

Evaluación de la prueba Aspergillus Galactomannan Ag Virclia^R Monotest como alternativa a *kit* PlateliaTM Aspergillus EIA

Evaluation of the Aspergillus Galactomannan ag Virclia^R Monotest test as an alternative to PlateliaTM Aspergillus EIA kit

Rubi Troncoso C¹., Claudia Sepúlveda F¹., Evelyn Sepúlveda P²., Camila Guzmán U¹., Marcela Morales G³ y Cecilia Tapia P¹.

¹Laboratorio de Especialidad Clínica Dávila.

²Laboratorio VidaIntegra-Omesa Microbac, Ltda.

No hay conflictos de interés a declarar.

Estudio financiado por la empresa Microbac Ltda.

Recibido: 25 de mayo de 2021 (segunda versión: 14 de abril de 2022) / Aceptado: 2 de junio de 2022

Resumen

Introducción: La prueba Aspergillus galactomannan Ag Virclia[®] (GM-VClia) es una técnica de galactomannano monotest, automatizada, basada en inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA). **Objetivo:** Evaluar el desempeño del test de GM-VClia en muestras de suero y lavado bronquioalveolar (LBA) procesadas previamente con el *kit* PlateliaTM Aspergillus EIA (GM-Plat). **Materiales y Métodos:** Se estudiaron 56 muestras de suero y 40 de LBA, correspondientes a un total de 59 pacientes (algunos con determinación de galactomannano en ambas muestras) con enfermedades pulmonares, hematológicas, LES, Covid-19 y tumores, entre otros. Trece pacientes tuvieron aspergilosis invasora (1 probada y 12 probables). **Resultados:** La correlación entre ambos métodos para suero y LBA fue $r = 0,8861$ $p < 0,0001$ y $r = 0,6368$ $p < 0,001$, respectivamente. Hubo una concordancia global de 67,7% (65/96), siendo de 85,7% (48/56) en sueros y 42,5,0% (14/49) en LBA. Al subir el punto de corte en LBA por GM-VClia la concordancia aumentó a 85,7%. **Conclusiones:** Se observó una mayor correlación y concordancia en sueros que en LBA. El *kit* GM-VClia presentó una mayor sensibilidad y valor predictor negativo (VPN), que el *kit* GM-Plat. Las desventajas de GM-VClia, la constituyen la categoría “dudoso”, que dificulta la interpretación y que, con los puntos de corte actuales en LBA, la correlación con GM-Plat es menor. Las ventajas son su mayor sensibilidad, facilidad de procesamiento y una mayor rapidez en los resultados.

Palabras clave: Aspergillus; galactomannano; ELISA; inmunoensayo quimioluminiscente; aspergilosis.

Abstract

Background: The Aspergillus Galactomannan Ag Virclia[®] (GM-VClia) test is a monotest and automated galactomannan technique based on chemiluminescent immunoassay (CLIA). **Aim:** To evaluate the performance of the GM-VClia test in serum and bronchioalveolar lavage (BAL) samples previously processed with the PlateliaTM Aspergillus EIA kit (GM-Plat). **Methods:** 56 samples of serum 40 from BAL (some of them with galactomannan determination in both samples), from patients with pulmonary diseases, hematological diseases, SLE, Covid-19 and tumors, among others, were studied. Thirteen patients had invasive aspergillosis (1 proven and 12 probable). **Results:** The correlation between both methods for serum and BAL was $r = 0.8861$ $p < 0.0001$ and $r = 0.6368$ $p < 0.001$, respectively. There was a global concordance of 67.7% (65/96), being 85.7% (48/56) in sera and 42.5.0% (14/49) in BAL. By raising the cut-off point in LBA by GM-VClia, the agreement increased to 85.7%. **Conclusions:** A greater correlation and concordance was observed in sera than in BAL. The GM-VClia kit had a higher sensitivity and NPV than the GM-Plat kit. The disadvantages of GM-VClia are the “doubtful” category, which makes interpretation difficult and that with the current cut-off points in LBA the correlation with GM-Plat is lower. The advantages are its greater sensitivity, ease of processing and faster results.

Keywords: Aspergillus; galactomannan; ELISA; chemiluminescent immunoassay; aspergillosis.

