

Rolul investigațiilor alergologice în diagnosticul Aspergilozei Bronho-Pulmonare Alergice (ABPA)

Roxana Silvia Bumbăcea^{1,2}, Ileana Ghiordănescu², Brîndușa Petruțescu²

1. UMF "Carol Davila", București; 2. Spitalul Universitar de Urgență Elias, București - Compartimentul Alergologie

REZUMAT

Aspergiloza bronho-pulmonară alergică (ABPA) este o afecțiune pulmonară caracterizată prin răspunsul inflamator imuno-alergic la prezența intrabronșică a sporilor și miceliilor speciilor de *Aspergillus*. ABPA afectează pacienții cu astm preexistent sau fibroză chistică rareori fiind descrise cazuri de ABPA în absența acestor două afecțiuni. Prevalența reală a cazurilor de ABPA este necunoscută. Actual, prin izolare de ARNm și clonare se pot produce antigene recombinante utile pentru diagnosticul fidel al ABPA. O parte dintre aceste antigene recombinante sunt utile pentru discriminarea între indivizii cu ABPA și cei cu astm cu sensibilizare la *Asp. f. Asp f 4* și *Asp f 6* reprezintă markeri specifici esențiali pentru confirmarea suspiciunii clinice de ABPA având o specificitate 100% și o sensibilitate de 90%. Testarea hiperreactivității la *Asp f* se face prin metode in vivo: testare cutanată prick cu citire imediată și tardivă și in vitro: determinarea de Ig E specifice și Ig G specifice și dozarea precipitinelor. În ABPA, testarea cutanată prick este aproape întotdeauna pozitivă. Nivelul normal de Ig E totale, la un pacient cu boală activă pulmonară exclude diagnosticul de ABPA. Nivelele de Ig E serice totale sau specifice se corelează cu gradul de activitate a bolii fiind utile pentru monitorizarea răspunsului la tratament.

Cuvinte-cheie: aspergiloza bronhopulmonară alergică, astm, fibroza chistică, hipersensibilitate, teste serologice, testare cutanată

ABSTRACT

The role of allergological tests in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis (ABPA)

Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis (ABPA) is an uncommon respiratory condition in which *Asp. spp* spores and mycelia inhalation trigger an immuno allergic inflammatory response in the bronchial airways. ABPA mostly develops in asthmatic and cystic fibrosis patients. The true prevalence of ABPA is not known. It is important to exclude ABPA in all asthmatics with positive skin reactivity to *Aspergillus*. Currently, a number of allergens from *A. fumigatus* have been cloned and the mRNA was purified – these are the recombinant antigens which can be used to distinguish between ABPA and fungal sensitization. IgE specific for *Asp f 4* and *Asp f 6* are restricted to ABPA patients and have a sensitivity and specificity of 90% and 100%, respectively. *Aspergillus* hypersensitivity can be demonstrated using in vivo (skin prick test) and in vitro methods (specific Ig E and Ig G, serum precipitins). In ABPA skin prick test is almost always positive. Normal levels of total IgE exclude ABPA. Serum total and specific Ig E vary according to disease activity and are useful for monitoring the treatment.

Keywords: Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis, asthma, cystic fibrosis, hypersensitivity, serological tests, skin prick test

Introducere

ABPA este definită ca o afecțiune pulmonară caracterizată prin răspunsul inflamator imuno-alergic la prezența intrabronșică a sporilor și miceliilor speciilor de *Aspergillus* (*Asp. spp*) reprezentate în principal de *Asp. Fumigatus*, *Asp. Niger*, *Asp. Flavus* și *Asp. Nidulans*. Cu toate acestea, modificări clinice și radiologice similare celor observate în ABPA sunt descrise și în asociere cu alți fungi (*Stemphylium lanuginosum*, specii de *Candida*, specii de *Helminthosporium*, specii de *Curvularia*, *Schizophyllum commune*, *Dreschlera hawaiiensis*, *Fusarium vasinfectum*)^{1,2,3}.

ABPA apare la pacienți non-imunocompromiși, în absența aspergilozei invazive, activitatea macrofagelor alevolare și a polimorfonuclearelor neutrofile (ca celule implicate în imunitatea celulară locală pulmonară) fiind normală⁴.

