

Evaluation of Galactomannan Assay in Serum for Detection of Invasive Aspergillosis in Patients with Hematologic Malignancies and Bone Marrow Transplant Recipients

Mojtaba Nabili¹,
Tahereh Shokohi²,
Ghasem Jan Babaei²,
Kamran Ali Moghaddam³,
Ardeshir Ghavamzadeh⁴

¹ PhD Student of Medical Mycology & Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Social Security Organization of Golestan Province, Sari, Iran

² Department of Medical Mycology & Parasitology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Department of Internal Medical, Molecular Cell-Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Department of Internal Medical, Hematology-Oncology Research Center and Stem Cell Transplantation (HORCSCT; formerly HORCBMT), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received December 24, 2011 ; Accepted February 27, 2012)

Abstract

Background and purpose: Invasive aspergillosis, is a serious fatal disease caused by fungal species of *Aspergillus* in patients with neutropenia, bone marrow transplant recipients, patients with blood disorders, chronic granulomatous disease, recipients of long-term steroids or antibiotics. Galactomannan antigen (GM) is a polysaccharide of *Aspergillus* present in the cell wall of *Aspergillus* spp. which is released during the growth and invasion of fungi to hyphae tissue. The prevalence of invasive aspergillosis is between 1-15% and the mortality rate will increase to more than 90% if diagnosis is delayed.

Materials and methods: A cross-sectional study was carried out within a year to investigate the GM antigen serum in patients with hematologic malignancies in oncology ward of Imam Khomeini Hospital in Sari and recipients of bone marrow transplant in Shariati Hospital, Tehran. Six ml blood was collected from 62 patients and serum stored at -20°C until examination. The GM antigens of serum was obtained through ELISA using Platelia™ *Aspergillus* EIA kit. GM Assays were classified as positive when the optical density ratio was >0.5.

Results: The patients were 40 male and 22 female. The highest mortality rate was seen in patients with ALL (31.2%), AML and non-Hodgkin's lymphoma (25%), and Hodgkin's lymphoma (12.5%). The GM test was found positive in 16 patients (22%) with optical density of >0.5. According to the revised guidelines of EORTC/MSG, 18 patients (29%) suffered from IA of whom 5 cases (28%) were probable and 13 cases (72%) were possible. Sensitivity and specificity of this test was 90% and 61%, respectively.

Conclusion: The ELISA is a valuable diagnostic method to detect *Aspergillus* antigen in the blood, which could be used as a useful and important screening test to identify patients at risk.

Key words: Galactomannan antigen, Invasive aspergillosis, bone marrow transplant recipients, hematologic malignancy

ارزیابی سطح سرمی آنتی ژن گالاکتومانان به منظور تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی و گیرندگان پیوند مغز استخوان

مجتبی نیلی^۱
طاهره شکوهی^۲
قاسم جان بابایی^۳
کامران علی مقدم^۴
اردشیر قوام زاده^۴

چکیده

سابقه و هدف: آسپرژیلوزیس مهاجم بیماری شدید و کشنده قارچی ناشی از گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس در بیماران دچار نوتروپنی، دریافت کنندگان پیوند مغز استخوان، بیماران دچار اختلالات خونی، گرانولوماتوز مزمن، دریافت کنندگان طولانی مدت داروهای استروئیدی و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. آنتی‌ژن گالاکتومانان (GM)، پلی‌ساکاریدی از دیواره سلولی قارچ آسپرژیلوس است که طی رشد و تهاجم به بافت از هایف قارچ آزاد می‌شود. شیوع آسپرژیلوزیس مهاجم بین ۱۵-۱ درصد است و میزان کشندگی آن اگر تشخیص بیماری به تأخیر بیافتد به بیش از ۹۰ درصد می‌رسد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، سطح سرمی آنتی‌ژن گالاکتومانان در بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی بخش انکولوژی بیمارستان امام خمینی ساری و گیرندگان پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تهران در مدت یک سال مورد بررسی قرار گرفت. شش میلی‌لیتر خون از ۶۲ بیمار که دارای شرایط ورود به مطالعه بودند گرفته شد و تا زمان انجام آزمایش در 20°C نگهداری شد. آنتی‌ژن GM موجود در نمونه‌های سرم گرفته شده از بیماران به روش الیزا و با استفاده از کیت *Platelia™ Aspergillus EIA* ارزیابی شد و نمونه‌های دارای مقادیر بیشتر از ۰/۵ به‌عنوان مثبت تلقی شد.

یافته‌ها: از ۶۲ بیمار مورد بررسی ۴۰ بیمار مرد و ۲۲ بیمار زن بودند. بیشترین میزان مرگ و میر به ترتیب در بیماران مبتلا به ALL (۳۱/۲ درصد)، AML و لنفوم غیر هوچکین (۲۵ درصد) و لنفوم هوچکین (۱۲/۵ درصد) رخ داد. تست GM در ۱۶ نمونه (۲۲ درصد) مثبت اعلام شد. بر اساس دستورالعمل اصلاح شده EORTC/MSG، ۱۸ (۲۹ درصد) بیمار از لحاظ ابتلاء به آسپرژیلوس مهاجم به تفکیک به صورت؛ ۵ مورد (۲۸ درصد) محتمل و ۱۳ مورد (۷۲ درصد) ممکن بودند. حساسیت و اختصاصیت آنتی ژن GM به ترتیب ۶۱ درصد و ۹۰ درصد بود.