Correspondencia a:

Cecilia Tapia Paredes
cvtapiap@gmail.com.

Introducción

La aspergilosis invasora (AI) es una enfermedad fúngica, producida por mohos del género *Aspergillus* que compromete la vida de pacientes inmunosuprimidos, con una alta tasa de mortalidad y que afecta a individuos de riesgo, fundamentalmente neutropénicos. El diagnóstico de la aspergilosis se basa en parámetros clínicos, de laboratorio y radiológicos¹. La detección de galactomanano (GM) de *Aspergillus* es un biomarcador validado para la detección y monitorización de aspergilosis, formando parte de los criterios diagnósticos. Por años, la marca de referencia ha sido Platelia™ *Aspergillus* EIA, que cuenta con un gran respaldo científico y literatura disponible^{2,3}. Recientemente, nuevos kits que detectan este antígeno están disponibles en el mercado, uno de ellos es la prueba *Aspergillus* galactomannan Ag Virclia®, que presenta la ventaja de ser un *monotest* (test uno a uno) y de ser automatizada (en el equipo Virclia® Lotus), permitiendo el procesamiento de las muestras sin necesidad de acumularlas, optimizando los costos. Esta prueba consiste en un inmunoensayo quimioluminiscente de captura tipo *sandwich* (siglas CLIA en inglés) para detección de antígeno de galactomanano de *Aspergillus* en muestras humanas de suero, plasma y lavado broncoalveolar (LBA). La plataforma automatizada Virclia® Lotus ha sido evaluada en el diagnóstico serológico de otras infecciones con buenos resultados^{4,5}. Este es el primer estudio a publicar, que se realiza con la plataforma Virclia® Lotus, para medición de galactomanano de *Aspergillus* en el medio nacional e internacional.

Los objetivos del estudio fueron comparar las propiedades del test de referencia de Bio-Rad (Platelia™) frente al nuevo test de Vircell (Virclia®) y evaluar cómo se ajustan a la práctica actual del laboratorio clínico. Además, evaluar el desempeño analítico del test de *Aspergillus* galactomannan Ag Virclia®, en muestras de suero y LBA procesadas previamente con el kit Platelia™ *Aspergillus* EIA y, por último, correlacionar los resultados del estudio con la historia clínica de los pacientes.

Materiales y Métodos

A partir de muestras de suero (n = 56) y LBA almacenadas (n = 40), provenientes de pacientes de Clínica Dávila (2019-2020) y procesadas previamente con el kit Platelia™ *Aspergillus* EIA, se evaluó el kit *Aspergillus* galactomannan Ag Virclia® (algunos pacientes tenían determinación de galactomanano en suero y LBA, a la vez). Además de procesar las muestras se revisó la historia clínica de los pacientes a quienes pertenecían las muestras, obteniéndose datos clínicos en 59 de ellos.

Aspergillus Galactomannan Virclia® Monotest

VIRCLIA® es un inmunoensayo quimioluminiscente indirecto (CLIA) en formato *monotest* desarrollado por Vircell S.L. para la detección cualitativa del antígeno galactomanano de *Aspergillus* en muestras de suero, plasma y LBA humano. El método CLIA se basa en la captura de los antígenos en la muestra con anticuerpos inmovilizados en la superficie del poliestireno. El antígeno no unido se elimina mediante lavado. A continuación, los anticuerpos marcados con peroxidasa reaccionan con el antígeno capturado y el conjugado no unido se elimina mediante lavado. El conjugado unido se activa con la ayuda de una solución de sustrato quimioluminiscente que generará una emisión rápida de un “peak” de luz que se puede leer con un luminómetro.

Los métodos de detección basados en quimioluminiscencia han recibido mucha atención debido a su bajo fondo (“background”), linealidad y amplio rango dinámico. Cuando se combina con inmunoensayos enzimáticos, el efecto de amplificación de la señal proporcionado por la enzima permite el diseño de pruebas CLIA con tiempos de incubación más cortos, manteniendo o mejorando su sensibilidad.