Prevalența

ABPA a fost multă vreme subdiagnosticată în majoritatea țărilor. În ultimii 20 de ani numărul de cazuri de ABPA descrise în literatură a crescut datorită creșterii gradului de informare a medicilor, elaborării criteriilor de diagnostic și

accesului la analize cu sensibilitate și specificitate crescute.

ABPA afectează pacienții cu astm preexistent (în orice stadiu - de la formele ușoare la astm corticodependent) sau fibroză chistică⁵, rareori fiind descrise cazuri de ABPA în absența acestor două afecțiuni (polimorfism al genei ce codifică proteina surfactant, afecțiuni ce determină clearance ciliar ineficient, hipersecreția de mucus, prezența HLA-DR2).

În urma meta - analizelor efectuate (pornind de la studii efectuate în perioada 1952 - 2008)⁶ s-a constatat o prevalență a ABPA la pacienții cu astm de 1-2 %, 7-14% la pacienții cu astm corticodependent și 7.8-15% la cei cu fibroză chistică. Prevalența reală a cazurilor de ABPA este însă necunoscută, diagnosticul fiind dificil de realizat datorită manifestărilor clinice nespecifice și asemănărilor cu astmul cu sensibilizare la fungi ceea ce explică latența de până la 10 ani, uneori, între apariția primelor manifestări și momentul diagnosticului.

Particularitățile *Aspergillus*

Fungii se definesc ca organisme eucariote (au structură complexă: nucleu și membrană), heterotrofe (necesită sub-

strat organic pentru a-și procura carbonul necesar creșterii și dezvoltării), nonfotosintetice.

Genul *Aspergillus* cuprinde aproximativ 250 de specii de funghi ai căror spori reprezintă 0.1 - 22 % din totalul sporilor izolați prin tehnici specifice de captare, din atmosferă. Dintre aceste specii doar o mică parte sunt considerate a fi patogene pentru om (cel mai frecvent descrise ca fiind implicate în patologia pulmonară sunt *Aspergillus Fumigatus*, *Aspergillus Niger*, *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus Nidulans*)⁵.

Aspergillus fumigatus este un fung ubicuitar, multicelular, parazit, cu reproducere asexuată în principal, termorezistent⁷. Se dezvoltă pe materii organice în curs de descompunere, sol, stive de lemne, iarbă cosită; sporii pot fi găsiți în aerul din pivnițe, subsoluri, clădiri vechi, instalații de aer condiționat montate necorespunzător, etc.

O corelație între nivelul expunerii și apariția ABPA nu a fost demonstrată clar, deși Radin, Greenberger și Patterson sugerează că expunerea la concentrații crescute de spori e asociată cu exacerbări ale ABPA⁸.

Structura *Aspergillus fumigatus*

“Corpul” fungului este format din hife (filamente nucleate, septate), divizate dichotomic la un unghi de 45°. Rețeaua formată prin ramificarea și intersectarea hifelor alcătuiește miceliul⁹. Hifele prezintă porțiuni specializate ce se dilată ter-

minal formând vezicule din care emerg radiar sporii (numiți și conidii) ce acoperă suprafața veziculelor (figura 1).

Întregul ansamblu format din hifă specializată, veziculă și spori se numește Conidiofor (sau sporangiu) și reprezintă unitatea formatoare de spori asexuați.

