

# İnvaziv Fungal İnfeksiyonlarda Erken Tanı

Dr. Zekaver Odabaşı

Marmara Ü. Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İstanbul

Günümüzde nötropenik hastalarda fungal infeksiyonlar artık en önemli mortalite ve morbidite sebepleri arasında sayılmaktadır <sup>1,2</sup>. Hematolojik kanser/transplant vakalarında özellikle uzun nötropeni süresi, organ hasarı (mukozit, GVHD, organ yetmezlikeli) ve önceden fungal infeksiyon ve/veya kolonizasyon öyküsü olan yüksek riskli hasta gruplarına invazif fungal infeksiyon (İFİ) gelişme riski %15-25' dir (tablo 1) <sup>3,4</sup>. Gelişen fungal infeksiyonların %90'ından çoğunda *Candida* ve *Aspergillus* türleri etkindir <sup>5</sup>, ancak *Trichosporon*, *Pseudallescheria*, *Fusarium* ve *Scedosporium* türlerine bağlı nadir görülen mantar infeksiyonlarında da artış gözlenmektedir <sup>6,7</sup>.

**Tablo 1.** Hematolojik kanser/transplant vakalarında fungal infeksiyon sıklığı<sup>3</sup>

Hastalık	Fungal İnfeksiyon Sıklığı
AlloBMT, PBSCT	15-25%
Akut myelojenik lösemi	10-15%
Akut lenfositik lösemi	5-10%
AutologBMT, PBSCT	2-6%

Nötropenik hastalarda *Candida* infeksiyonlarında mortalite %50 <sup>8,9</sup> ve *Aspergillus* infeksiyonlarda ise %100 <sup>10,11</sup> gibi yüksek düzeylerde seyredilmektedir. Daha önceki çalışmalarda nötropenik hastalarda fungal infeksiyon tedavisi ne kadar erken başlanırsa prognoz da o kadar iyi olacağı gösterilmiştir <sup>12,13</sup>, bu sebeple bu infeksiyonların erken tanı ve tedavisi çok önem taşımaktadır.

Günümüzde İFİ'lerin erken tanısı açısından bize yardımcı olacak yeterli hassasiyet ve özgüllüğe sahip oturmuş bir tanı yöntemi henüz yoktur. Halen hastalardan alınan doku örneklerinde mantar hücrelerinin gösterilmesi veya bu örneklerin kültürlerinde etken mantarın üretilmesi tanıda altın standarttır. Oysa febril nötropeni grubu hastalarda, trombositopeni ve genel durum bozuklukları sebebi ile biopsi ve derin doku örneklemeleri genelde pek mümkün olmamaktadır. Genel olarak İFİ'lerde tanı yöntemleri, Kültüre dayalı ve Kültür dışı yöntemler olmak üzere iki ayrı grupta ele alınabilir (tablo 2).

İFİ'lerde kan kültürleri her zaman pozitif olmayabilir, *Candida* ve *Fusarium* infeksiyonlarında %50 <sup>14-17</sup>, *Aspergillus* infeksiyonlarında ise en fazla %5 civarında pozitif olabilmektedir <sup>18</sup>. Balgam kültürü ve bronkoalveolar lavaj (BAL) gibi solunum yolu sekresyonlarının kültürü özellikle *Aspergillus* infeksiyonlarında %50 veya daha az vakada tanıda yardımcı olmaktadır <sup>19,20</sup>. Nötropenik olmayan vakalarda solunum

**Tablo 2.** İnvazif fungal infeksiyonlarda tanı yöntemleri

<i>Kültüre dayalı tanı yöntemleri</i>	<i>Kültüre dayanmayan tanı yöntemleri</i>
Doku – sekresyon kültürleri (Kan, bronko alveoler lavaj, balgam, idrar, abse drenajı, cilt, derin doku-organ biyopsisleri)	Serolojik tanı yöntemleri Galaktomannan Beta glukcan PCR Diğer İnce kesitli tomografik inceleme (HRCT)
	Patolojik inceleme