Platelia® *Aspergillus* EIA

Es un inmunoensayo enzimático (EIA) de doble *sandwich* desarrollado por Bio-Rad, que utiliza un anticuerpo monoclonal EBA-2 de rata para capturar la cadena lateral de β -1,5-galactofuranósido de la molécula. Se utiliza para la detección del antígeno de galactomanano de *Aspergillus* en suero y LBA⁶. Los anticuerpos monoclonales se utilizan para recubrir los pocillos de la microplaca y unir el antígeno y para detectar el antígeno unido a la microplaca sensibilizada (reactivo conjugado: anticuerpos monoclonales ligados a peroxidasa). Las muestras de suero o LBA se tratan térmicamente en presencia de EDTA para disociar los complejos inmunes y precipitar proteínas que podrían interferir con la prueba. Las muestras tratadas y el conjugado se agregan a los pocillos recubiertos con anticuerpos monoclonales y se incuban. Se forma un complejo anticuerpo monoclonal - galactomanano - anticuerpo monoclonal / peroxidasa, en presencia del antígeno galactomanano⁶.

Para la interpretación de los resultados por ambos métodos se utilizaron los siguientes puntos de corte:

- Para el kit Platelia™ *Aspergillus* EIA, se utilizó el punto de corte de valor de index < 0,5 para resultado negativo y > 0,5 para resultado positivo, para suero y LBA, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- Para el kit *Aspergillus* galactomannan Ag Virclia®, se utilizó la tabla interpretativa recomendada por el fabricante: index < 0,16 para resultado negativo, entre 0,16 y 0,2 para resultado dudoso y > 0,2 para resultado positivo.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism, versión 9.0. Se hizo análisis de correlación y contingencia.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético-Científico de Clínica Dávila.

Resultados

Las 96 muestras clínicas correspondieron a 59 pacientes con antecedentes clínicos y patologías de base de riesgo que incluían enfermedades pulmonares, malignidades hematológicas, lupus eritematoso sistémico (LES), COVID-19, y tumores sólidos, entre otros (Tabla 1). Dentro de los pacientes con factores de riesgo, 13 tuvieron diagnóstico de aspergilosis invasora, de las cuales una fue probada (con histología y cultivo positivo a *Aspergillus*) y 12 probables.

La Tabla 2, muestra las ventajas y desventajas de ambos kits.

En relación a los datos de laboratorio, la Figura 1 muestra la correlación entre ambos métodos para muestras de suero y LBA. En ambos tipos de muestra la correlación es positiva y estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Hubo una concordancia global de 67,7% (65/96) entre ambos métodos, siendo de 85,7% (48/56) en sueros y 42,5,0% (14/49) en LBA. El detalle de las cifras se muestra en la Tabla 3.

Analizando los datos y en concordancia con los expertos de Vircell, se observó que en LBA, usando índices $> 0,6$ como verdaderos positivos, la concordancia con el kit Platelia™ es de 87,5% (Figura 2, Tabla 4).

El desempeño analítico del kit *Aspergillus galactomannan Ag Virclia® Monotest*, en comparación al kit Platelia™ *Aspergillus*, tomando en cuenta los casos de aspergilosis EIA, se muestra en la Tabla 4.

El kit *Aspergillus galactomannan Ag Virclia®*, presentó una mayor sensibilidad y valor predictor negativo (VPN) que la técnica de referencia.

Tabla 1. Descripción de los antecedentes clínicos de los pacientes que participan en el estudio de evaluación. Número de muestras utilizadas por grupo (n)

Antecedentes clínicos (factores de riesgo)	n
Asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonía bacteriana, fibrosis pulmonar, tuberculosis, enfermedad pulmonar intersticial, aspergilosis pulmonar previa	11
Linfomas (Hodgkin, no Hodgkin)	9
COVID-19	9
Cáncer de mama, pulmón, melanoma, tumores malignos	7
Insuficiencia hepática crónica, polineuropatía, trastornos colónicos, rotura de aneurisma, enfermedad valvular aórtica	5
Mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico	4
Enfermedad por VIH	4
Lupus eritematoso sistémico	3
Granulomatosis de Wegener, vasculitis reumatoide	2
Granulomatosis de Wegener, vasculitis	2
Lucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica	2
Trasplante cardíaco	1
Total	59

