

# Diagnostik invasiver *Aspergillus*- und *Mucor*-Infektionen

Autoren:

Prof. Dr. med. Holger Rohde

UKE Hamburg

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Dr. rer. nat. Kora Huber

Mikrobiologin

Consultant Infektiologie

## Hintergrund

Invasive Schimmelpilzinfektionen (Invasive Mould Infections, IMIs) wie die invasive Aspergillose oder die invasive Mukormykose, die durch die Gattung *Aspergillus* bzw. durch Vertreter der Ordnung Mucorales (u. a. Gattung *Mucor*) verursacht werden, sind eine Haupttodesursache bei Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen oder einer langandauernden immunsuppressiven Therapie (Boch et al. 2016, Lamoth und Calandra 2017, Patterson und Donnelly 2019). Sie sind mit hoher Morbidität assoziiert, verursachen lebensbedrohliche Kom-

pplikationen und sind schwer zu verhindern, schwer zu diagnostizieren und schwer zu behandeln (Dignani 2014, Patterson und Donnelly 2019). Ihre Häufigkeit hat in den letzten zwei Jahrzehnten zugenommen. Ursache dafür ist u. a. die Zunahme von Patienten mit expliziten Risikofaktoren für die Entwicklung invasiver Schimmelpilzinfektionen (Abb. 1) (Bassetti und Bouza 2017, Chitasombat und Kontoyiannis 2015, Lass-Flörl und Cuenca-Estrella 2017).

- Mehr Empfänger von Knochenmark- und Organtransplantaten
- Weiterentwicklung der medizinischen Behandlungsoptionen mit dem vermehrten Einsatz invasiver intensivmedizinischer Maßnahmen
- Verlängerte Aufenthaltsdauer auf Intensivstationen
- Fortschritte bei der Behandlung von Krebserkrankungen
- Komplikation bei Patienten mit HIV/Aids

**Abbildung 1:** Ursachen für einen Anstieg von Risikopopulationen mit Immunsuppression (Bassetti und Bouza 2017, Chitasombat und Kontoyiannis 2015, Lass-Flörl und Cuenca-Estrella 2017).

Typischerweise werden invasive Schimmelpilzinfektionen durch *Aspergillus fumigatus* und andere *Aspergillus* spp. hervorgerufen. In den letzten Jahren ist die Inzidenz invasiver pulmonaler Aspergillosen (IPA) angestiegen (Bongomin et al., 2017 sagen mehr als 300 000 Fälle pro Jahr weltweit) (Moura et al. 2018). Die Letalität einer IPA liegt zwischen 35 % und 80 %, wobei die hohe Letalität vor allem der späten Diagnose und der damit einhergehenden verzögerten und/oder inadäquaten Therapie zuzuordnen ist (Moura et al. 2018). Die Verzögerung der Diagnosestellung ist Folge von häufig unspezifischen Zeichen und Symptomen, der vergleichsweise niedrigen Sensitivität und Spezifität verfügbarer diagnostischer Testverfahren und des verzögerten mikrobiologischen Nachweises mittels Kultur. Konventionelle Verfahren erlauben in der Regel eine sichere Identifizierung bis auf Genus-Ebene, die Spezies-Identifizierung kann allerdings problematisch sein. Vor diesem Hintergrund sind die Entwicklung und die Standardisierung schnellerer und präziserer Nachweismethoden von besonderer Bedeutung (Moura et al. 2018; Bongomin et al. 2017).

*Mucor* spp., *Rhizopus* spp. und *Lichtheimia* spp. (die Erreger der Mukormykose) sind für etwa 5–15 % der invasiven Schimmelpilzinfektionen verantwortlich (Lamoth und Calandra 2017). Aufgrund der schwierigen Diagnostik wird jedoch von einer höheren Dunkelziffer an Infektionen und Koinfektionen durch Mucorales ausgegangen (Lewis et al. 2013). Es wurden Untersuchungsmethoden für den Mucorales-Nachweis entwickelt, die aber nur eingeschränkt in Kliniken verfügbar sind (Patterson und Donnelly 2019).

Da die definitive Diagnose invasiver Aspergillosen oder Mukormykosen eine besondere Herausforderung darstellt, werden diese Infektionen oftmals nicht diagnostiziert oder zum Teil vollkommen übersehen. Selbst wenn klinisch eine invasive Schimmelpilzinfekti-

on möglich erscheint, machen die nicht optimalen diagnostischen Methoden zum definitiven Erregernachweis regelhaft empirische Therapien unter Berücksichtigung epidemiologischer Daten, der Anwendung von eingeschränkt spezifischen Antigen-Testen und bildgebenden Verfahren notwendig (Dignani 2014). Um in diesem Kontext die Basis empirischer Therapien zu verbessern, ist die Erhebung präziser epidemiologischer Daten von ausschlaggebender Bedeutung. Diese Informationen können durch Autopsie-Studien gewonnen werden (Dignani 2014).

In solchen Erhebungen zeigte sich:

- Trotz Einbeziehung epidemiologischer Daten liegt die Chance, invasive Pilzinfektionen (IFDs) ante mortem zu diagnostizieren, bei nur 50 % (Dignani 2014).
- Autopsie-Ergebnisse von 1017 Patienten mit hämatologischen Malignomen aus den Jahren 1989–2003 zeigten bei 31 % der Patienten invasive Mykosen, von denen 75 % ante mortem nicht diagnostiziert worden waren (Chamilos et al. 2006).
- Der mediane Anteil der ante mortem diagnostizierten invasiven Pilzinfektionen (IFI) in sechs Autopsie-Studien (1976–2008) ergab 46 ante mortem diagnostizierte IFIs pro 100 IFI-positive Autopsien (Bereich 16–60) (Dignani 2014).
- Eine Analyse von insgesamt 5863 Autopsien bei Intensivpatienten zeigte, dass die nicht erkannte Aspergillose eine der häufigsten nachgewiesenen postmortalen Fehldiagnosen ist (Winters et al. 2012).

Entscheidend für eine adäquate Therapieentscheidung und die weitere Prognose sind zunächst das rechtzeitige Erkennen von Risikofaktoren (Abb. 2) und die Entwicklung einer risikoadaptierten diagnostischen und therapeutischen Strategie.

- Neutropenie (< 500 Neutrophile/mm<sup>3</sup> über > 10 Tage)
- Allogene/autologe Blutstammzelltransplantation
- Kortikosteroide (> 0,3 mg/kg/Tag Prednison-Äquivalent für > 3 Wochen)
- Behandlung mit T-Zell-immunsupprimierenden Medikamenten (z. B. monoklonale Antikörper während der vergangenen 90 Tage)
- Organtransplantation

#### Weitere Faktoren:

Schwere Mukosa-Schäden, Grunderkrankungen (Diabetes mellitus, COPD, schwere alkoholbedingte Leberzirrhose in Zusammenhang mit langem Aufenthalt auf der Intensivstation, Tumorerkrankung, HIV, schwere Influenza)

**Abbildung 2:** Risikofaktoren für IMI wie Aspergillosen und Mukormykosen (Bassetti und Bouza 2017, Crum-Cianflone 2016, De Pauw 2008, Kousha et al. 2011, Lass-Flörl und Cuenca-Estrella 2017, Patterson und Donelli 2019, Ruhnke et al. 2018).

#### **(Zu Risikofaktoren für IMIs siehe auch CME-Modul „Invasive Aspergillus- und Mucor-Infektionen: Herausforderungen und Therapieoptionen“.)**

Während IMIs ursprünglich vor allem bei neutropenischen Krebspatienten und bei Patienten mit hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) nachgewiesen wurden (Mellinghoff et al. 2018), werden sie mittlerweile auch zunehmend bei Patienten nach Organtransplantationen, bei Patienten mit soliden Tumoren, Autoimmunerkrankungen, angeborenen Immunerkrankungen oder immunsuppressiven Therapien einschließlich Anti-Calcieneurin-Inhibitoren, TNF-Inhibitoren oder Immunmodulatoren (Anti-Zytokine, Kinase-Inhibitoren, monoklonale Antikörper) beobachtet. Die klinische Präsentation kann gerade bei diesen Patienten atypisch oder schleichend sein (Lamoth 2016, Lamoth und Calandra 2017). Patienten mit langem Aufenthalt auf der Intensivstation sowie HIV/Aids-Patienten und Langzeitsteroid-Patienten stellen weitere Risikogruppen dar (Abb. 2) (Bassetti und Bouza 2017).

