, Torii H, Sugino Y. Gelation of *Limulus amoebocyte* lysate by an antitumor (1-3)-beta-D glucan. *Biochem Biophys Res Com* 1981; 101: 434-439.
24. Kato A, Takita T, Furuhashi M, Takanashi T, Maruyama Y, Hishida A. Elevation of blood (1-3)-beta-Dglucan concentrations in hemodialysis patients. *Nephron* 2001; 89: 15-19.
25. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kwokawa M, Chiba S, Motokura T, Hirai H, Ogawa S. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1-3)-beta-D glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2733-2741.
26. Klont RR, Meis JFG, Verweij PE. Critical assessment of issues in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: S32-S37.
27. Klont R, Mennink-Kersten M, Ruegebrink D, Rijs A, Blijlevens N, Donnelly JP, Verweij P. Paradoxical increase in circulating *Aspergillus* antigen during treatment with caspofungin in a patient with pulmonary aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2006; 43: e23-e25.
28. Lewis RE, Wiederhold NP, Chi J, Han XY, Komanduri KV, Kontoyannis DP, Prince RA. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infect Immun* 2005; 73: 635-637.
29. Lewis RE, Wiederhold NP, Lionakis MS, Prince RA, Kontoyannis DP. Frequency and species distribution of gliotoxin producing *Aspergillus* isolates recovered from patients at a tertiary care center. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 6120-6122.
30. Maertens J, Deeren D, Dierckx D, Theunissen K. Preemptive antifungal therapy: still a way to go. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19: 551-556.
31. Maertens J, Glasmacher A, Selleslag D, Ngai A, Ryan D, Layton M, Taylor A, Sable C, Kartsonis N. Evaluation of serum sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for circulating galactomannan during caspofungin therapy: results from the caspofungin invasive aspergillosis study. *Clin Infect Dis* 2005; 41: e9-e14.
32. Maertens JA, Theunissen K, Deeren D, Meerssman W, Van Eldere J. Defining a case of invasive aspergillosis by serum galactomannan. *Med Mycol* 2006; 44: S173-S178.
33. Maertens J, Theunissen K, Lodewyck T, Lagrou K, Van Eldere J. Advances in the serological diagnosis of invasive aspergillosis infections in patients with hematological disorders. *Mycoses* 2007; 50: S1-S17.
34. Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, Werschakelen J, Lagrou K, Verbeken E, Wilmer A, Verhagen J, Boogaerts M, Van Eldere J. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1242-1250.
35. Maertens JA, Klont R, Masson C, Theunissen K, Meerssman W, Lagrou V, Heinen C, Crepin B, Vand Eldere J, Tabouret M, Donnelly JP, Verweij PE. Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1329-1336.
36. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1762-1769.
37. Marr KA, Leisenring W. Design issues in studies evaluating diagnostic tests for aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2005; 41: S381-386.
38. McLintock LA, Jordanides NE, Allan EK, Copland M, Steward K, Parker A, Devaney M, Holyoake M, Jones BI. The use of a risk group stratification in the management of invasive fungal infection: a prospective validation. *Br J Haematol* 2004; 124: 403-404.
39. Meerssman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 621-625.
40. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Klont RR, Warris A, Gavini F, Opden Camp JM, Verweij PE. Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false positive Platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2929-2931.
41. Mennink-Kersten M, Warris A, Verweij P. (1-3)-beta-D glucan in patients receiving intravenous amoxicillin-clavulanic acid. *N Engl J Med* 2006; 354: 2834-2835.

42. Metan G, Durusu M, Uzun O. False positivity for *Aspergillus* antigenemia with amoxicillin-clavulanic acid. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2548-2549.
43. Miceli MH, Graziutti M, Woods G, Diaz J, Krishna S, Kiwan E, Syed M, Barlogie B, Anaissie E. Outcome of invasive aspergillosis (IA) in 30 patients with hematological cancer: immunity is (almost) everything. *Blood* 2006; 108: 5314.
44. Miceli MH, Anaissie E. When a paradoxical increase in serum galactomannan antigen during caspofungin therapy is not paradoxical after all. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 757-760.
45. Moreno JM, Alhambra A, Cuétara MS, Ortiz MC, Pontón J, del Palacio Perez Medel A, del Palacio A. Incidence of invasive fungal infection in adult haematological malignancy: a prospective validation of a risk stratification scheme. *Br J Haematol* 2006; 134: 343-345.
46. Murashige N, Kami M, Kishi Y, Fujisaki G, Tanosaki R. False-positive results of *Aspergillus* enzyme linked immunosorbent assays for a patient with gastrointestinal graft versus host disease taking a nutrient containing soybean protein. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 333-334.
