

Aspergilosis: mecanismos de patogenicidad implicados y aproximación al diagnóstico de laboratorio

José Luis Blanco, Javier Guedeja-Marrón, Jesús Caballero y Marta Eulalia García

Departamento Patología Animal I, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España

Resumen

Las aspergilosis constituyen un amplio grupo de enfermedades, dentro de las cuales las más graves son las aspergilosis invasoras, alteraciones que afectan fundamentalmente a individuos inmunodeprimidos. En el presente trabajo se realiza una revisión centrada en tres aspectos principales de estas alteraciones: 1) Posibilidad de diferenciación de cepas de *Aspergillus fumigatus* tanto por métodos fenotípicos como genotípicos, 2) Mecanismos de patogenicidad de esta especie fúngica y en especial los relacionados con la actividad elastasa y 3) Procedimientos de diagnóstico de laboratorio de las aspergilosis, principalmente en relación con la determinación de antígenos circulantes y secuencias de ADN en suero y orina de pacientes.

Aspergillus, *Aspergillus fumigatus*, Patogenicidad, Inmunodiagnóstico, PCR

Aspergilosis: Mechanisms of pathogenicity implicated and approach to laboratory diagnosis

Summary

Aspergilosis comprises a wide range of clinical conditions, of which the most serious is invasive aspergilosis, which particularly affects immunodeficient individuals.

In the present work we present a review centred on three main aspects of this disease: 1) Possibility of differentiation of strains of *Aspergillus fumigatus* by phenotypic and genotypic methods, 2) Mechanisms of pathogenicity of this species and especially the relationships of elastase activity, and 3) Laboratory diagnosis of aspergilosis, principally in terms of determination of circulating antigens and DNA sequences in the blood and urine of patients.

Key words

Aspergillus, *Aspergillus fumigatus*, Pathogenicity, Immunodiagnosis, PCR

Nos proponemos en el presente trabajo realizar una revisión de la situación actual de las aspergilosis, una de las infecciones hospitalarias más importantes, tanto por su frecuencia como por su gravedad, centrándonos especialmente en el estudio de los mecanismos de patogenicidad y en los avances en el diagnóstico de laboratorio de estos procesos. En los últimos años son constantes las descripciones de nuevas sustancias implicadas en la patogenicidad de *Aspergillus fumigatus*, que además tienen gran importancia para el posible diagnóstico de la enfermedad: si siempre que hay invasión por el hongo es porque secreta una determinada sustancia, cada vez que ésta sea detectada sería indicativa de la enfermedad. Esta es la premisa sobre la que trabajan muchos laboratorios en el mundo y lo que nos impulsa a la realización de esta puesta al día de las últimas investigaciones al respecto.

Aspergilosis

Las aspergilosis constituyen un grupo de enfermedades que en los últimos años están alcanzando una gran importancia, entre las cuales se encuentran asma alérgica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergiloma y aspergilosis invasora. Están producidas por hongos considerados oportunistas, incluidos en el género *Aspergillus*, de los cuales sin duda el más importante es *A. fumigatus*, responsable de la mayoría de los procesos morbosos ocasionados por este género.

Los más graves de estos procesos son las aspergilosis invasoras, alteraciones que afectan fundamentalmente a individuos inmunodeprimidos; por tanto se trata de una patología directamente relacionada con personas que han sido sometidas a un trasplante, y las que son sometidas a terapias con fármacos citotóxicos y corticosteroides; también se relacionan con pacientes con fibrosis quística [1].

Entre las infecciones sistémicas graves causadas por hongos patógenos, la incidencia de aspergilosis aparece en segundo lugar, sólo superada por las infecciones por *Candida*, si bien las aspergilosis son las que producen una mayor mortalidad [2].

Aunque inicialmente las aspergilosis fueron incluidas entre los criterios definitorios de sida, después fueron

Dirección para correspondencia:

Dr. José L. Blanco Cancelo
Departamento Patología Animal I, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, España
Tel.: +34 1 3943717, Fax: +34 1 3943908
E-mail: jlblanco@eucmax.sim.ucm.es

excluidas por su escasa incidencia [3]. Esto parece ser debido a que clásicamente la inmunodepresión por células T no se relaciona con una mayor predisposición al desarrollo de aspergilosis, a diferencia de lo que acontece con otros hongos como *Cryptococcus neoformans* o *Histoplasma capsulatum*. Parece aceptada una incidencia de aspergilosis invasora en pacientes con infección por el VIH de aproximadamente un 5-7 por 1000, siendo más frecuente hallar una simple colonización aspergilar del tracto respiratorio superior, con valores de hasta un 5% [4].