yolu sekresyonlarında mantar üretmenin çok fazla bir anlamı olmamakla birlikte sigara öyküsü olmayan, nötropenik vakalarda fungal üreme anlamlı kabul edilmelidir<sup>21</sup>. Daha önce belirttiğimiz gibi hastalar çoğunlukla trombositopenik olduklarından derin doku biyopsisi almada sıkıntı olmaktadır. Pulmoner infeksiyonlarda diğer tanı yöntemleri ile tanı konulmadığında transbronşial biyopsi veya açık akciğer biyopsisi denenebilir. Hastanın durumunda ciddi kötüleşme varsa ve empirik tedaviye yanıt vermiyorsa açık akciğer biyopsisi denenebilir, bu işlemin komplikasyon oranı %10-15 civarındadır<sup>22</sup>. Açık akciğer biyopsisi sonucunda %20-40 vakada tanıya yardımcı olmayan, belli bir özellik göstermeyen patolojik bulgulara rastlanırken, önemli sayıda vakada da yapılan bronko alveoler lavaj bulguları ile uyum göstermeyen farklı biopsi bulguları görülmektedir. Diğer taraftan, tipik radyolojik görüntü itibarıyla pulmoner fungal infeksiyon düşünülen vakalarda yapılan bir çalışmada bu vakaların açık akciğer biyopsileri sonucunda sadece %51’inde fungal infeksiyon gösterilebilirken diğer yarısında fungal infeksiyon dışı infeksiyöz/non-infeksiyöz etiolojiler tespit edilmiştir<sup>23</sup>. Kemik iliği nakli vakalarında açık akciğer biyopsisinin tedavi edilebilir bir sebep bulma açısından etkinliği zayıftır. Bu konuda yapılan bir çalışmada pulmoner infiltrasyonları olan ve bir etken bulunamayan 12 kemik iliği transplant vakasında açık akciğer biyopsisi sonucunda, bilateral pulmoner nodülü olan hastaların sadece dördünde tedavi edilebilir infeksiyöz bir sebep bulunmuşken diğer 8 hastada herhangi bir özellik göstermeyen fibrozis ve benzeri değişiklikler bulunmuştur<sup>24</sup>. Trombosit sayıları 50 binin üzerinde ise transbronşial biyopsi denenebilir. Son zamanlarda özellikle trans-torasik biyopsi yöntemi, etkinliği açısından ön plana çıkmaya başladı, bu yöntemin komplikasyon oranlarında %10 civarındadır. Allojenik KİT hastalarında yapılan bir çalışmada CT veya USG yardımıyla yapılan pulmoner biyopsilerde 21 vakanın 14’ünde (%67) fungal infeksiyon gösterilmiştir<sup>25</sup>. Hematolojik malinitesi olan ve radyolojik olarak pulmoner infiltrasyonları olan hastalarda yapılan başka bir çalışmada da perkütan ince iğne aspirasyon biyopsisinin fungal infeksiyonları göstermede duyarlılığı %70.5 ve PPV

(positive predictive value) %100 olarak tespit edilmiştir <sup>26</sup>. Bu çalışmalar gösteriyor ki perkütan ince iğne biyopsisi, açık akciğer biyopsisine göre daha az invazif ve etkin bir tanı yöntemidir. Akciğer dışında karaciğer, cilt gibi diğer organlarda da şüpheli lezyonlar varsa yapılacak biyopsiler tanıda yardımcı olabilir. Alınan her türlü sekresyon, doku ve tüm diğer örneklemelerin usulüne uygun transportu ve uygun şartlarda incelenmesi çok önemlidir. Doku parçaları gerekirse homojenize edilerek kültüre ekilmelidir, BAL materyalleri alındıktan sonra +4 derecede tutularak nakledilmeli ve en geç 4 saat içerisinde değerlendirilmiş olmalıdır <sup>22</sup>. Biyopsi materyalleri fungal yapıları tanıyan deneyimli patoloğlarca ve uygun boyama teknikleri ile değerlendirilmelidir.

