

El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora

Amalia del Palacio¹, María Soledad Cuétara² y José Pontón³

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

Resumen

La aspergilosis invasora es una enfermedad con una elevadísima morbimortalidad en pacientes inmunodeficientes, debido en parte a la dificultad de diagnosticar la enfermedad tempranamente. Para su diagnóstico se deben utilizar conjuntamente técnicas de imagen (tomografía axial computarizada de alta resolución) y técnicas de laboratorio como la observación directa, el cultivo y la detección de marcadores (antígenos fúngicos como el galactomanano o ADN de *Aspergillus*) que pueden encontrarse en sangre en un estadio inicial de la infección.

Palabras clave

Aspergilosis invasora, Diagnóstico

Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis

Summary

Invasive aspergillosis is major cause of morbidity and mortality in immunosuppressed patients, in part due to the inability to identify infected patients at an early stage of the disease. Diagnosis is based on a combination of imaging (high-resolution computed tomography) and a number of laboratory techniques including direct examination, culture and circulating markers (galactomannan and *Aspergillus* DNA) which can be detected at early stages of the infection.

Key words

Invasive aspergillosis, Diagnostic methods

El género *Aspergillus* está constituido por hongos filamentosos que habitualmente se reproducen asexualmente por conidios (*Deuteromycetes*), presentando algunas especies también reproducción sexual (*Ascomycetes*). Aunque se han descrito más de 180 especies, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* son responsables del 95% de las infecciones en humanos (Figuras 1 y 2). *Aspergillus terreus* y *Aspergillus nidulans* son agentes de aspergilosis menos frecuentes [1].

Los conidios de *Aspergillus* son ubicuos y, por consiguiente, son frecuentes contaminantes de laboratorio. Existen altas concentraciones tanto en el aire exterior como en el interior de los hospitales, en la tierra y sobre todo en la materia orgánica en descomposición [2]. Por otro lado, el género *Aspergillus* forma parte de la micro-

biota normal saprofita orofaríngea, de fosas nasales, tegumentos y del tubo gastrointestinal [2]. La concentración de conidios de *Aspergillus* parece aumentar en relación con obras de remodelación o con conducciones de aire contaminadas, situaciones que se han asociado con la aparición de brotes de aspergilosis nosocomial [2]. Asimismo, los esparadrapos contaminados pueden ser origen de contaminaciones e infecciones nosocomiales [2]. Esta distribución tan ubicua puede dificultar el diagnóstico de laboratorio de las aspergilosis.

Aspergillus puede causar un amplio espectro de infecciones en el ser humano que van desde las formas superficiales (otitis externas fúngicas, onicomicosis, queratomycosis, infecciones de heridas y quemaduras) a la aspergilosis profunda invasora que es la que plantea los mayores retos diagnósticos al microbiólogo y al clínico [3]. La presentación clínica de la aspergilosis invasora es variable, inespecífica y tardía, siendo esencial sospecharla en situaciones de riesgo [4,5]. La sospecha clínica de aspergilosis invasora debe ser siempre confirmada por técnicas de imagen (tomografía axial computarizada, resonancia magnética nuclear) y procedimientos microbiológicos e histológicos. La aspergilosis invasora se adquiere habitualmente por inhalación de conidios, dando lugar a una infección pulmonar y, menos frecuentemente, a una infección de senos y oídos. La infección por vía cutánea es posible (por rotura de barrera debida a catéteres y esparadrappo contaminado), aunque esta forma de adquisición es rara [4]. La diseminación a distancia es posible por vía hemática y por continuidad (por infiltración vascular y tisular). En la tabla 1, tomada de Lin *et al.* [6], se encuentran recogidos los porcentajes de las diversas formas clíni-

Dirección para correspondencia:

Dra. Amalia del Palacio
Servicio de Microbiología
Hospital Universitario Doce de Octubre
Avenida de Córdoba s/n
28041 Madrid, España
Tel.: +34 91 390 82 39/390 8634
Fax: +34 91 565 27 65
E-mail: apalacioh.hdoc@salud.madrid.org

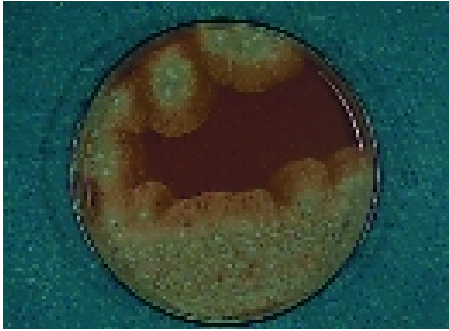


Figura 1. *Aspergillus fumigatus*. Aspecto macroscópico de una colonia en agar glucosado de Sabouraud con cloranfenicol.



Figura 2. *Aspergillus fumigatus*. Imagen microscópica de una colonia con azul algodón de lactofenol (x400).

cas de aspergilosis invasora. Es destacable que las formas pulmonares difusas son las más prevalentes, seguidas de las formas pulmonares localizadas (aspergilomas). La aspergilosis invasora de senos, las formas cutáneas primitivas y las traqueobronquitis tienen mejor pronóstico.

Tabla 1. Porcentaje de aspergilosis invasora [6].

Localización	TxMO	Malignidad hematológica	Sida
Pulmón (difusa)	25	53	61
Pulmón (localizada)	3	10	21
Senos	6	5	4
Traquea-bronquios	0	0	2
Cutánea	2	1	0
Diseminada	53	29	4
Varios órganos	10	2	8

TxMO: Trasplante de médula ósea

Puesto que los síntomas clínicos de la aspergilosis invasora son tardíos e inespecíficos, en la práctica habitual es fundamental estratificar a los enfermos neutropénicos por grupos de riesgo según criterios de Prentice *et al.* [7]. En la tabla 2 se encuentran ordenados de mayor a menor los factores de riesgo que predisponen a padecer infección fúngica invasiva, y en la tabla 3 aquéllos relacionados con la aspergilosis invasora en trasplante hepático [8-9].

Tabla 2. Factores de riesgo de micosis invasora en neutropénicos. Riesgo alto [7].

- < 100 neutrófilos > 3 semanas
- Trasplante de médula ósea no relacionado
- Enfermedad injerto contra huésped
- Neutropenia < 500 > 5 semanas
- Corticosteroides > 2 mg/kg > 2 semanas
- Corticosteroides > 1 mg/kg con neutropenia
- AraC altas dosis
- Fludarabina

Recientemente, Len *et al.* [10] (del Grupo para el Estudio de la Infección en el Trasplante, GESITRA) han presentado en el ICAAC 2003 un estudio sobre los factores de riesgo de la aspergilosis invasora en receptores de trasplante de órgano sólido. La aspergilosis invasora tem-

prana (< 90 días) se asocia de forma significativa con estancia prolongada en UCI, hemodiálisis, tratamiento con OKT3 y con la infección sintomática por citomegalovirus. La aspergilosis invasora tardía (>90 días) se asocia, por el contrario, con rechazo crónico que requiere una gran inmunosupresión y con insuficiencia renal crónica.