استنتاج: روش الیزا ابزار تشخیصی مناسبی برای ردیابی آنتی‌ژن آسپرژیلوس در خون می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان یک تست غربالگری در بیماران در معرض خطر برای آسپرژیلوس مهاجم مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌ژن گالاکتومانان، آسپرژیلوزیس مهاجم، گیرندگان پیوند مغز استخوان، بدخیمی خونی

مقدمه

آسپرژیلوزیس مهاجم بیماری شدید و کشنده قارچی ناشی از گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس در بیماران، دچار نوتروپنی، دریافت کنندگان پیوند مغز استخوان، بیماران دچار اختلالات خونی، گرانولوماتوز مزمن،

مؤلف مسئول: طاهره شکوهی - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

۱. دانشجوی دکتری قارچ شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، سازمان تامین اجتماعی استان گلستان

۲. گروه قارچ شناسی و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۳. گروه داخلی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۴. گروه داخلی، مرکز تحقیقات خون و انکولوژی و پیوند مغز استخوان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۰/۱۰/۱۲ تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۸

شرایط وخیم کلینیکی که در این گروه از این بیماران وجود دارد مانع استفاده از این روش تهاجمی می‌گردد. روش‌های تشخیصی دیگر نیز مثل کشت خون، کشت نمونه‌های بافتی، کشت از برونکوآلوئولار لاواژ (BAL) در IA به ندرت مثبت و اغلب منفی می‌شود و ممکن است زمانی کشت جواب دهد که بیماری پیشرفت کرده باشد (۱۸). برای غلبه بر این محدودیت‌ها روش‌های مختلفی برای تشخیص سریع، حساس و اختصاصیت بالا برای IA به وجود آمد که شامل استفاده از روش‌های غیروابسته به کشت بر پایه تعیین آنتی‌ژن‌های آسپرژیلوس مثل آنتی‌ژن گالاکتومانان در نمونه‌های بالینی می‌باشند (۲۰).

آنتی‌ژن گالاکتومانان (GM)^۳، پلی‌ساکارییدی از دیواره سلولی قارچ آسپرژیلوس است که طی رشد و تهاجم به بافت از هایف قارچ آزاد می‌شود. این آنتی‌ژن یک کربوهیدرات محلول در آب است و در نمونه‌های مختلف بالینی همانند، سرم، BAL^۴، ادرار، مایع مغزی نخاعی به وسیله روش الایزای ساندریجی شناسایی می‌شود. البته جهت تعیین این آنتی‌ژن از روش‌های دیگر سرولوژی مثل؛ آزمایش رادیوایمنواسی (RIA)^۵ و لاتکس آگلوتیناسیون (LA)^۶ نیز استفاده می‌شود ولی مطالعات نشان داده‌اند که، این روش‌ها فقط در طی مراحل پیشرفته عفونت در بیشتر بیماران مشکوک به آسپرژیلوس مهاجم مثبت می‌گردد. علاوه بر این، آنتی‌ژن GM در نمونه‌های سرمی در آزمایش الایزا به میزان بیشتر و بسیار زودتر از سایر روش‌های سرولوژی شناسایی می‌شود. مطالعات نشان داده است که تعیین آنتی‌ژن GM یک روش با دقت و صحت بالا بوده قبل از بروز علائم کلینیکی و بسیار سریع‌تر از روش‌های بر پایه کشت مثبت شده و در تشخیص آسپرژیلوس مهاجم کمک‌کننده می‌باشد (۲۱). تعیین آنتی‌ژن GM در خون به مراحل مدیریت و پایش بیماری مثل تعیین سطح

دریافت کنندگان طولانی مدت داروهای استروئیدی و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (۶-۱). در سالیان اخیر وجود آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران بستری در بخش‌های انکولوژی و مراکز پیوند مغز استخوان که بیماران بستری در آن‌ها به دلیل شرایط ویژه در معرض آلودگی می‌باشند بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۷). علی‌رغم پیشرفت‌های حاصل شده در روش‌های تشخیصی، آسپرژیلوزیس مهاجم هنوز به‌عنوان یک بیماری که به خوبی تشخیص داده نمی‌شود شناخته شده تشخیص قطعی آن قبل از مرگ بیمار و قبل از تکثیر فراوان عامل قارچی به سختی صورت می‌گیرد (۳). در سال‌های اخیر عفونت‌های فرصت طلب قارچی به علت پیشرفت‌های رایج پزشکی در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی منجر به افزایش جمعیت‌های این بیماران شده به‌صورت تهاجمی و کشنده ظاهر می‌شوند (۸-۱۰). از این رو مطالعات متعددی در کشورهای مختلف در زمینه تعیین معیارهای تشخیصی، روش‌های تشخیصی، اپیدمیولوژی، مدیریت و درمان آن در جمعیت‌های مختلف صورت گرفته است (۱۱-۱۴). شیوع آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران با وضعیت وخیم در مطالعات مختلف بسیار متفاوت می‌باشد (۱۵-۱۷). شیوع آسپرژیلوزیس مهاجم بین ۱-۱۵ درصد است و میزان کشندگی آن اگر تشخیص بیماری به تأخیر بیفتد به بیش از ۹۰ درصد می‌رسد (۳).