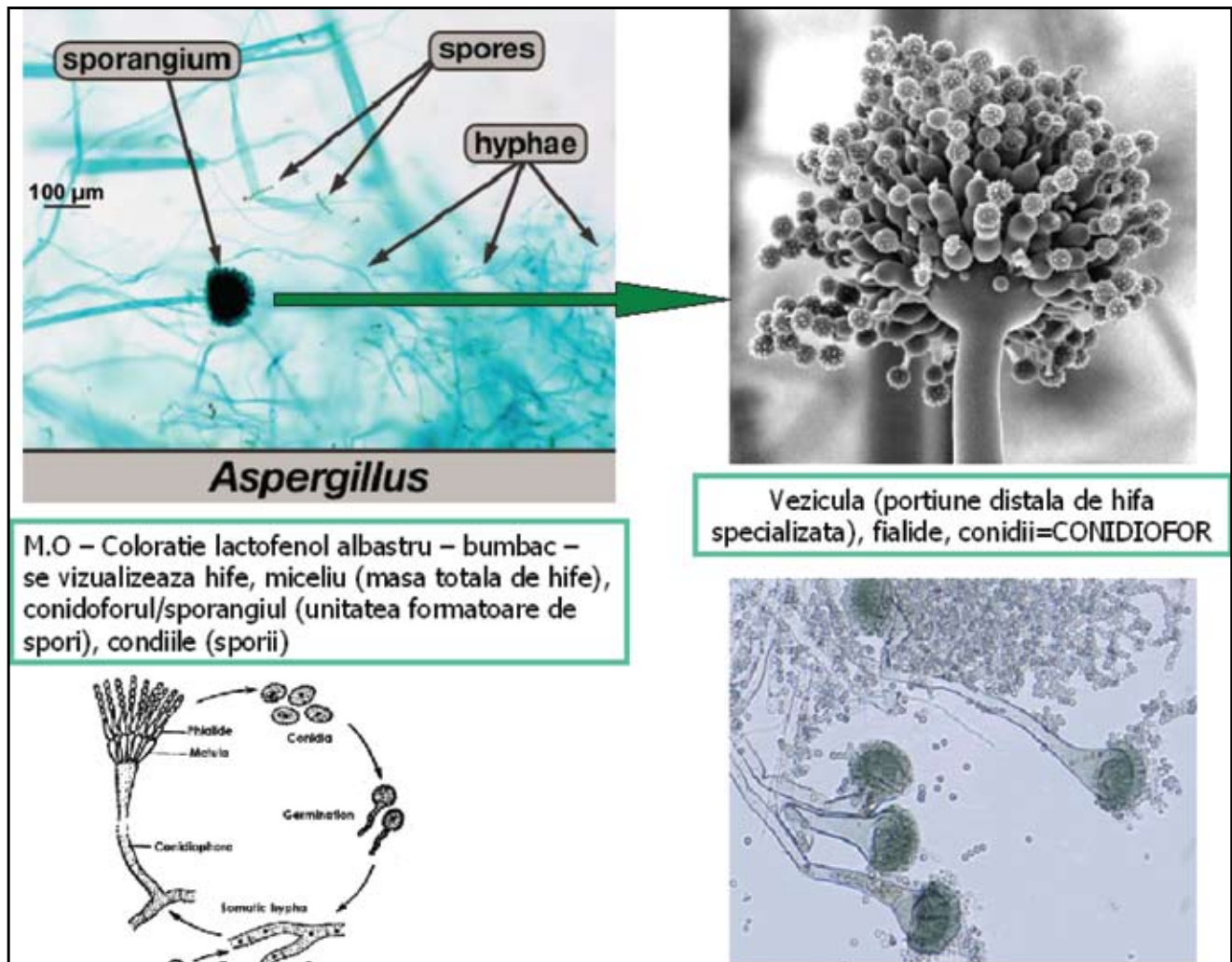
Sporii de *Aspergillus*, cu diametrul de 2-3 μm, sunt inhalați, captați la nivelul laminei de mucus din căile aeriene, unde pot adera la suprafața celulelor epiteliale. Într-un interval de aproximativ 6 ore de la inhalare, dependent de condițiile locale, sporii germinează și formează hife și micelii ce se dezvoltă pe și între celulele epiteliale, ajungând până la membrana bazală (în ABPA nu se produce invazia vaselor locale)¹⁰.

Elemente patogene (figura 2)

Elementul central al patogeniei ABPA îl constituie promovarea activității eozinofilelor și a mastocitelor conjugată cu efectul mycotoxinelor și al exoproteazelor fungice asupra țesutului pulmonar^{11,12}.

Se generează reacții de hipersensibilitate de tip imediat (mediate Ig E), și reacții întârziate, de tip III (Arthus), prin complexe imune cu activarea căii alternative a complementului^{13,14} și uneori reacții de tip IV (tuberculine - like) cu apariția secundară de granuloame. Reacțiile de tip IV sunt rare și sunt considerate necaracteristice.