Tabla 3. Factores de riesgo de aspergilosis invasora en receptores de trasplante hepático [8,9].

- Insuficiencia renal con creatinina plasmática superior a 2,5 mg/dl durante los tres primeros meses post-trasplante
- Disfunción grave del injerto con bilirrubina plasmática superior a 15 mg/dl durante los tres primeros meses post-trasplante
- Trasplante urgente por fallo hepático fulminante
- Estancia en UCI mayor de siete días
- Desarrollo de enfermedad por citomegalovirus o *Pneumocystis carinii*
- Leucopenia grave con una cifra menor de 1000/mm³
- Nuevo trasplante

Impacto de la aspergilosis invasora

La aspergilosis invasora es una causa importante de morbilidad y mortalidad en enfermos inmunosuprimidos [4,11]. En la última década, diversos estudios hechos en hospitales terciarios modernos de Europa han demostrado que hasta el 4% de la población total hospitalaria (población no seleccionada) tiene aspergilosis invasora [12,13]. El diagnóstico se hace frecuentemente de forma tardía e incluso post-mortem, estimándose actualmente que hasta un 30% de casos de aspergilosis invasora no se diagnostica ni trata, siendo un hallazgo necrópsico [12,13] (Figura 3). En la tabla 4 se muestra la incidencia de aspergilosis invasora según la enfermedad de base [4,11,14], observándose que el grupo de riesgo más numeroso lo constituyen los enfermos hematológicos, con una prevalencia del 61%. La aspergilosis invasora se asocia de forma significativa a la inmunosupresión intensa, neutropenia profunda y mantenida, alteración de la inmunidad celular y la existencia de trabajos de construcción en áreas hospitalarias [4,11,14].

El diagnóstico temprano es esencial para instaurar un tratamiento antifúngico. En pacientes neutropénicos con aspergilosis invasora diagnosticada y tratada tras más de 10 días de la aparición del primer signo clínico y radiológico, la mortalidad atribuida a esta infección era del 90%, pero descendía al 40% cuando el tratamiento era instaurado tempranamente [15].

Tabla 4. Incidencia de aspergilosis invasora según enfermedad de base [11].

• Leucemia, linfoma (29%)
• Trasplante alogénico de médula ósea (25%)
• Trasplante de órgano sólido (9%)
• SIDA (8%)
• Trasplante autólogo de médula ósea (7%)
• Tumor de órgano sólido (4%)

El diagnóstico de la aspergilosis invasora mediante técnicas microbiológicas convencionales

El diagnóstico microbiológico tradicional de la aspergilosis depende de la presentación clínica y se basa en la sospecha clínica y la posterior confirmación microbiológica y anatomopatológica. En las aspergilosis superficiales la visión directa y el cultivo permiten apoyar el diagnóstico clínico de presunción. En enfermos con aspergilosis invasora pulmonar el examen directo del esputo suele ser negativo, siendo positivo, por el contrario, el examen microscópico del lavado broncoalveolar (Figura 4). En las formas de aspergilosis invasora cutáneas o de senos (muestras de lavados) pueden visualizarse micelios tabicados.

El examen directo con KOH, calcoflúor o Gram (Figura 5) permite un diagnóstico presuntivo rápido. El examen de tejidos obtenidos por biopsia teñidos con PAS o plata metenamina permite visualizar filamentos septados con ramificaciones en ángulo agudo (Figura 6). El problema estriba en que otros patógenos fúngicos, como *Fusarium* spp. y *Scedosporium* spp., son indistinguibles morfológicamente. Una mayor especificidad puede conseguirse mediante técnicas inmunohistoquímicas, combinando calcoflúor y anticuerpos específicos [16,17].

El aislamiento de *Aspergillus* por cultivo es un método sensible para detectar la infección y permite la identificación de la especie infectante y la realización de pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. *Aspergillus* spp. no es exigente en sus requerimientos nutritivos y el microbiólogo debe tener en cuenta que cuando se sospecha una infección por este género no debe utilizarse la cicloheximida en los medios de cultivo, porque inhibe su crecimiento. Aunque generalmente las especies patógenas humanas son capaces de crecer por encima de 37 °C, los medios de cultivo deben ser incubados a 25-37 °C durante cuatro semanas y, a ser posible, utilizando tubos en lugar de placas, ya que la deshidratación de los mismos después de cuatro semanas es menor [18]. El medio de cultivo más utilizado para diferenciar las distintas especies es el agar Czapeck-Dox [2].

Dado que *Aspergillus* es contaminante frecuente, el cultivo tiene una especificidad variable, ya que no permiten discriminar entre colonización e invasión, ni descartar la contaminación [19]. Por ejemplo, el aislamiento de *Aspergillus* en esputo, una de las muestras que se procesan con mayor frecuencia, puede ser consecuencia de la inhalación de conidios y no de una infección pulmonar. El valor predictivo aumenta si se obtienen cultivos con múltiples colonias o se aíslan repetidamente en esputos seriados [20,21]. Algunos estudios han demostrado que hasta el 20% de los cultivos de esputo pueden ser falsos positivos en receptores de un trasplante de médula ósea [21], siendo el porcentaje incluso más alto en receptores de trasplante de órgano sólido [22]. El valor predictivo del cultivo también depende de los factores de riesgo del paciente. Así, Perfect *et al.* [23] observaron que en los



Figura 3. Aspecto macroscópico de pulmón procedente de necropsia de paciente con aspergilosis invasora. Se observa infarto, necrosis y destrucción de la arquitectura pulmonar.

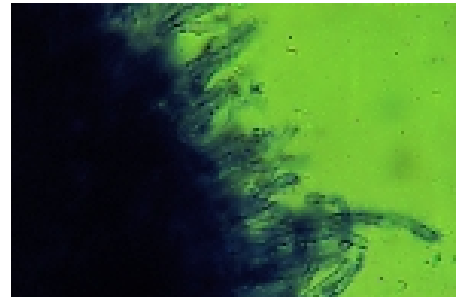


Figura 4. Examen directo con azul algodón de lactofenol de un esputo de receptor de trasplante renal, en el que se observan abundantes micelios tabicados de *Aspergillus fumigatus*.

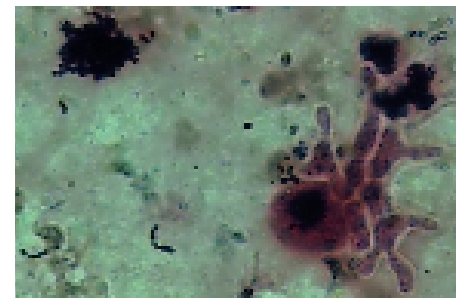


Figura 5. Tinción de Gram (x1.000) de un esputo de paciente con aspergilosis pulmonar invasora, se observan micelios tabicados.