به تأخیر افتادن تشخیص قطعی، عدم درمان مناسب و به موقع و وجود بیماری‌های زمینه‌ای مختلف از دلایل بالا بودن مرگ و میر در این بیماران بوده است (۱۹). روش‌های استاندارد طلایی^۱ برای تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم شامل بررسی‌های هیستوپاتولوژیک و کشت نمونه‌های بافتی است اما این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی هستند. آزمایشات پاتولوژی از نمونه‌های بافتی اغلب در طی بیوپسی از شش‌ها یا بیوپسی شش از طریق برانش^۲ صورت می‌گیرد ولی متأسفانه ترومبوسایتوپنی شدید و

3. Galactomannan
4. Bronchoalveolar Lavage
5. Radio Immune Assay
6. Latex Agglutination

1. Gold standard
2. Transbronchial

آنتی ژن، پاسخ بیمار به درمان‌های ضد قارچی و اصلاح نوع داروهای مصرفی کمک می‌کند. بنابراین با توجه به شیوع بالا و میزان مرگ و میر آسپرژیلوس مهاجم در بیماران بستری در بخش‌های انکولوژی و مراکز پیوند مغز استخوان و اهمیت تشخیص زودرس این بیماری و همچنین به علت بعضی محدودیت‌های روش‌های تشخیص سنتی، لزوم استفاده از روش‌هایی بر پایه غیر متکی به کشت همانند تعیین سطح سرمی آنتی ژن GM ضروری به نظر می‌رسد. لذا این مطالعه با هدف ارزیابی سطح سرمی آنتی ژن گالاکتومانان به منظور تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی و گیرندگان پیوند مغز استخوان صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

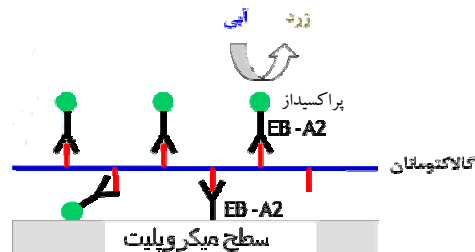
در این مطالعه توصیفی-مقطعی، سطح سرمی آنتی ژن گالاکتومانان در بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی بخش انکولوژی بیمارستان امام خمینی ساری و گیرندگان پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تهران انجام پذیرفت. نمونه‌گیری از خون پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی از بیمار و یا همراهان با نظارت پزشک معالج، خود بیمار و یا همراهان وی انجام گردید. پرسشنامه بیماران به صورت محرمانه تکمیل شد و هیچ‌گونه مداخله اضافی در روند بالینی، تشخیص و درمانی بیمار صورت نگرفت. در این مطالعه بیماران دارای (۱) نوتروپنی ($500\text{mm}^3 <$ به مدت بیشتر از ۱۰ روز) (۲)، تب بیش از ۹۶ ساعت علی‌رغم درمان آنتی بیوتیک‌های وسیع‌الطیف (۳)، تب بالای 38°C و یا کمتر از 36°C و (۴) استفاده طولانی‌مدت از کورتیکواستروئیدها و ایمونوساپرسیوها به مدت ۳ هفته در ۶۰ روز گذشته وارد مطالعه شدند و افراد در حال مصرف آنتی بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مثل پیراسیلین - تازاباکتام^۱، بیماران مبتلا به عفونت‌های ناشی از عوامل بیفیدوباکتریوم، استافیلوکوک، سودوموناس به دلیل واکنش متقاطع با

آنتی ژن GM و ایجاد نتایج مثبت کاذب در آزمایش سرولوژی و همچنین در صورت عدم رضایت بیمار از انجام خون‌گیری از جمعیت در حال مطالعه خارج می‌شدند. تمامی اطلاعات دموگرافیک و بالینی افراد مورد مطالعه شامل: سن، جنس، تاریخ نمونه‌گیری، شرح مختصری از علایم بیمار مثل تب بالای مداوم و یا عود مجدد، علایم نارسایی تنفسی حاد، یافته‌های CT، یافته‌های برونکوسکوپی، علایم عفونت سینوس، علایم عفونت CNS، بررسی میزان سلول‌های خونی مثل تعداد WBC و وجود نوتروپنی، انجام شیمی درمانی و تعداد دوره‌های شیمی درمانی، انجام رادیوتراپی و تعداد دوره‌های رادیوتراپی، نوع بدخیمی، درمان ضد قارچی، نام داروی ضد قارچی، زمان شروع داروی ضد قارچی در فرم اطلاعاتی ثبت شد و نمونه‌گیری از بیماران انجام گرفت. نمونه‌گیری دو بار در هفته شامل ۴ میلی لیتر خون داخل بطری کشت خون BHI بی‌فازیک و ۲ml داخل لوله فاقد ضد انعقاد انجام شد. نمونه‌ها در بسته‌های حاوی یخ و در کمترین زمان ممکن به آزمایشگاه تحقیقاتی قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی انتقال داده شد. در مطالعه حاضر از روش سرولوژیکی تعیین آنتی ژن GM در نمونه سرم همراه با سایر روش‌های تشخیصی دیگر همچون کشت جهت تشخیص آسپرژیلوس مهاجم استفاده شد. در این مرحله آنتی ژن GM موجود در نمونه‌های سرم گرفته شده از بیماران را به روش الیزا و با استفاده از کیت *Platelia™ Aspergillus EIA* شرکت Bio-Rad کشور فرانسه با Lot No؛ ۶۲۷۶۹ در آزمایشگاه تحقیقاتی قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران اندازه‌گیری شد. در تست تعیین GM از میکروپلیت‌هایی که به وسیله آنتی‌بادی ضد آنتی ژن GM که در ته چاهک‌ها پوشیده شده استفاده گردید سپس نمونه سرم و آنتی‌بادی تعیین‌کننده را اضافه و در 37°C به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه کرده سپس پلیت‌ها را شستشو و رنگ‌زا اضافه و ۳۰ دقیقه در 30°C در