Febril nötropeni gurubu hastaların %15-25' inde takipleri esnasında pulmoner infiltrasyonlar ortaya çıkabilir ve bunların 2/3'si ateş ortaya çıktıktan ortalama 5 gün sonra radyolojik olarak görüntülenebilir. Ateş sebebi ile empirik antibiyotik almalarına rağmen yeterli ateş yanıtı alınamayan febril nötropenik hastaların konvansiyonel x-ray grafi ile ancak %10'unda akciğer infiltrasyonu tespit edilebilmesine rağmen <sup>27, 28</sup>, aynı anda yapılan CT incelemede bu vakaların %50'sinde bariz veya şüpheli pulmoner infiltrasyonlar gösterilebilir <sup>29-32</sup>. Özellikle CT incelemesinde Halo işareti ve Air-crescent bulguları pulmoner aspergillozis (PA) açısından önemli ipucu verirler. Halo işareti; akciğerde nodüler bir infiltrasyon ve bunu çevreleyen kanama ve ödeme bağlı daha az yoğunluktaki buzlu cam manzarasıdır, PA'nın erken dönemlerinde ortaya çıkar. Halo işareti PA'nın 3, 7 ve 14üncü günlerdinde ortalama %68, %22 ve %19 ihtimalle görülebilir <sup>33</sup>, dikkat edilirse hastalığın erken döneminde Halo işaretinin tespit edilme ihtimali daha yüksektir. Halo işareti febril nötropenik bir hastada özellikle PA'yı düşündürse de sadece bu hastalığa özgü bir bulgu değildir, diğer küf mantarı infeksiyonlarında, nodüler malinitelerde, hemorajik pulmoner nodüller ve Weger's hastalığı gibi diğer hastalıklarda da görülebilir. Air-crescent (hava-hilal) işareti ise PA'nın geç döneminde nodül veya infiltrarda gelişen kaviteyona bağlı hilal şeklindeki bulgudur. Özellikle nötropeniden çıkmaya yakın dönemde belirginleşir ve PA'nın geç dönem radyolojik bulgusudur. Air-crescent işareti hastalığın 3,7 ve 14üncü günlerinde %8, %25 ve %63 ihtimalle görülebilir<sup>33</sup>. Air-crescent işareti PA dışında, kaviteyona sebep olan diğer infeksiyonlarda da görülebilir. Özellikle son dönemlerde, febril nötropenik olupta empirik antibiyotik tedavisine rağmen ateşi 72-96 saati aşkın devam eden vakalarda fungal infiltrasyonları göstertmedeki üstünlüğü nedeni ile pulmoner CT görüntüleme yapılması önerilmektedir<sup>22</sup>. Erken dönem yapılan CT görüntüleme pulmoner fungal infeksiyonların erken tanısında yardımcı olabilir, erken antifungal başlanması ile bu vakalarda prognozun daha iyi olduğu gösterilmiştir <sup>34</sup>. CT görüntülemede spiral CT den ziyade ince kesitli HRCT inceleme (high resolution computerized tomography) tercih edilmelidir.