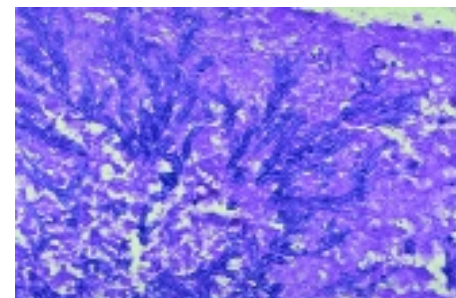


Figura 6. Invasión tisular (histología) con presencia de hifas de *Aspergillus* en tejido pulmonar: diámetro regular septado con ramificaciones en ángulo de 45°.

enfermos con riesgo alto, un cultivo positivo se asocia con aspergilosis invasora en el 50-64% de los casos, mientras que en los enfermos con riesgo intermedio la incidencia de aspergilosis invasora desciende al 8-28% (Tabla 5). La rentabilidad de las muestras microbiológicas es mayor si se obtienen mediante broncoscopia (aspirados y cepillados bronquiales, lavado broncoalveolar). En este caso, la rentabilidad de las muestras se sitúa en torno al 50% [19-22]. En los receptores de trasplante de médula ósea los cultivos positivos de *Aspergillus* tienen un valor predictivo muy alto (en torno al 70-80%) [23]. La obtención de biopsias mediante agujas guiadas radiológicamente es un procedimiento diagnóstico muy rentable, en general desprovisto de complicaciones, si bien pueden obtenerse falsos negativos si no se toma el tejido invadido por el micelio [24].

Tabla 5. Riesgo de aspergilosis invasora en enfermos con cultivo positivo de *Aspergillus* spp. [23].

Riesgo alto	
Trasplante alogénico de médula ósea	64%
Neutropenia	64%
Cáncer hematológico	50%
Riesgo intermedio	
Trasplante autólogo de médula ósea	28%
Esteroides	20%
VIH	19%
Trasplante de órgano sólido	17%
Diabetes	11%
Enfermedad pulmonar	9%
Cáncer no hematológico	8%

Dados los problemas de especificidad que presenta el cultivo, su correcta valoración requiere la utilización conjunta de la histología, el patrón de referencia (*gold standard*) que permite establecer de forma probada en pacientes cancerosos e inmunodeprimidos la existencia de micosis invasora por hongos filamentosos según los criterios conjuntos de la EORTC y el *Mycoses Study Group* de la NIAID [25]. Sin embargo, el problema en enfermos neutropénicos y cancerosos es que las biopsias pulmonares, lavados broncoalveolares, etc., están contraindicados, ya que habitualmente tienen trombopenia, hipoxemia y mal estado general. La diferenciación entre colonización e invasión en heridas y quemaduras también requiere el estudio simultáneo microbiológico e histológico, lo que conlleva la realización de biopsias. La infiltración de tejido viable por micelios tabicados demuestra de forma concluyente la invasión fúngica [26].

Un problema importante de las pruebas tradicionales de diagnóstico microbiológico es que se positivizan tardíamente en el curso clínico de la aspergilosis invasora [19-22].

Valor de los hemocultivos en el diagnóstico de la aspergilosis invasora

Las aspergilemias son excepcionales, representando del 0,5% al 2% de las fungemias, y son consecuencia de la invasión tisular [4]. Es un hecho bien conocido que *Fusarium* spp. y *Scedosporium* (*Scedosporium apiospermum* y *Scedosporium prolificans*) son las especies causantes de fungemia en las formas diseminadas de micosis invasora, siendo excepcionales las fungemias causadas por zigomicetos. Las aspergilemias son más fre-

cuentes en las endocarditis causadas por *Aspergillus* spp. Se estima que solo aproximadamente el 10% de las aspergilemias son significativas, debiéndose a contaminaciones el 90% de las fungemias no significativas (pseudaspergilemias). Los criterios para aclarar el significado clínico de la aspergilemia han sido establecidos por Duthie y Denning [27] en una publicación que se puede considerar clásica.

En pacientes con cáncer hematológico, la aspergilemia verdadera es de aparición tardía (precede solo en un día al *exitus* o se evidencia en la necropsia), incluso en pacientes con alto riesgo de padecer aspergilosis invasora [28]. El aislamiento de *A. terreus* en hemocultivo hace más probable que la aspergilemia sea verdadera [28].

Diagnóstico serológico de la aspergilosis invasora mediante la detección de anticuerpos

Aunque la detección de anticuerpos mediante distintas técnicas es útil para el diagnóstico de aspergiloma y de aspergilosis alérgica [17], su utilidad es muy limitada en el diagnóstico de aspergilosis invasora por su baja sensibilidad. Sin embargo, estudios recientes utilizando pruebas de ELISA han puesto de manifiesto que aproximadamente un tercio de los pacientes con aspergilosis invasora presenta títulos de anticuerpos de utilidad diagnóstica [29,30].

Diagnóstico de la aspergilosis invasora mediante la detección de antígeno

Desde hace 20 años se conoce la presencia de antígenos en el suero de enfermos con aspergilosis invasora. Aunque *A. fumigatus* tiene más de 100 componentes antígenicos, los de mayor utilidad diagnóstica en enfermos con aspergilosis invasora son el galactomanano y el (1-3)- β -D-glucano [2]. El (1-3)- β -D-glucano es un componente de la pared celular de *Aspergillus* y otros hongos como *Candida* y *Pneumocystis carinii* que puede ser detectado utilizando pruebas comercializadas (Fungitec G, Seikagaku Corporation, Japón, Wako-WB 003, Wako Chemical, Alemania, y Glucatell, Associates of Cape Code, Inc., USA). La detección del (1-3)- β -D-glucano presenta una sensibilidad en torno al 90%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 59%, un valor predictivo negativo del 97% y una eficacia global del 85%. Los falsos positivos se asocian a enfermos en hemodiálisis con aparatos con membranas de celulosa, en tratamiento con albúmina, inmunoglobulinas, sulfamidas y anticancerosos [31]. Actualmente la experiencia clínico-micológica acumulada con esta prueba es limitada y es necesario ampliarla mediante estudios prospectivos en poblaciones estratificadas por factores de riesgo.

El galactomanano es un componente de la pared celular del género *Aspergillus* [2], siendo el principal exoantígeno liberado durante la invasión tisular. En enfermos con aspergilosis invasora, el galactomanano puede ser detectado en suero, orina, líquido cefalorraquídeo y líquido pericárdico. También está presente en el lavado broncoalveolar, pero en éste está sin definir el punto de corte para diferenciar entre infección y colonización [14]. Para la detección de galactomanano se han desarrollado dos métodos comerciales. El primero de ellos está basado en una aglutinación con partículas de látex recubiertas de un anticuerpo monoclonal que reacciona con el galactomanano (Pastorex *Aspergillus*, Sanofi Diagnostics Pasteur, Francia). Esta técnica tiene un límite de detección de

15 ng/ml de galactomanano, por lo que es poco sensible y ya no se utiliza. Actualmente se utiliza un ELISA (Platelia®*Aspergillus*, Bio-Rad, Francia) que emplea el mismo anticuerpo monoclonal que el Pastorex *Aspergillus*, pero es mucho más sensible, presentando un límite de detección de 0,5-1 ng/ml de galactomanano [2]. Además de su sensibilidad, la prueba es muy reproducible cuando se comparan los resultados obtenidos entre distintos laboratorios [32].