Aufgrund des erweiterten Spektrums an Schimmelpilzregern, einer Vielzahl an klinischen und radiologischen Befunden und eines expandierenden Spektrums an immunkompromittierten Patienten bleibt die IMI-Diagnose eine große Herausforderung und basiert im klinischen Alltag auf einem Bereich an Wahrscheinlichkeiten (nachgewiesen, wahrscheinlich, möglich) (Lamoth und Calandra 2017).

Nach der aktuellen Definition invasiver Pilzkrankungen (IFD) der European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group und dem National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) erfordert die Diagnose einer nachgewiesenen („proven“) IFD den Nachweis mittels Kultur und/oder histologische Nachweise (z. B. positive Kultur von normalerweise sterilen Körperflüssigkeiten und/oder positiver Befund/Nachweis in Gewebebiopsien oder Resektionsproben) (Buchheidt et al. 2016). Eine Übersicht zu diagnostischen Maßnahmen zeigt Tabelle 1 (Moura et al. 2018). Eine frühe Diagnose, aber vor allem ein frühzeitiger Beginn einer wirksamen Therapie ist mit einer verbesserten Überlebensrate assoziiert. Unabhängig vom Vorliegen definitiver diagnostischer Ergebnisse beginnt daher eine antimykotische Therapie üblicherweise empirisch oder präemptiv, basierend auf Risikofaktoren, Fieber oder Thorax-CT (Boch et al. 2016).

#### **(Siehe hierzu auch CME-Modul „Invasive Aspergillus- und Mucor-Infektionen: Herausforderungen und Therapieoptionen“.)**

**Tabelle 1:** Diagnostische Methoden für Schimmelpilzinfektionen am Beispiel der invasiven pulmonalen Aspergillose (IPA) (Moura et al. 2018)

<b>Konventionelle mykologische Untersuchung</b>	Direkte mikroskopische Untersuchung Histologischer Nachweis Kultur
<b>Bildgebende Verfahren</b>	Thorax-Röntgenaufnahme Computertomographie Hochauflösende Computertomographie (HRCT)
<b>Kulturunabhängige Antigen-Teste</b>	Galactomannan-Test (1,3)- $\beta$ -D-Glucan-Test Lateral-flow device (LFD)-Test (Extrazellulärer Glycoprotein-Test)
<b>Molekulare Methoden</b>	PCR

## Diagnostische Maßnahmen bei klinischem Verdacht auf eine invasive Schimmelpilzinfektion

Die meisten Zeichen und Symptome einer invasiven Pilzerkrankung wie Fieber, Husten, Sputum, pleuritische Schmerzen, Hämoptysen und Atemnot sind unspezifisch (Ruhnke et al. 2018). Dies ist ein wesentlicher Grund für eine verzögerte Diagnosestellung und macht es notwendig, bei Patienten mit einem Risiko für eine Schimmelpilzinfektion deren diagnostische Abklärung frühzeitig zu initiieren (Patterson et al. 2016). Die differenzialdiagnostische Aufarbeitung umfasst notwendigerweise die Kombination unterschiedlicher diagnostischer Methoden, vor allem bildgebende Ver-

fahren (CT, MRT) sowie Methoden zum Erregernachweis (Histopathologie, Kultur, Antigen-Teste) (Arvanitis et al. 2014, Lass-Flörl und Cuenca-Estrella 2017).

Die EORTC und MSG haben Standard-Definitionen für die Diagnose invasiver Pilzinfektionen (IFI) erstellt. Nach EORTC/MSG Guidelines gibt es drei Stufen zur IFI-Wahrscheinlichkeit: nachgewiesen/proven, wahrscheinlich/probable, möglich/possible (Abb. 3, Beispiel *Aspergillus* spp.) (Moura et al. 2018).

- Die diagnostisch **nachgewiesene IFI** basiert auf sichtbaren, charakteristischen *Aspergillus* spp.-Hyphen bei der histologischen oder direkt mikroskopischen Untersuchung einer Probe und der Isolierung von *Aspergillus* spp. mittels Kultur von einem sterilen Bereich.
- Die **wahrscheinliche IFI-Diagnose** ist definiert über patientenspezifische Risikofaktoren sowie klinische und mykologische Befunde.
- Die **mögliche IFI-Diagnose** basiert nur auf den klinischen Symptomen und Risikofaktoren des Patienten ohne mykologische Bestätigung.
- Biomarker wie Galactomannan (GM) und  $\beta(1,3)$ -Glucan (BG) sind teilweise in die mikrobiologischen Diagnostikkriterien der EORTC/MSG einbezogen.
- Die EORTC/MSG Definitionen beziehen sich jedoch nach wie vor hauptsächlich auf die konventionellen Labormethoden (Histologie und Kultur).
- Molekulare Methoden waren bisher nicht in die EORTC/MSG Definitionen aufgenommen, aufgrund fehlender Standardprotokolle, trotz klinischer Belege und Nachweise zum Einsatz dieser Techniken bei der IPA-Diagnose.

(Moura et al. 2018).

- Die European *Aspergillus*-PCR Initiative (EAPCRI) erarbeitete mittlerweile Empfehlungen für PCR mit Plasma und Serumproben, die einen Standard für PCR (keine Standard-Methode für PCR) etablieren, sodass *Aspergillus*-PCR in die überarbeiteten EORTC/MSG Konsensus-Definitionen aufgenommen wird

(Barnes et al. 2018; Patterson und, Donnelly 2019; Ruhnke et al. 2018).

Abbildung 3: IFI-Wahrscheinlichkeit, Beispiel *Aspergillus* spp., nach EORTC/MSG (Moura et al. 2018, Patterson und Donnelly 2019).

## Bildgebende Verfahren

Bei der Behandlung von Risikopatienten muss ein an die Patientensituation angepasstes diagnostisches und therapeutisches Konzept zur Anwendung kommen. Patienten mit einem mittleren bis hohen Risiko sollten bei Fieber frühzeitig eine Computertomographie (CT) des Thorax erhalten, wenn das Fieber anderweitig nicht erklärt und eine empirische antibakterielle Therapie über vier Tage unwirksam ist (Vehreschild und Huber 2018). Die Thorax-CT ist eine sensitive Methode zum Nachweis pulmonaler In-

filtrate bei febriler Neutropenie. Die hochauflösende Computertomographie, kurz HRCT, gilt als bestes bildgebendes Verfahren für die Diagnose einer invasiven Schimmelpilzinfektion (IMI), da typische IMI-Läsionen wie Halo-Zeichen und Inversed-Halo-Zeichen entdeckt werden können (Lamoth und Calandra 2017). Bei Patienten mit persistierender Granulozytopenie sollte ungeachtet der Breitspektrumantibiotika-Behandlung bei allen Hochrisikopatienten eine Thorax-CT zur primären Diagnose einer invasiven pulmonalen Mykose erfolgen (Ruhnke et al. 2018)

## Invasive Aspergillose

Im CT-Bild ist auf morphologische Korrelate einer invasiven Aspergillose (IA) zu achten (Abb. 4). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass diese Zeichen keineswegs spezifisch sind und insbesondere das Halo-Zeichen und andere noduläre Infiltrate bei nicht-immunsupprimierten Patienten oft Ausdruck anderer Erkrankungen (Tumoren, Blutungen, Sarkoidose, Wegener-Granulomatose) sein können (Caillot et al. 2001, Lass-Flörl et al. 2007, Lamoth und Calandra 2017). Pilztypische Infiltrate bei Patienten, die wenige oder keine IMI-Risikofaktoren haben, bedürfen immer einer weiterführenden Abklärung (z. B. Histologie) und sollten nie ausschließlich empirisch behandelt werden (Lass-Flörl und Cuenca-Estrella 2017).