Figura 1. Structura *Aspergillus fumigatus*. Preluare și modificare după Campbell, cap. 31, Fungi, biology 6A, site-ul Facultății de Biologie DeAnza



Tabelul I. Clasificarea antigenelor *Aspergillus fumigatus*

CLASIFICAREA AG. ASP. F.	
După localizare	intracelulare (nesecretate sau structurale): polizaharide din peretele celular
	extracelulare (secretate sau metabolice): exoproteaze, micotoxine
După structura chimică	proteine
	polizaharide
	glicoproteine
După funcție	enzime: proteaze, catalaze, enolaze, superoxid dismutaza
	proteine de transport: lipocalina
	proteine reglatorii: proteine de șoc termic

Capacitatea sporilor de *Aspergillus fumigatus* (*Asp f*) de a adera la epiteliul bronșic este influențată de: nivelul de spori inhalati, capacitatea fungului de a secreta enzime proteolitice, starea de preactivare a celulelor epiteliale (prezentă atât în cazul subiecților astmatici cât și în cazul celor cu fibroza chistică), calitatea mucusului și eficiența clearance-ului ciliar.

Celulele epiteliale activate secretă IL 6, IL 8 cu efect chemotactic pentru neutrofile și de stimulare a detașării celulelor epiteliale. Acțiunea citokinelor eliberate de către neutrofile, a enzimelor proteolitice și micotoxinelor eliberate de către sporii și miceliile de *Aspergillus* favorizează penetrarea fungului până la nivelul mucoasei bronșice¹⁵. Anticorpilor anti Asp f permit antigenelor solubile și fragmentelor micelare să patrundă și să se depoziteze la nivelul parenchimului pulmonar.

Sporii și miceliile conțin (antigene nesecretate) și eliberează (antigene secretate) antigene ce sunt prelucrate de către celulele prezentatoare de antigen (APC). Prezența HLA - DR 2

sau DR 5 la suprafața APC reprezintă un factor predispozant la ABPA. APC prezintă antigenele limfocitelor T (LT) de la nivelul țesutului limfoid pulmonar. LT activate se vor diferenția către LTh 2 ce sintetizează și eliberează IL 4, IL 5, IL 13 și GM - CSF.

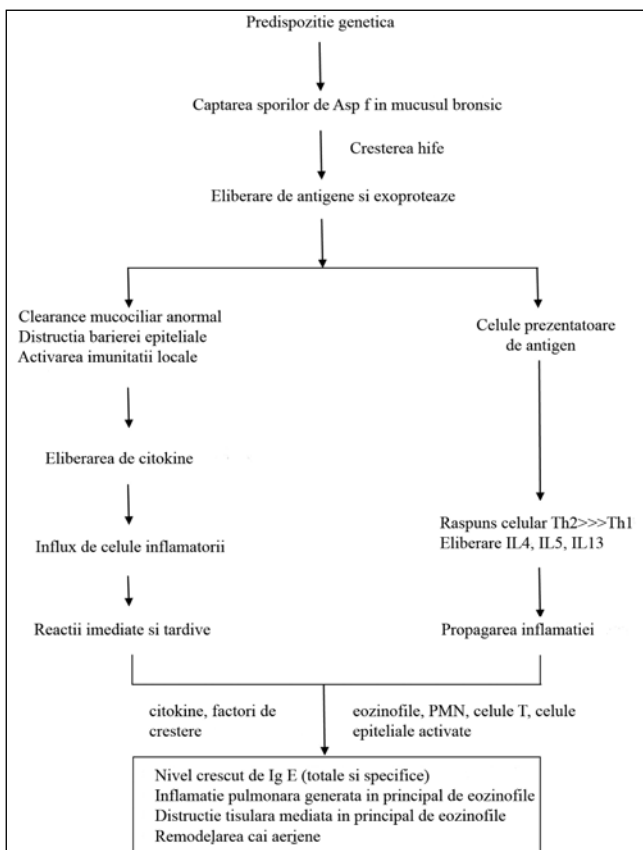
IL 4 și IL 5 stimulează diferențierea, proliferarea, migrarea la nivel tisular și creșterea duratei de viață a eozinofilelor¹². Producția de Ig E, Ig G și Ig A de către plasmocite este stimulată, ca urmare a creșterii expresiei CD 23 la suprafața Limfocitelor B sub acțiunea IL 4, IL 13 și GM-CSF.

Antigenele Asp f

Sunt descriși aproximativ 40 de epitopi, capabili să lege Ig E și peste 20 de antigene recombinante¹⁶ ale Asp f numerotate de la 1 la 23 și clasificate conform tabelului I.

