



# Detección de antígeno galactomanano de *Aspergillus* en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

Montserrat Rovira Tarrats<sup>1</sup> y Jorge Puig de la Bellacasa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de TPH, Servicio de Hematología Clínica, Escuela de Hematología Farreras-Valentí y <sup>2</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Clínic, IDIBAPS, Universidad de Barcelona, España

## Resumen

La aspergilosis invasora es en la actualidad la primera causa de muerte de causa infecciosa en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Ello se debe en parte a la falta de un diagnóstico precoz. Recientemente se ha descrito la detección del antígeno de galactomanano de *Aspergillus* en suero por una técnica de ELISA. El objetivo de este estudio fue validar su utilidad en el contexto del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

## Palabras clave

Aspergilosis invasora, Antígeno de galactomanano de *Aspergillus*, Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

## *Aspergillus* galactomannan detection in allogeneic hematopoietic cell transplantation

## Summary

Invasive aspergillosis has become the leading cause of death after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. This is partially due to the lack of a prompt diagnosis. Recently the detection of *Aspergillus* galactomannan antigen by means an ELISA technique in serum has been described. The objective of this study was to validate its usefulness in the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation setting.

## Key words

Invasive aspergillosis, *Aspergillus* galactomannan antigen, Allogeneic hematopoietic cell transplantation

La incidencia de infecciones fúngicas invasoras ha aumentado de forma notable en las dos últimas décadas [1-4]. A modo de ejemplo, la aspergilosis invasora es una infección cada vez más diagnosticada en el paciente inmunodeprimido. En receptores de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, población especialmente inmunodeprimida, la incidencia de aspergilosis invasora es de un 4-10% [5-10] y es actualmente la primera causa de muerte de etiología infecciosa en esta población [11].

A pesar de que se han logrado avances en el tratamiento antifúngico [12-15], la mortalidad asociada a estas infecciones sigue siendo muy elevada, alrededor de un 50%, en parte debido a las dificultades de establecer un diagnóstico de forma precoz [16,17].

Tradicionalmente, los criterios diagnósticos de la aspergilosis invasora incluyen la presencia de hifas en tejidos y un cultivo positivo para *Aspergillus* [18,19], lo cual implica la realización de procedimientos invasores, muchas veces contraindicados en estos pacientes debido a la pancitopenia y al mal estado general de estos enfermos. En un intento de solventar este problema, los clínicos han estimado la probabilidad de presentar una aspergilosis invasora basándose en criterios microbiológicos, clínicos y radiológicos. Recientemente un comité de consenso formado por miembros del grupo cooperativo de Infecciones fúngicas invasoras de la EORTC (EORTC-IFICG) y del grupo de estudio micológico del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID-MSG), ha desarrollado definiciones estándares de infecciones fúngicas invasoras en pacientes con cáncer y pacientes receptores de un trasplante de progenitores hematopoyéticos con la finalidad de llegar a un acuerdo en las presentaciones clínicas de los pacientes y para que se pudieran incluir dichos enfermos en ensayos clínicos siendo catalogados con los mismos criterios [20].

La necesidad de tener en clínica métodos no invasores para el diagnóstico de la aspergilosis invasora se ha hecho realidad con el desarrollo de métodos capaces de detectar ADN de *Aspergillus* o un polisacárido celular denominado galactomanano [21], presentes en suero durante el crecimiento del hongo en los tejidos [22].

### Dirección para correspondencia:

Dra. MMontserrat Rovira  
Unitat TPH, Servicio de Hematología Clínica  
Hospital Clínic  
C/ Villarroel 170  
08036 Barcelona, España  
E-mail: mrovira@clinic.ub.es

Recientemente se ha introducido un test comercial de ELISA para la detección de antígeno galactomanano de *Aspergillus* [18,23-28]. El test utiliza el anticuerpo monoclonal de ratón EB-A2 y reconoce las cadenas laterales de 1-5-D-galactofuranósido de las moléculas de galactomanano. En pacientes hematológicos ha mostrado una excelente sensibilidad y especificidad [23].