1. tazobactam

بیمارستان‌های مورد مطالعه از نظر شرایط و معیارهای ورود به مطالعه بررسی شدند. از این بین، تعداد ۷۰ بیمار دارای معیارهای ورود، ۸ بیمار به علت عدم رضایت همراهان بیمار از مطالعه خارج و در نهایت ۶۲ بیمار بررسی شدند. از این تعداد بیمار ۴۰ بیمار (۶۴/۵ درصد) مرد و ۲۲ بیمار (۳۵/۵ درصد) زن بودند. حداقل سن بیماران ۲ سال و حداکثر ۷۴ سال بود. میانگین سنی بیماران مورد مطالعه ۳۲/۱۷ سال بود. میزان مرگ و میر در بیماران مورد مطالعه ۳۳/۹ درصد بود که از ۶۲ بیمار مشکوک به آسپرژیلوزیس مهاجم؛ ۲۱ بیمار فوت کردند. بیشترین میزان مرگ و میر به ترتیب در بیماران مبتلا به ALL^۶ (۳۱/۲ درصد)، AML^۷، لنفوم غیرهوچکین (۲۵ درصد) و لنفوم هوچکین (۱۲/۵ درصد) بود. بیشترین بدخیمی در افراد مورد بررسی به ترتیب ALL با فراوانی ۱۹ (۳۰/۶ درصد)، AML با فراوانی ۱۴ (۲۲/۶ درصد)، لنفوم هوچکین با فراوانی ۱۱ (۱۷/۷ درصد) بود. در بررسی‌های به عمل آمده از علایم و نشانه‌های بالینی بیماران مورد مطالعه، بیشترین علایم به ترتیب مربوط به تب بالا و مداوم (۸۳/۹ درصد)، بی حالی و ضعف (۶۲/۹ درصد)، سرفه (۲۲/۶ درصد) و تب بالا و پایین‌رونده (۱۴/۵ درصد) بود. در این مطالعه ۵۶ بیمار (۹۰/۳ درصد) دارای نوتروپنی بودند. بیشتر بیماران ۶۰ نفر (۹۶/۸ درصد) تحت شیمی درمانی قرار داشتند. در بررسی‌های به عمل آمده در سی تی اسکن از سینوس ۵ بیمار (۸/۱ درصد) افزایش ضخامت موکوزال سینوس ماگزیلاری، اتموئیدال، اسفنوئیدال و درگیری دوطرفه مشاهده شد. در سی تی اسکن مغز یک مورد آتروفی مغز و یک مورد ضخامت هیپوفیز مشاهده شد. در سی تی اسکن ریه سه مورد (۴/۸ درصد) انفیلتراسیون منتشر دیده شد. هر چند که علایم اختصاصی سی تی اسکن آسپرژیلوس مهاجم در بیماران نوتروپنیک شامل Halo sign و

مکان تاریکی انکوبه می‌کنیم. سپس واکنش با H₂SO₄ متوقف شده در صورت وجود آنتی‌ژن رنگ زرد ایجاد می‌شود (برطبق دستور پرورشور کیت (Platelia™ *Aspergillus* EIA) (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: شمای کلی تست تعیین گالاکتومانان در نمونه سرم یا نمونه شت و شوی برانش

به منظور تشخیص بیماری‌های تهاجمی در افراد در معرض خطر و همچنین طراحی مطالعات کارآزمایی بالینی جهت بررسی داروهای جدید و راهکارهای مدیریتی، سازمان اروپایی درمان و تحقیقات سرطان^۱ (EORTC) و موسسه بین‌المللی آلرژی و گروه مطالعه‌ای بیماری قارچی^۲ (MSG) یک تعریف استاندارد جهت عفونت‌های قارچی تهاجمی برای تحقیقات اپیدمیولوژیکی و کلینیکی وضع نموده است. در این تعریف افراد مشکوک به آسپرژیلوس مهاجم بر اساس عوامل میزبان، معیارهای کلینیکی و قارچ‌شناسی در سه دسته قطعی^۳، محتمل^۴، ممکن^۵ دسته‌بندی شدند (۲۲).

تجزیه و تحلیل اطلاعات از نمونه‌های بیماران مورد مطالعه در جداول و فرم‌های اطلاعاتی ثبت گردید و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) و graph pad (نسخه ۴) مورد تجزیه و تحلیل آماری شد.

یافته‌ها

درمطالعه حاضر تمامی بیماران بستری در بخش‌های

6. Acute Lymphoblastic Leukemia
7. Acute Myeloid Leukemia

1. European Organization for Research and Treatment of Cancer
2. Mycosis Study Group
3. Proven
4. Probable
5. Possible

در مطالعه حاضر با توجه به بررسی‌های بالینی و آزمایشگاهی صورت گرفته و تجزیه و تحلیل نتایج علایم بالینی بیماران (مثل یافته‌های رادیوگرافی، سی‌تی‌اسکن و تظاهرات و علایم کلینیکی)، عوامل میزان، زمینه‌ای و آزمایشات قارچ شناسی (مانند کشت و اندازه‌گیری آنتی ژن GM) بر اساس دستورالعمل اصلاح شده EORTC/MSG، ۱۸ (۲۹ درصد) بیمار از لحاظ ابتلاء به آسپرژیلوس مهاجم به تفکیک به صورت؛ ۵ مورد (۲۸ درصد) محتمل و ۱۳ مورد (۷۲ درصد) ممکن بودند (جدول شماره ۲). در مطالعه حاضر میزان مرگ و میر در بین افراد محتمل و ممکن آسپرژیلوس مهاجم ۵۵/۶ درصد بود. از ۱۳ بیماری که تست GM آن‌ها مثبت شده بود ۹ بیمار (۶۹ درصد) فوت کرده بودند.