İFİ'lerin tanısında kullanılabilen bir diğer yöntem serolojik tanı yöntemleridir. Galaktomannan antijen testi, beta gluklan testi ve PCR testleri üzerinde en çok çalışılan yöntemlerdir. Bunlar arasında özellikle galaktomannan antijen testi bir çok merkezde rutin kullanıma girmeye başlamıştır. Galaktomannan, Aspergillus türlerinin de içinde olduğu hyalohyphomycetes grubu küf mantarlarının hücre duvar yapısında bulunan bir moleküldür. Aspergillus infeksiyonları nötropenik hastalarda invazif seyreder, özellikle damarsal yapılara karşı afinitesi vardır ve çevre damarları invaze eder, ürettiği ortama galaktomannan antijeni salgılanır. Galaktomannan antijeni Latex agglutinasyon (LA) veya ELISA yöntemi ile hasta kanında veya sekresyonlarında tespit edilebilir, ELISA testi LA test metoduna göre daha üstün olduğundan son yıllarda tamamen ELISA yöntemi kullanılmaktadır<sup>35-39</sup>. ELISA testinde fare EB-A2 monoklonal antikoları ile galaktomannanın yan zinciri olan (1→5)-β-D-galactofuranose molekülü tespit edilir. Farklı çalışmalarda, nötropenik hasta gruplarında PA tanısına yönelik olarak kullanıldığında testin duyarlılığı %67-100, özgüllüğü ise %81-99 oranlarında bulunmuştur<sup>37,38,40,41</sup>. Bu çalışmalarda nötropenik hastalarda düzenli aralıklarla galaktomannan antijen testi yapıldığında PA gelişmesinden ortalama 3-4 gün kadar önce serumda antijen pozitifliği gösterilebilmektedir. Ayrıca, PA'lı vakaların takiplerinde serum galaktomannan antijen testi, uygulanan antifungal tedavinin başarı düzeyi ile doğru orantılı olarak değişmektedir. Galaktomannan serumdan kısa sürede uzaklaştırıldığından haftada iki veya daha fazla sıklıkta bakılması önerilmektedir, iki veya daha fazla sayıda ardışık serum örneğinin pozitif olması testin duyarlılığını daha da arttırmaktadır<sup>38</sup>. Bu test açısından en önemli handikap yetişkinlerde %6-14 arasında değişen, pediatrik popülasyonda ise %83'lere kadar varan yüksek yalancı pozitiflik düzeyleridir<sup>39,41,42</sup><sup>36,38,43-45</sup>. Galaktomannan çeşitli besin ürünlerinde (süt ve süt ürünleri, tahıllar, besin katkı maddeleri) ve antibiyotiklerde (tazocillin) bulunabildiğinden muhtemelen bu maddelerin barsaklardan translokasyonu yalancı pozitiflikte rol oynamaktadır<sup>43,46,47</sup>. Özellikle neonatal yaş grubunda, süt ve süt ürünlerinin yoğun alınmasının yanında bu yaş grubunda barsaklarda yoğun olarak bulunan Bifidobacterium türlerinin yalancı pozitiflikte rol oynayabileceği gösterilmiştir<sup>45</sup>. Diğer taraftan oral alımı olmayan ve tamamen parenteral beslenen KİT hastalarında yoğun mukozite rağmen yalancı pozitiflik olmadığı gösterilmiştir<sup>48</sup>. Yapılan bir başka çalışmada da özellikle anti-aspergillus antikor oluşumunun yalancı negatifliğe sebep olabileceği gösterilmiştir, bu vakalarda testin cutt-off değerlerinin düşürülmesi yalancı negatifliği azaltmaktadır<sup>42</sup>. Galaktomannan antijen testi serum örnekleri dışında BAL, trakeal sekresyon, beyin omurilik sıvısı gibi çeşitli vücut sıvı ve sekresyonlarında da bakılabilmektedir. Özellikle BAL ve trakeal sekresyonlarda yapılan testler umut verici olmakla birlikte henüz serum testi kadar oturmuş bir kullanımı yoktur<sup>49</sup>. CT ile tespit edilen ve etiyojisi belirlenemeyen nötropenik pnömoni hastalarında alınan BAL sıvıları test edildiğinde tüm PA vakalar galaktomannan pozitif bulunur-

ken ardışık serum testi takiplerinde PA'lı vakaların sadece yarısında galaktomannan testi pozitif bulunmuştur<sup>50</sup>. Son olarak, bu test EORTC-MSG tarafından belirlenen fungal infeksiyonların tanı kriterleri arasında yer almaktadır<sup>51</sup>. Ancak unutmamak lazım ki EORTC-MSG kriterleri hasta takibinde kullanılmaktan ziyade İFİ'lerin tanım ve klasifikasyonunda kullanılmaktadır. Galaktomannan testi ile nötropenik hasta takibinde prospektif olarak yapılmış etkinlik testlerine ihtiyaç vardır.