Con estos antecedentes, el objetivo de nuestro estudio fue investigar la utilidad de la detección de galactomanano en los pacientes sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico. En este estudio, analizamos de forma prospectiva el valor de este test en estos pacientes, población de alto riesgo de presentar una aspergilosis invasora.

## Material y métodos

**Pacientes.** Desde enero de 1999 a enero del 2001 en nuestra Unidad, en todos los pacientes adultos que ingresaron para la práctica de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, se analizó el índice de galactomanano de forma prospectiva dos veces por semana con el test comercial Platelia®*Aspergillus* hasta el alta hospitalaria o fallecimiento del paciente. Además, una vez en domicilio, los pacientes que seguían bajo tratamiento inmunodepresor se monitorizaron, una vez por semana.

**Test de ELISA: interpretación de resultados.** El test ELISA (Platelia®*Aspergillus*; Bio-Rad) se interpretó según las recomendaciones del fabricante. Los resultados se expresaron como un índice entre densidades ópticas obtenidas entre la muestra sérica del paciente y un control. Un índice superior a 1,5 ng/ml fue considerado positivo. Los resultados entre 1 y 1,5 ng/ml fueron considerados como indeterminados, y un índice por debajo de 1 ng/ml fue negativo. Cuando una muestra era informada como indeterminada se repetía de nuevo el test en la misma muestra y en una muestra adicional obtenida de forma inmediata.

**Definición de aspergilosis invasora.** La aspergilosis invasora fue definida y clasificada según los criterios de la EORTC/MSG [20]. En este estudio, los resultados del galactomanano se excluyeron como criterio microbiológico.

**Manejo terapéutico de la neutropenia febril.** Se hospitalizaron a todos los pacientes que ingresaban para la práctica de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en habitaciones de flujo laminar durante la fase de neutropenia. Según la práctica habitual de nuestra Unidad, se administró profilaxis antifúngica con fluconazol durante 60 días y este era substituido por itraconazol oral en pacientes que presentaron enfermedad de injerto contra el huésped.

La cobertura inicial para la neutropenia febril incluyó un betalactámico (un carbapenémico). A las 48 h, si persistía con fiebre, se añadía vancomicina y/o un aminoglucósido. Dicha cobertura antibiótica también era modificada según los resultados microbiológicos. El criterio para añadir anfotericina B al tratamiento antimicrobiano era: 1) fiebre persistente a los cinco días de una cobertura antibiótica intravenosa adecuada; 2) desarrollo de infiltrados pulmonares en la radiología torácica bajo tratamiento antibacteriano; 3) aislamiento de hongos filamentosos en el aparato respiratorio superior e inferior, y 4) fiebre que reaparecía después de un intervalo afebril de 48 h, bajo cobertura antibacteriana amplia.

En todos los pacientes se realizaba una radiografía de tórax a su ingreso y una vez a la semana, y siempre que fuera necesario en caso de fiebre o síntomas respiratorios.

En pacientes con sospecha de infección fúngica invasora con radiología de tórax patológica se realizaba un lavado broncoalveolar de inmediato. En las muestras obtenidas se realizaban cultivos para bacterias (se incluía *Legionella*), micobacterias, hongos y virus, así como tinción de plata metenamina para *Pneumocystis carinii* [29,30]. En caso de fallecimiento, se practicaba la necropsia siempre que era posible, en ese caso se enviaban muestras tisulares para cultivos bacterianos y fúngicos.