Tabla 2. Ventajas comparativas y desventajas del kit *Aspergillus galactomannan Ag Virclia® Monotest* versus el kit Platelia™ *Aspergillus* EIA

	Platelia™ <i>Aspergillus</i> EIA.	<i>Aspergillus galactomannan Ag Virclia® Monotest</i> .
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Amplia literatura científica por su largo tiempo en el mercado - Un único punto de corte para definir positivo o negativo 	<ul style="list-style-type: none"> - Formato <i>monotest</i>, con reactivos listos para su uso - Solución única y definitiva para muestras urgentes - Protocolo simple y automatizado con resultados en una hora - Configuración personalizada de muestras y reactivos - Cada <i>monotest</i> incluye un calibrador y un control negativo que permite la validación e interpretación de los resultados para cada muestra individualmente - Uso de tubo primario, no precisa pipeteo manual
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Formato ELISA con dificultad de automatización - Utilización de 4 pocillos controles cada vez que se utiliza el kit - Procesamiento completamente manual - No permite procesar muestras urgentes - Mayor tiempo de procesamiento. Incubaciones largas - Se deben acumular muestras para aprovechar los pocillos, ya que requiere usar calibrador y controles cada vez - No permite el uso de tubo primario. 	<ul style="list-style-type: none"> - Escasa literatura científica disponible hasta el momento - Requiere pretratamiento de la muestra, al igual que la técnica de referencia - Usa un punto de corte diferente al de la técnica de referencia - Existe una categoría de resultado "dudoso", que resulta difícil de interpretar

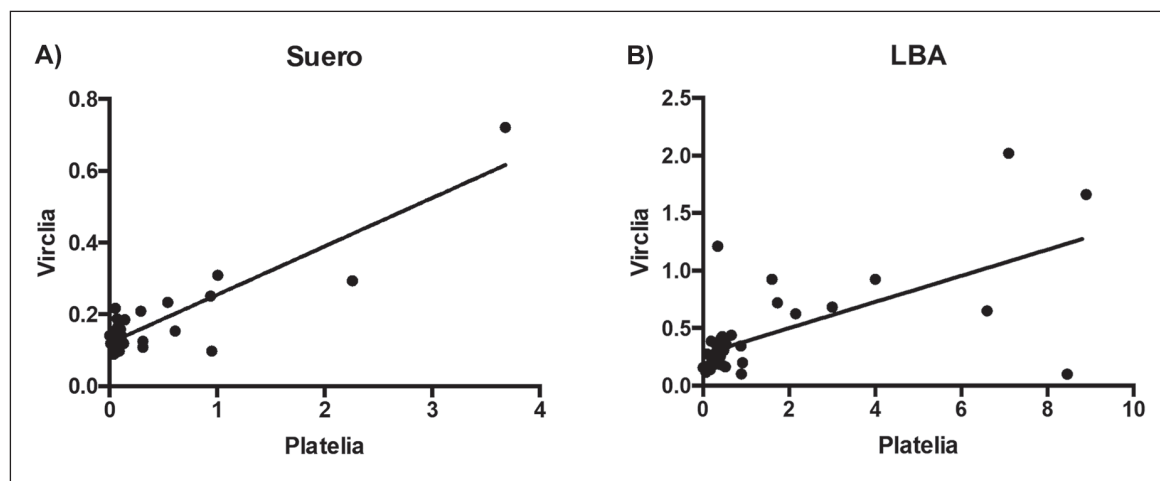


Figura 1. Correlación entre las técnicas *kit* Aspergillus galactomannan Ag Virclia®, en muestras de **A)** suero, $r = 0,8861$ $p < 0,0001$ y **B)** LBA, $r = 0,6368$ $p < 0,001$.