Serolojik tanı yöntemlerinden ikincisi PCR ile fungal DNA yapılarının tespit edilmesidir. Bu konuda geliştirilen ve deneme sürecinde olan bir çok PCR yöntemleri olmasına rağmen henüz pratik kullanıma giren standart bir PCR protokolü yoktur. Pan-fungal primerler (örneğin 18s ribozomal DNA) ya da *Aspergillus* gibi belli bir mantar türüne yönelik primerler aracılığıyla hasta serum ya da BAL sıvısında fungal infeksiyon araştırması yapılabilmektedir<sup>52-57</sup>. Bu yöntem ile özellikle PA tanısına yönelik çalışmalarda testin duyarlılığı %75-100, özgüllüğü ise %90'ların üzerinde bulunmuştur<sup>58, 59</sup>. Bu çalışmalarda galaktomannan antijen testinde olduğu gibi haftada iki kez veya daha fazla alınan serum örnekleri ile düzenli test edildiğinde klinik infeksiyon başlamadan ortalama 9 gün önce testin pozitifleşmeye başladığı gösterilmiştir. Test açısından en önemli handikap ise yüksek yalancı pozitiflik ve buna bağlı düşük PPV değerleridir (%42-44). Yalancı pozitiflik değerleri özellikle BAL sıvısı test edildiğinde fungal kolonizasyon riski nedeni ile daha sık olmaktadır<sup>60</sup>. Son zamanlarda geliştirilen RT-PCR yöntemi ile fungal yük miktarının hassas bir şekilde gösterilmesi sağlanmıştır<sup>61, 62</sup>, ancak bu yöntem ile yapılan çalışmalarda da yalancı pozitiflik sorun olmaya devam etmektedir<sup>63</sup>.

Funfal infeksiyonların tanısında kullanılan bir diğer test yöntemi de Beta glukan testi'dir. (1→3)-β-D-glukan *Candida* ve *Aspergillus* türleri başta olmak üzere bir çok maya ve küf mantarının hücre duvar yapısında bulunan bir moleküldür<sup>64</sup>. Denizde yaşayan ve Horseshoe crab olarak bilinen bir canlıdan izole edilen Faktör G, beta glukan ile temas ettiğinde kimyasal bir reaksiyon verir, Beta glukan testi bu kimyasal etkileşim temelinde geliştirilmiş bir testtir<sup>65-67</sup>. Bu konuda ilk geliştirilen test Japonya orijinli Fungitec-G™ beta glukan testidir (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan). Bu test ile 1995'te yapılan bir çalışmada testin duyarlılığı %90 ve özgüllüğü %100 olarak tespit edilmiştir<sup>68</sup>. Bu test yöntemi ile geliştirilen bir diğer kit ise ABD orijinli Glucate™ beta glukan testidir (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA, US). Bu kit ile AML/MDS grubu nötropenik hastalarda yapılan iki çalışmada fungal infeksiyonların tanısında testin duyarlılığı kanıtlanmış İFİ'lerde %100, özgüllüğü %80-94 ve NPV (negative predictive value) %100 olarak bulunmuştur<sup>69, 70</sup>. İki veya daha fazla sayıda ardışık serum örneği pozitif olduğunda testin özgüllüğü %100'lere varırken PPV %40'lardan %98-100'e çıkmaktadır. Hastaların düzenli serolojik takiplerinde klinik olarak fungal infeksiyon tanısından ortalama 4-12 gün önce testin pozitifleşmeye başladığı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda beta glukan testi

ile *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Trichosporon* türleri gibi farklı fungal etkenlere bağlı İFİ'ler gösterilebilmiştir. Beta gluklan testinde diğer serolojik yöntemlere göre yalancı pozitiflik değerleri oldukça düşüktür ( $\leq$  %7) ve testin pratikte gerçekleştirilmesi ortalama iki saat sürmektedir, 5 mikrolitre serum test için yeterli olmaktadır. Bu test ile yalancı pozitifliğe sebep olan durumlar selüloz hemodiyaliz membranları ve bazı immünglobulin preparatlarıdır<sup>71, 72</sup>. Testin dezavantajı sayılabilecek nokta ise fungal infeksiyonların tanısı açısından belli bir mantar türüne özgü olmamasıdır. Hücre duvarında beta gluklan düzeyi çok düşük düzeyde olan *zygomycetes* infeksiyonlarında, ve *Cryptococcus* infeksiyonlarda test negatif sonuç vermektedir<sup>64, 73, 74</sup>. Genel olarak beta gluklan testi etkinliği açısından ümit verici olmakla birlikte daha fazla sayıda bu yöntemle yapılmış çalışmaya ihtiyaç vardır.