## Resultados

Durante el periodo de estudio, se incluyeron de forma consecutiva los 74 pacientes que ingresaron para la práctica de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Las principales características de los pacientes se describen en la tabla 1. La leucemia mieloide crónica fue el diagnóstico más frecuente para la indicación de trasplante de progenitores hematopoyéticos (n=21). Sesenta y tres pacientes recibieron un trasplante de progenitores hematopoyéticos de un hermano HLA idéntico y 11 a partir de un donante no emparentado. Con respecto al acondicionamiento, 67 pacientes fueron acondicionados con regimen mieloablativo y los restantes siete con un acondicionamiento de intensidad reducida. La fuente de progenitores fue sangre periférica en 55 pacientes, médula ósea en 18 y sangre de cordón umbilical en uno. En 31 trasplantes de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica se realizó eliminación de linfocitos T del inóculo. La duración de la neutropenia fue de 23 días (mediana, rango 12-44). Tres pacientes fallecieron antes de la recuperación de la neutropenia.

Tabla 1. Características de los pacientes (n=74)

Edad, mediana (rango)	37 (15-60)
Sexo (masculino/femenino)	45/29
Enfermedad hematológica	
Leucemia mieloide aguda	12
Leucemia Linfoblástica aguda	8
Leucemia Bifenotípica aguda	2
Leucemia mieloide crónica	21
Mieloma múltiple	6
Leucemia linfática crónica	5
Linfoma no Hodgkin	6
Enfermedad de Hodgkin	2
Síndrome mielodisplásico	9
Aplasia medular grave	3
Episodios con antifúngicos	27
Duración de la neutropenia (días)	23 (12-44)
Fuente de progenitores	
Sangre periférica	55
Médula ósea	18
Cordón umbilical	1
Donante	
Hermano HLA idéntico	63
Donante no emparentado	11
Regimen de acondicionamiento	
Mieloablativo	67
No mieloablativo	7

La aspergilosis invasora fue diagnosticada en ocho de los 74 pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos (11%). Siguiendo los criterios de la EORTC/MSG, la aspergilosis invasora fue clasificada como probada en un paciente, probable en cinco y posible en otros dos. Las características de los ocho pacientes con

**Tabla 2.** Características de los pacientes con aspergilosis invasora.

N	Sexo/ edad	Enfermedad de base	EICH aguda grado	Esteroides	AI	Órganos afectos de AI	Localización aislamiento	ELISA	Muerte en relación AI	Días desde diag. AI hasta muerte
1	F/33	AMG	I	Si	Probable	Pulmón, senos	LBA: <i>A. fumigatus</i>	2+	No	60
2	F/41	LNH	O	No	Probada	Cerebro, pulmón, hígado, tiroides	LBA: <i>A. flavus</i> Autopsia	2+	Si	41
3	F/30	LMA	I	Si	Posible	Pulmón	Sin aislamiento	1+	Si	57
4	M/50	LMA	I	Si	Probable	Pulmón, cerebro	LBA: <i>A. fumigatus</i>	1+	Si	11
5	M/48	LMA	I	Si	Probable	Pulmón	LBA: <i>A. flavus</i>	-	Si	15
6	M/35	SMD	O	No	Probable	Pulmón	LBA: <i>A. fumigatus</i>	-	No	65
7	M/50	MM	III	Si	Probable	Pulmón	LBA: <i>A. terreus</i> y <i>A. flavus</i>	6+	Si	36
8	M/35	LLA	I	Si	Posible	Pulmón	Sin aislamiento	2+	No	145

LMA: leucemia mieloide aguda; LLA: leucemia linfoblástica aguda; AMG: aplasia medular grave; SMD: síndrome mielodisplásico; LNH: linfoma no Hodgkin; MM: mieloma múltiple; LBA: lavado broncoalveolar; EICH: enfermedad del injerto contra el huésped; M: masculino; F: femenino; AI: aspergilosis invasora