Bei Verdacht auf eine invasive Aspergillose aufgrund der CT-Befunde sollten die Patienten eine bronchoalveoläre Lavage erhalten, da diese die höchste Sensitivität bietet. Sofern diese nicht durchgeführt werden kann, ist alternativ die Verwendung von Sputum oder Trachealsekret möglich. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass diese Methode eine höhere Gefahr sowohl falsch positiver wie auch falsch negativer Ergebnisse mit sich bringt (Vehreschild und Huber 2018).

- Gut definierte noduläre Infiltrate von > 1 cm
- Noduläre Infiltrate mit milchglasartigem Umgebungsinfiltrat über 270° und mehr der Zirkumferenz (Halo-Zeichen, „Heiligenschein“)
- Noduläre Infiltrate mit einer Luftsichel (Luftsichelzeichen)
- Neu aufgetretene Kavernen
- Lungeninfiltrate mit Gefäßabbrüchen in der Angio-CT

**Abbildung 4:** Diagnostische Kriterien für das Vorliegen einer invasiven pulmonalen Aspergillose (IPA) in der CT-Thorax (Ullmann et al. 2018, Vehreschild und Huber 2018).

## Invasive Mukormykose

Bei der Mukormykose werden – neben den klinischen Symptomen – in der CT des Thorax häufiger konsolidierte Herde mit einem milchglasartigen Zentralbereich beobachtet (sog. Inversed-Halo-Zeichen oder auch Atoll-Zeichen), wobei es auch *Aspergillus*-typische Befunde geben kann (Lamoth und Calandra 2017).

Klinisch und radiologisch gibt es keine sicheren Zeichen, die eine Unterscheidung zwischen einer invasiven Aspergillose (IA) und einer Mukormykose erlauben, allerdings kommen bestimmte Verläufe bei Mukormykosen häufiger vor. An eine Mukormyko-

se ist insbesondere dann zu denken, wenn eine Infektion unter einer *Aspergillus*-wirksamen Prophylaxe auftritt oder eine *Aspergillus*-gerichtete Therapie unwirksam bleibt, insbesondere bei sehr rascher klinischer Progression. Rhinoorbitozerebrale und gastrointestinale Manifestationen sind bei Mucorales deutlich häufiger als bei *Aspergillus* (Abb. 5) (Lamoth und Calandra 2017, Vehreschild und Huber 2018).

**(Siehe hierzu auch CME-Modul „Invasive Aspergillus- und Mucor-Infektionen: Herausforderungen und Therapieoptionen“.)**

- Durchbruch unter einer *Aspergillus*-wirksamen Pilzprophylaxe
- Progression und/oder Dissemination innerhalb weniger Tage
- Befall des Gastrointestinaltrakts oder der Nasennebenhöhlen
- Große konsolidierte pulmonale Herde mit zentralen milchglasartigen Infiltraten (Inversed-Halo-Zeichen)

**Abbildung 5:** Klinische Anzeichen einer möglichen Mukormykose im Vergleich zur Aspergillose (Lamoth und Calandra 2017, Vehreschild und Huber 2018).

## Mikrobiologische Diagnostik

Die mikrobiologische oder histopathologische Dokumentation invasiver Schimmelpilzinfektionen (IMIs) ist essenziell für die Therapieentscheidung und erfordert oftmals invasive Maßnahmen wie Bronchoskopie oder Gewebebiopsie. Trotz einer breiten Palette an Testverfahren für einen direkten oder indirekten IMI-Nachweis aus klinischen Proben (Kulturen, Antigen-Nachweis, PCR) gibt es in

vielen Fällen eine Ungewissheit bezüglich der Diagnose, die als „mögliche IMI“ bewertet wird. Aufgrund der limitierten Sensitivität dieser diagnostischen Maßnahmen und Bedenken hinsichtlich der Spezifität bei einigen Verfahren wird eine Kombination verschiedener Tests empfohlen (Lamoth 2016, Lamoth und Calandra 2017).B.

## Schimmelpilznachweise mittels Mikroskopie und Kulturverfahren

Gewebeproben von Patienten mit Verdacht auf IMI sollten nicht nur mittels Pilzkultur, sondern auch mikroskopisch untersucht werden (Ruhnke et al. 2018).

- Eine direkte Untersuchung auf Pilzmyzel-Elemente nach geeigneter Färbung (Blankophor White) kann bei allen klinischen Proben (Biopsie- und Abstrichpräparate, Liquor, BAL, Sputum, andere Körperflüssigkeiten oder respiratorische Sekrete, Gewebeproben) durchgeführt werden (Lamoth und Calandra 2017, Shah et al. 2013).
- Die zytologische Beurteilung von gewonnenem Material unter dem Mikroskop ist ein empfohlenes Vorgehen. Bronchoskopie-Proben oder Gewebebiopsien sollten mit Periodic-Acid-Schiff (PAS-Reaktion), Grocott-Methenamin-Silber-Färbung oder optischen Aufhellern untersucht werden (Ruhnke et al. 2018).
- Die diagnostische Genauigkeit histopathologischer und zytopathologischer Untersuchungen für die Identifizierung von *Aspergillus* spp. versus andere filamentöse Pilze wurde auf ca. 78% geschätzt (Lamoth und Calandra 2017, Shah et al. 2013).
- Die kulturelle Anzucht von Mucorales gelingt nur selten. Aus diesem Grund wird die Mehrheit der Diagnosen letztlich histologisch aus Gewebsbiopsien gestellt, wo Mukormykosen sich aufgrund der gegenüber *Aspergillus* abweichenden Verzweigung und Dicke der Pilzhyphen bei Mucorales sowie dem Fehlen von Septen identifizieren lassen (Vehreschild und Huber 2018).
- Diagnostische Eingriffe (z.B. Gewebebiopsie) können durch Kontraindikationen bei schwerkranken Patienten problematisch sein (Powers-Fletcher und Hanson 2016).

Zum Nachweisverfahren mittels Kultur sollten Gewebeproben oder flüssige Materialien (BAL, Punktate) entnommen werden. Abstriche sind weniger geeignet und sollten vermieden werden. Ein potenzielles *Aspergillus*-Wachstum kann häufig schon nach wenigen Tagen bewertet werden. Die abschließende Bewertung ist jedoch erst nach mehrtägiger Inkubation (10–14 Tage) möglich.

- Kulturen aus Sekreten des unteren Respirationstraktes, die mittels Bronchoskopie und bronchoalveolärer Lavage (BAL) gewonnen werden, sind Teil der IMI-Diagnostik, wobei die Ausbeute bei BAL-Diagnostik mit einer Sensitivität von nur 20%–50% nach aktuellen multizentrischen Studien gering ist (Lamoth und Calandra 2017, Maertens et al. 2016, Marr et al. 2015, Ullmann et al. 2018).
- *Aspergillus* spp. können grundsätzlich aus allen Atemwegsmaterialien sowie aus Biopsiematerial, Pleurapunktaten, Aszites, Liquor etc. als Kultur angezüchtet werden (Vehreschild und Huber 2018).
- Eine positive BAL-Kultur muss nicht notwendigerweise Ausdruck einer Infektion sein, sondern kann auch aus einer Kolonisation mit Schimmelpilzen resultieren. An diese Möglichkeit ist gerade auch bei Patienten nach Lungentransplantation und bei chronischen Lungenerkrankungen wie einer COPD oder Bronchiektasen zu denken (Lamoth und Calandra 2017).
- Wachstum von Schimmelpilzen (z. B. *Aspergillus* und Mucorales spp.) aus Atemwegsmaterialien von Patienten mit klinischen Zeichen einer IFD/IMI und prolongierter Granulozytopenie sollten als möglicher Indikator einer Pilzpneumonie bewertet werden (Ruhnke et al. 2018).
- Die Kultur der BAL-Proben sollte trotz der nicht optimalen Sensitivität immer erfolgen, da hierdurch wichtige Informationen für eine gezielte antimykotische Therapie erhalten werden können. Sie wird in allen Fällen bei Verdacht auf IMI empfohlen (Vehreschild und Huber 2018).
- Zu beachten ist, dass nur Kulturen von Proben steriler Bereiche (nicht BAL) und/oder histologische Untersuchungen den definitiven Nachweis einer invasiven Schimmelpilzinfektion liefern (Boch et al. 2016).