Özet olarak nötropenik hastalarda fungal infeksiyonların erken tanı ve tedavisinin prognozu ciddi düzeyde etkilemesi sebebi ile günümüzde kullandığımız klasik tanı yöntemlerinin yanında etkin erken tanı yöntemlerine ihtiyaç vardır. Belirttiğimiz serolojik testler ve HRCT incelemesi bu konuda ümit vericidir. Erken HRCT incelemenin pulmoner infeksiyonların tanısında etkinliğinin gösterilmesi sebebi ile özellikle empirik antifungal başlanması öncesinde rutin yapılması önerilmektedir. Mevcut serolojik tanı yöntemleri erken tanıda oldukça faydalı gibi görüncede bu testlerin prospektif olarak tedavide ve prognozda etkinliklerini değerlendiren çalışmalara ihtiyaç vardır.

### Kaynaklar

1. Bow EJ, Loewen R, Cheang MS, Schacter B. Invasive fungal disease in adults undergoing remission-induction therapy for acute myeloid leukemia: the pathogenetic role of the antileukemic regimen. *Clinical Infectious Diseases* 1995; 21:361-369.
2. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *Journal of Infection* 1996; 33:23-32.
3. O'Brien S, Blijlevens M, Mahfouz T, Anaissie E. Infections in patients with hematological cancer: recent developments. *Hematology* 2003;438=72.
4. De La Rosa G, Champlin R, Kontoyiannis D. Risk factors for the development of invasive fungal infections in allogeneic blood and marrow transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2001; 4:3-9.
5. 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.
6. Fleming RV, Walsh TJ, Anaissie EJ. Emerging and less common fungal pathogens. *Infectious Disease Clinics of North America* 2002; 16:915-33.
7. Walsh TJ, Groll AH. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transplant Infectious Disease* 1999; 1:247-61.
8. Pagano L, Antinori A, Ammassari A, et al. Retrospective study of candidemia in patients with hematological malignancies. Clinical features, risk factors and outcome of 76 episodes. *Eur J Haematol* 1999; 63:77-85.

9. Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, et al. Candidemia in cancer patients: A prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clinical Infectious Diseases* 1999; 28:1071-1079.
10. Abbasi S, Shenep JL, Hughes WT, Flynn PM. Aspergillosis in children with cancer: A 34-year experience. *Clin Infect Dis* 1999; 29:1210-1219.
11. Wallace JM, Lim R, Browdy BL, et al. Risk factors and outcomes associated with identification of *Aspergillus* in respiratory specimens from persons with HIV disease. *Chest* 1998; 114:131-137.
12. von Eiff M, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zuhlsdorf M, van de Loo J. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration* 1995; 62:341-347.
13. Aisner J, Wiernik PH, Schimpff SC. Treatment of invasive aspergillosis: relation of early diagnosis and treatment to response. *Annals of Internal Medicine* 1977; 86:539-43.
14. Berenguer J, Buck M, Witebsky F, Stock F, Pizzo PA, Walsh TJ. Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive candidiasis. Disseminated versus single-organ infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 1993; 17:103-109.
15. Boutati EL, Anaissie EJ. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: Ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood* 1997; 90:999-1008.
16. Girmenia C, Jaalouk G. Detection of *Candida* in blood smears of patients with hematologic malignancies. *European J of Haematology* 1994; 52:124-125.
17. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clinical Infectious Diseases* 1997; 24:1122-1128.
18. Duthie R, Denning DW. *Aspergillus* fungemia: Report of two cases and review. *Clinical Infectious Diseases* 1995; 20:598-605.
19. Rañó A, Agustí C, Jimenez P, et al. Pulmonary infiltrates in non-HIV immunocompromised patients: a diagnostic approach using non-invasive and bronchoscopic procedures. *Thorax* 2011; 56:379-87.
20. Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *American Journal of Medicine* 1996; 100:171-178.
21. Yu VL, Muder RR, Poorsattar A. Significance of isolation of *aspergillus* from the respiratory tract in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: results from a 3y prospective study. *American Journal of Medicine* 1986; 81:249-254.
22. Maschmeyer G, Beinert T, Buchheidt D, et al. Diagnosis and antimicrobial therapy of pulmonary infiltrates in febrile neutropenic patients. *Annals of Hematology* 2003; 82:S118-S126.
23. Kim K, Lee M, Kim J, et al. Importance of Open Lung Biopsy in the Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients With Hematologic Malignancies. *Annals of Hematology* 2002; 71:75-79.
24. Shaikh ZHA, Torres A, Walsh GL, Champlin RE, Kontoyiannis DP. Open lung biopsy in bone marrow transplant recipients has poor diagnostic yield for a specific diagnosis. *Transpl Infect Dis* 2001; 4.
25. Jantunen E, Piilonen A, Volin L, et al. Radiologically guided fine needle lung biopsies in the evaluation of focal pulmonary lesions in allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29:353-6.
26. Nosari A, Anghileri M, Carrafiello G, et al. Utility of percutaneous lung biopsy for diagnosing filamentous fungal infections in hematologic malignancies. *Haematologica* 2003; 88:1405-9.