Tabla 3. Concordancia del *kit* Platelia™ Aspergillus EIA con el *kit* Aspergillus galactomannan Ag Virclia® Monotest en sueros y LBA

Platelia™	LBA		Platelia™	Suero	
	Virclia®	Total		Virclia®	Total
+	+	12	+	+	5
+	-	2	+	-	2
+	Dudoso	2	+	Dudoso	0
-	-	5	-	-	43
-	+	14	-	+	2
-	Dudoso	5	-	Dudoso	4

Discusión

Las infecciones fúngicas invasoras representan una gran amenaza para pacientes inmunodeprimidos. El diagnóstico y tratamiento tempranos son esenciales para alcanzar un buen éxito terapéutico⁷. Los resultados de las técnicas de cultivo definen los casos probados de AI, junto con la presentación clínica en el paciente. Sin embargo, en los casos de infección temprana del hongo, esta metodología no es adecuada ya que presenta poca sensibilidad y es muy laboriosa^{8,9}. Estas características llevaron a la mejora de las herramientas de diagnóstico,

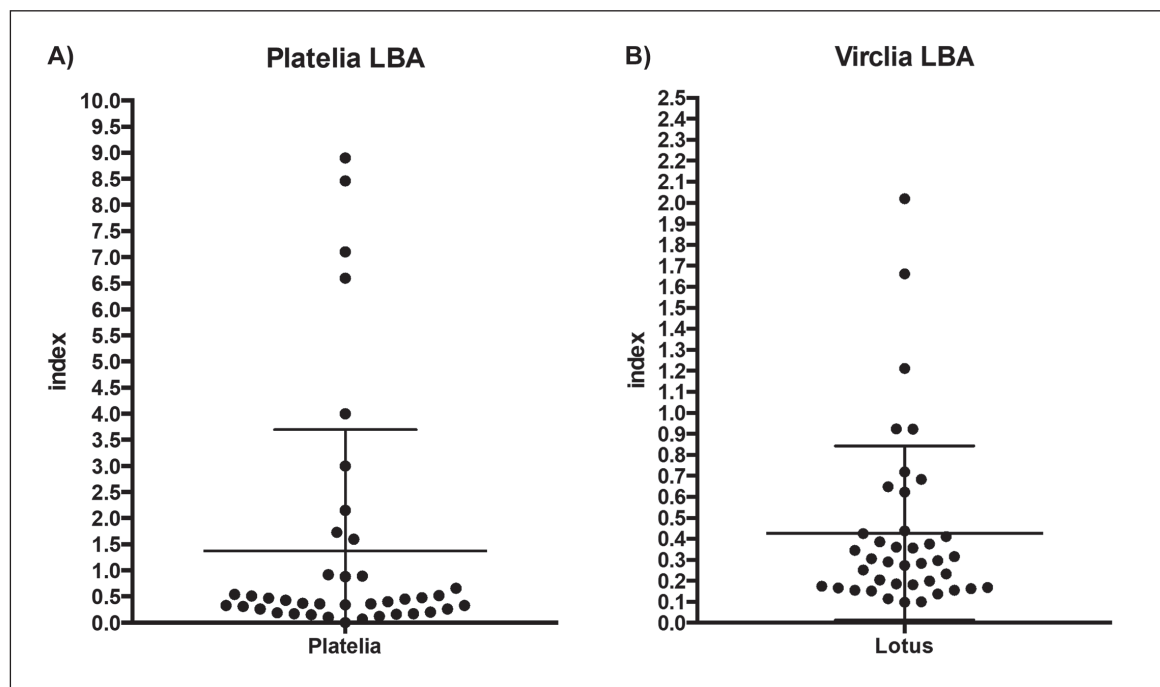


Figura 2. Distribución de valores de índice (index) en muestras de LBA con **A)** *kit* Platelia™ Aspergillus EIA y **B)** con *kit* Aspergillus galactomannan Ag Virclia® utilizado en el instrumento Lotus. Ambas metodologías tienen diferentes puntos de corte.

Tabla 4. Desempeño de los kits Platelia™ Aspergillus EIA y Aspergillus galactomannan Ag Virclia® Monotest en este estudio

	S	E	VPP	VPN
Kit Platelia™ Aspergillus EIA	33,77%	78,69%	22,53%	84,21%
kit Aspergillus galactomannan Ag Virclia®	50,00%	67,27%	25,00%	86,05%

Sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictor positivo (VPP), valor predictor negativo (VPN).

como es el desarrollo de detección de galactomanano. Estos biomarcadores se utilizan hoy en día en la práctica clínica diaria¹⁰⁻¹².