Die morphologische Charakterisierung basierend auf makroskopischer Untersuchung und Mikroskopie ist nach wie vor die Methode der Wahl für die Spezies-Identifizierung filamentöser Pilze. An diese können sich weitere Untersuchungsmethoden anschließen – insbesondere molekulare Methoden zur Speziesidentifikation finden zunehmend auch im Routinelabor Anwendung (Lamoth und Calandra 2017). Hierbei findet vor allem die Sequenzierung der ribosomalen DNA („internal transcribed spacer region“, 18S oder 26S/28S rDNA) Anwendung. Es ist jedoch zu beachten, dass *Aspergillus* spp. nicht immer bis zur Speziesebene differenziert werden können. Hierfür ist die Sequenzierung weiterer Gene (β-Tubulin, Calmodulin) erforderlich. Diese Methodik ist jedoch nicht routinemäßig in jedem

Labor verfügbar (Balajee et al. 2009, Lamoth und Calandra 2017). Eine verlässliche Identifizierung von Schimmelpilz-Spezies kann unter Einsatz eines MALDI-TOF erfolgen. Hierzu sind standardisierte Vorgehensweisen und verlässliche Referenzdatenbanken erforderlich (De Carolis et al. 2012, Lamoth und Calandra 2017).

Damit eine rechtzeitige Therapie eingeleitet und damit das Therapieergebnis verbessert werden kann, wurden kulturunabhängige diagnostische Testverfahren entwickelt, um eine frühe Diagnose mit verbesserter Spezifität zu erstellen (Boch et al. 2016, Patterson und Donnelly 2019).

## Kultur-unabhängige Erregernachweise: Detektion von Zellwandbestandteilen (Antigen-Teste)

Unspezifische klinische Zeichen und Symptome sowie radiologische Befunde und fehlende Sensitivität bei konventionellen Kulturmethoden sind die Hauptschwierigkeiten bei der Diagnose invasiver Schimmelpilzinfektionen wie der invasiven Aspergillose (IA). Daher wurden Antigen-Testverfahren in den letzten Jahren zu einem der Eckpfeiler der IA-Diagnostik (Tab. 2).

Antigen-basierte, kulturunabhängige Verfahren haben das Ziel, pilzspezifische Zellwandkomponenten nachzuweisen. Hierzu gehören der Galactomannan-Test und der (1,3)-β-D-Glucan (BDG)-Test. Beide Testverfahren sind nicht für den direkten Nachweis von Mucorales geeignet (Boch et al. 2016).

## Galactomannan (GM)

Als früher und sensitiver Marker einer invasiven Aspergillose hat sich der Nachweis von *Aspergillus*-Antigen bewährt (Tab. 2), der nach den Guidelines der EORTC ein Diagnosekriterium einer wahrscheinlichen („probable“) *Aspergillus*-Infektion ist. Hierzu wird Galactomannan, ein Polysaccharid der *Aspergillus*-Zellwand, mittels eines Enzymimmunoassays (ELSA) nachgewiesen (Boch et al. 2016). Der Routine-Antigen-Nachweis mit dem *Aspergillus*-Galactomannan-ELISA-Test (zweimal wöchentlich oder häufiger) wird bei Hochrisikopatienten ohne Schimmelpilzprophylaxe als ratsam bewertet (Ruhnke et al. 2018).

Galactomannan wird während des Wachstums des Pilzes im Gewebe in die Blutbahn abgegeben. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (EB-A2) kann eine Antigen-Seitenkette (β-1,5-Galactofuranoyl mit linearem Mannan-Core mit α1,2- und α1,6-Bindungen) nachgewiesen werden (Patterson und Donnelly 2019). Der Test ist validiert für Serum- und BAL-Proben (Lamoth und Calandra 2017). Die Durchführung mit BAL-Flüssigkeit ist gut geeignet für den Nachweis einer *Aspergillus*-Infektion und hat eine höhere Sensitivität als Zytologie, Kultur oder transbronchiale Biopsien (Nguyen et al. 2011, Patterson und Donnelly 2019). Insbesondere ist die Sensitivität des Galactomannan-Nachweises in

BAL-Proben mit 85 % deutlich höher als die Sensitivität des Testes mit Serumproben (47 %) (Patterson und Donnelly 2019). Dies wurde in zwei Meta-Analysen, die für die GM-Testung in BAL eine Sensitivität von 85 %–90 % und eine Spezifität von 90 %–95 % fanden, bestätigt (Guo et al. 2010, Lamoth 2016, Lamoth und Calandra 2017, Zou et al. 2012).

Der Nachweis von *Aspergillus*-Antigen unterstützt bei einer entsprechenden klinischen oder radiologischen Befundkonstellation die Diagnose einer invasiven *Aspergillus*-Infektion. Aufgrund möglicher falsch positiver Ergebnisse sollten insbesondere grenzwertig positive Ergebnisse aus dem Serumtest nachkontrolliert werden. Ein negativer Befund schließt eine Aspergillose nicht aus, da es bei einer Infektion nicht zu einem ständigen Vorhandensein von Antigenen im Blut kommt. Auch in diesem Fall sollte der Test kurzfristig wiederholt werden (Arvanitis et al. 2014, Lamoth und Calandra 2017, Lass-Flörl und Cuenca-Estrella 2017). Der Galactomannan-Nachweis erlaubt keinen exakten Hinweis auf die Pilzspezies, und auch Nicht-*Aspergillus*-Fadenpilze können Galactomannan bilden. Nutzen und Verlässlichkeit der Galactomannan-Teste kann durch Kombination mit einer Erreger-spezifischen PCR (Nachweis von *Aspergillus fumigatus*

oder *Aspergillus* spp.) gesteigert werden (Lamoth 2016, Patterson und Donnelly 2019, Tong et al. 2018). Sowohl EORTC-MSG als auch ECIL-Gremien haben den Einsatz der GM-Testung auch zur Diagnose der zerebralen Aspergillose validiert (Sensitivität in einer kürzlich durchgeführten Studie 88 %, Spezifität 96 %) (Chong et al. 2016, Lamoth 2016; Chong et al. 2016).

Da Mucorales kein Galactomannan besitzen, ist diese für invasive *Aspergillus*-Infektionen empfohlene Nachweismethode für Mucorales ungeeignet. Ein negativer Galactomannan (GM)-Test erhöht jedoch bei Vorliegen von weiteren Befunden mit Hinwei-

sen auf eine invasive Schimmelpilzinfektion die Wahrscheinlichkeit einer Mukormykose (Lamoth und Calandra 2017). Auch ein positiver Galactomannan-Test schließt eine Mukormykose als Ursache allerdings nicht aus (Vehreschild und Huber 2018).

Es muss betont werden, dass der alleinige Einsatz des Galactomannan-Nachweises für die Abklärung einer invasiven Schimmelpilzinfektion ungeeignet ist. Alle Richtlinien geben starke Empfehlungen, den Antigen-Nachweis mit weiteren Verfahren wie direkter Mikroskopie, Kultur und Histopathologie zu kombinieren (Cornely et al. 2014, Skiada et al. 2013).