Sin duda, uno de los principales grupos de riesgo de aspergilosis invasora son los pacientes sometidos a trasplante. Así, en el caso concreto de trasplante de médula ósea se ha descrito una frecuencia de aspergilosis de 4-38% [5], con una mortalidad aproximada del 60%, si bien ésta puede reducirse por el diagnóstico precoz y el tratamiento eficaz [6]. Otros autores indican mortalidades superiores, que llegan al 94% [7]. Saugier-Weber *et al.* [8], también en pacientes trasplantados de médula ósea describieron que un 5% desarrollaron aspergilosis pulmonar invasora, con un 82% de mortalidad; en ningún caso se detectaron anticuerpos, y sólo en uno de los 18 pacientes se detectó antígeno de *Aspergillus*, unos días antes de la muerte del paciente.

La fibrosis quística es la enfermedad hereditaria letal más frecuente en la raza blanca. En los últimos años se ha hecho especial hincapié en la alta frecuencia de aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) en enfermos con fibrosis quística, con una prevalencia aproximada del 10% [9]. Otros autores citan que en un 25% de pacientes con fibrosis quística se describió colonización por *A. fumigatus* y en un 6,5% se diagnosticó ABPA [10]. En nuestro país, Negrodo *et al.* [11] han descrito una colonización por *A. fumigatus* en un 25,8% de pacientes con fibrosis quística, mientras que el 33,3% poseían anticuerpos frente a este hongo.

Dentro del concepto de aspergilosis invasora, consideramos de gran importancia el hecho de que cada vez se van describiendo más casos en pacientes no inmunodeprimidos [4], que ha llegado en estudios realizados en España hasta un porcentaje del 18,7% [12], lo que lleva a estos autores a recomendar que se sospeche de aspergilosis invasora ante pacientes que presentan fiebre e infiltrados pulmonares, no sólo inmunodeprimidos, sino también aquéllos aparentemente inmunocompetentes, que no respondan al tratamiento antibiótico habitual y cuyos estudios microbiológicos rutinarios muestren la presencia de hongos.

En los últimos años las principales investigaciones acerca del poder patógeno de *A. fumigatus* se han centrado en dos campos:

1. Posibilidad de diferenciación de cepas aisladas de diferentes orígenes, con objeto por una parte de poder prever su patogenicidad, y por otro, de poder identificar como iguales los aislados procedentes de distintos pacientes, de diferentes partes de un área (un hospital por ejemplo) y de distintas localizaciones en un mismo paciente.
2. Estudio de los diferentes compuestos sintetizados por estos hongos, y con un papel claro en la patogenicidad, y consecuentemente, en el desarrollo de la enfermedad, y por ende, implicados en el diagnóstico.

Diferenciación de cepas de *Aspergillus fumigatus*

Métodos fenotípicos. La variabilidad fenotípica se ha estudiado por las características morfológicas, sensibilidad a diferentes toxinas, electroforesis enzimática con respecto a movilidad de esterasa y fosfatasa, e inmuno-

blotting. También se han utilizado los sistemas de ubiquinona y la comparación electroforética de enzimas. Ninguna de estas técnicas se ha desarrollado como un sistema formal y reproducible porque su grado de discriminación es bajo y la estandarización difícil [13-16]. No debe olvidarse el hecho de que el depender de factores ambientales hace que sea un procedimiento demasiado variable para ser considerado concluyente [17].

Métodos genotípicos. Se asume que *A. fumigatus* se propaga casi exclusivamente por vía asexual a través de la producción de conidios [18]. Esto ha hecho que se hayan aplicado diferentes sistemas a la diferenciación genómica dentro de *Aspergillus*: patrones de fragmentos de restricción (RFLP), separación electroforética de cromosomas, amplificación aleatoria de ADN (RAPD), Southernblot con ADN ribosomal o mitocondrial, secuencias genómicas no ribosomales, etc. [15,17,19,20]. Si bien los resultados iniciales de estas investigaciones parecen prometedores, todavía no se puede hablar de realidad en el campo de la diferenciación genómica de cepas de *A. fumigatus*.

Un problema añadido es la descripción de un mismo mecanismo de patogenicidad originado por sustancias diferentes. Es el caso que citaremos a continuación de la actividad elastasa, lo que implicaría diferencias genómicas pero con el mismo efecto patogénico, o lo que es lo mismo, con la misma potencial virulencia.