aspergilosis invasora se describen en la tabla 2. Siete de estos pacientes fueron sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos a partir de un hermano histocompatible, y uno a partir de un donante no emparentado. La fuente de progenitores fue sangre periférica en siete pacientes (en tres de ellos se efectuó eliminación de linfocitos T) y sangre de cordón umbilical en uno. La mediana del diagnóstico de aspergilosis fue de 83 días post-trasplante de progenitores hematopoyéticos (rango 32-180). Sólo un paciente estaba neutropénico en el momento de la aspergilosis invasora. Seis de ocho pacientes presentaron enfermedad de injerto contra huésped aguda, grado I en cinco y III en otro paciente. Todos los pacientes con enfermedad de injerto contra huésped recibieron esteroides (2 mg/kg/día). Ninguno de estos pacientes presentó enfermedad de injerto contra huésped de tipo crónico. El diagnóstico de aspergilosis invasora probada/probable se estableció mediante cultivo para hongos en seis pacientes, siendo la muestra del lavado broncoalveolar positiva para *Aspergillus fumigatus* en tres pacientes, *Aspergillus flavus* en dos y *A. flavus* y *Aspergillus terreus* al mismo tiempo en otro paciente. Tres pacientes con aspergilosis invasora probable tenían de forma concomitante una infección por citomegalovirus.

Todos los pacientes con aspergilosis invasora fallecieron, cinco en relación a la aspergilosis invasora, dos debido a toxoplasmosis y otro debido a un síndrome linfoproliferativo post-trasplante de progenitores hematopoyéticos. La necropsia se practicó sólo en uno de los cinco pacientes que fallecieron por la aspergilosis invasora y confirmó el diagnóstico. En los tres pacientes que fallecieron de otras causas se practicó la autopsia, no hallándose *Aspergillus* en ningún caso. El tiempo transcurrido desde el diagnóstico de aspergilosis invasora hasta la muerte fue de 41 días de mediana (rango, 11-57) para los cinco pacientes que fallecieron de aspergilosis invasora y 65 días (rango, 60-145) en los otros tres que fallecieron de otras causas.

Los resultados de los valores de galactomanano en los pacientes con aspergilosis invasora se describen en la tabla 3. Se recogieron 832 muestras de suero de los 74 pacientes. Se observaron 14 muestras positivas, todas ellas en pacientes con aspergilosis invasora. Seis pacientes con aspergilosis invasora tenían valores positivos para galactomanano (75%). No se identificó ninguna falso positivo. El test fue positivo en el paciente con aspergilosis invasora probada, en los tres con probable (60%) y en los dos con posible (100%).

De los ocho pacientes con aspergilosis invasora, en dos la detección del galactomanano fue negativa. De los otros seis, cuatro ya estaban recibiendo anfotericina B debido a fiebre persistente cuando el galactomanano se hizo positivo, y en los otros dos restantes el galactomanano fue positivo a la vez que se inició el tratamiento antifúngico debido a indicación clínica. La presencia de galactomanano precedió al desarrollo de infiltrados pulmonares en dos pacientes y coincidió en otro. La evolución de la antigenemia por galactomanano en el paciente número siete se muestra en la figura.

La sensibilidad y especificidad del test fueron del 75% y 100%, respectivamente. Los valores predictivos positivo y negativo fueron del 100% y 97%, de forma respectiva.

**Tabla 3.** Resultados de galactomanano en los pacientes con aspergilosis invasora.

	Galactomanano	
	Positivo	Negativo
Aspergilosis invasora probada (n=1)	1	0
Aspergilosis invasora probable (n=5)	3	2
Aspergilosis invasora posible (n=2)	2	0
Sin aspergilosis invasora (n= 66)	0	66
Total	6	68

## Discusión

El diagnóstico de la aspergilosis invasora en el paciente inmunodeprimido continúa siendo un reto. En un intento de mejorar y estandarizar el diagnóstico de las infecciones fúngicas invasoras en los pacientes con cáncer y sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos, la EORTC/MSG ha generado unos criterios diagnósticos para su clasificación uniforme [20]. Sin embargo, dichos criterios son útiles, tal como indican sus autores, para la investigación clínica, pero son poco aplicables en la práctica clínica habitual. De hecho, los cultivos pueden tardar días o semanas en crecer, y el examen histopatológico de las muestras de tejido, todavía considerados los estándares diagnósticos, obtenidas mediante procedimientos agresivos, a menudo no pueden realizarse por la pancitopenia y gravedad de estos pacientes. Dado