## (1,3)- $\beta$ -D-Glucan (BDG)

(1,3)- $\beta$ -D-Glucan (BDG) ist ein Hauptbestandteil der *Aspergillus*-Zellwand, kommt aber auch bei anderen Pilzen vor. Bei Patienten mit invasiven Mykosen oder solchen mit hohem Risiko für eine invasive Mykose ist BDG im Serum nachweisbar. Das Ergebnis liefert jedoch keine Unterscheidung zwischen Infektionen mit *Aspergillus* oder anderen Pilzen (z. B. *Pneumocystis*, *Candida*).

Erreger der Ordnung Mucorales werden durch den Test nicht erfasst (Lamoth und Calandra 2017, Patterson und Donnelly 2019).

Zur Entdeckung erhöhter BDG-Konzentrationen im Serum wird der von der FDA freigegebene Fungitell®-Test in den USA und Europa eingesetzt. Bei Risikopatienten mit nachgewiesenen Serum-BDG-Werten von mindestens 80 pg/ml besteht eine hohe Assoziation mit einer invasiven Pilzinfektion (< 60 pg/ml negativ) (Lamoth und Calandra 2017). Falsch positive Ergebnisse können bei Patienten mit Nierenersatzverfahren sowie begleitender antibakterieller Therapie oder Bakteriämie auftreten. Basierend auf den Ergebnissen von vier großen Meta-Analysen werden eine Sensitivität von 60%–80% und eine Spezifität von 80%–90% angegeben (Lamoth und Calandra 2017). Ein fehlender BDG-Nachweis oder Nachweise in nur niedriger Konzentration haben einen hohen negativ prädiktiven Wert für eine invasive Pilzinfektion.

Der BDG-Test wird empfohlen:

- bei Verdacht auf eine invasive Mykose oder zum Screening von Patienten, die aufgrund ihrer Grunderkrankung für eine invasive Pilzinfektion prädisponiert sind (schwer immunsupprimierte Patienten, z. B. Neutropenie, nach KMT) (Ruhnke et al. 2018), und
- bei Verdacht auf eine invasive Aspergillose aufgrund radiologisch verdächtiger Befunde (Lamoth und Calandra 2017).

Nach Angaben des Herstellers liefert die Untersuchung Ergebnisse innerhalb einer Stunde (Fungitell® Herstellerangaben).

Daten bezüglich Organtransplantat-Patienten oder nicht neutropenischen Patienten sind begrenzt und es gibt Bedenken bezüglich der Spezifität (Lamoth und Calandra 2017).



- Sowohl GM- als auch BDG-Testung haben eine Bedeutung für die Routine-Diagnose der invasiven Aspergillose (IA) bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen während der Hochrisikoperiode (z. B. Neutropenie oder nach allogener HSCT).
  - Die Bewertung ist jedoch limitiert bei anderen Patientengruppen wie Organtransplantat-Empfängern oder bei nicht-neutropenischen Patienten, bei denen die IA-Prävalenz geringer ist und die Sensitivität/Spezifität der Testergebnisse vermindert ist.
  - Bei Hochrisikopatienten mit klinischen / radiologischen Zeichen (hohe Prä-Test-Wahrscheinlichkeit) hätte ein positiver GM oder BDG wahrscheinlich wenig Einfluss auf die therapeutische Entscheidung bei diesen Patienten, da sie ohnehin behandelt würden.
  - Verstärkt werden kann aber die IA-Diagnose (von möglich zu wahrscheinlich). Dies kann dabei helfen, die IA von anderen Mykosen zu differenzieren, und kann als Grundlage für ein Follow-up dienen.
  - Bei Hochrisikopatienten kann GM- oder BDG-Monitoring (einmal oder zweimal pro Woche) hilfreich sein für die frühe Entdeckung einer IA bei präemptiven Strategien (Lamoth 2016).
- 
- Erreger der Ordnung Mucorales werden durch den Test nicht erfasst (Lamoth und Calandra 2017, Patterson und Donnelly 2019).

**Tabelle 2:** Charakteristika des Galactomannan- und des 1,3-β-D-Glucan-Tests (Lamoth 2016).

Pilz-Biomarker	Assay / Test	Indikationen	Klinische Probe	Empfohlener Cut-off	Sensitivität (%) Spezifität (%)
<b>Galactomannan</b>	Platelia <i>Aspergillus</i>	Invasive Aspergillose	Serum	OD 0,5	60–80 / 80–95
	EIA (Bio-Rad Laborator.Marne- La-Coquette, France		BAL	OD 0,5–1	85–90 / 90–95
			CSF	OD 0,5–2	85–90 / 95–100
<b>1,3-β-D-Glucan</b>	Fungitell (Associat. of Cape Cod Inc. [East Falmouth, MA, USA])	Invasive Aspergillose  Invasive Candidose  andere invasive Mykosen*	Serum	60–80 pg/ml	60–80 / 80–95

\* nicht invasive Mukormykose; BAL: Bronchoalveoläre Lavage; CSF: Zerebrospinalflüssigkeit

## Schimmelpilznachweise mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = Polymerase-Chain-Reaction) ist eine molekularbiologische Methode, mit der kurze DNA-Abschnitte auf einfache Weise vervielfältigt werden können. Erforderlich sind die DNA-Vorlage, das Enzym DNA-Polymerase, das die Vervielfältigung katalysiert, Primer (Ansatzstücke für die Polymerase) und die DNA-Bausteine (Desoxynukleosidtriphosphate). Die PCR ermöglicht es, in einer Probe vorhandene DNA oder RNA zu vermehren und hierüber nachzuweisen. Findet man in der Probe

die Erbinformation eines Erregers, so kann das auf die Infektion mit diesem Erreger hinweisen. Die PCR benötigt deutlich weniger Zeit als die Kultur und ist ein Verfahren, das aufgrund der hohen Spezifität und Sensitivität auch aus Direktmaterial Ergebnisse noch am selben Tag liefern kann (Schubert und Wieser 2013). Durch Wahl geeigneter Primer ist es möglich, nicht nur generell die Anwesenheit von Schimmelpilzen zu zeigen, sondern sogar Hinweise auf die Spezies zu generieren.

### Aspergillus-PCR

Für die *Aspergillus*-Diagnostik kommen *Aspergillus*-spezifische Primer zur Anwendung, aber auch panfungale Primer, mit deren Hilfe *Aspergillus* ebenfalls nachgewiesen werden kann. Die Primer binden und detektieren Genregionen, die möglichst stabil und hochkonserviert vorliegen, z. B. in der 18S-rRNA, mitochondriale DNA-Bereiche oder die ITS-1-Region, der Alkaline-Protease oder den *Aspergillus*-Collagen-like (acl)-Genen (Powers-Fletcher et al. 2016). Aufgrund fehlender Standardisierung und Validierung sind PCR-Verfahren, deren Stellenwert seit vielen Jahren Gegenstand von Diskussionen ist, bisher noch nicht in die EORTC/MSG-Guidelines aufgenommen worden (Patterson und Donnelly 2019). Eine potenziell sehr hohe Sensitivität insbesondere aus Atemwegsmaterial muss gegen eine mangelhafte Standardisierung der Verfahren und das hohe Potenzial für eine Überdiagnostik (ubiquitär vorkommender Erreger mit hoher Kontaminationsgefahr) abgewogen werden (Barnes et al. 2018, Vehreschild und Huber 2018). Insbesondere bei Patienten mit gänzlich unklaren Befunden, schlechtem Ansprechen und/oder sonst negativer Diagnostik sollte jedoch eine ergänzende Untersuchung unter Einsatz einer PCR zumindest in Betracht gezogen werden (Vehreschild und Huber 2018).