Sustancias implicadas en la patogenicidad

Diferentes sustancias se han descrito como importantes en la patogenicidad de *A. fumigatus*, si bien en algunos casos existen datos contradictorios entre diferentes autores. Especial importancia se le ha dado a la actividad elastasa de *A. fumigatus*, principalmente por las siguientes razones [21]: a) la elastina constituye un componente importante de la proteínas pulmonares totales, b) *A. fumigatus* tiene una conocida actividad elastasa y c) la elastasa es un importante factor de virulencia en otros patógenos pulmonares, como *Pseudomonas aeruginosa*.

Se ha descrito que mientras que todos los aislamientos que causan aspergilosis invasora producen elastasa, no todos los aislamientos que producen esta enzima fueron asociados con una enfermedad invasora [22,23].

Actualmente parece que la actividad elastasa en *A. fumigatus* puede deberse a la síntesis de diferentes proteasas elastinolíticas, y no de un compuesto único:

1. Una serin-proteasa alcalina de 33 kDa [23], muy semejante a la quimiotripsina [22]. Hasegawa *et al.* [24] han aislado y caracterizado este compuesto, que ellos indican con un PM de 32 kDa, con 336 residuos de aminoácidos y un punto isoeléctrico de 9,1.
2. Una metaloproteasa de 43 kDa [25], que para otros autores presentaría un PM de 42,1 kDa y estaría constituida por 389 aminoácidos [26], probablemente producida y excretada durante el crecimiento fúngico en tejido pulmonar [27].
3. Una aspártico-proteasa (Aspergillopepsin F) de 39 kDa y 393 aminoácidos [28]. Esta Aspergillopepsin F es capaz de hidrolizar no sólo la elastina, sino también colágeno y laminina, las otras dos matrices proteicas principales del pulmón [28].
4. Una quimiotripsina, descrita como constante en *A. fumigatus* y específica de especie, que tendría gran importancia en la patogenicidad de la aspergilosis, degradando compuestos como elastina, colágeno, fibrinógeno y laminina, además de presentar una potente acción histolítica [29,30].

La expresión de la actividad elastasa se ha descrito como dependiente de la temperatura [31]. Asimismo se ha comprobado que cuando se añade peptona al medio, no se produce degradación de la elastina, lo que indicaría la posibilidad de tratarse de un enzima inducible [32].

Si bien se le da una gran importancia a esta elastasa, parece evidente que no es el único factor de virulencia, habiendo otras proteasas importantes que se producen y actúan *in vivo* [33]. Así, se han descrito distintas sustancias como importantes en la patogenicidad de *A. fumigatus*:

1. Una mitogilina de 18 kDa [34] con actividad citotóxica [35] y que podría estar relacionada con proteínas similares sintetizadas por *Aspergillus restrictus* y *Aspergillus giganteus*, que parece ser podría llegar a permitir la diferenciación específica de cepas de *A. fumigatus* [34]. Se trataría de un antígeno principal de 18 kDa, de la que el gen responsable ha sido secuenciado recientemente, y que resultaría ser homóloga en un 99% a la mitogilina de *A. restrictus* [36].

2. Una metaloproteasa de 40 kDa con actividad residual colagenolítica [21], cuyo gen que la codifica ha sido recientemente clonado [37].

3. Un galactomanano secretado al medio como un exoantígeno de importancia diagnóstica [38-40].

4. Una Proteína similar a la del *heat shock* que podría jugar un papel importante en los mecanismos inmunorreguladores de las aspergilosis [41].

5. Factores cilioinhibidores que permitirían colonizar la mucosa, de los que el más importante sería la gliotoxina [42]. Se ha concedido gran importancia al mecanismo por el cual *A. fumigatus* puede colonizar la mucosa respiratoria. En este sentido, Amitami *et al.* [42] han purificado y caracterizado dos factores cilioinhibidores: uno de bajo PM y otro de elevado PM. El primero de ellos resultó ser la gliotoxina, metabolito conocido de *A. fumigatus*. El otro compuesto, constituido a su vez por proteínas con 35 y 25 kDa todavía no ha sido perfectamente caracterizado, si bien no posee actividad elastinolítica ni proteolítica. La gliotoxina junto con otras micotoxinas, principalmente ácido helvólico y fumagilina, han recibido últimamente una gran atención dentro de la patogenicidad de este hongo [43], con un efecto inmunosupresor *in vivo* [2].