Inițial antigenele Asp f au fost obținute prin purificare din extractele de *Aspergillus* (antigen crud, neprelucrat format dintr-o amestur de proteine, glicoproteine, polizaharide, toxine și componente inerte)¹⁷. Metoda permitea extragerea de antigene cu mare variabilitate, dificil de reprodus. Actual, prin izolare de ARNm din culturi, la 72-96 de ore și clonare se pot produce antigene recombinante utile pentru diagnosticul fidel al ABPA (in vivo și in vitro),

Figura 2. Patogenia ABPA. Legendă: Asp f – *Aspergillus fumigatus*, Th2, 1– limfocit T helper 2 respectiv 1



Tabelul II. Numerotarea antigenelor recombinante - Preluat din *Medical Mycology*, 2005, 43, S189 – S196 reprezentând Alergene ale *Aspergillus fumigatus* aprobate de Uniunea Societatilor de Imunologie, Comitetul pentru Nomenclatura Alergenelor, 2004

Allergen*	kD	Nature of allergen	Binding of IgE†
Asp f 1	18	Ribotoxin	83‡ [42]
Asp f 2	37	Fibrinogen binding (?)	90 [42]
Asp f 3	19	Peroxisomal protein	94 [42]
Asp f 4	30	–	78 [42]
Asp f 5	40	Metalloproteinase	93 [28]
Asp f 6	26.5	Mn superoxide dismutase	56 [42]
Asp f 7	12	–	46 [28]
Asp f 8	11	Ribosomal protein-P2	–
Asp f 9	34	–	89 [2, 28]
Asp f 10	34	Aspartic protease	28 [28]
Asp f 11	24	Peptidyl-prolyl isomerase	–
Asp f 12	47	Heat shock protein-P90	–
Asp f 13	34	Alkaline serine proteinase	–
Asp f 15	16	–	–
Asp f 16	43	–	70 [2]
Asp f 17	–	–	–
Asp f 18	34	Vacuolar serine proteinase	–
Asp f 22	46	Enolase	–
Asp f 23	44	L3 ribosomal protein	–

Tabelul III. Antigene recombinante utile în diagnosticul diferențial ABPA - Astm cu sensibilizare la *Aspergillus fumigatus*

Antigenul	Localizarea	Prezența ca aeroalergen	Prezența Ig E specifice în ser (ABPA)	Prezența Ig E specifice în ser (astm)	Sensibilitate și specificitate
Asp f 4	intracelulară	NU	DA	NU	↑↑↑
Asp f 6	intracelulară	NU	DA	NU	↑↑↑
Asp f 3	extracelulară	DA	DA	DA	↓↓↓
Asp f 5	extracelulară	DA	DA	DA	↓↓↓

Tabelul IV. Criterii de diagnostic majore și minore pentru ABPA survenită la pacienții cu astm preexistent

ABPA Seropozitivă (ABPA-S) Istoric de Astm (frecvent dificil de controlat) Ig E totale crescute (> 1000 UI/ mL) Reactivitate cutanată imediată la Asp.f Ig E specifice anti Asp.f crescute Ig G specifice anti Asp.f crescute	Alte criterii ce susțin diagnosticul: Eozinofilie periferică (absentă în terapia p.o cu Corticosteroizi!) Infiltrate inflamatorii pulmonare (absente în terapia p.o cu Corticosteroizi!) Sputa închisă la culoare (brună) Bronhii impactate datorită producției crescute mucus vizibile radiologic Culturi din spută pozitive pentru Asp. f
ABPA cu bronșiectazii centrale (ABPA-CB) Criteriile mai sus amintite - pozitive Bronșiectazii centrale (CT high - resolution)	

eliminându-se practic dezavantajele primei metode¹⁸. Alergenele recombinante sunt numerotate conform tabelului II.

O parte dintre aceste antigene recombinante sunt utile pentru discriminarea între indivizii cu ABPA și cei cu astm cu sensibilizare la Asp f (tabelul III)^{18,19}.

Nivelul seric al Ig E capabile să lege antigene recombinante este mai mare în cazul pacienților cu ABPA decât în cazul pacienților cu astm cu sensibilizare la Asp f¹⁸.

Asp f 4 și Asp f 6 reprezintă markeri specifici esențiali pentru confirmarea suspiciunii clinice de ABPA având o specificitate 100 % și o sensibilitate de 90 %¹⁸.

Banerjee și colaboratorii au arătat că 70 % dintre pacienții cu ABPA au nivele crescute de Ig E îndreptate împotriva Asp f 16, în timp ce pacienții cu teste cutanate pozitive pentru Asp f nu au²⁰.