Actualmente la detección de galactomanano de *Aspergillus* es un procedimiento útil en el diagnóstico de la aspergilosis invasora en enfermos neutropénicos con alto riesgo de padecer micosis invasora. Las concentraciones de galactomanano en suero se asocian con la invasión (angioinvasión) tisular cuando existe una aspergilosis invasora, son fluctuantes y aunque no se conoce con exactitud su cinética, se sabe que en su aclaración intervienen las células de Kupffer [2]. La obtención de sueros debe ser prospectiva, debiéndose estudiar al menos dos sueros por semana. Sin embargo, este punto está siendo debatido en la actualidad, ya que no se conoce con exactitud el perfil de liberación de galactomanano en todos los pacientes. Algunos autores han propuesto la detección en días alternos, e incluso a diario, pero no se tiene todavía experiencia con estas propuestas. La mayor parte de la experiencia clínico-micológica acumulada procede de Europa (Países Bajos y Francia) y corresponde a pacientes neutropénicos de alto riesgo con neutropenia profunda y mantenida y receptores de trasplante alogénico de médula ósea. Recientemente, la FDA (*Food and Drug Administration*) ha aprobado la utilización de Platelia®*Aspergillus* en EE.UU.

En la tabla 6 hemos recogido las series publicadas inicialmente por Maertens *et al.* [33,34] y Sulahian *et al.* [35], agrupando como número total de aspergilosis invasora la suma de casos probados y probables. Creemos que estas publicaciones son muy interesantes por incluir un alto número de pacientes neutropénicos adultos con datos de neutropenia mantenida [33,34], y en el caso de Sulahian *et al.* [35], aunque no se dan datos sobre la duración de la neutropenia, se incluye un alto número de pacientes (casi 800), siendo casi el 70% receptores de trasplante alogénico de médula ósea y un porcentaje elevado de población pediátrica. En estos trabajos es destacable que la realización es prospectiva, realizándose bisemanalmente la cuantificación de galactomanano. Se considera que la prueba es positiva cuando se obtienen al menos dos determinaciones positivas, siendo el punto de corte elegido de 1 ng/ml por Maertens *et al.* [33,34] y de 1,5 ng/ml por Sulahian *et al.* [35]. La utilidad de la prueba es grande porque se adelanta en varios días al diagnóstico de la aspergilosis invasora realizado por otros procedimientos, permitiendo instaurar una terapia antifúngica adelantada y presenta una sensibilidad superior al 90%, una especificidad superior al 94%, un valor predictivo positivo superior al 87% y un valor predictivo negativo superior al 95% (Tabla 6).

En una reciente publicación de Herbrecht *et al.* [29] en la que estudian prospectivamente y dos veces por semana la detección de galactomanano en pacientes oncohematológicos adultos y niños, llama la atención que a diferencia de los otros trabajos previamente comentados, aceptan como positivo una sola determinación de galactomanano, recomendando el punto de corte en 0,7 ng/ml. Con estos parámetros obtienen una sensibilidad del 73%, una especificidad del 94% y una eficacia global del 84% en la aspergilosis invasora probada. Este trabajo destaca que en población pediátrica existe un alto porcentaje de falsos positivos, hecho que se ha visto documentado

Tabla 6. Estudios prospectivos de aspergilosis invasora mediante detección de galactomanano con Platelia®*Aspergillus*.

	Maertens <i>et al.</i> [33]	Maertens <i>et al.</i> [34]	Sulahian <i>et al.</i> [35]
Punto de corte (ng/ml)	1	1	1,5
Nº de pruebas positivas	2	2	2
Aspergilosis invasora (n) ¹	33	39	53
Sensibilidad (%)	93	90	91
Especificidad (%)	95	98	94
VPP ² (%)	93	87	ND ³
VPN ⁴ (%)	95	98	ND
Falsos positivos (%)	8	14	12
Precocidad días [n(%)]	6 (54)	5 (68)	7 (40)
Eficacia global (%)	94	95	ND

¹Aspergilosis invasora: suma de casos probados y probables

²VPP: Valor predictivo positivo

³ND: sin datos

⁴VPN: Valor predictivo negativo

ampliamente en otros trabajos [29,35,36]. Un aspecto muy interesante puesto de manifiesto por Herbrecht *et al.* [29] es que en pacientes con baja inmunosupresión, el 36% tiene anticuerpos anti-*Aspergillus* al comienzo de la infección, siendo en estos enfermos posible la formación de inmunocomplejos que interferirían con la detección de galactomanano y reducirían la sensibilidad del Platelia®*Aspergillus* (en torno al 40%). Dado que la detección de anticuerpos podría ser utilizada con fines diagnósticos [29,30] y si los resultados de estos estudios se confirman, en el futuro será interesante combinar la detección antigénica (galactomanano) y la detección de anticuerpos para aumentar la sensibilidad y para explicar los resultados falsos negativos de la detección de galactomanano.

Algunos autores han propuesto títulos de corte más bajos. Así, en la reciente comercialización de Platelia®*Aspergillus* en EE.UU., Bio-Rad recomienda un punto de corte de 0,5 ng/ml; esta recomendación se basa en el estudio de 148 enfermos leucémicos o receptores de trasplante de médula ósea sin evidencia de aspergilosis, de los cuales 132 tenían un índice inferior a 0,5 ng/ml. En 31 enfermos con aspergilosis probada o probable, según los criterios establecidos por Ascioğlu [25], 25 tenían valores inferiores a 0,5 ng/ml y, por consiguiente, la sensibilidad en este grupo era del 80,7% y la especificidad del 89,2%. De cara al futuro, si en Europa y EE.UU. se continua utilizando distintos puntos de corte, se crearán muchas dificultades a la hora de estudiar y comparar distintas publicaciones y datos; incluso Ruth Ashbee (comunicación personal) ha llegado a ironizar diciendo que ¡Europa y EE.UU. estarán separadas por la utilización de la misma prueba!

En 100 pacientes con trasplante alogénico de médula ósea, Maertens *et al.* [37] encuentran una sensibilidad del 94% y una especificidad del 99%, con valores predictivos positivo y negativo del 94% y 98%, respectivamente. La precocidad de la antigenemia respecto al estudio radiológico fue de ocho días en el 80% de los enfermos, y de nueve días en el 89% cuando se comparaba con los cultivos positivos de *Aspergillus* spp. En la tabla 7 se recogen los datos en función de que se considere como resultado positivo una sola determinación de galactomanano (≥ 1 ng/ml) o dos determinaciones, según Maertens *et al.* [37].