Um eine Aufnahme der *Aspergillus*-PCR in die EORTC/MSG-Guideline zu erreichen, wurde die European *Aspergillus* PCR Initiative (EAPCRI) gegründet. Ziel der EAPCRI ist es, einen Standard für die *Aspergillus*-PCR-Methode zu evaluieren (standardisierte Extraktion sowie Amplifikations- und Detektions-Protokolle für verschiedene Probenotypen) und diesen in klinischen Studien zu evaluieren, sodass die PCR in die zukünftigen Konsensus-Definitionen für invasive Pilzkrankungen als Testverfahren ergänzt werden kann (Patterson und Donnelly 2019, Ruhnke et al. 2018, White et al. 2010). In Zusammenarbeit von 21 europäischen medizinischen Zentren wurde eine *Aspergillus*-PCR-Standardisierung durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Zentren unterschiedliche DNA-Extraktionsprotokolle verwendeten und zum Teil sehr unterschiedliche PCR-Amplifikationsmethoden zur Anwendung brachten. Folglich konnten sehr unterschiedliche

Ergebnisse beobachtet werden. Während Sensitivität, Spezifität und diagnostische Odds Ratio (DOR) in Zentren, die den Empfehlungen entsprechende Bedingungen anwendeten, bei 88,7 %, 91,6 % bzw. 119,9 % lagen, so betrugen diese Parameter bei Zentren mit abweichenden Protokollen 57,7 %, 77,2 % und 8,9 % (Patterson und Donnelly 2019, White et al. 2010).

Faktoren mit dem größten Einfluss auf die analytische Performance einer PCR sind:

- Die Art der Extraktionsmethode
- Bead Beating“ (Zellaufschluss) der Probe
- Verwendung einer internen Kontroll-PCR

Die Ergebnisse des letzten Cochrane-Reviews zeigen, dass die PCR eine moderate diagnostische Genauigkeit für das IA-Screening aufweist, aber einen hohen negativen prädiktiven Wert hat, der es ermöglicht, die Diagnose einer invasiven Aspergillose auszuschließen (Aguado et al. 2015, Patterson und Donnelly 2019, Ruhnke et al. 2018). Ein schlechter positiver prädiktiver Wert limitiert die Diagnosestellung bei niedriger Prävalenz der Erkrankung. Der Einsatz einer *Aspergillus*-PCR kann jedoch helfen, Schwächen der Antigen-basierten Analytik auszugleichen (Aguado et al. 2015, Patterson und Donnelly 2019, Ruhnke et al. 2018). Es ist zu berücksichtigen, dass ähnlich wie bei der Galactomannan-Testung die Behandlung mit Schimmelpilz-aktiven Antimykotika vor der BAL-Probengewinnung die Leistungsfähigkeit der *Aspergillus*-PCR-Untersuchung signifikant vermindert (Ruhnke et al. 2018).

Mittlerweile sind robuste PCR-Protokolle für den *Aspergillus*-Nachweis in Plasma und Serumproben verfügbar, sodass die *Aspergillus*-PCR in die überarbeiteten EORTC-/MSG-Konsensus-Definitionen aufgenommen werden wird (Barnes et al. 2018, Patterson und Donnelly 2019). Aufgrund des niedrigen positiven prädiktiven Werts (PPV) sollte ein positiver *Aspergillus*-PCR-Test im Blut durch eine andere Methode bestätigt werden (z. B. *Aspergillus*-GM) (Ruhnke et al. 2018).

### Fazit *Aspergillus*-PCR

- Die *Aspergillus*-PCR kann vor allem zum Nachweis in Atemwegsmaterialien (BAL) eingesetzt werden. Der Einsatz für den Nachweis im Blut ist umstritten.
- Der Nachweis von *Aspergillus*-DNA im Blut (bei neutropenischen Patienten und/oder hämatologischen Malignomen) sollte als indikativ für IA bewertet werden (Ruhnke et al. 2018).
- Studien legen nahe, dass molekulare Diagnostikmethoden in Kombination mit Antigen-Detektion erfolgen sollen (Ruhnke et al. 2018).
- Die PCR hat nicht nur das Potenzial, eine IA-Diagnose auszuschließen, sondern ermöglicht in Kombination mit einer Antigen-Testung eine frühere Diagnose und Behandlung invasiver Aspergillosen bei Hochrisikopatienten, mit dem zusätzlichen Vorteil eines Nachweises genetischer Marker, die mit antimykotischer Resistenz assoziiert sind (Barnes und White 2016).
- Ein positiver PCR-Test trotz antimykotischer Behandlung identifiziert möglicherweise Patienten mit Breakthrough-Infektionen oder solche mit unzureichendem Ansprechen auf eine antimykotische Therapie und kennzeichnet so eine Patientenpopulation, die eine Verstärkung oder Modifikation der antimykotischen Behandlung benötigt (Ruhnke et al. 2018).

## Mucorales-PCR

Wie bei der Aspergillose stehen für Mucorales PCR-Verfahren mit wechselnder Sensitivität und Spezifität für den Erregernachweis aus Atemwegsmaterial und Biopsien zur Verfügung (Vehreschild und Huber 2018).

### Fazit Mucorales-PCR

- Der Nachweis von Mucorales bleibt eine Herausforderung, aber kürzlich konnten PCR-Methoden für einen erfolgreichen Nachweis in BAL und Serum entwickelt werden (Ruhnke et al. 2018).
- Die Arbeitsgruppe Boch et al. etablierte ein DNA-Microarray, mit dem 15 unterschiedliche Pilzspezies einschließlich Mucorales nachgewiesen werden können (Boch et al. 2016).

## Multiplex-PCR zum Nachweis von Schimmelpilzen

Da die Infektionserreger nicht nur *Aspergillus fumigatus*, sondern auch andere Schimmelpilze wie z. B. *Mucor* spp. sein können, wurden breitere molekularbiologische Untersuchungsplattformen wie Microarray-basierte PCR-Systeme entwickelt.

Multifungale DNA-Microarrays, die 15 verschiedene Pilze (*Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Scedosporium* und *Trichosporon* spp.) mit moderater Sensitivität (64 %) aber guter Spezifität (80 %) nachweisen können, konnten hausintern für den Nachweis von Non-*Aspergillus*-Schimmelpilzen entwickelt werden (Boch et al. 2015, Ruhnke et al. 2018).

Kommerziell verfügbare Test-Systeme können bis zu 21 verschiedene pathogene Pilzerreger und Bakterien identifizieren, auch wenn Patienten mit hämatologischen malignen Erkrankungen mit Antiinfektiva bei febriler Granulozytopenie behandelt werden. Dieses Testsystem wurde nicht nur bei Patienten mit hämatologischen Malignitäten, sondern auch bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) eingesetzt. (Ruhnke et al. 2018).

## Abschließende Bewertung / Fazit

### Diagnostik / Nachweis invasiver *Aspergillus*-Infektionen

- Bildgebende Verfahren (Computertomographie), mikrobiologische Untersuchungen (direkte Mikroskopie, Kultur, PCR, Pilz-Biomarker) sowie Histopathologie sind die Säulen der IMI-Diagnostik (Lamoth und Calandra 2017).
- Keiner der bisher verfügbaren diagnostischen Tests verfügt alleine über ausreichende Sensitivität und Spezifität, sodass die optimale Vorgehensweise auf einer Kombination verschiedener diagnostischer Strategien beruht. Diese schließt bildgebende Verfahren, Biomarker (Galactomannan und 1,3-β-D-Glucan) und molekulare Methoden (PCR) ein (Lamoth 2016, Lamoth und Calandra 2017).
- Eine Kombination verschiedener Methoden im regelmäßigem Screening ist sowohl für eine frühe Diagnose als auch für eine Überwachung des Ansprechens auf die antimykotische Behandlung obligatorisch (Ruhnke et al. 2018).
- Die PCR-Technik für den Nachweis von Schimmelpilzen (in erster Linie *Aspergillus* oder Mucorales) und die Fortschritte bei der Standardisierung der Pilz-PCR-Technik in den letzten Jahren könnten zukünftig Vorteile bringen.
- Der geeignete diagnostische Ansatz zum IMI-Nachweis sollte individuell für jede Klinik erfolgen, basierend auf der lokalen IMI-Epidemiologie und der Verfügbarkeit diagnostischer Tests (Lamoth 2016, Lamoth und Calandra 2017).
- Zurzeit kann die beste diagnostische Treffsicherheit durch eine Kombination von unterschiedlichen Testsystemen (z. B. *Aspergillus*-GM + PCR ± BDG) für eine IPA-Diagnose bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen erzielt werden (Ruhnke et al. 2018).
- Neue diagnostische Tests (z. B. Lateral-Flow-Technologie = LFD oder Volatile-Metaboliten-Profile von *Aspergillus fumigatus* im Atem) wurden entwickelt, und die ersten Ergebnisse sind vielversprechend (Ruhnke et al. 2018).