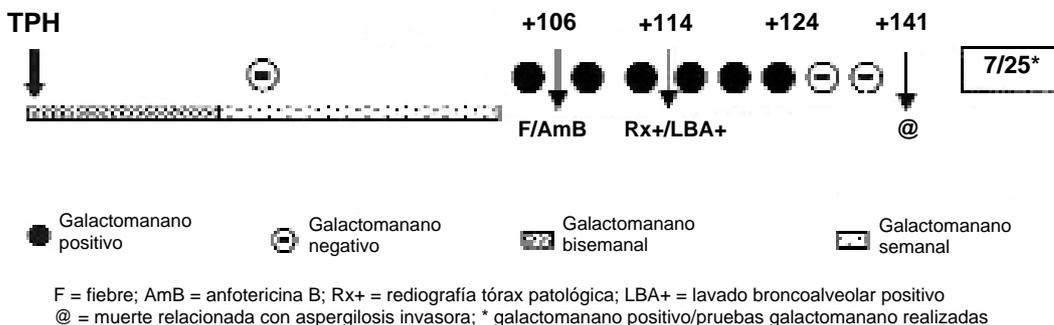


Figura. Diagrama correspondiente al paciente nº 7.

que los síntomas clínicos y radiológicos son poco específicos, la aspergilosis invasora es casi siempre un diagnóstico de sospecha y se inicia su tratamiento de forma empírica. Además, cuando una lesión se detecta radiológicamente, es probable que ya sea demasiado tarde para que el tratamiento sea eficaz. Por estas razones, y con la intención de iniciar el tratamiento de forma precoz e idealmente mejorar el pronóstico de estos enfermos, los métodos indirectos de diagnóstico tales como la detección de anticuerpos, fragmentos de ADN o antígenos fúngicos han cobrado especial interés en la última década.

Entre los productos celulares de *Aspergillus*, el galactomanano ha sido el más exhaustivamente estudiado y se ha demostrado su presencia en el suero de pacientes con aspergilosis invasora. En este estudio analizamos el resultado de las determinaciones seriadas de galactomanano circulante en el diagnóstico de la aspergilosis invasora en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyético, mediante una técnica comercial de ELISA. Utilizando las recomendaciones del laboratorio, confirmamos una elevada especificidad y una menor sensibilidad (75%). La sensibilidad de este estudio es similar a la descrita en la bibliografía [23,24,27].

Aunque se precisaron muestras seriadas para maximizar los resultados, pudimos demostrar la presencia de galactomanano en los pacientes con aspergilosis invasora probada (uno), en tres pacientes con aspergilosis invasora probable (60%) y en los dos pacientes con aspergilosis invasora posible (100%). Podemos especular sobre las posibles explicaciones para los dos falsos negativos en dos pacientes con aspergilosis invasora probable, por ejemplo la hipotética limitada angioinvasividad o encapsulación del proceso, el uso de profilaxis o la escasa liberación de galactomanano. La alta especificidad observada (100%), también está en concordancia con otras series publicadas [23,24,27]. Es importante señalar que no se observó ningún falso positivo. Aunque no obtuvimos ninguno, el significado de los resultados falsamente positivos sigue siendo una incógnita. Con excepción de especies de *Penicillium*, no se conocen reacciones cruzadas con otros patógenos fúngicos [32]. La especificidad de especie del test no puede descartar patógenos fúngicos con presentaciones clínicas similares, entre las que se incluyen especies emergentes como *Alternaria*, *Fusarium* y mucorales.