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی مطلق و نسبی تست تعیین آنتی ژن GM در نمونه‌های سرم در موارد بیماران مشکوک به آسپرژیلوس مهاجم در بین مبتلایان به بدخیمی‌های خونی بخش انکولوژی بیمارستان امام خمینی ساری و گیرندگان پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعی تهران سال ۱۳۸۹

نوبت نمونه تست تعیین آنتی ژن GM	نوبت اول	نوبت دوم	مجموع
تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
کاتاف بیشتر از ۰/۵	۱۳ (۲۶)	۳ (۱۳/۶)	۱۶ (۲۲)

جدول شماره ۲: اطلاعات مربوط به ۱۸ بیمار محتمل و ممکن آسپرژیلوس مهاجم در بین مبتلایان به بدخیمی‌های خونی بخش انکولوژی بیمارستان امام خمینی ساری و گیرندگان پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعی تهران سال ۱۳۸۹

ردیف	سن و جنس	نارسایی تنفسی	علامت رادیوگرافی و CT	بیماری زمینه‌ای	نوتروپنی	IA طبقه بندی	عاقبت بیمار
۱	۲/مرد	+	انفیلتراسیون ریه، افزایش ضخامت سینوس ماگزینار، آتروفی مغز	HLH	-	Probable	فوت
۲	۲۴/مرد	-	-	ALL	+	Possible	زنده
۳	۲۲/زن	+	-	ALL	+	Probable	فوت
۴	۴۲/زن	-	-	ALL	+	Possible	فوت
۵	۵۶/مرد	-	-	لنفوم	+	Possible	فوت
۶	۷۴/مرد	-	-	CLL	-	Probable	زنده
۷	۱۸/مرد	+	انفیلتراسیون منتشر در هر دو لوب	ALL	+	Probable	فوت
۸	۵۰/مرد	-	-	AML	+	Possible	فوت
۹	۵۰/زن	+	-	لنفوم هوچکین	+	Probable	فوت
۱۰	۴۷/مرد	-	-	لنفوم هوچکین	+	Possible	فوت
۱۱	۶۰/مرد	-	-	لنفوم	+	Possible	زنده
۱۲	۱۴/مرد	-	-	ALL	+	Possible	زنده
۱۳	۹/زن	-	-	آمی فانکونی	+	Possible	فوت
۱۴	۲۹/زن	+	افزایش ضخامت سینوس ماگزینار و اتمونیدال وی لترال	لنفوم هوچکین	+	Possible	زنده
۱۵	۲۰/مرد	-	افزایش ضخامت سینوس ماگزینار و اسفونیدال	لنفوم هوچکین	+	Possible	زنده
۱۶	۲۴/مرد	-	افزایش ضخامت سینوس ماگزینار	AML	+	Possible	زنده
۱۷	۴۸/مرد	+	-	AML	+	Possible	زنده
۱۸	۶۰/مرد	+	-	لنفوم	+	Possible	فوت

Air crescent است ولی در هیچ‌یک از این بیماران دیده نشد. در بررسی‌های کشت خون در نوبت اول ۹۰/۳ درصد (۵۶ نفر) نتیجه منفی داشتند و در ۱ نفر (۱/۶ درصد) کاندیدا آلیکس و در ۴ نفر (۶/۵ درصد) باکتری مشاهده گردید. باکتری‌ها شامل استافیلوکوک ارئوس (۳ نفر) و انتروباکتر (۱ نفر) بود. در کشت‌های خون نوبت دوم و سوم نتیجه همگی کشت‌ها منفی شد. کشت خون از نظر آسپرژیلوس در ۱۰۰ درصد بیماران منفی بود.

اندازه‌گیری آنتی ژن گالاکتومانان در سرم:

در مطالعه حاضر، بررسی آنتی ژن GM به وسیله تست الایزای ساندویچی در نمونه‌های سرم در ۷۲ نمونه (۵۰ نمونه نوبت اول و ۲۲ نمونه نوبت دوم) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مثبت روش آنتی ژن GM با کاتاف ۰/۵ در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. در مطالعه حاضر ۱۳ بیمار، تست GM آن‌ها مثبت شد که در ۳ بیمار (۶ درصد) تست تعیین آنتی ژن GM با کاتاف بیشتر از ۰/۵ در هر دو نوبت مثبت بود که در کل ۱۶ نمونه (۲۲ درصد) با کاتاف بیشتر از ۰/۵ مثبت اعلام شد. براساس اطلاعات موجود و بررسی‌های به عمل آمده حساسیت و اختصاصیت این تست به ترتیب ۶۱ درصد و ۹۰ درصد بود.

بحث

درمان‌های تجربی در گروه‌های در معرض خطر دارای معایب زیادی از جمله سمیت، افزایش هزینه بیمار به دلیل درمان غیر مؤثر می‌باشد (۲۴، ۲۳). از طرف دیگر برای درمان‌های انحصاری شناسایی بیماران در معرض خطر^۱ ضرورت دارد بنابراین انجام آزمایشات حساس و سریع مورد نیاز است. این مطالعه با هدف شناسایی آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران بدخیمی خونی و گیرندگان پیوند مغز استخوان باروش تشخیصی ELISA انجام شد.