Los antecedentes clínicos de las muestras biológicas del estudio pertenecían a pacientes con diferentes patologías clínicas de base, como puede observarse en la Tabla 1; entre este grupo de muestras se encontraban muestras serológicas y respiratorias (LBA). Al comparar las características generales de los ensayos de galactomanano utilizados en este estudio, existen diferencias entre ambos métodos (Tabla 2).

Las ventajas de la nueva técnica Virclia®, con respecto a Platelia™, la técnica de referencia, son:

- el ensayo CLIA es de acceso aleatorio para el diagnóstico y seguimiento de la aspergilosis invasora
- permite procesar muestras con urgencia
- el formato *monotest* permite el seguimiento diario del paciente
- los resultados pueden estar en el mismo día, sin procesamiento por lotes, y sin acumulación de muestras y
- el protocolo de procesamiento es simple y automatizado que proporciona resultados en un margen de una hora desde el tratamiento de muestras del paciente.

Estas ventajas contribuyen con el diagnóstico oportuno de la infección fúngica invasora por *Aspergillus* spp. Este estudio refuerza, además, las propiedades del kit de Virclia®, con datos estadísticos del desempeño de los kits de estudio.

Los resultados de la correlación de ambos métodos para suero y LBA, muestran que ambos tipos de muestras tienen una correlación positiva, estadísticamente significativa en ambos casos (Figura 1). En base a interpretación del coeficiente kappa, las muestras de suero mostrarían una correlación muy buena ($r = 0,88$, $p < 0,0001$) y las muestras de LBA mostrarían una correlación buena ($r = 0,63$, $p < 0,001$). La menor correlación de las muestras de LBA podría estar relacionada con las propiedades heterogéneas de este tipo de espécimen biológico en contraposición a la homogeneidad de las muestras serológicas y como se discutirá más adelante, al punto de corte del kit de Virclia®.

La concordancia global de los resultados extraídos tras el análisis estadístico de los datos de la Tabla 2 indican

un 67,7% (65/96) entre ambos métodos, siendo de 85,7% (48/56) en sueros y 42,5,0% (14/49) en LBA.

En la Figura 2 se muestran las distribuciones de valores de índice en muestras de LBA para ambos métodos. Como puede observarse, aunque las dos metodologías tienen valores de corte distintos, la diferenciación entre valores positivos y negativos del diagnóstico es comparable, especialmente si se utilizase un punto de corte más alto para LBA con la técnica Virclia®. Esto representa una ventaja para la monitorización del estado del paciente.

En cuanto al análisis del desempeño de ambos kits, se observó una mayor sensibilidad de la metodología Virclia®, en particular sobre 16% de sensibilidad mayor que Platelia™. Por el contrario, Platelia™ mostró 11% de mayor especificidad que Virclia®. El diagnóstico y tratamiento tempranos de las infecciones fúngicas son esenciales para éxito terapéutico óptimo; por ello, la sensibilidad en este tipo de pruebas diagnósticas prevalece frente a la especificidad. La pérdida de verdaderos positivos puede representar la pérdida de pacientes por sepsis, debido a un retraso en el tratamiento antifúngico. En este aspecto, Virclia® representaría una metodología útil para mejorar las expectativas clínicas de este tipo de pacientes. Finalmente, en cuanto a valor predictor positivo (VPP) y VPN, Virclia® mostró ventajas frente a Platelia™.

Como conclusión, estos resultados muestran que ambos kits correlacionan bien, pero la correlación mejor se dio en sueros en comparación con muestras de LBA. Así mismo, el kit Aspergillus galactomannan Ag Virclia® presentó una mejor concordancia con el kit el kit Platelia™ Aspergillus EIA, en sueros (85,7%) que en LBA. Sin embargo, al usar otro punto de corte en las últimas muestras, la concordancia fue igual a la de sueros (aumentó de 44,5 a 85,7%). Por otra parte, el kit Aspergillus galactomannan Ag Virclia® Monotest presentó una mejor sensibilidad, VPP y VPN, que el kit Platelia™ Aspergillus EIA. Uno de los aspectos a mejorar del Aspergillus galactomannan Ag Virclia® Monotest, está relacionado con los puntos de corte que incluyen la categoría “dudoso”, ya que es difícil de interpretar. Además, los puntos de corte en LBA, deberían interpretarse con cautela, sabiendo que con un index 0,6, la concordancia con el cuadro clínico es mucho