De los ocho pacientes con aspergilosis invasora, dos tuvieron el galactomanano negativo y los otros seis pacientes estaban bajo tratamiento con anfotericina B cuando el galactomanano se positivizó. La presencia de galactomanano precedió al desarrollo de infiltrados pulmonares en la radiología torácica en dos pacientes y coin-

idió en otro paciente. Por tanto, la detección de galactomanano no tuvo un impacto determinante en el tratamiento de estos pacientes con aspergilosis invasora ya que, por indicación clínica, se encontraban ya bajo tratamiento antifúngico. De momento, apoyados por nuestros resultados, creemos que el galactomanano confirma la etiología aspergilar del proceso infeccioso en el contexto adecuado. Además, dado que tuvimos dos falsos negativos creemos que el galactomanano no sustituye a otras técnicas diagnósticas como la tomografía axial computarizada [34] en el proceso diagnóstico de fiebre sin focalidad aparente y con sospecha de infección fúngica invasora en los pacientes hematológicos de alto riesgo.

El excelente valor predictivo positivo (100%) y el negativo de 97% pueden ayudar en la aproximación diagnóstica del paciente febril e inmunodeprimido, sobre todo si además hay hallazgos radiológicos [34]. Un resultado positivo confirmado debería ser indicación de cobertura antifúngica, aunque no existan signos clínicos. Estos excelentes valores predictivos positivo y negativo también se confirman en otras series publicadas [18,23,24].

En resumen, este estudio prospectivo confirma la utilidad diagnóstica de la determinación seriada de galactomanano mediante el test de ELISA en pacientes con trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos con excelentes sensibilidad, especificidad, y valores predictivos positivo y negativo.

Como reflexión, es importante señalar que en nuestra experiencia, a pesar de los buenos resultados de este test, todos los pacientes con aspergilosis invasora fallecieron y en seis de ocho pacientes la aspergilosis invasora fue la causa de la muerte. La explicación de esta elevada mortalidad es que todos estos pacientes fueron sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, una población de especial alto riesgo de aspergilosis invasora. Como es ya conocido estos pacientes tienen un pronóstico peor en comparación con otros pacientes hematológicos si desarrollan una aspergilosis invasora. Ello se debe a que los pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos acumulan muchos factores desfavorables de aspergilosis invasora y la neutropenia es sólo uno de ellos. Estos pacientes fallecen debido a la pobre reconstitución inmunológica y aún teniendo un diagnóstico precoz, el tratamiento antifúngico que disponíamos hasta este momento no era suficiente para curar la infección mientras el paciente permanecía inmunodeprimido.