Mc Laughlin *et al.* [38] mantienen que en receptores de trasplante alogénico de médula ósea la utilización de un punto de corte de 0,5 ng/ml arroja una sensibilidad en la detección de galactomanano del 92%, con una espe-

Tabla 7. Según Maertens *et al.* [37]. Trasplante alogénico de médula ósea¹.

Punto de corte (ng/ml)	≥1	≥1
Nº tests positivos	1	≥2
Sensibilidad	94,4	94,4
Especificidad	85,4	98,8
VPP	58,6	94,4
VPN	98,6	98,8

¹Datos en 100 casos

cificidad del 97% en la aspergilosis invasora probada, mientras que utilizando un punto de corte de 1,5 ng/ml la sensibilidad desciende al 46%. En este trabajo se resalta también que en los enfermos que reciben un tratamiento antifúngico eficaz (profiláctico o empírico) para hongos filamentosos, la detección de galactomanano tiene menos sensibilidad (30%) en los pacientes con aspergilosis invasora probada tratados con voriconazol que en los tratados con fluconazol (63%) cuando el punto de corte es 1,5 ng/ml. Sin embargo, utilizando un punto de corte de 0,5 ng/ml no se afecta la sensibilidad (85% para voriconazol frente al 82% para el fluconazol). Asimismo, el galactomanano antecede en un promedio de cinco días a los signos clínico-radiológicos [38].

La detección de galactomanano es una herramienta útil también en la monitorización de la terapéutica antifúngica y puede incluso ser utilizado para predecir la respuesta al tratamiento antifúngico, ya que el aumento del valor de galactomanano (≥ 1 ng/ml) sobre el valor basal en la primera semana de tratamiento predice el fallo terapéutico con una sensibilidad del 44%, una especificidad del 87% y un VPP del 94% [39]. Por consiguiente, el galactomanano es un marcador terapéutico ya que permite establecer el pronóstico de tratamiento de la aspergilosis invasora y puede servir para modificar el mismo o añadir una segunda droga antifúngica con el objeto de potenciar o mejorar la eficacia del antifúngico que inicialmente se hubiese elegido [39]. Esta utilidad del galactomanano para monitorizar la respuesta terapéutica ha sido también ampliamente estudiada en modelos animales experimentales [40,41].

La experiencia obtenida hasta el momento sugiere que la detección de galactomanano es una herramienta útil para el diagnóstico temprano de la aspergilosis invasora en enfermos de alto riesgo con cáncer hematológico. Sin embargo, es necesario estudiar prospectivamente distintas poblaciones de pacientes inmunodeprimidos para establecer el posible valor de la antigenemia en cada grupo de ellos. Por ejemplo, en población pediátrica la sensibilidad de la detección del galactomanano es más baja, apareciendo con frecuencia resultados falsos positivos [29,35,36], mientras que la detección retrospectiva de galactomanano en receptores de trasplante hepático parece tener menos utilidad [42]. Asimismo, es muy importante tener en cuenta la incidencia de la aspergilosis invasora en cada grupo, ya que cuando la incidencia es baja se afectan los valores predictivos positivo y negativo. En la tabla 8, tomada de Klont *et al.* [43], se observan distintas incidencias de aspergilosis invasora y cómo se afectan los valores predictivos de la antigenemia y la detección de ADN de *Aspergillus* por PCR.

Un aspecto importante para conocer la utilidad de una prueba diagnóstica es el análisis de los resultados falsos negativos o positivos. La tasa de falsos negativos con *Platelia*[®]*Aspergillus* oscila entre el 8% y el 10% de los enfermos con aspergilosis invasora documentada

Tabla 8. Valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) en la detección de antígeno de *Aspergillus* por *Platelia*[®]*Aspergillus*, y de ADN en sangre mediante PCR, según las distintas incidencias de aspergilosis invasora [43].

Incidencia (%)	<i>Platelia</i> [®] <i>Aspergillus</i> en suero		PCR en sangre	
	VPP (%)	VPN (%)	VPP (%)	VPN (%)
0,5	10	95,4	1,4	100
5	50	95,7	13	100
10	69	96,6	24	100
20	84	97,5	82	100

[33,34,37]. Varios factores podrían influir en esta ausencia de reactividad, aunque se desconoce realmente su causa [44]. Así, por ejemplo, la encapsulación del proceso infeccioso impediría la liberación de galactomanano en los líquidos orgánicos [44], el grado de angioinvasión podría ser menor en pacientes no neutropénicos y, como ya hemos mencionado, podrían formarse inmunocomplejos que impidan la detección de galactomanano en enfermos con anticuerpos frente a *Aspergillus* [29]. También se ha especulado con que el tratamiento previo antifúngico suprimiría la producción de galactomanano por el hongo.

La tasa de falsos positivos con *Platelia*[®]*Aspergillus* oscila entre el 8% y el 14% [34,36,43,45-47] y han sido observados en receptores de trasplante de médula ósea, pacientes neutropénicos [46], niños [35], neonatos [36] y en rechazo crónico o enfermedad injerto contra huésped después de trasplante alogénico de médula ósea [47]. Como causas posibles de los resultados falsos positivos en pacientes neutropénicos, se ha sugerido la colonización masiva del tracto digestivo por *Aspergillus*, infecciones por otros hongos (*Paecilomyces variotii*, *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. y *Candida* spp.) [45] y bacteriemia por grampositivos y gramnegativos [45] que liberasen en el torrente circulatorio exoantígenos que presenten reacciones cruzadas con el anticuerpo monoclonal utilizado en *Platelia*[®]*Aspergillus*. En los pacientes que tienen mucositis grave por la utilización de drogas citotóxicas, el galactomanano de los cereales de la ingesta podría pasar al torrente circulatorio, produciéndose una falsa antigenemia. Incluso la leche maternizada comercial puede producir antigenemia transitoria [48]. Ansorg *et al.* [49] han comunicado que la absorción gastrointestinal del galactomanano contenido en diversos alimentos (vegetales, cereales) puede verse aumentada en enfermos con mucositis grave.

El conocimiento de la causa de los falsos positivos es fundamental para entender la utilidad diagnóstica de *Platelia*[®]*Aspergillus* ya que, teóricamente al menos, cabría la posibilidad de que un único resultado positivo de galactomanano fuese una antigenemia transitoria verdadera en pacientes intensamente neutropénicos y que el tratamiento antifúngico decapitase la infección. Para aclarar el significado de los falsos positivos es fundamental enjuiciar clínicamente a los pacientes y realizar PCR cuantitativa del ADN de *Aspergillus*.