6. Factores de adherencia de *Aspergillus* a tejidos del hospedador. La atención de los investigadores se ha centrado principalmente en las interacciones con el fibrinógeno, una glicoproteína plasmática incluida en la vía de coagulación y en reacciones inflamatorias; se ha demostrado que el fibrinógeno depositado sobre epitelios dañados forma un lugar de unión para numerosos microorganismos patógenos [35]. Según estos autores, de los diferentes hongos investigados, únicamente algunos *Aspergillus* patógenos, en particular *A. fumigatus*, se unen significativamente al fibrinógeno.

En este mismo sentido, *A. fumigatus* también interacciona con la laminina, el principal componente estructural de la membrana basal pulmonar [35]. Los lugares de unión todavía no han sido identificados, pero parece ser que sean los mismos receptores fúngicos los responsables de la unión a fibrinógeno y laminina.

En conclusión, a pesar de la amplia bibliografía existente al respecto, todavía no se han elucidado los determinantes moleculares incluidos en la virulencia del patógeno oportunista *A. fumigatus*. Probablemente la virulencia sea el resultado de la actividad de numerosos factores que incluirían uno o más sistemas de adherencia, varias toxinas y enzimas extracelulares. Algunos autores indican que ciertas cepas de *A. fumigatus* están mejor

adaptadas al crecimiento en tejido pulmonar, y de aquí su mayor capacidad para sobrevivir y proliferar, dando lugar a una patología [44].

Pero en definitiva, la duda persiste: ¿Hay un factor de virulencia en *A. fumigatus* o su patogenicidad es resultado exclusivamente de la receptividad del hospedador? [35]; o bien: ¿Todas las cepas de *A. fumigatus* tienen la misma capacidad para invadir tejidos o existen diferencias genómicas relacionadas con el desarrollo de la enfermedad? [17].

Diagnóstico de aspergilosis

En individuos inmunodeprimidos la terapia antifúngica resulta efectiva sólo si se aplica en los primeros estadios de la enfermedad; si se inicia demasiado tarde su efectividad decrece considerablemente. Incluso en muchos casos las micosis invasivas se reconocen únicamente en la autopsia [45]. Todo ello lleva a la necesidad de disponer de métodos sensibles, rápidos y efectivos para el diagnóstico de las aspergilosis.

En los últimos años se han desarrollado diversos procedimientos tanto para la detección de anticuerpos como de antígenos en suero y orina de pacientes con aspergilosis, con desigual resultado según el tipo de aspergilosis.

Así, en el caso concreto de la ABPA, se ha comprobado que estos pacientes tienen un elevado nivel de anticuerpos específicos de tipo IgG e IgE, lo cual supone un criterio de ayuda para el diagnóstico [46]. Por tanto las técnicas de inmunoblotting con la subsiguiente detección de subclases de IgG y de IgE pueden jugar un importante papel en el serodiagnóstico de enfermedades alérgicas debidas a *A. fumigatus* [47].

También se ha descrito la utilidad de la técnica ELISA, más sensible que el *immunoblotting* para cuantificar IgE anti-*Aspergillus* en pacientes con fibrosis quística [46].

En la aspergilosis pulmonar de colonización y en la necrotizante crónica, la detección de anticuerpos es de utilidad diagnóstica, especialmente la detección de anticuerpos específicos anti-elastasa por Western-Blot [48].

En el caso de las aspergilosis invasoras, parece ser que el camino más adecuado sería el de la detección de antígenos específicos en sangre u orina de pacientes. Esto vendría directamente influenciado por la carencia de respuesta inmune en aquellos individuos inmunodeprimidos, que constituyen sin duda el grupo de riesgo de pacientes con aspergilosis.

Por tanto, la descripción de antígenos puros de conocidas propiedades físicoquímicas serían de gran valor tanto para definir los diferentes mecanismos inmunológicos incluidos en estas enfermedades como en el diagnóstico de las mismas.

La detección de antígenos puede ser un método efectivo cuando se disponga de reactivos suficientemente sensibles y específicos. Las investigaciones actuales apuntan en esa dirección [49], si bien se encuentra la dificultad de estandarización de los extractos de *A. fumigatus* [47]. En este sentido ya hemos comentado a la hora de hablar de la producción de elastasa, su característica de ser inducida, y por tanto, la posibilidad de síntesis *in vivo*, sin que sea detectada *in vitro*.