Criteriile diagnostice ale ABPA

ABPA apare în special la pacienți astmatici sau cu fibroză chistică. În cazul **pacienților astmatici**, diagnosticul ABPA se bazează pe realizarea de criterii clinice, biologice și imagistice. Zece criterii de diagnostic au fost inițial identificate însă, dintre acestea, doar o parte sunt considerate **esențiale (majore)** (tabelul IV). Criteriile **minore**, de exemplu infiltratele pulmonare și eozinofilia periferică, pot fi prezente doar în timpul exacerbărilor sau în faza acută a bolii.

Bronșiectaziile centrale reprezintă un criteriu important care însă nu este întotdeauna prezent la momentul diagnosticului. Greenberger²¹ identifică 2 tipuri de pacienți 1) ABPA

- S - pacienții întrunesc criteriile clinice, paraclinice și serologice dar nu au bronșiectazii centrale, 2) ABPA - CB - pacienții au criterii diagnostice prezente și bronșiectazii centrale. La acestea Kumar adaugă o a treia categorie de pacienți ABPA - CB - ORF - în care pacienții întrunesc criteriile diagnostice și în plus față de bronșiectaziile centrale au și alte modificări radiologice: fibroză pulmonară, emfizem, modificări fibrocavitare și modificări pleurale^{22,23}.

În cazul **fibrozei chistice**, ABPA reprezintă o complicație frecventă a bolii, apărând la aproximativ 10 % dintre pacienți. Diagnosticul e frecvent întârziat datorită suprapunerii multor criterii de diagnostic peste manifestările clinice obișnuite ale fibrozei chistice (tabelul V).

ESCF (Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis) propune 2 serii de criterii: **majore și minore**. Pentru diagnosticul de ABPA sunt necesare 2 criterii majore (din 3 câte sunt în total) și 2 minore (din 6).

Rareori ABPA apare în absența astmului sau a fibrozei chistice în asociere cu alte boli pulmonare cronice ce asociază sindrom obstructiv, granulomatoza bronho-centrică, sinuzita alergică cu sensibilizare la fungi, Sindromul Hiper - Ig E (Buckley), boli cronice granulomatoase.

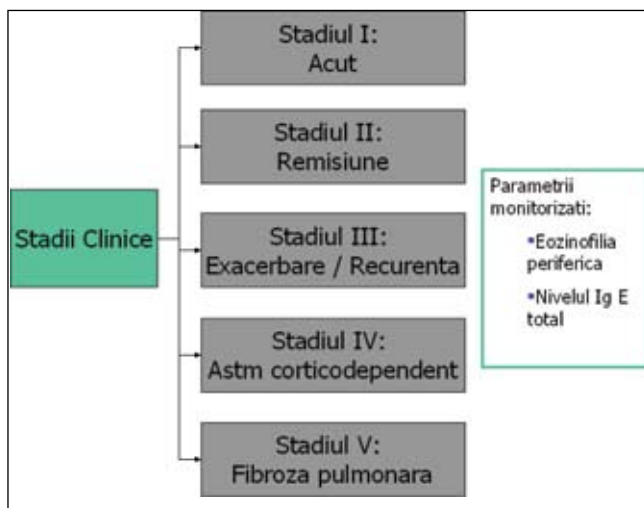
Caracteristici clinice și stadializare

ABPA poate să apară și în copilărie, cel mai frecvent însă este întâlnită la adulții tineri (decada 3). Majoritatea pacienților cu ABPA au antecedente alergice: rinită, conjunctivită, dermatită atopică, sensibilizare la alergene aeropurtate comune de mediu sau trofalergene¹⁴.

Tabelul V. Criterii de diagnostic majore și minore pentru ABPA survenită la pacienții cu fibroză chistică preexistentă

Criterii majore	Criterii minore
Reactivitate cutanată imediată la Asp f Anticorpi precipitanți anti Asp f Nivel de Ig E totale >1000 UI/L	Bronhoconstricție Eozinofilie periferică >1000/microL Istoric de infiltrate pulmonare Nivel de Ig E totale sau Ig E anti Asp f crescute Culturi pozitive pentru Asp f din spută Răspuns pozitiv la terapia cu Corticosteroizi sistemici

Figura 3. Stadializarea clinică a ABPA



Apariția ABPA este asociată cu transformarea formelor ușoare sau medii de astm în astm corticodependent²⁴, în contextul apariției unor simptome neobișnuite: stare generală alterată, febră (38,5°), prezența de dopuri de mucus și spută purulentă, tuse, durere toracică sau rareori hemoptizie.