En conclusión, la detección de galactomanano en suero es un criterio muy útil para establecer el diagnóstico temprano de aspergilosis invasora, siempre que se respalde con datos clínicos, micológicos y radiológicos [14,50]. Se optimizan los resultados de galactomanano cuando se estudian a los pacientes de alto riesgo de padecer aspergilosis invasora prospectivamente durante el periodo de

mayor riesgo, extrayendo sueros bisemanalmente y continuando incluso durante el tratamiento antifúngico, pues ya hemos visto que es una herramienta útil para la monitorización del tratamiento antifúngico y tiene valor pronóstico. Cuando se confirma la existencia de antigenemia de *Aspergillus* debe realizarse tomografía computarizada de alta definición de tórax y, si fuese posible, una broncoscopia. La instauración de un tratamiento anticipado (*pre-emptive therapy*) basado en estos datos permite reducir el número de pacientes que requieren tratamiento antifúngico, disminuyendo los costes y posibles efectos secundarios por tratamiento antifúngico generalizado [51]. El impacto beneficioso que tiene el diagnóstico temprano de aspergilosis invasora ha sido demostrado de forma fehaciente por Caillot *et al.* [52] al hacer disminuir la mortalidad por aspergilosis invasora, descendiendo desde el 60% al 12%, utilizando conjuntamente la detección prospectiva de galactomanano, tomografía computarizada de alta definición, broncoscopia, cirugía y tratamiento antifúngico con azoles.

A pesar del conocimiento actual sobre la utilidad diagnóstica de Platelia®*Aspergillus*, existen una serie de incógnitas que deben resolverse en trabajos futuros:

- Puesto que la cinética de galactomanano *in vivo* no es completamente conocida y los datos sobre el perfil de liberación de galactomanano son insuficientes, ¿habría que hacer la determinación prospectiva de galactomanano más frecuentemente?, ¿incluso a diario?
- ¿Existe relación entre el lugar anatómico donde asienta la infección y la liberación de galactomanano al torrente circulatorio?
- Puesto que la sensibilidad de la detección de galactomanano se reduciría por la presencia de anticuerpos anti-*Aspergillus*, ¿habría que hacer simultáneamente detección de galactomanano y de anticuerpos en los pacientes menos inmunodeprimidos?
- ¿Qué se entiende por galactomanano positivo?: ¿un solo resultado positivo ó al menos dos resultados positivos?
- ¿Qué punto de corte debemos elegir?: ¿1,5 ng/ml?, ¿1,2 ng/ml?, ¿1 ng/ml?, ¿0,7 ng/ml?, ¿0,5 ng/ml?
- ¿La utilización de antifúngicos activos frente a *Aspergillus* en quimioprofilaxis (voriconazol, itraconazol, anfotericina B) obligarían a elegir un punto de corte de 0,5 ng/ml?
- ¿Qué significan los valores falsos positivos de galactomanano?
- Puesto que está sin definir la utilidad prospectiva de la detección de galactomanano en poblaciones no neutropénicas, ¿qué utilidad tiene en otros grupos de enfermos como receptores de trasplante de órgano sólidos, población pediátrica, sida, enfermedad granulomatosa crónica, tumores de órgano sólido, etc.?
- ¿Es la detección de galactomanano un buen marcador terapéutico?
- ¿El tratamiento antifúngico previo (quimioprofilaxis) eliminaría la infección por *Aspergillus*? En este sentido, una sola detección de galactomanano coincidiendo con periodos de máxima neutropenia e inmunosupresión podría no ser un falso positivo, sino una antigenemia transitoria.
- ¿Existe reactividad cruzada con bacterias y hongos?
- ¿Qué otros procesos podrían explicar los valores de galactomanano falsos positivos?
- ¿Qué son y a qué se deben los valores de galactomanano falsos negativos?

En cualquier caso, debe recordarse siempre que la sensibilidad en la detección de galactomanano de *Aspergillus* es más elevada en enfermos con aspergilosis invasora probada, que en aquéllos con aspergilosis invaso-

ra catalogada de probable y que, por supuesto, en los enfermos con diagnóstico de aspergilosis invasora posible según los criterios conjuntos de la EORTC y el *Mycoses Study Group* del NIAID [25].

Hay que tener presente que la máxima utilidad de detección de galactomanano en *Aspergillus* es, actualmente, en poblaciones neutropénicas consideradas de alto riesgo según los criterios de Prentice *et al.* [7], y en las que la incidencia de aspergilosis invasora es elevada [43], con lo que los valores predictivos positivo y negativo son, asimismo, elevados.

Diagnóstico molecular de la aspergilosis invasora

En esta última década, se han desarrollado técnicas para la detección de ADN de *Aspergillus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [53-56], aunque al no existir todavía técnicas comercializadas no se han implantado de forma rutinaria en el laboratorio asistencial. Inicialmente, los estudios se centraron en la detección de ADN del género *Aspergillus* [53,54] pero también se están utilizando cebadores universales con la finalidad de detectar levaduras y hongos filamentosos [55,56].

Puesto que no existen técnicas comercializadas, todos los estudios se han realizado con técnicas desarrolladas en cada laboratorio, lo que aumenta la variabilidad y dificulta la comparación de resultados. Aunque se puede detectar ADN fúngico en la mayoría de las muestras clínicas, las muestras respiratorias presentan problemas para su estudio con técnicas moleculares porque es difícil diferenciar al portador asintomático o transitorio de *Aspergillus* spp. del que presenta una aspergilosis invasora, ya que el 25% de la población sana presenta PCR positiva para *Aspergillus* en muestras respiratorias [53]. La cuantificación de la carga fúngica mediante la realización de PCR en tiempo real puede ayudar a solucionar este problema [57,58]. La muestra idónea es la sangre (sangre entera, suero, plasma), prefiriéndose la sangre entera (sin coagular), puesto que la sensibilidad de la PCR en el plasma es menor [59]. Utilizando sangre entera de enfermos con aspergilosis invasora documentada, la sensibilidad de la prueba es del 100% cuando se estudian dos o más muestras, como se observa en la tabla 9 [60]. En este estudio, el promedio de días con neutropenia fue de 16, y hubo siete enfermos con aspergilosis invasora *de novo* y 77 controles. Un resultado positivo de PCR en sangre antecedió en un promedio de dos días a los signos y síntomas clínicos, y al diagnóstico clínico en un promedio de nueve días [60].

Dada la enorme sensibilidad (la detección de ADN por PCR es, aproximadamente, 20 veces más sensible que el cultivo [61], detectándose de 1-10 fg de ADN fúngico ó 1-5 unidades formadoras de colonias/ml), las técnicas de PCR pueden ser muy útiles como herramienta de monitorización del tratamiento antifúngico. En pacientes con aspergilosis invasora, el número de muestras PCR positivas desciende en los que tienen una respuesta favorable al tratamiento, lo que no sucede en los que no responden al mismo [55]. La cuantificación de la carga fúngica mediante PCR en tiempo real en sangre periférica puede aplicarse en la monitorización terapéutica [62-64], siendo un procedimiento rápido, específico y muy sensible en la detección y cuantificación de ADN de *A. fumigatus* [63,64].