La purificación de uno de estos antígenos, un galactomanano, ha llevado al desarrollo de un método comercial de diagnóstico de aspergilosis por aglutinación en látex (Pastorex *Aspergillus* test), cuya sensibilidad en pacientes con aspergilosis invasora para algunos autores ronda el 90% [39,50]. Su inconveniente es que estos anti-

genos de galactomanano son rápidamente eliminados de sangre circulante por la formación de complejos inmunes y la endocitosis por las células de Kupffer en el hígado [6]. Estos mismos autores han mostrado la mayor utilidad del sistema Pastorex para detectar galactomanano en orina con respecto a suero, si bien en cualquier caso no se encontró una diferencia apreciable entre la infección por *Aspergillus* y la presencia en personas sin infección. Por tanto podría ser interesante su utilización únicamente en casos de pacientes con riesgo de padecer aspergilosis, pues lo que detecta es el contacto con el hongo, pero no la enfermedad en sí. Esto ha llevado a ciertos autores a indicar que este test Pastorex muestra una baja sensibilidad y especificidad en el diagnóstico inicial de aspergilosis invasora, y siempre se debe simultanear con el cultivo microbiológico, considerando los resultados obtenidos conjuntamente con evidencias clínicas y radiológicas, así como con la obtención de muestras seriadas [7,51]. Este test se ha adaptado recientemente a un ELISA tipo *sandwich* con una mayor sensibilidad y especificidad [52].

Para Haynes y Rogers [53] los métodos ELISA son muy superiores al test de aglutinación de látex tipo Pastorex, que sólo en uno de los 19 casos investigados fue el primer indicador de la existencia de aspergilosis. Stynen *et al.* [54] describen un ELISA doble *sandwich* que permite detectar galactomanano a cantidades tan bajas como 1 ng, mejor en suero que en orina, y que puede detectarse al menos 39 días antes de la muerte. El análisis de múltiples muestras del mismo paciente incrementa notablemente la posibilidad de detección del antígeno; así se recomienda la toma de muestras entre diariamente a dos veces por semana, especialmente durante periodos febriles en pacientes con neutropenia [55].

Además del mencionado galactomanano, recientemente ha aparecido la descripción de distintos antígenos circulantes útiles para el diagnóstico de aspergilosis invasora. Hamilton *et al.* [56] han descrito la utilidad de la detección de una Cu, Zn, superóxido dismutasa en pacientes con aspergilosis por inmunoblotting. Otros autores han utilizado la detección de un carbohidrato de *Aspergillus* en suero de pacientes [57].

Dentro de otros métodos de diagnóstico de aspergilosis, Jauregui *et al.* [58] describen que la detección de quitina es un método sensible que permite cuantificar el grado de infección fúngica de un órgano y podría ser de utilidad en estudios sobre la patogenia de la infección por *A. fumigatus* y en la evaluación de la eficacia de fármacos antifúngicos.

Se ha aislado una proteína inmunodominante de 90 kDa que presenta actividad catalasa, que ha mostrado reacción inmune específica con un 90,3% de muestras de suero de pacientes con aspergiloma, y en ningún caso con sueros de individuos control. Por tanto, constituiría un potencial marcador para el diagnóstico de pacientes con aspergiloma [59].

A pesar de ser muchos los métodos descritos en los últimos años, ninguno de ellos aparece por el momento como un método infalible, con eliminación total de falsos positivos y negativos, para el diagnóstico de aspergilosis [60].

El test ideal no sólo debería mostrar una buena sensibilidad y especificidad, sino también tener un alto valor predictivo de los casos negativos que evitarían que muchos pacientes fueran innecesariamente tratados con fármacos potencialmente tóxicos o de elevado coste [61].

Una buena alternativa a los métodos inmunológicos podría ser la amplificación de secuencias específicas de DNA de *A. fumigatus* con su posterior detección en gel de agarosa. Ya Spreadbury *et al.* [1] demostraron la utili-

dad de la técnica PCR para detectar ADN de *A. fumigatus* tanto en animales infectados experimentalmente como en muestras clínicas de pacientes humanos. Una de las principales críticas al uso de PCR para detectar ADN de *Aspergillus* es el hecho de que, toda vez que los conidios de *Aspergillus* son habituales en el ambiente, resultarían comunes contaminantes. Por ello, se tendría un elevado riesgo de contaminación con ADN durante el proceso de PCR. Sin embargo, se han detectado productos amplificados sólo cuando se añaden por encima de 10^5 conidios a la mezcla para PCR, resultando evidente que tales cantidades es imposible que lleguen a dicha mezcla [1].