27. Feusner J, Cohen R, O'Leary M, Beach B. Use of routine chest radiography in the evaluation of fever in neutropenic oncology patients. *J Clin Oncol* 1988; 6:1969-1702.
28. Jochelson M, Altschuler J, Stomper P. The yield of chest radiography in febrile and neutropenic patients. *Ann Intern Med* 1986; 105:708-709.
29. Barloon TJ, Galvin JR, Mori M, Stanford W, Gingrich RD. High-resolution ultrafast chest CT in the clinical management of febrile bone marrow transplant patients with normal or nonspecific chest roentgenograms. *Chest* 1991; 99:928-933.
30. Heussel C, Kauczor H, Heussel G, Fischer B, Mildenerger P, Thelen M. Early detection of pneumonia in febrile neutropenic patients: use of thin-section CT. *Am J Roentgenol* 1997; 169:1347-1353.
31. Heussel C, Kauczor H, Heussel G, et al. Pneumonia in febrile neutropenic patients and in bone marrow and blood stem-cell transplant recipients: Use of high-resolution computed tomography. *J Clin Oncol* 1999; 17:796-805.
32. Janzen D, Padley S, Adler B, Muller N. Acute pulmonary complications in immunocompromised non-AIDS patients: comparison of diagnostic accuracy of CT and chest radiography. *Clin Radiol* 1993; 47:159-165.
33. Caillot D, Couaillier JF, Bernard A, et al. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J Clin Oncol* 2001; 19:253-259.
34. Caillot D, Casasnovas O, Bernard A, et al. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol* 1997; 15:139-47.
35. Verweij PE, Stynen D, Rijs AJMM, de Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFGM. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Jl of Clin Microbiol.* 1995; 33:1912-14.
36. Verweij PE, Latge J-P, Rijs AJMM, et al. Comparison of antigen detection and PCR assay using bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for hematological malignancies. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33:3150-3153.
37. 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 Microbiol* 1999; 37:3223-3228.
38. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, Van Eldere J, Boogaerts M. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood* 2001; 97:1604-1610.
39. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33:497-500.
40. Williamson ECM, Oliver DA, Johnson EM, Foot ABM, Marks DI, Warnock DW. Aspergillus antigen testing in bone marrow transplant recipients. *J Clin Pathol* 2000; 53:362-366.
41. Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P, Leblanc T, Lacroix C, Derouin F. 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.
42. 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.