در مطالعه حاضر میزان و شیوع آسپرژیلوزیس مهاجم در ۶۲ بیمار مبتلا به بدخیمی خونی و گیرندگان پیوند مغز استخوان مورد مطالعه با روش تشخیصی الایزا، ۲۲ درصد بوده است که نشان دهنده شیوع بالای این بیماری در این گروه‌های در معرض خطر می‌باشد. از آنجایی که بیمارستان شریعتی تهران و بیمارستان امام خمینی ساری دو مرکز ارجاعی مهم برای این گروه‌های در معرض خطر می‌باشد این میزان می‌تواند منعکس کننده بالا بودن شیوع این بیماری در ایران در این افراد باشد. مطالعات مختلف شیوع آسپرژیلوزیس مهاجم این بیماری را از ۱۵-۱ درصد گزارش کردند (۳). اما برخی شیوع را در اتوپسی بیماران مبتلا لوسمی حاد ۴۱ درصد گزارش کردند (۲۸، ۲۷). برخی دیگر شیوع را ۷ درصد گزارش کردند (۲۶). در مطالعه حاضر شیوع محتمل و ممکن آسپرژیلوزیس مهاجم از بین ۳۳ بیمار مبتلا به لوسمی حاد ۲۱ درصد (۷ بیمار) گزارش شد. بعضی از مطالعات میزان مرگ و میر را ۶۰ درصد گزارش کرده، متذکر شده‌اند که با تعویق درمان میزان مرگ و میر افزایش می‌یابد (۳). در مطالعه Shohan و همکاران میزان مرگ و میر ۹۵ درصد گزارش شده است (۲۹). در مطالعه بدیعی و همکاران از ۱۴ بیماری که توسط روش مولکولی PCR-ELISA نتایج مثبتی برای آسپرژیلوزیس داشتند ۵ بیمار علی‌رغم درمان ضد قارچی

(۳۵/۵ درصد) فوت کردند (۳۰). میزان مرگ و میر ناشی از آسپرژیلوزیس مهاجم در گیرندگان پیوند بیش از ۹۰ درصد می‌باشد و عامل ۱۵-۱۰ درصد از تمامی مرگ و میرهای گیرندگان پیوند در سال اول، آسپرژیلوزیس مهاجم می‌باشد (۳۱). در مطالعه حاضر میزان مرگ و میر ناشی از آسپرژیلوزیس مهاجم در گیرندگان پیوند مغز استخوان ۴۵ درصد بود. اختلافات موجود در میزان شیوع در گزارشات مختلف می‌تواند ناشی از عوامل و مشکلات خاصی همانند استفاده از روش‌های تشخیصی مختلف مانند روش سنتی (کشت خون)، مولکولی و تعیین آنتی ژن گالاکتومانان، عدم انجام بیوپسی به علت خطر آفرین بودن ناشی از ترومبوسیتوپنی این روش در بیمارانی که شرایط بحرانی دارند و عدم انجام اتوپسی می‌باشد. متأسفانه در این مطالعه با توجه به عدم امکان انجام روش بیوپسی و اتوپسی پس از مرگ از بیماران مشکوک به آسپرژیلوزیس مهاجم جهت بررسی‌های پاتولوژی و تأیید قطعی آن، هیچ مورد قطعی آسپرژیلوزیس مهاجم گزارش نگردید.

در مطالعه حاضر بیشترین میزان بیشترین میزان مرگ و میر در بیماران به ترتیب ALL (۳۰/۶ درصد)، AML (۲۲/۶ درصد) و لنفوم هوچکین (۱۷/۷ درصد) بود. در مطالعه بدیعی و همکاران در بین ۱۹۴ بیمار مورد مطالعه از نظر آسپرژیلوزیس مهاجم، ۳۷/۹ درصد بیماران AML، ۱۹/۹ درصد ALL، لنفوم ۱۴/۳ درصد و بقیه بیماران بیماری‌های زمینه‌ای آنمی آپلاستیک، پان سیتوپنی، لوسمی میلوئیدی مزمن داشتند (۳۰). در مطالعه Ramirez و همکاران بیشترین میزان مرگ و میر آسپرژیلوزیس مهاجم در بین بیماران با بیماری زمینه‌ای لوسمی ۴۷ درصد، لنفوم ۲۹ درصد، میلوما ۲۲ درصد، آپلازی ۱۰ درصد گزارش کردند. در این مطالعه ۴۶ درصد این بیماران دارای نوتروپنی بودند (۳۲). در مطالعات Hebart از ۸۴ بیمار مورد مطالعه از نظر آسپرژیلوزیس مهاجم بیماری‌های زمینه‌ای به ترتیب

1. High Risk

شامل لوسمی حاد (۳۹ بیمار)، لوسمی میلوئیدی مزمن (۲۵ نفر) لنفوم (۹ نفر)، سندرم میلودیسیپلاستیک (۶ نفر)، مولتیپل میلوما (۲ نفر)، آنمی آپلاستیک (۲ نفر) و تالاسمی (۱ نفر) بودند (۳۳). امروزه در بسیاری از مطالعات و مراکز از روش‌های تشخیصی سریع مثل تعیین آنتی ژن GM به خصوص در نمونه‌های BAL و سرم استفاده می‌شود که در تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم بسیار کمک کننده می‌باشد. در یک مطالعه آینده‌نگر صورت گرفته در بیماران نوتروپنیک مبتلا به آسپرژیلوزیس مهاجم نشان داده شد که حساسیت تست تعیین آنتی ژن GM در نمونه سرم معادل ۹۰ درصد می‌باشد (۳۴). در مطالعه White و همکاران که بر روی ۱۱۶ بیمار مشکوک به آسپرژیلوزیس مهاجم تست GM را انجام داده بودند حساسیت این تست ۷۶/۷ درصد نشان داده شد (۳۵). به کارگیری نمونه BAL در بیماران آسپرژیلوزیس مهاجم به خصوص در بیمارانی که نوتروپنیک نیستند جهت تشخیص بسیار مفید می‌باشد، زیرا سلول‌های نوتروفیل موجود در جریان خون با اتصال به رسپتور مانوز آنتی ژن‌های GM این آنتی ژن‌ها را پاک‌سازی می‌کنند و سطح این آنتی ژن در سرم کاهش یافته در نهایت حساسیت تست تعیین آنتی ژن GM در نمونه سرم پایین می‌آید. از این رو توصیه شده است که در این بیماران تست تعیین آنتی ژن‌های GM بر روی ریه که اولین ناحیه ورود کونیدی آسپرژیلوس بوده در صورت ژرمیناسیون و مهاجم به بافت این ناحیه آنتی ژن GM در مایعات درون ریه آزاد می‌شود؛ متمرکز شود (۳۶). در مطالعه هدایتی و همکاران که بر روی نمونه‌های BAL جهت تشخیص آسپرژیلوزیس مهاجم در بیماران بستری ICU انجام شد، ۴ مورد (۳۰/۸ درصد) ممکن و ۹ مورد (۶۹/۲ درصد) محتمل گزارش گردید (۴۰). در مطالعه دیگری از همین محققین حساسیت و اختصاصیت تست تعیین آنتی ژن GM با کاتاف بیشتر از ۰/۵ در نمونه‌های BAL به ترتیب ۹۲ درصد و ۶۶ درصد منتشر شد (۴۱). اگرچه تست GM