Für die Diagnose der invasiven Mukormykose stehen deutlich weniger Testverfahren zur Verfügung als für die Diagnose der invasiven Aspergillose (Cornely et al. 2014, Ruhnke et al. 2018). Die folgende Zusammenfassung berücksichtigt u. a. Parameter, die in den Guidelines der European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases and European Confederation of Medical Mycology Guidelines zu Diagnose und Management der Mukormykose genannt werden (Cornely et al. 2014).

### Diagnostik Nachweis invasiver Mukormykose

- Bildgebende Verfahren erhalten eine starke Empfehlung, um das Ausmaß der Erkrankung zu bestimmen (Cornely et al. 2014).
- Zur Differenzierung der Mukormykose von der Aspergillose bei hämatologischen Malignitäten und Stammzell-Transplantat-Empfängern wird die Identifizierung von Reverse-Halo-Zeichen mittels Computertomographie nahegelegt (moderate Empfehlung) (Cornely et al. 2014).
- Zur Mukormykose-Diagnose erhalten die direkte Mikroskopie vorzugsweise unter Verwendung optischer Aufheller, die Histopathologie und die Kultur eine starke Empfehlung (Cornely et al. 2014).
- Die Erreger-Identifizierung auf Spezies-Ebene mittels molekularer Methoden und Empfindlichkeitstestung bekommt eine starke Empfehlung, um epidemiologische Kenntnisse zu erhalten (Cornely et al. 2014).
- Die Empfehlung für eine Behandlung basierend auf minimalen Hemmkonzentrationen (MHK-Werten) wird nur marginal unterstützt (Cornely et al. 2014).
- Multiplex-PCR-Untersuchungen, die die klinisch wichtigsten Mucorales in Serum oder BAL nachweisen, sind vielversprechend für eine frühe Diagnose der Mukormykose (Lamoth und Calandra 2017).

## Neue diagnostische Tests – zukünftige Optionen

### Lateral-Flow-Technologie (LFD) bei invasiver Aspergillose (IA)

Wenngleich der bronchoalveoläre Lavage (BA-Galactomannan [GM])-Test als einer der vielversprechendsten Ansätze zur frühzeitigen Diagnose invasiver (pulmonaler) Aspergillosen (IPA) gilt, variiert die Verfügbarkeit der Testergebnisse zentrumsspezifisch von weniger als einem Tag bis zu mehreren Tagen und erfordert die Notwendigkeit eines entsprechend ausgestatteten Labors, das routinemäßig GM-Antigen-Teste durchführt. Das *Aspergillus* Lateral-Flow-Device (LFD, ein neuerer Point-of-Care-Test [patientennahe Labordiagnostik (POCT)]) hat das Potenzial für eine rasche und einfache IA-Diagnose (Hoenigl et al. 2018, Ruhnke et al. 2018). Ein muriner monoklonaler Antikörper, JF4, bindet an ein extrazelluläres Glykoprotein-Antigen, das während des *Aspergillus*-Wachstums ausgeschieden wird, und unterscheidet zwischen Konidien und Hyphen (Patterson und Donnelly 2019). In präklinischen Studien wurde ein rascher und konsistenterer *Aspergillus*-Nachweis im Vergleich zum klassischen GM- und BDG-Nachweis dokumentiert. Der LFD-Devis-

Prototyp zeigte eine Sensitivität von 89 % und eine Spezifität von 88 %. Beste Ergebnisse wurden bei Kombination des LFD mit dem GM-Nachweis-Test und PCR erhalten (Patterson und Donnelly 2019). Der 15 Minuten dauernde Einweg-Test kann in einfachen Einrichtungen mit bronchoalveolären Lavage (BAL)-Proben durchgeführt werden. In einer retrospektiven monozentrischen Studie wurde der *Aspergillus*-Lateral-Flow-Device (LFD)-Test bei 39 bronchoalveolären Lavage (BAL)-Proben von Patienten mit hämatologischen malignen Erkrankungen und organtransplantierten Patienten evaluiert. Sensitivitäten und Spezifitäten des BAL-LFD-Tests für mutmaßliche invasive pulmonale Aspergillosen (IPA) lagen bei 100 % bzw. 81 % (Hoenigl et al. 2018, Patterson und Donnelly 2019). Für die routinemäßige klinische Anwendung sind jedoch multizentrische Studien mit größeren Stichproben und auch aus anderen Patientenkollektiven notwendig (Hoenigl et al. 2018, Patterson und Donnelly 2019).

Eine Kombination der oben beschriebenen Testverfahren GM plus BDG oder LFD kann Vorteile bringen: Zwei positive Ergebnisse bezüglich GM und BDG oder LFD sind hilfreich, um die IA-Diagnose zu bestätigen, wohingegen zwei negative Ergebnisse (GM und LFD) geeignet sind, eine IA auszuschließen (Zang et al. 2019).

### Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

In-situ-Hybridisierung (ISH) ist eine molekularbiologische Methode zum Nachweis von Nukleinsäuren (RNA oder DNA) in Geweben, einzelnen Zellen oder auf Metaphase-Chromosomen. Dabei wird eine künstlich hergestellte Sonde aus einer Nukleinsäure eingesetzt, die über Basenpaarungen an die nachzuweisende Nukleinsäure bindet (Hybridisierung). Weite Verbreitung haben die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) für den Nachweis von DNA oder RNA (RNA-FISH) in Zellkernen einzelner Zellen oder Geweben mit farbgebenden (chromogenen) Molekülen (FISH-Test) (Gall und Pardue 1969, Powers-Fletcher und Hanson 2016). In der Literatur werden diverse Studien beschrieben, in denen ISH zum Nachweis von *Aspergillus fumigatus* oder *Aspergillus* spp. in Gewebebiopsien eingesetzt wurde (Moura et al. 2018). FISH hat sich zu einem bedeutenden Werkzeug für eine schnelle und direkte Einzelzell-Identifizierung von Mikroorganismen entwickelt.

Vorteile im Vergleich zu anderen Methoden sind:

- Die Protokolle zur Durchführung sind relativ einfach.
  - Die Zeit bis zum Erhalt des Ergebnisses ist kürzer (60–90 Minuten) als die Zeit für das Ergebnis einer mikrobiologischen Kultur und der Amplifikation von Nukleinsäuren.
  - Es ist keine Vorbehandlung der Probe notwendig, da die Analyse direkt mit der intakten Probe erfolgt.
  - Mit der FISH-Methode muss keine DNA aus der Probe extrahiert werden, ein Vorteil gegenüber der PCR.
  - Die Materialkosten sind geringer als bei allen zurzeit erhältlichen PCR-basierten Techniken.
  - FISH ermöglicht eine Identifizierung auf Gattungs- und Spezies-Stufe.
- (Moura et al. 2018).

Eine Limitierung besteht darin, dass für den Nachweis eine Konzentration von mindestens 10<sup>5</sup> Kolonie-formenden Einheiten (CFU) benötigt wird (Moura et al. 2018).

## Fazit:

Konventionelle mikrobiologische Methoden, bildgebende Verfahren und Antigenteste bilden die Eckpfeiler der IPA-Diagnose. Im Vergleich zu PCR-basierten Schimmelpilznachweisen ist der Direktnachweis von Pilzen mittels FISH ähnlich sensitiv, jedoch weniger kontaminationsanfällig. Vor diesem Hintergrund wäre daher die FISH eine vielversprechende Methode für die Diagnostik von *hh* und anderen Fadenpilzen (Moura et al. 2018, Smith und Rickerts 2017 PMID- 27837511).