Otra consideración importante es la posible detección por PCR de ADN de *Aspergillus* en falsos positivos, al haberse generado por la colonización del tracto respiratorio por este hongo sin causar enfermedad activa. Por esto se ha sugerido que los resultados basados en la hibridación del ADN probablemente resulten demasiado sensibles para el diagnóstico de aspergilosis clínica [1].

Reddy *et al.* [62] han descrito un método de detección de ADN de *A. fumigatus* en orina de pacientes sospechosos de aspergilosis invasora. Esta metodología necesita más estudio para comprobar su utilidad. Makimura *et al.* [63] han descrito una metodología PCR capaz de detectar un amplio rango de hongos de importancia médica a partir de muestras clínicas (sangre, líquido cerebroespinal y esputos), y en trabajos posteriores describen la capacidad de detectar específicamente infecciones por *A. fumigatus* [64]. Nosotros hemos desarrollado una metodología capaz de diferenciar específicamente cepas de *A. fumigatus* [65].

Melchers *et al.* [66] han descrito una metodología PCR para detectar especies de *Aspergillus* en muestras de lavado broncoalveolar y, por tanto, para identificar aspergilosis invasora en pacientes de riesgo.

Tang *et al.* [67] han descrito un PCR específico para la detección de *A. fumigatus* y *A. flavus* en líquido de lavado broncoalveolar; esta metodología podría resultar muy útil en el diagnóstico de aspergilosis pulmonar invasora.

En definitiva, si bien son numerosas las investigaciones realizadas en los últimos años, todavía no están claros los mecanismos de patogenicidad de *A. fumigatus*, y sobre todo, su implicación en la diferenciación de cepas, pudiendo llegar a hablarse de cepas patógenas y saprófitas. Desde el punto de vista del diagnóstico, parece que el camino a seguir, especialmente en aspergilosis invasoras, es la detección de antígenos o secuencias de ADN en sangre u orina, sin que por el momento exista una metodología que podamos considerar eficaz.