حساسیت و اختصاصیت بالایی را در این مطالعه نسبت به PCR نشان داد اما این تست قادر به شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس نیست و همان‌طور که می‌دانیم امروزه بعضی از گونه‌های آسپرژیلوس نسبت به داروهای ضد قارچی مقاومت‌هایی را از خود نشان داده‌اند. بنابراین استفاده از تست‌هایی نظیر Real-Time PCR/FRET که امکان و توانایی شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس را دارد با ارزش می‌باشد. دلایل مختلفی برای این مسأله بیان شده است در مطالعه Sanguinetti و همکاران که بر روی ۲۴ نمونه BAL تهیه شده از بیماران قطعی و محتمل روش‌های Real Time PCR و GM با هم مقایسه شد که ۱۰۰ درصد نمونه‌ها با تست GM مثبت بود در حالی که ۹۰ درصد نمونه‌ها با تست Real Time PCR مثبت شده بود یعنی ۲ بیمار علی‌رغم مثبت شدن GM تست Real Time PCR آن‌ها منفی شده بود. در بررسی‌های به عمل آمده مشخص شد که نتیجه PCR منفی ممکن است به دلیل نتیجه عفونت بیماران با دیگر گونه‌هایی باشد که در آن مطالعه از پرایمر و پروب‌های اختصاصی آنان استفاده نشده بود. دلیل دیگر این که مثبت شدن ELISA ممکن است در نتیجه وجود دیگر قارچ‌های رشته‌ای نظیر گونه‌های پنی‌سیلیوم باشد که ایجاد واکنش متقاطع در آزمایش GM می‌کند (۳۹-۳۷). در مطالعه حاضر ۸۵ درصد بیمارانی که آنتی ژن GM آن‌ها مثبت شده بود داروی آمفوتریسین B مصرف کرده بودند که این نشان‌دهنده این است که داروی آمفوتریسین بر روی این تست تأثیر چندانی نداشته علی‌رغم مصرف دارو باز هم تست مثبت شده است. در همین مطالعه تمامی بیمارانی که فوت کرده آزمایش GM آن‌ها مثبت شده بود نیز همگی داروی آمفوتریسین B مصرف کرده بودند اما به علت این که احتمالاً تشخیص به موقع نبوده دارو دیگر اثری نداشته است. روش الیزا ابزار تشخیصی مناسبی برای ردیابی آنتی ژن آسپرژیلوس در خون می‌باشد اما امکان و توانایی شناسایی گونه‌های مختلف

نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از بیماران و پرسنل صدوق هر دو مرکز به خصوص سرکارخانم عذرا مهدوی سرپرستار و سرکارخانم رشیدی پرستار بخش انکولوژی بیمارستان امام خمینی ساری که در اجرای این تحقیق با صبر و حوصله ما را یاری کردند اعلام می‌دارند. این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد قارچ‌شناسی آقای مجتبی نیلی می‌باشد.

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۶۱-۸۸ است که منابع مالی آن به طور مشترک توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و مرکز تحقیقات خون و انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تامین شده است.

آسپرژیلوس را ندارد بنابراین تست GM همراه با روش Real Time PCR/FRET که روش بسیار مناسبی برای تشخیص گونه‌های آسپرژیلوس در بیماران با بدخیمی‌های خونی و گیرندگان پیوند مغز استخوان است در غربالگری بیماران در معرض خطر متقارن با یکدیگر برای تأیید تشخیص IA بسیار مناسب می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله مراتب قدردانی و سپاس خود را از همکاری صمیمانه و حمایت‌های مالی معاونت محترم تحقیقات و فناوری و پرسنل مسئولیت‌پذیر دانشگاه علوم پزشکی مازندران و مرکز تحقیقات خون و انکولوژی و پیوند مغز استخوان، بیمارستان شریعتی تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران ابراز می‌داریم.

References

- Vandewoude KH, Vogelaers D, Blot SI. Aspergillosis in the ICU- The new 21st century problem? *Med Mycol* 2006, 44(Supple): S71-S76.
- Lewis M, Kallenbach J, Ruff P, Zaltzman M, Abramowitz J, Zwi S. Invasive pulmonary aspergillosis complicating influenza A pneumonia in a previously healthy patient. *Chest* 1985; 87(5): 691-693.
- Stevens DA, Kan VL, Judson MA, Morrison VA, Dummer S, Denning DW, et al. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2000; 30(4): 696-709.
- Vandewoude KH, Blot SI, Depuydt P, Benoit D, Temmerman W, Colardyn F, et al. Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. *Crit Care* 2006; 10(1): R31.
- Verweij PE, Denning DW. The challenge of invasive aspergillosis: increasing numbers in diverse patient groups. *Int J Infect Dis* 1997; 2: 61-63.
- Patterson TF. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet* 2005; 366(9490): 1013-1025.
- Wingard JR, Anaissie EJ. *Fungal Infections in the Immunocompromised Patient*. 1st ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group; 2005. p. iii-v.
- Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, et al. Use of Real-Time PCR on Blood Samples for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2001; 33(9): 1504-1512.
- Joseph Wheat L, Walsh T. Diagnosis of Invasive Aspergillosis by Galactomannan Antigenemia Detection using an enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27(4): 245-251.