Actualmente no está claro si la detección de ADN es más sensible que la detección de galactomanano en el diagnóstico de la aspergilosis invasora. Así, Kami *et al.* [63] observaron que la PCR en tiempo real era más sensible que el estudio de antigenemia en pacientes onco-

Tabla 9. PCR en el diagnóstico de aspergilosis invasora en trasplante alogénico de médula ósea según Herbart *et al.* [60].

	PCR (+) 1 muestra	PCR (+) ≥ 2 muestras
Sensibilidad (%)	100	100
Especificidad (%)	65	84
VPP ¹ (%)	15	28
VPN ² (%)	100	100

¹VPP: Valor predictivo positivo²VPN: Valor predictivo negativo

hematológicos con neutropenia prolongada (media de 39 días). En la tabla 10 se muestran los resultados comparativos entre PCR, detección de galactomanano por Platelia® *Aspergillus* (punto de corte 1,5 ng/ml, considerándose positivas al menos dos muestras) y Fungi-Tec, siendo interesante reseñar que la positividad por PCR precedió a la de galactomanano en 2,8 días y a la del Fungi-Tec en 6,5 días. Sin embargo, Costa *et al.* [65] observaron que la detección de galactomanano era más sensible (52% vs. 45%) que la PCR en tiempo real para establecer el diagnóstico de aspergilosis invasora, al igual que Sanguinetti *et al.* [58], que describen una sensibilidad mayor en la detección de galactomanano (100% vs. 90%) que la PCR en tiempo real para el diagnóstico de la aspergilosis pulmonar invasora.

Actualmente se conoce poco sobre el origen y la cinética del paso de ADN fúngico a la sangre. Se ha sugerido que la respuesta del huésped al hongo impediría la liberación de ADN desde el lugar anatómico donde asienta la infección al torrente circulatorio cuando el grado de angioinvasión es menor [44]. También desconocemos cómo circula por la sangre y cómo es metabolizado, o cómo desaparece de la sangre, hechos esenciales para intentar establecer el calendario de obtención de muestras para el estudio de ADN.

Tabla 10. PCR en tiempo real según según Kami *et al.* [63]. Comparación con antigenemia y Fungi-Tec®.

	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
PCR	79	97
GM Platelia® <i>Aspergillus</i>	58	97
Fungi-Tec®	67	84

Conclusión

La aspergilosis invasora es una enfermedad con una elevadísima morbimortalidad que en parte se debe a la incapacidad de diagnosticar la enfermedad tempranamente. Se deben utilizar conjuntamente para su diagnóstico tomografía computarizada de alta definición y marcadores (antígenos fúngicos como el galactomanano, o ADN de *Aspergillus*) que pueden ser detectados en la sangre en un estadio inicial de la infección. Un aspecto fundamental es definir en qué tipo de población se deben utilizar estas pruebas prospectivamente: pacientes catalogados como de alto riesgo de padecer aspergilosis invasora (enfermos oncohematológicos con neutropenia profunda y prolongada). Es importante resaltar que la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de las pruebas con marcadores (antígenos y ADN fúngico) son más elevadas en los enfermos con aspergilosis invasora probada, que en los que tienen aspergilosis invasora probable y por supuesto que los que tienen aspergilosis invasora posible según los criterios de Ascioğlu *et al.* [25].

Bibliografía

- Abarca ML. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: S79-S84.
- Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergilosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310-350.
- Borges M, Liébana A. Presentaciones clínicas de la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: S85-S89.
- Denning DW. Invasive aspergilosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 781-805.
- Paterson D, Singh N. Invasive aspergilosis in transplant recipients. *Medicine* 1999; 78: 123-138.
- Lin SJ, Schanz J, Teutsch SM. Aspergilosis case fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 358-366.
- Prentice HG, Kibbler CC, Prentice AG. Towards a targeted, risk based, antifungal strategy in neutropenic patients. *Br J Haematol* 2000; 110: 273-284.
- Singh N, Arnow PM, Bonham A, *et al.* Invasive aspergilosis in liver transplant recipients in the 1990s. *Transplantation* 1997; 64: 716-720.
- Singh N. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1692-1696.
- Len O, Gavaldá J, San Juan R, *et al.* Invasive Aspergilosis (IA) in Solid Organ Transplant (SOT) recipients: risk factors of death. [Abstract M-999]. 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, 2003.
- Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, *et al.* Invasive aspergilosis. Disease spectrum, treatment practices and outcomes. *Medicine* 2000; 79: 250-260.
- Groll AH, Shah PM, Mentzel C, *et al.* Trends in the post-mortem epidemiology of invasive fungal infections at a University hospital. *J Infect* 1996; 33: 23-32.
- Vogesen M, Wanders A, Haas A, Ruckdeschel G. A four-year review of fatal aspergilosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 42-45.
- Denning DW. Early diagnosis of invasive aspergilosis. *Lancet* 2000; 355: 423-424.
- Von Eiff M, Zuhlsdorf M, Roos N, *et al.* Pulmonary fungal infections in patients with haematological malignancies – diagnostic approaches. *Ann Hematol* 1995; 70: 135-141.
- Binder C, Ruchel R. Mixed systemic mycosis with fatal outcome in a patient with acute myeloblastic leukaemia. *Mycoses* 2000; 43: 59-63.
- Pontón J, García ME, López Medrano R. Diagnóstico basado en métodos independientes del cultivo. En: Pemán J, Martín Mazuelo E, Rubio MC (Eds.) Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2001: 14.1-14.21.