Bibliografía

- Spreadbury C, Holden D, Aufaufre-Brown A, Baineridge B, Cohen J. Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31:615-621.
- Sutton P, Newcombe NR, Waring P, Mullbacher A. In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infect Immun* 1994;62:1192-1198.
- Alba D, Gomez-Cerezo J, De la Rosa P, Molina F. Aspergillosis pulmonar invasiva como primera manifestación de SIDA. *Med Clin (Barc)* 1994;102:435-436.
- Barbera JR, Castro M, Capdevila JA, Ortega A, Garcia A, Ocaña I. Aspergillosis diseminada en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. *Med Clin (Barc)* 1994;103:101-104.
- Wingard JR, Beals SV, Santos GW, Merz GW, Saral R. *Aspergillus* infections in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1987;2:175-181.
- Ansorg R, Heintschel E, Rath PM. *Aspergillus* antigenemia compared to antigenemia in bone marrow transplant recipients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 582-589.
- Hopwood V, Johnson EM, Cornish JM, Foot ABM, Evans EGV, Warnock DW. Use of the Pastorex *aspergillus* antigen latex agglutination test for the diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Pathol* 1995;48:210-213.
- Saugier-veber P, Devergie A, Sulahian A, et al. Epidemiology and diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in bone marrow transplant patients: result of a 5 year retrospective study. *Bone Marrow Transplant* 1993;12:121-124.
- Murali PS, Bamrah BS, Choi H, Fink JN, Kurup VP. Hyperimmune serum modulates allergic response to spores in a murine model of allergic aspergillosis. *J Leukoc Biol* 1994;55:29-34.
- Mroueh S, Spock A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Chest* 1994;105:32-36.
- Negredo P, Ballesteros S, Borrajo E, et al. Colonización por hongos en pacientes con fibrosis quística. *Rev Iberoam Micol* 1993;10:101-103.
- Alba D, Gomez-Cerezo J, De la Rosa P, Molina F, Vazquez JJ. Aspergillosis pulmonar invasora. *Rev Clin Esp* 1995; 195:22-25.
- Denning DW, Clemons KV, Hanson LH, Stevens DA. Restriction endonuclease analysis of total cellular DNA of *Aspergillus fumigatus* isolates of geographically and epidemiologically diverse origin. *J Infect Dis* 1990;162: 1151-1158.
- Loudon KW, Burnie JP, Coke AP, Matthews RC. Application of polymerase chain reaction to fingerprinting *Aspergillus fumigatus* by random amplification of polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1117-1121.
- Girardin H, Latge JP, Srikantha T, Morrow B, Soll DR. Development of DNA probes for fingerprinting *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1547-1554.
- García ME, Blanco JL, Kurup VP. Immunochemical reactivity of *Aspergillus fumigatus* antigens from different sources. *Rev Iberoam Micol* 1997;14:55-59.
- Mondon P, Thelu J, Lebeau B, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Virulence of *Aspergillus fumigatus* strains investigated by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Med Microbiol* 1995;42:299-303.
- Aufauvre-Brown A, Cohen J, Holden DW. Use of a randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 1992;30:2991-2993.
- Birch M, Noland N, Shankland GS, Denning DW. DNA typing of epidemiologically related isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Epidemiol Infect* 1995;114:161-168.
- Girardin H, Sarfati J, Traore F, Dupoy Camet J, Derouin F, Latge JP. Molecular epidemiology of nosocomial invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1994;32:684-690.
- Holden DW, Tang CM, Smith JM. Molecular genetics of *Aspergillus* pathogenicity. *Antonie van Leeuwenhoek* 1994;65:251-255.
- Guglielminetti M, Piccioni PD, Iadarola P, Luisetti M, Caretta G. Production of serine chymotrypsin-like elastase by *Aspergillus fumigatus* strains. *Bol Micol* 1993;8:27-33.
- Kolattukudy PE, Lee JD, Rogers LM, et al. Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis. *Infect Immun* 1993;61:2357-2368.
- Hasegawa Y, Nikai T, Yamashita R, et al. Isolation and characterization of elastolytic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *Jpn J Med Mycol* 1995;36:235-243.
- Markaryan A, Morozova I, Yu H, Kolattukudy P. Purification and characterization of an elastolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. *Infect Immun* 1994;62:2149-2157.
- Sirakova TD, Markaryan A, Kolattukudy PE. Molecular cloning and sequencing of the cDNA and gene for a novel elastolytic metalloproteinase from *Aspergillus fumigatus* and its expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1994;62:4208-4218.
- Tomee JFC, Kauffman HF, Klimp AH, De Monchy JGR, Koeter GH, Dubois AEJ. Immunologic significance of a collagen derived culture filtrate containing proteolytic activity in *Aspergillus*-related diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:768-778.
- Lee JD, Kolattukudy PE. Molecular cloning of the cDNA and gene for an elastolytic aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus* and evidence of its secretion by the fungus during invasion of the host lung. *Infect Immun* 1995;63:3796-3803.
- Bouchara JP, Tronchin G, Larcher G, Annaix V, De gentile L, Chabasse D. *Aspergillus fumigatus* interactions with host proteins: fixation and degradation. *J Mycol Med* 1992;2:43-48.
- Coulot P, Bouchara JP, Renier G, Annaix V, Planchenault C, Tronchin G et al. Specific interaction of *Aspergillus fumigatus* with fibrinogen and its role in cell adhesion. *Infect Immun* 1994; 62: 2169-2177.
- Denning DW, Elliot J, Keaney M. Temperature-dependent expression of elastase in *Aspergillus* species. *J Med Vet Mycol* 1993;31:455-458.
- Kothary MH, Chase T, Macmillan JD. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. *Infect Immun* 1984;43:320-325.
- Frosco MB, Chase T, Macmillan D. The effect of elastase specific monoclonal and polyclonal antibodies on the virulence of *Aspergillus fumigatus* in immunocompromised mice. *Mycopathologia* 1994;125:65-76.
- Moser M, Cramer R, Menz G, et al. Cloning and expression of recombinant *Aspergillus umigatus* allergen I/a (rAsp f I/a) with IgE binding and type I skin test activity. *J Immunol* 1992;149:454-460.
- Bouchara JP, Tronchin G, Larcher G, Chabasse D. The search for virulence determinants in *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* 1995;3:327-330.
- Arruda LK, Mann BJ, Chapman MD. Selective expression of a major allergen and cytotoxin, Asp II, in *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol* 1992;149:3354-3359.
- Jaton-Ogay K, Paris S, Huerre M, et al. Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* 1994; 14:917-928.
- Fratamico PM, Long WK, Buckley HR. Production and characterization of monoclonal antibodies to a 58-kilodalton antigen of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1991; 59:316-322.
- Drouhet E. Rapid tests for immunodiagnosis of invasive opportunistic mycoses. *Rev Iberoam Micol* 1993;10:53-67.
- Latge JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP, et al. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1994; 62:5424-5433.
- Kumar A, Reddy LV, Sochanik A, Kurup VP. Isolation and characterization of a recombinant heat shock protein of *Aspergillus fumigatus*. *J Allergy Clin Immunol* 1993;91:1024-1030.
- Amitani R, Taylor G, Elezis EN, et al. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infect Immun* 1995;63:3266-3271.
- Bauer J, Gareis M, Bott A, Gedek B. Isolation of a mycotoxin (gliotoxin) from a bovine udder infected with *Aspergillus fumigatus*. *J Med Vet Mycol* 1989;27:45-50.
- Tang CM, Cohen J, Rees AJ, Holden DW. Molecular epidemiological study of invasive pulmonary aspergillosis in a renal transplantation unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:318-321.
- Ruchel R. Diagnosis of invasive mycoses in severely immunosuppressed patients. *Ann Hematol* 1993;67:1-11.
- Knutsen AP, Mueller KR, Hutchenson PS, Slavina RG. Serum anti-*Aspergillus fumigatus* antibodies by immunoblot and ELISA in cystic fibrosis with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93:926-931.
- Trompelt J, Becker WM, Schlaak M. Analysis of IgG subclass and IgE response in allergic disease caused by *Aspergillus fumigatus* by immunoblotting techniques. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;104:390-398.
- Pinel C, Monod M, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Western-Blot detection of IgG anti-*Aspergillus fumigatus* elastase in sera of patients with aspergillosis. *J Med Vet Mycol* 1994;32:231-234.
- Torres JM, Madrenys N. El diagnóstico serológico de la aspergilosis sistémica. *Rev Iberoam Micol* 1993;10:75-79.
- Dupont B, Improvisi L, Provost F. Detection de galactomannane dans les aspergilloses invasives humaines et animales avec un test au latex. *Bull Soc Fr Mycol Med* 1990;19:35-42.
- Verweij PE, Latge JP, Rijs AJMM, et al. Comparison of antigen detection and PCR assay during bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1995;33:3150-3153.
- Verweij PE, Stynen D, Rijs AJMM, de Pauw BE, Hoogkamp JAA, Meis JFGM. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1995;33:1912-1914.
- Haynes K, Rogers TR. Retrospective evaluation of a latex agglutination test for diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:670-674.
- Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1995;33:497-500.
- Manso E, Montillo M, De Sio G, D'Amico S, Discepoli G, Leoni P. Value of antigen and antibody detection in the serological diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 756-760.
- Hamilton AJ, Holdom MD, Hay RJ. Specific recognition of purified Cu, Zn superoxidized-mutase from *Aspergillus fumigatus* by immune human sera. *J Clin Microbiol* 1995;33: 495-496.
- Patterson TF, Minitier P, Patterson JE, Rapoport JM, Andriole VT. *Aspergillus*