## Literatur

- Aguado JM, Vázquez L, Fernández-Ruiz M et al. Serum galactomannan versus a combination of galactomannan and polymerase chain reaction-based aspergillus DNA detection for early therapy of invasive aspergillus in high-risk hematological patients: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 2015;60(3):405–414.
- Arvanitis M, Ziakas PD, Zacharioudakis IM et al. PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance. *J Clin Microbiol* 2014;52(10):3731–3742.
- Balajee SA, Borman AM, Brandt ME et al. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J Clin Microbiol* 2009;47(4):877–884.
- Barnes RA, White PL, Morton CO et al. Diagnosis of aspergillosis by PCR: clinical considerations and technical tips. *Med Mycol* 2018;56(Suppl 1):60–72.
- Barnes RA, White PL. PCR Technology for Detection of Invasive Aspergillosis. *J Fungi (Basel)* 2016;2(3) pii: E23.
- Bassetti M, Bouza E. Invasive mould infections in the ICU setting: complexities and solutions. *J Antimicrob Chemother* 2017;72(Suppl 1): i39-i47.
- Boch T, Spiess B, Cornely OA et al. Diagnosis of invasive fungal infections in haematological patients by combined use of galactomannan, 1,3-beta-D-glucan, *Aspergillus* PCR, multifungal DNA-microarray, and *Aspergillus* azole resistance PCRs in blood and bronchoalveolar lavage samples: results of a prospective multicentre study. *Clin Microbiol Infect* 2016;22(10):862–868.
- Boch, T, Reinwald, M, Postina, P et al. Identification of invasive fungal diseases in immunocompromised patients by combining an *Aspergillus* specific PCR with a multifungal DNA-microarray from primary clinical samples. *Mycoses* 2015;58(12):735–745.
- Bongomin F, Gago S, Oladele RO et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi* 2017;3(4):E57
- Buchheidt D, Reinwald M, Spiess B et al. Biomarker-based diagnostic work-up of invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised paediatric patients – is *Aspergillus* PCR appropriate? *Mycoses* 2016;59(2):67–74.
- 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(1): 253–259
- Chamilos G, Luna M, Lewis RE et al. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989–2003). *Haematologica* 2006;91(7):986–989.
- Chitasombat MN, Kontoyiannis DP. The “cephalosporin era” of triazole therapy: isavuconazole, a welcomed newcomer for the treatment of invasive fungal infections. *Expert Opin Pharmacother* 2015;16(10):1543–1558
- Chong GM, Maertens JA, Lagrou K et al. Diagnostic performance of galactomannan antigen testing in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2016;54(2):428-431.
- Cornely OA, Arikan-Akdagli S, Dannaoui E et al. ESCMID and ECMM joint guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(Suppl 3):5–26.
- Crum-Cianflone NF. Invasive Aspergillosis Associated With Severe Influenza Infections. *Open Forum Infect Dis* 2016;3(3):ofw171.
- De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(5):475–484.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP et al. 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.
- Dignani MC. Epidemiology of invasive fungal diseases on the basis of autopsy reports. *F1000 Prime Rep* 2014;6:81; published online 2014 Sep 4. doi: 10.12703/P6-81.
- Fungitell® Herstellerangaben
- Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969;63(2): 378–383.



- Guo YL, Chen YQ, Wang K et al. Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. *Chest* 2010;138(4): 817–824
- Hoenigl M, Eigl S, Heldt S et al. Clinical evaluation of the newly formatted lateral-flow device for invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses* 2018;61(1):40–43.
- Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev* 2011;20(121):156–174
- Lass-Flörl C, Cuenca-Estrella M. Changes in the epidemiological landscape of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother* 2017;72(Suppl 1):i5–i11.
- Lass-Flörl C, Resch G, Nachbaur D et al. The value of computed tomography-guided percutaneous lung biopsy for diagnosis of invasive fungal infection in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2007;45(7):e101–104.
- Lewis RE, Cahyame-Zuniga L, Kontoyiannis DP et al. Epidemiology and sites of involvement of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: a 20-year autopsy study. *Mycoses* 2013;56(6):638–645.
- Lamoth F, Calandra T. Early diagnosis of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother* 2017;72(Suppl 1):i19–i28.
- Lamoth F. Galactomannan and 1,3-beta-D-Glucan Testing for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J Fungi (Basel)* 2016;2(3) pii: E22.
- Maertens JA, Raad II, Marr KA et al. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by Aspergillus and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *Lancet* 2016;387(10020):760–769
- Marr KA, Schlamm HT, Herbrecht R et al. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2015;162(2):81–89.
- Mellinghoff SC, Panse J, Alakel N et al. Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: 2017 update of the recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society for Haematology and Medical Oncology (DGHO). *Ann Hematol* 2018;97(2):197–207.
- Moura S, Cerqueira L, Almeida A. Invasive pulmonary aspergillosis: current diagnostic methodologies and a new molecular approach. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018;37(8):1393–1403.
- Nguyen MH, Leather H, Clancy CJ et al. Galactomannan testing in bronchoalveolar lavage fluid facilitates the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies and stem cell transplant recipients. *Biol Blood Marrows Transplant* 2011;17(7):1043–1050.
- Patterson TF, Donnelly P. New Concepts in Diagnostics for Invasive Mycoses: Non-Culture-Based Methodologies. *J Fungi (Basel)* 2019;5(1) pii: E9
- Patterson TF, Thompson GR 3rd, Denning DW et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2016;63(4):e1–60
- Powers-Fletcher MV, Hanson KE. Molecular Diagnostic Testing for Aspergillus. *J Clin Microbiol* 2016;54(11):2655–2660
- Ruhnke M, Behre G, Buchheidt D et al. Diagnosis of invasive fungal diseases in haematology and oncology: 2018 update of the recommendations of the infectious diseases working party of the German society for hematology and medical oncology (AGIHO). *Mycoses* 2018;61(11):796–813
- Schubert S, Wieser A. Molekulare Methoden in der mikrobiologischen Diagnostik. *Biospektrum* 2013;7:743–747.
- Shah AA, Hazen KC. Diagnostic accuracy of histopathologic and cytopathologic examination of Aspergillus species. *Am J Clin Pathol* 2013;139(1):55–61
- Smith IM, Rickerts V. Identification of Fungal Pathogens in Tissue Samples from Patients with Proven Invasive Infection by Fluorescence In Situ Hybridization. *Methods Mol Biol* 2017; 1508:281–288.
- Skiada A, Laternier F, Groll AH et al. Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with hematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3). *Haematologica* 2013;98(4):492–504.
- Tong T, Shen J, Xu Y. Serum galactomannan for diagnosing invasive aspergillosis in pediatric patients: A meta-analysis. *Microb Pathog* 2018;118:347–356.
- Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdogli S et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect* 2018;24(Suppl 1):e1-e38.

Vehreschild JJ, Huber K. Invasive Aspergillus- und Mucor-Infektionen: Herausforderungen und Therapieoptionen. Pfizer CME Med Learning 2018, [https://cme.medlearning.de/pfizer/aspergillus\\_mucor/pdf/cme.pdf](https://cme.medlearning.de/pfizer/aspergillus_mucor/pdf/cme.pdf)

White PL, Bretagne S, Klingspor L et al. Aspergillus PCR: one step closer to standardization. *J Clin Microbiol* 2010;48(4):1231–1240.

Winters B, Custer J, Galvagno SM et al. Diagnostic errors in the intensive care unit: a systematic review of autopsy. *BMJ Qual Saf* 2012;21(11):894–902.

Zang L, Guo Z, Xie S et al. The performance of galactomannan in combination with 1,3-beta-D-glucan or aspergillus-lateral flow device for the diagnosis of invasive aspergillosis: Evidences from 13 studies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2019;93(1):44–53.

Zou M, Tang L, Zhao S et al. Systematic review and meta-analysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis. *PLoS One* 2012;7(8):e43347.