În cazul pacienților cu fibroză chistică și ABPA tabloul e dominat de scădere în greutate și creșterea frecvenței acceselor de tuse productivă.

Se deosebesc 5 stadii de ABPA în funcție de care se face ajustarea tratamentului (figura 3).

Testarea hiperreactivității la Asp f

Testarea hiperreactivității la Asp f se face prin metode **in vivo**: testare cutanată prick cu citire imediată și tardivă și **in vitro**: determinarea de Ig E specifice și Ig G specifice și dozarea precipitinelor.

Testarea in vivo

Testarea cutanată prick se face utilizând mix de alergene de *Aspergillus* - extract standardizat (preparat comercial), în condiții standard de executare. Metoda are sensibilitate și specificitate crescute.

Citirea testului se face la fiecare 15 minute în prima oră și apoi după 6 ore (pentru evidențierea unei eventuale reacții întârziate). Rareori (16-33 % dintre pacienți) sunt descrise și reacții bifazice, acestea nefiind considerate caracteristice pentru ABPA^{14,25,26}. Dacă testarea cutanată prick este negativă, rezultatul poate fi confirmat și prin injectarea intradermică de *Aspergillus*, care însă utilizează extract crud, produs în laborator, nestandardizat¹⁷.

Testarea in vitro

Presupune dozarea Ig E și Ig G (dacă e posibil fracțiunile Ig G1 și Ig G4) specifice anti Asp f precum și a precipitinelor (exprimate ca număr de linii de precipitare după dubla difuzie în gel).

Prezența anticorpilor anti Asp f 4 și 6 permite diferențierea între ABPA și astmul cu sensibilizare la Asp f. Metoda de determinare a Ig E specifice, cu sensibilitatea cea mai mare este metoda ImmunoCAP.

Variația nivelului anticorpilor specifici e dependentă de tratament, vârsta pacientului și stadiul bolii. Unele antigene ale Asp. f (catalaze, tripsina, chimotripsina) sunt esențiale pentru reacția de precipitare¹⁴.

Concluzii

Genul *Aspergillus* cuprinde aproximativ 250 de specii de fungi ai căror spori reprezintă 0.1 - 22% din totalul sporilor izolați prin tehnici specifice de captare, din atmosferă. Dintre aceste specii doar o mică parte sunt considerate a fi patogene pentru om (cel mai frecvent descrise ca fiind implicate în patologia pulmonară sunt *Aspergillus Fumigatus*, *Aspergillus Niger*, *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus Nidulans*)⁵. O corelație între nivelul expunerii și apariția ABPA nu a fost demonstrată clar, deși Radin și colaboratorii sugerează că expunerea la concentrații crescute de spori e asociată cu exacerbări ale ABPA.

ABPA este o afecțiune subevaluată, prevalența reală a cazurilor de ABPA nefiind cunoscută.

ABPA afectează pacienții cu astm preexistent (în orice stadiu - de la formele ușoare la astm corticodependent) sau fibroză chistică, rareori fiind descrise cazuri de ABPA în absența acestor două afecțiuni.

Există o similitudine între manifestările clinice ale ABPA și astmul cu sensibilizare la fungi.

Nivelul normal de Ig E totale, la un pacient cu boală activă pulmonară exclude diagnosticul de ABPA¹⁴.

Nivelele de Ig E serice totale sau specifice sunt necesare pentru diagnosticul diferențial al ABPA și se corelează cu gradul de activitate a bolii²⁷, fiind utile pentru monitorizarea răspunsului la tratament.

Testarea cutanată prick și dozarea Ig E specifice (metode cu sensibilitate și specificitate crescută) permit diagnosticul precoce al bolii²⁸, asociindu-se cu un prognostic favorabil, implicit împiedicând evoluția spre modificări ireversibile ale țesutului pulmonar (fibroză).