- antigen detection in the diagnosis of invasive aspergillosis. *J Infect Dis* 1995;171:1553-1558.
58. Jauregui A, Martinez ML, Arnaiz I, Pontón J, Cisterna R. Estudio de la infección diseminada por *Aspergillus fumigatus* mediante la detección de quitina. *Rev Iberoam Micol* 1994;11:21-24.
59. Lopez-Medrano R, Ovejero MC, Calera JA, Puente P, Leal F. An immunodominant 90-Kilodalton *Aspergillus fumigatus* antigen is the subunit of a catalase. *Infect Immun* 1995;63:4774-4780.
60. Blanco JL, Garcia ME, Castillo L, Kurup VP. Antígenos de *Aspergillus fumigatus* en el diagnóstico de aspergilosis broncopulmonar alérgica por técnica ELISA. *Rev Iberoam Micol* 1994;11:34.
61. Burnie JP. Early diagnosis of systemic fungal infection. *Curr Opin Infect Dis* 1995;8:258-260.
62. Reddy LV, Kumar A, Kurup VP. Specific amplification of *Aspergillus fumigatus* DNA by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1993;7:121-126.
63. Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H. Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* 1994;40:358-364.
64. Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H. Specific detection of *Aspergillus* and *Penicillium* species from respiratory specimens by polymerase chain reaction (PCR). *Jpn J Med Sci Biol* 1994;47:141-156.
65. García ME, Blanco JL, Nagai H, Guo J, Kurup VP. Diferenciación de *Aspergillus fumigatus* por una técnica PCR. *Rev Iberoam Micol* 1994;11:52.
66. Melchers WJG, Verweij PE, Van der Hurk P, *et al.* General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 1994;32:1710-1717.
67. Tang CM, Holden DW, Aufauvre-Brown A, Cohen J. The detection of *Aspergillus* spp. by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1313-1317.