## Bibliografía

1. Warnock DW. Fungal infections in neutropenia: current problems and chemotherapeutic control. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41 (suppl D): 95-105.
2. Richardson MD, Kokki MH. Diagnosis and prevention of fungal infections in the immunocompromised host. *Blood Rev* 1998; 12: 241-254.
3. Denning DW, Marinus A, Cohen J, *et al*. An EORT multicenter prospective survey of invasive aspergillosis in hematological patients: diagnosis and therapeutic outcome. *J Infect* 1998; 37: 173-180.
4. Salonen J, Nikoskelainen J. Lethal infections in patients with hematological malignancies. *Eur J Haematol* 1993; 51: 102-108.
5. Jantunen E, Piilonen A, Volin L, *et al*. Diagnostics aspects of invasive *Aspergillus* infections in allogeneic BMT recipients. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 867-871.
6. Wingard JR, Beals SU, Santos GW, *et al*. Aspergillosis infections in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1997; 2: 175-181.
7. McWhinney PHM, Kibbler C, Hamon MD, *et al*. Progress in the early diagnosis and management of aspergillosis in bone marrow transplantation: 13 years experience. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 397-404.
8. Saugier-veber P, Devergie A, Sulahian A, *et al*. Epidemiology and diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in bone marrow transplant patients: result of 5 years retrospective study. *Bone marrow Transplant* 1999; 12: 121-124.
9. Morrison VA, Haake RJ, Weisdorf DJ. Non-Candida fungal infections after bone marrow transplantation: risk factors and outcome. *Am J Med* 1994; 86: 4497-4503.
10. Wald A, Leisenring W, van Burik JA, *et al*. Epidemiology of *Aspergillus* Infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1997; 175: 1459-1466.
11. Jantunen E, Ruutu P, Niskanen L, *et al*. Incidence and risk factors for invasive fungal infections in allogeneic BMT recipients. *Bone marrow Transplant* 1997; 19: 801-808.
12. Slavin MA, Osborne B, Adams R, *et al*. Efficacy and safety of fluconazole prophylaxis for fungal infections after bone marrow transplantation: A prospective, randomised, double-blind study. *J Infect Dis* 1995; 171:1545-1552.
13. Stevens DA, Lee JY. Analysis of compassionate use itraconazole therapy for invasive aspergillosis by the NIAID Mycosis Study Group criteria. *Arch Intern Med* 1997; 157: 1857-1862.
14. Walsh TJ, Hiemenz JW, Seibel NL, *et al*. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: Analysis of safety and efficacy in 556 cases. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1383-1396.
15. Manavathu EK, Dimmock JR, Vashistha SC, *et al*. In-vitro and in-vivo susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to a novel conjugated styryl ketone. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 585-590.
16. Denning DW. Therapeutic outcome of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*, 1996; 23: 608-615.
17. Rinaldi MG. Problems in the diagnosis of invasive fungal diseases. *Rev Infect Dis*. 1991; 13: 493-495.
18. 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 a stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood* 2001; 97: 1604-1610.
19. Yu VL, Muder RR, Poorsattar A. Significance of isolation of *Aspergillus* from the respiratory tract in diagnosis on invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Med* 1986; 8: 249-254.
20. Ascioğlu S, De Pauw B, Bennett JE, *et al*. Analysis of definitions used in clinical research on invasive fungal infections (IFI): consensus proposal for new, standardised definitions. In: Program and abstracts of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, 1999 [Abstract J92].
21. Latgé JP, Kobayashi H, Debeauvais JP, *et al*. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1994; 62: 5424-5433.
22. Rogers TR, Haynes KA, Barnes RA. Value of antigen detection in predicting invasive aspergillosis. *Lancet* 1990; 336: 1210-1213.
23. Maertens J, Verhaegen J, Demuyneck H, *et al*. Autopsy-Controlled prospective evaluation of serial screening for circulating Galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3223-3228.
24. Ulusakarya A, Chachaty E, Vantelon JM, *et al*. Surveillance of *Aspergillus* galactomannan antigenemia for invasive aspergillosis by enzyme-linked immunosorbent assay in neutropenic patients treated for hematological malignancies. *Haematology J* 2000; 1:111-116.
25. Kawamura S, Macsaki S, Noda T, *et al*. Comparison between PCR and detection of antigen sera for diagnosis of pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 218-220.
26. Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, *et al*. Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase Chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Pediatric Infect Dis J* 1996; 15: 232-234.
27. Machetti M, Feasi M, Van Lint MT, *et al*. Comparison of an enzyme immunoassay and a latex agglutination system for the diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 1998; 21: 917-921.
28. Stynen D, Sarfati J, Goris A, *et al*. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus* galactomannan. *Infect Immunol* 1992; 60: 2237-2245.
29. Raño A, Agusti C, Jimenez P, *et al*. Pulmonary infiltrates in non-HIV immunocompromised patients: a diagnostic approach using non-invasive and bronchoscopic procedures. *Thorax* 2001; 56: 379-387.
30. Danes C, Gonzalez-Martin J, Pumarola T, *et al*. Pulmonary infiltrates in immunosuppressed patients: analysis of a diagnostic protocol. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2134-2140.
31. Stynen D, Goris A, Sarfati J, *et al*. A new sensitive sandwich ELISA to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 497-500.
32. Swaninck CMA, Meis JFGM, Rijs AJMM, *et al*. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay for detecting *Aspergillus* galactomannan. *J. Clin Microbiol* 1997; 35: 257-260.
33. Hashiguchi K, Niki Y, Soejima R. Cyclophosphamide induces false positive results in detection of *Aspergillus* antigen in urine. *Chest* 1994; 105: 975-976.
34. Caillot D, Casanovas O, Bernard A, *et al*. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed topography scan and surgery. *J Clin Onc* 1997; 15: 139-147.