18. Pemán J. Diagnóstico de la aspergilosis invasiva. Rev Iberoam Micol 2000; 17: S90-S92.
19. Barnes AJ, Denning DW. Aspergilli-significance as pathogens. Rev Med Microbiol 1993; 4: 176-180.
20. Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory – tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Am J Med 1996; 100: 171-178.
21. Mc Whinney PH, Kibbler CC, Hamon MD, et al. Progress in the diagnosis and management of aspergillosis in bone marrow transplantation: 13 years' experience. Clin Infect Dis 1993; 17: 397-404.
22. Yu VL, Muder RR, Poorsattar A. Significance of isolation of *Aspergillus* from the respiratory tract in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: results from a three-year prospective study. Am J Med 1986; 81: 249-254.
23. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, et al. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. Clin Infect Dis 2001; 33: 1824-1833.
24. Jantunen E, Pilonin A, Volin L, et al. Diagnostic aspects of invasive *Aspergillus* infection in allogenic BMT recipients. Bone Marrow Transpl 2000; 25: 867-871.
25. Ascioğlu S, de Paw B, Bennett JE, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. Clin Infect Dis 2002; 34: 7-14.
26. Wheeler MS, Mc Ginnis MR, Schell WA, Walker DH. *Fusarium* infection in burned patients. Am J Clin Pathol 1981; 75: 304-311.
27. Duthie R, Denning DW. *Aspergillus* fungemia: report of two cases and review. Clin Infect Dis 1995; 20: 598-605.
28. Kontoyiannis DP, Sumoza D, Tarrand J, et al. Significance of aspergillemia in patients with cancer: a 10 year study. Clin Infect Dis 2000; 31: 188-189.
29. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, et al. *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. J Clin Oncol 2002; 20: 1898-1906.
30. Chan C, Woo PCY, Lung ASP, et al. Detection of antibodies specific to an antigenic all wall galactomannoprotein for serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus* aspergillosis. J Clin Microbiol 2002; 40: 2041-2045.
31. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, et al. Plasma (1-3)- β -D glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet 1995; 345: 17-20.
32. Verweij PE, Erjavec Z, Sluiter W, et al. Detection of antigen in sera of patients with invasive aspergillosis: intra- and interlaboratory reproducibility. J Clin Microbiol 1998; 36: 1612-1616.
33. Maertens J, Verhaegen J, Demuyneck H, et al. Autopsy – controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis. J Clin Microb 1999; 37: 3223-3228.
34. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, et al. Screening for circulating galactomannan as a non-invasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. Blood 2001; 97: 1604-1610.
35. Sulahian A, Boutboul, Ribaud P, et al. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4 year prospective study. Cancer 2001; 91: 311-318.
36. Siemann N, Koch-Dorfler M, Gaude M. False positive results in premature infants with the Platelia® *Aspergillus* sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. Mycoses 1998; 41: 373-377.
37. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, et al. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogenic stem cell transplant recipients. J Infect Dis 2002; 186: 1297-1306.
38. Mc Laughlin L, Balajee A, Leisenring W, et al. Bio-Rad Platelia® *Aspergillus* EIA detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in human serum: performance evaluation in a large bone marrow transplant center. Poster 7. Focus on Fungal Infections. Phoenix, Arizona, March 20-22, 2002.
39. Boutboul F, Alberti C, Leblanc T, et al. Invasive aspergillosis in allogenic stem cell transplant recipients: increasing anti-gemia is associated with progressive disease. Clin Infect Dis 2002; 34: 939-943.
40. Patterson TF, Minter P, Ryan JL, Andriole VT. Effect of immunosuppression and amphotericin B on *Aspergillus* antigenemia in an experimental model. J Infect Dis 1988; 158: 415-422.
41. Petraitiene R, Petraitis VV, Groll AH, et al. Antifungal activity and pharmacokinetics of posaconazole (SCH 56592) in treatment and prevention of experimental invasive pulmonary aspergillosis: correlation with galactomannan antigenemia. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 857-869.
42. Fortún J, Martín Dávila P, Alvarez M, et al. *Aspergillus* antigenemia sándwich-enzyme immunoassay test as a sero-diagnostic method for invasive aspergillosis in liver transplant recipients. Transplantation 2001; 71: 145-149.
43. Klont RR, Meis JFG, Verweij PE. Critical assessment of issues in the diagnosis of invasive aspergillosis. Clin Microbiol Infect 2001; 7 (Supplement 2): 32-37.
44. Verweij PE, Weemaes CM, Curfs Jo HAJ, et al. Failure to detect circulating *Aspergillus* markers in a patient with chronic granulomatous disease and invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 2000; 38: 3900-3901.
45. Swanink CM, Meis JF, Rijs AJ, et al. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus* galactomannan. J Clin Microbiol 1997; 35: 257-260.
46. Kami M, Kanda Y, Ogawa S, et al. Frequent false-positive results of *Aspergillus* latex agglutination test: transient *Aspergillus* antigenemia during neutropenia. Cancer 1999; 86: 274-281.
47. Hamaki T, Kami M, Kanda Y, et al. False-positive results of *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay in a patient with chronic graft – versus – host disease after allogenic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 2001; 28: 633-634.
48. Gangneux JP, Lavarde D, Bretagne S, et al. Transient *Aspergillus* antigenemia: think of milk. Lancet 2002; 359: 1251.
49. Ansorg R, van de Boom R, Rath PM. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. Mycoses 1997; 40: 353-357.
50. Patterson TF, Minter P, Patterson JE, et al. *Aspergillus* antigen detection in the diagnosis of invasive aspergillosis. J Infect Dis 1995; 171: 1553 – 1558.
51. Severens JL, Donnelly JP, Meis JF, et al. Two strategies for managing invasive aspergillosis: a decision analysis. Clin Infect Dis 1997; 25: 1148 – 1154.
52. Caillot D, Casanovas O, Bernard A, et al. Improved management of invasive aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. J Clin Oncol 1997; 15: 139 – 147.
53. Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, et al. Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 1164 – 1168.
54. Melchers WJ, Verweij PE, van der Hurk P, et al. General primer – mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. J Clin Microbiol 1994; 32: 1710 – 1717.
55. Einsele H, Hebart H, Roller G, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. J Clin Microbiol 1997; 35: 1353 – 1360.
56. Van Burik JA, Myerson D, Schrechise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. J Clin Microbiol 1998; 36: 1169-1175.
57. Kawazu M, Kanda Y, Goyama S, et al. Rapid diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis by quantitative polymerase chain reaction using bronchial lavage fluid. Am J Hematol. 2003;72:27-30.
58. Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, et al. Comparison of real-time PCR, conventional PCR, and galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. J Clin Microbiol. 2003;41:3922-3925.
59. Löffler J, Hebart H, Brauchle V, Schumacher V, Einsele H. Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. J Clin Microbiol 2000; 38: 3830-3833.
60. Hebart H, Löffler J, Meisner C, et al. Early detection of *Aspergillus* infection after allogenic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. J Infect Dis 2000; 181: 1713-1719.
61. Loeffler J, Kloepfer K, Hebart H, Najvar L, Graybill JR, Kirkpatrick WR, Patterson TF, Dietz K, Bialek R, Einsele H. Polymerase chain reaction detection of *Aspergillus* DNA in experimental models of invasive aspergillosis. J Infect Dis. 2002;185: 1203-1206.
62. Loeffler J, Henke N, Hebart H, et al. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. J Clin Microbiol 2000; 38: 586-590.
63. Kami M, Fukui T, Ogawa S, et al. Use of real time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 2001; 33: 1504-1512.
64. Spiess B, Buchheidt D, Baust C, et al. Development of a Light Cycler PCR assay for detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in clinical samples from neutropenic patients. J Clin Microbiol 2003; 41: 1811-1818.
65. Costa C, Costa JM, Desterke C, et al. Real time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of antigen in serum by Enzyme-Linked Immunosorbent assay for the diagnosis of invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 2002; 40: 2224-2227.