mejor. Consensos recientes plantean puntos de corte más alto para galactomanano en LBA, especialmente en el reciente cuadro clínico descrito: la aspergilosis asociada a COVID-19¹³. A pesar de esto, Virclia puede considerarse como una excelente alternativa a Platelia™, más sensible,

que facilita la rutina clínica y otorga una mayor rapidez en la obtención de resultados.

Agradecimientos: A Microbac Ltda y Vircell S.L. por el apoyo técnico y científico.

Referencias bibliográficas

- 1.- Rabagliati R. Update in the diagnostic and therapeutic approach of invasive aspergillosis in adult population. *Rev Chilena Infectol*, 2018. 35(5): 531-44. doi: 10.4067/s0716-10182018000500531.
- 2.- Siemann M, Koch-Dorfler M. The Platelia Aspergillus ELISA in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis (IPA). *Mycoses*, 2001. 44(7-8): 266-72. PMID: 11714060.
- 3.- Ullmann A J, Aguado J M, Arkan-Akdagli S, Denning D W, Groll A H, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect*, 2018; 24 Suppl 1: e1-e38. <https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/action/showPdf?pii=S1198-743X%2818%2930051-X>
- 4.- Ortiz de la Tabla V, Berrueto M, García Payá E, Fernández M, García J A, Masiá M, et al. Evaluation of the Virclia(R) automated chemiluminescent immunoassay system for diagnosing pneumonia caused by *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Lab Anal*, 2018. 32(6): e22431. doi: 10.1002/jcla.22431.
- 5.- Cubero A, Durántez C, Almaraz A, Fernández-Lago L, Gutiérrez M P, Castro M J, et al. Usefulness of a single-assay chemiluminescence test (Tularaemia VIRCLIA IgG + IgM monostest) for the diagnosis of human tularemia. Comparison of five serological tests. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018. 37(4): 643-9. doi: 10.1007/s10096-017-3155-9.
- 6.- Insert PLATELIA™ ASPERGILLUS EIA 96 PRUEBAS 62796 - Bio-Rad https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/62796_881045_ES.pdf.
- 7.- Shannon V R, Andersson B S, Lei X, Champlin R E, Kontoyannis D P. Utility of early versus late fiberoptic bronchoscopy in the evaluation of new pulmonary infiltrates following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45(4): 647-55. doi: 10.1038/bmt.2009.203.
- 8.- Lass-Flörl C, Resch G, Nachbaur D, Mayr A, Gastl G, Auberger J, et al. The value of computed tomography-guided percutaneous lung biopsy for diagnosis of invasive fungal infection in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*, 2007. 45(7): p. e101-4. doi: 10.1086/521245.
- 9.- Shah A A, Hazen K C. Diagnostic accuracy of histopathologic and cytopathologic examination of *Aspergillus* species. *Am J Clin Pathol*, 2013. 139(1): 55-61. doi: 10.1309/AJCPO8VTSK3HRNUT.
- 10.- Marchetti O, Lamoth F, Mikulska M, Viscoli C, Verweij P, Bretagne S, et al. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant*, 2012. 47(6): 846-54. doi: 10.1038/bmt.2011.178.
- 11.- Ruhnke M, Böhme A, Buchheidt D, Cornely O, Donhuijsen K, Einsele H, et al. Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology--Guidelines from the Infectious Diseases Working Party in Hematology and Oncology of the German Society for Hematology and Oncology (AGIHO). *Ann Oncol* 2012. 23(4): 823-33. doi: 10.1093/annonc/mdr407.
- 12.- Pfeiffer C D, Fine J P, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*, 2006. 42(10): 1417-27. <https://doi.org/10.1086/503427>.
- 13.- Koehler P, Bassetti M, Chakrabarti A, Chen SCA, Lopes Colombo A, Hoenigl M, et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. *Lancet Infect Dis* 2021; 21(6): e149-62. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30847-1.