43. Swanink CMA, Meis JFGM, Rijs AJMM, Donnelly JP, Verweij PE. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus* galactomannan. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35:257-260.
44. Rohrlrich P, Sarfati J, Mariani P, et al. Prospective sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for serum galactomannan: early predictive value and clinical use in invasive aspergillosis. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15:232-7.
45. Verweij P, Klont R, Warris A, Op Den Camp H, Mennink-Kersten M. Cross-Reactivity of Anti-Galactomannan Antibody EB-A2 with Lipoteichoic Acid (LTA) of *Bifidobacterium bifidum* spp. *pennsylvanicum*. 43rd ICAAC Abstracts, American Society for Microbiology, September. Chicago, IL, 2003:Abstract: M-1027, page 462.
46. Ansong R, van der Bloom R, Rath P. Detection of *Aspergillus* antigen in food and antibiotics. *J Clin Microbiol* 1997; 40:353-357.
47. Sulahian A, Touratier S, Leblanc T, Rouselot P, Derouin F, Ribaut P. False positive aspergillus antigenemia related to concomitant administration of tazocillin, 43rd ICAAC Abstracts, American Society for Microbiology, September, Chicago, IL, 2003.
48. Blijlevens N, Donnelly J, Meis J, Verweij P, de Pauw B. *Aspergillus* galactomannan antigen levels in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients given total parenteral nutrition. *Transpl Infect Dis* 2002; 4:64-5.
49. Ruhnke M, Scheer C, Otto K, Maschmeyer G, Schwartz S. Value of galactomannan Detection (*Platelia Aspergillus*) from bronchoalveolar lavage samples for diagnosis of aspergillosis, 43rd ICAAC Abstracts, American Society for Microbiology, September, Chicago, IL, 2003.
50. Becker M, Lugtenburg E, Cornelissen J, Van Der Schee C, Hoogsteden H, De Marie S. Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage fluid and serum in haematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br J Haematol* 2003; 121:448-57.
51. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, 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.
52. Skladny H, Buchheidt D, Baust C, et al. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3865-3871.
53. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36:1169-1175.
54. Einsele H, Hebart H, Roller G, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35:1353-1360.
55. Walsh TJ, Francesconi A, Kasai M, Chanock SJ. PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33:3216-3220.
56. Bretagne S, Costa J-M, Marmorat-Khoung A, et al. Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33:1164-1168.
57. Melchers WJ, Verweij PE, van den Hurk P, et al. General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32:1710-1717.
58. Hebart H, Loffler J, Meisner C, et al. Early detection of *Aspergillus* infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. *J Infect Dis* 2000; 181:1713-1719.

59. Lass-Flörl C, Aigner J, Gunsilius E, et al. Screening for *Aspergillus* spp. using polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with haematological malignancies. *Brit J Haematol* 2001; 113:180-184.
60. Raad I, Hanan H, Huaringa A, Sumoza D, Hachem R, Albitar M. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis using polymerase chain reaction-based detection of *Aspergillus* in BAL. *Chest* 2002; 121:1171-1176.
61. 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.
62. Pham A, Tarrand JJ, May Gea. Diagnosis of invasive mold infections by real-time quantitative PCR. *Am J Clin Pathol* 2003; 119:38-44.
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. Odabasi Z, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, McGinnis MR, Ostrosky-Zeichner L. Differences in beta glucan (BG) levels in culture supernatants of a variety of fungi., Program and abstracts of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; September 14-17, 2003, Chicago, IL, 2003.
65. Ohki M, Nakamura T, Morita T, Iwanaga S. A new endotoxin sensitive factor associated with hemolymph coagulation system of horseshoe crab (*Limulidae*). *FEBS Lett* 1980; 120:217-20.
66. Morita T, Tanaka S, Nakamura T, Iwanaga S. A new (1-3)- $\beta$ -D-glucan-mediated coagulation pathway found in *limulus* amoebocytes. *FEBS Lett* 1981; 129:318-321.
67. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, Tanaka K, Hara K. (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan in culture fluid of fungi activates factor G, a *limulus* coagulation factor. *J Clin Lab Anal* 1995; 9:334-9.
68. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, et al. Plasma (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 1995; 345:17-20.
69. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH. Detection of (1 $\rightarrow$ 3)-b-D-Glucan (BG) in the serum of leukemia patients (pts) with invasive fungal infections (IFI), Program and Abstracts of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; September 27-30, 2002, San Diego, CA, 2002.
70. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. (1-3)- $\beta$ -D-Glucan (BG) for the Diagnosis of invasive fungal infections (IFI) in leukemia patients on antifungal Prophylaxis, Program and Abstracts of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; September 14-17, 2003; Chicago, Illinois., 2003.
71. Kato A, Takita T, Furuhashi M, Takahashi T, Maruyama Y, Hishida A. Elevation of blood (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan concentrations in hemodialysis patients. *Nephron* 2001; 89:15-9.
72. Ikemura K, Ikegami K, Shimazu T, Yoshioka T, Sugimoto T. False-positive result in *Limulus* test caused by *Limulus* amoebocyte lysate-reactive material in immunoglobulin products. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1965-8.
73. Jojima H. Early diagnosis and treatment of pulmonary opportunistic infection by using polymerase chain reaction and beta-glucan in patients with hematological neoplasms. *Kurume Med J* 2001; 48: 117-27.
74. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, et al. Plasma (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33: 3115-3118.