47. Nakao A, Yasui M, Kawagoe T, Tamura H, Tamaka S, Tagaki H. False positive endotoxemia derives from gauze glucan after hepatectomy for hepatocellular carcinoma with cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 1413-1418.
48. Nucci M. Emerging moulds: *Fusarium*, *Scedosporium* and zygomycetes in transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 607-612.
49. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ketchum PA, Finkelman MA, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 199-205.
50. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, Ketchum PA, Wingard J, Schriff R, Tamura H, Finkelman MA, Rex JH. Multicenter clinica evaluation of the (1-3)-beta-D glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 654-659.
51. Paphitou NI, Ostrosky Zeichner L, Rex JH. Rules for identifying patients at increased risk for candidal infections in the surgical intensive care unit: approach to developing practical criteria for systematic use in antifungal prophylaxis trials. *Med Mycol* 2005; 43: 235-243.
52. Pazos C, del Palacio A. Diagnóstico precoz de la aspergilosis invasora en enfermos neutropénicos mediante la detección bisemanal de galactomano en suero con Platelia *Aspergillus*. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 99-102.
53. Pazos C, Moragues MD, Quindós G, Pontón J, del Palacio A. Diagnostic potential of (1-3)-beta-D-glucan and anti-*Candida albicans* germ tube antibodies for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 209-215.
54. Pazos C, Pontón J, del Palacio A. Contribution of (1-3) beta-D glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 299-305.
55. Pfeiffer C, Fine J, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a metaanalysis. *Clin Infect Dis* 2005; 42: 1417-1427.
56. Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1-3)-beta-D glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5957-5962.
57. Pontón J (Ed). Guía de bolsillo de la Aspergilosis invasora. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2003: 1-105.
58. Pontón J, del Palacio A. Influence of *Candida* colonization on the (1-3)-beta-D glucan assay. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 263-264.
59. Prentice HG, Kibbler CC, Prentice AG. Towards a targeted risk-based, antifungal strategy in neutropenic patients. *Br J Haematol* 2000; 110: 273-284.
60. Rex JH. Galactomannan and the diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1428-1430.
61. Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 5-11.
62. Rickerts V, Mousset S, Lambrecht E, Tintelnot K, Schwerdtfeger R, Presterl E, Jacobi V, Just-Nübling G, Bialek R. Comparison of hispatological analysis, culture, and Polymerase Chain Reaction Assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1078-1083.
63. Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaefele RL, Sein M, Chiu CC, Chu JH, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 634-653.
64. Singh N, Paterson DL. *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 44-69.
65. Subirá M, Martino R, Rovira M, Vazquez L, Serrano D, de la Cámara R. Clinical applicability of the new EORTC/MSG classification for invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and autopsy confirmed invasive aspergillosis. *Ann Hematol* 2003; 82: 80-82.
66. Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole D, Chandrasekar P, Langston A, Tarantolo SR, Greinix H, Morais de Azevedo M, Reddy V, Boparai N, Predicone L, Patino H, Durrant S. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2007; 356: 335-347.
67. Upton A, Gugel A, Leisenring W, Limaye A, Alexander B, Hayden R, Marr KA. Reproducibility of low galactomannan enzyme immunoassay index values tested in multiple laboratories. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4796-4800.
68. Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 531-540.
69. Upton A, Leisenring W, Marr K. (1-3) beta-D glucan assay in the diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1054-1056.
70. Vanderwoude KH, Vogeleers D, Blot SI. Aspergillosis in the ICU the new 21st century problem? *Med Mycol* 2006; 44: S71-S76.
71. Verweij P. Advances in diagnostic testing. *Med Mycol* 2005; 43: S121-S124.
72. Weisser M, Rausch C, Simick M, Sendi P, Steffen I, Buitrago C, Sonnet S, Gratwohl A, Passweg J, Fluckiger V. Galactomannan does not precede major signs on a pulmonary computerized tomographic scan suggestive of invasive aspergillosis in patients with haematological malignancies. *Clin Infect Dis* 41: 1143-1149.
73. Wilson ML. Infectious diseases and the autopsy. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 602-603.
74. Woods G, Miceli M, Graziutti M, Krishna S, Syed N, Kiwan E, Rahman M, Barlogie B, Anaissie E. Validation of serum *Aspergillus* galactomannan index as a surrogate endpoint for outcome of invasive aspergillosis: clinical and research implications. *Blood* 2006; 108: 2861.