Bibliografie

1. Lake FR, Tribe AE, Mcalder R, Froudust J, Thompson PJ. Mixed allergic bronchopulmonary fungal disease due to *Pseudallescheria boydii* and *Aspergillus*. *Thorax*, 1990;45: 489-491.
2. Greenberger PA, Diagnosis and management of allergic bronchopulmonary aspergillosis, *Allergy Proc*, 1994;15: 335-339.
3. Russell Blair, Jeremy S. Breit, Stephen P. Peters, Merck Manual Online Library, Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis (ABPA) Last full review / revision, April 2008 .
4. Tillie-Leblond I, Tonnel A-B. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy* 2005;60: 1004-1013.
5. Chupp G., Carolyn L., Fishman's pulmonary diseases and disorders, Mc Graw-Hill Professional, 2008, pg. 837-844.
6. Agarwal R. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Chest*, 2009;135(3):805 - 826.
7. Radin RC, Greenberger PA, Patterson R, Ghory A. Mould counts and exacerbations of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clin Allergy*, 1983;13: 271-275.
8. Brakhage AA, Jahn B, Schmidt A (eds) (1999). *Aspergillus fumigatus: Biology, Clinical Aspects and Molecular Approaches to Pathogenicity*. Karger, Basel.
9. Dracea L. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis (ABPA) - Characteristic Overview in Cystic Fibrosis. *Junahul Pediatricului* - Year IX, 2006: IX, Nr. 35-36.
10. Austen FK, Frank MM, Atkinson JP, Samter M. *Samter's Immunologic Diseases* 6th edition (September 15, 2001), Lippincott Williams & Wilkins Publishers, pg. 686 - 687.
11. Patterson R, Greenberger PA, Grammer LC. *Patterson's Allergic Diseases* 6th edition (March 2002), Lippincott Williams & Wilkins Publishers, pg 246-252.
12. Adelman DC, Casale TB, Corren J. *Manual of Allergy and Immunology: Diagnosis and Therapy* 4th edition (March 15, 2002), Janathan Corren By Lippincott Williams & Wilkins Publishers, pg. 59-60
13. Middleton, Elliott By Mosby. *Allergy: principles and practice* 5th ed (1998), pg. 844-851

14. Lazarus AA, Thilgar B, McKay SA. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis, *Disease - a - month*. 2008;54:547-564
15. Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110: 685–692.
16. Kurup VP, Kumar A.. Immunodiagnosis of aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 1991; 4(4): 439-456
17. Cramer R, Hemmann S, Ismail C, Menz G, Blaser K. Disease-specific recombinant allergens for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Int Immunol*, 1998;10(8):1211–1216
18. Hemmann S, Menz G, Ismail C, Blaser K, Cramer R. Skin test reactivity to 2 recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens in *A fumigatus*-sensitized asthmatic subjects allows diagnostic separation of allergic bronchopulmonary aspergillosis from fungal sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104: 601–607.
20. Banerjee B, Kurup VP, Greenberger PA, Johnson BD, Fink JN. Cloning and expression of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 16 mediating both humoral and cell-mediated immunity in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Clin Exp Allergy* 2001;31: 761–770.
21. Greenberger PA, Miller TP, Roberts M, Smith LL. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with and without evidence of bronchiectasis. *Ann Allergy* 1993;70: 333–338.
22. Prasad R, Garg R, Shukla SA. Allergic broncho-pulmonary aspergillosis with aspergilloma developing in a cane sugar mill worker. *The Internet Journal of Pulmonary Medicine*, 2007;9
23. Denning DW, O’Driscoll BR, Hogaboam CM, et al. The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. *Eur Respir J* 2006;27:615-26.
24. Greenberger PA, Patterson R. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. Model of Bronchopulmonary Disease with Defined Serologic, Radiologic, Pathologic and Clinical Findings from Asthma to Fatal Destructive Lung Disease. *Chest*, 1987, 91:6 Suppl 165S-171S
25. Rosenberg M, Patterson R, Mintzer R, Cooper BJ, Roberts M, Harris KE. Clinical and immunologic criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann Intern Med* 1977;86: 405–414.
26. McCarthy DS, Pepys J. Allergic broncho-pulmonary aspergillosis. Clinical immunology. 2. Skin, nasal and bronchial tests. *Clin Allergy* 1971;1: 415–432.
27. Phil Lieberman, John Anderson. Allergic Diseases Diagnosis and Treatment, Third Edition, pg.112-114
28. Patterson K, Strek ME. Strek Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. The Proceedings of the American Thoracic Society, 2010;7:237-244