10. Rello J, Esandi ME, Mariscal D, Gallego M, Domingo C, Valles J. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: report of eight cases and review. *Clin Infect Dis* 1998; 26(6): 1473-1475.
11. Meersseman W, Lagrou K, Johan M, Van Wijngaerden E. Invasive Aspergillosis in the Intensive Care Unit Aspergillosis in the ICU. *Clin Infect Dis* 2007; 45(2): 205-215.
12. Ampel NM. Diagnosing Invasive Aspergillosis in ICU Patients. Published in *Journal Watch Infectious Diseases* January 16, 2008. Available: http://www.jwath.org/cgi/collectiomArchive/editors_pick_hiv_aids. Accessed June 5, 2011.
13. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170(6): 621-625.
14. 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. *J Infect* 1996; 33(1): 23-32.
15. Esteban A, Fernández-Segoviano P. Is autopsy dead in the ICU? *Intensive Care Med* 2003; 29(4): 522-525.
16. Ascioglu S, Rex JH, de Paw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, 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(1): 7-14.
17. Segal BH, Walsh TJ. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(7): 707-717.
18. Wheat LJ. Approach to the diagnosis of invasive aspergillosis and candidiasis. *Clin Chest Med* 2009; 30(2): 367-377.
19. Vallés J, Mesalles E, Mariscal D, del Mar Fernández M, Peña R, et al. A 7-year study of severe hospital-acquired pneumonia requiring ICU admission. *Intensive Care Med* 2003; 29(11): 1981-1988.
20. Bulpa PA, Dive AM, Garrino MG, Delos MA, Gonzalez MR, Evrard PA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease patients with invasive pulmonary aspergillosis: benefits of Intensive care? *Intensive Care Med* 2001; 27(1): 59-67.
21. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, 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(1): 7-14.
22. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Denning, Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; 46(12): 1813-1821.
23. McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis* 2001; 33(5): 641-647.
24. O'Shaughnessy EM, Forrest GN, Walsh TJ. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: recent advances

- and new challenges. *Curr Treat Options Infect Dis* 2003; 5: 507-515.
25. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(2): 310-350.
26. Gerson SL, Talbot GH, Hurwitz S, Strom BL, Lusk EJ, Cassileth PA. Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1984; 100(3): 345-351.
27. Duong M, Ouellet N, Simard M, Bergeron Y, Olivier M, Bergeron MG. Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed mice. *J Infect Dis* 1998; 178(5): 1472-1482.
28. Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1997; 175(6): 1459-1466.
29. Shoham S, Hinestrosa F, Moore J Jr, O'Donnell S, Ruiz M, Light J. Invasive filamentous fungal infections associated with renal transplant tourism. *Transpl Infect Dis* 2010; 12(4): 371-374.
30. Badiee P, Kordbacheh P, Alborzi A, Ramzi M, Shakiba E. Molecular detection of invasive aspergillosis in hematologic malignancies. *Infection* 2008; 36(6): 580-584.
31. Paterson DL, Singh N. Invasive aspergillosis in transplant recipients. *Medicine (Baltimore)* 1999; 78(2): 123-138.
32. Ramírez M, Castro C, Palomares JC, Torres MJ, Aller AI, Ruiz M, et al. Molecular detection and identification of *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Mycoses* 2009; 52(2): 129-134.
33. Hebart H, Löffler J, Meisner C, Serey F, Schmidt D, Böhme A, et al. Early detection of aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. *J Infect Dis* 2000; 181(5): 1713-1719.
34. Hartemink KJ, Paul MA, Spijkstra JJ, Girbes AR, Polderman KH. Immunoparalysis as a cause for invasive aspergillosis? *Intensive Care Med* 2003; 29(11): 2068-2071.
35. White PL, Linton CJ, Perry MD, Johnson EM, Barnes RA. The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. *Clin Infect Dis* 2006; 42(4): 479-486.
36. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177(1): 27-34.
37. Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, Pagliari G, Fianchi L, Mele 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(8): 3922-3925.
38. Costa C, Costa JM, Desterke Ch, Botterel F, Cordonnier C, Bretagne S. Real-Time PCR Coupled with Automated DNA Extraction and Detection of Galactomannan Antigen in Serum by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40(6): 2224-2227.

39. Verweij PE, Weemaes CM, Curfs JH, Bretagne S, Meis JF. Failure to detect circulating Aspergillus markers in a patient with chronic granulomatous disease and invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38(10): 3900-3901.
40. Hedayati MT, Khodavaisy S, Alialy M, Mahdavi Omran S, Habibi MR. Invasive aspergillosis in intensive care unit patients from Iran. *Proceedings of the 5th Advances Against Aspergillosis conference*; 2012 Jan 26-28; Istanbul, Turkey.
41. Khodavaisy S, Hedayati MT, Alialy M, Habibi MR. Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid in intensive care unit patients at risk for invasive aspergillosis. *Proceedings of the 5th Advances Against Aspergillosis conference*; 2012 Jan 26-28; Istanbul, Turkey.