

Diagnostik invasiver *Aspergillus*- und Mucorales-Infektionen

Autoren:

Prof. Dr. med. Holger Rohde

UKE Hamburg

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Interessenkonflikte: Vortragstätigkeit Accelerate Diagnostics, Correvio, MSD, Pfizer, Infectopharm; Beratertätigkeit Pfizer, MSD, Shionogi

Dr. med. Dipl. Biochem. Jürgen Held

UK Erlangen

Institut Diagnostik und Hygiene

Interessenkonflikte: Vortragshonorare und finanzielle Studienunterstützung von der Pfizer Pharma GmbH. Weiterhin erhielt er Verbrauchsmaterialien von Associates of Cape Cod Inc., Vircell S.L., FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, IMMY und Amplex Biosystems GmbH.

Dr. rer. nat. Kora Huber

Mikrobiologin

Consultant Infektiologie, Medizinjournalistin

Berater-/Vortragshonorare /Medical Writing:

Correvio, Infectopharm, Pfizer, MSD, Shionogi, Astra Zeneca, Basilea

Hintergrund

Invasive Schimmelpilzinfektionen (Invasive Mould Infections, IMIs) werden vor allem durch Spezies der Gattung *Aspergillus* bzw. der Ordnung Mucorales (*Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Lichtheimia* spp., u.e a.) verursacht. Die entsprechenden Krankheitsbilder sind die invasive Aspergillose bzw. die invasive Mukormykose. Die Schimmelpilze befallen dabei primär die Nasennebenhöhlen und die Lunge, können jedoch auch disseminieren und dann prinzipiell alle Organe, v.a. das Gehirn infizieren. IMIs sind mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert. Tatsächlich sind IMIs eine Haupttodesursache bei Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen oder einer langandauernden immunsuppressiven Therapie (Boch et al. 2016; Lamoth and Calandra 2017; Patterson and Donnelly 2019). Ihre Prophylaxe stellt eine besondere Herausforderung dar, wie auch die Diagnose und Therapie (Dignani 2014; Patterson and Donnelly 2019). Die Häufigkeit der IMIs hat in den letzten zwei Jahrzehnten zugenommen. Ursache hierfür ist u. a. die Zunahme von Patienten mit Risikofaktoren für die Entwicklung von IMIs (Abb. 1) (Bassetti and Bouza 2017; Chitasombat and Kontoyiannis 2015; Lass-Flörl and Cuenca-Estrella 2017). Dabei ist es besonders wichtig zu beachten, dass IMIs nicht nur in neutropenischen Hochrisikokollektiven wie zum Beispiel nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) nachgewiesen werden (Mellinghoff et al. 2018). Vielmehr treten IMIs auch außerhalb dieser Gruppe bei Patienten nach Organtransplantationen, mit soliden Tumoren, mit Autoimmunerkrankungen, mit angeborenen Immundefekten oder unter immunsuppressiver Therapie mit Calcineurin-Inhibitoren, TNF- α -Inhibitoren oder anderen Immunmodulatoren (Anti-Zytokine, Kinase-Inhibitoren, monoklonale Antikörper mit Wirkung auf T-Zellen) auf. HIV/Aids- und Langzeitsteroid-Patienten stellen weitere Risikogruppen dar (Abb. 1) (Bassetti and

Bouza 2017). Besondere Beachtung muss das Auftreten von IMIs bei intensivmedizinisch betreuten Patienten ohne klassische Risikofaktoren erhalten (Tudesq et al. 2019; Pardo et al. 2019). In diesem Patientenkollektiv werden Infektionsraten zwischen 6 und 17 % beschrieben (Baddley et al. 2013; Lichtenstern et al. 2015; Meersseman et al. 2007). Eine Untergruppe dieses Kollektivs stellen Patienten mit schwerer Influenza-Pneumonie dar, die auf der Intensivstation behandelt werden müssen und bei denen eine invasive pulmonale Aspergillose (*Influenza-associated pulmonary aspergillosis*, IAPA) als Komplikation überdurchschnittlich häufig (19 %) beobachtet wird. Ein relevanter Anteil dieser Patienten (28 %) weist dabei keinen klassischen Immundefekt auf, der sie für eine pulmonale Aspergillose prädestiniert (Schauwvlieghe et al. 2018). Als Grund für die Häufung bei vermeintlich immungesunden Patienten wird die Behandlung der Influenza-Pneumonie mit Dexamethason (48 %), eine Schädigung des respiratorischen Epithels sowie eine Beeinflussung der T-Zell-Funktion durch das Influenza-Virus diskutiert (Rijnders, Schauwvlieghe, and Wauters 2020). In Analogie zur IAPA ist auch bei Patienten mit schwerer COVID-19 (coronavirus disease 2019)-Erkrankung eine ausgeprägte Häufung pulmonaler Aspergillosen aufgefallen (*COVID-19-associated pulmonary aspergillosis*, CAPA). Die Inzidenz bei COVID-19 Patienten auf Intensivstationen wird mit durchschnittlich 13,5 % angegeben. Die Pathogenese entspricht wahrscheinlich der bereits bei der IAPA diskutierten und wiederum weist ein relevanter Anteil der Patienten keine klassische Immunsuppression auf (Chong and Neu 2021). Es existieren mittlerweile zahlreiche Fallberichte, die auch das Auftreten von Mukormykosen bei Patienten mit schwerer Influenza-Pneumonie und COVID-19 beschreiben (Ahmadikia et al. 2021; Garg et al. 2021).

- Steigende Zahl von Patienten nach Knochenmark- oder Organtransplantation
- Verlängerte Aufenthaltsdauer auf Intensivstationen
- Fortschritte bei der Behandlung von Krebserkrankungen, z.B. neue Medikamente mit Erhöhung des Risikos für IMI
- Komplikation bei Patienten mit HIV/ Aids

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

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

Typischerweise werden IMIs durch *Aspergillus fumigatus* hervorgerufen. In den letzten Jahren ist die Inzidenz invasiver pulmonaler Aspergillosen angestiegen (200 000 Fälle pro Jahr weltweit) (Moura, Cerqueira, and Almeida 2018). Die Letalität der invasiven pulmonalen Aspergillose 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, Cerqueira, and Almeida 2018). Die Verzögerung der Diagnosestellung ist u. a. Folge der unspezifischen Symptomatik, aber auch der nicht optimalen Möglichkeiten zur Überwachung von Risikopatienten mittels geeigneter Biomarker, und des verzögerten Erregernachweises mittels kultureller Verfahren. Vor diesem Hintergrund sind die Entwicklung und die Standardisierung schnellerer und präziserer Nachweismethoden von besonderer Bedeutung (Moura, Cerqueira, and Almeida 2018).

Neben den *Aspergillus*-Arten werden bei IMIs auch Spezies aus der Ordnung der *Mucorales* nachgewiesen. Infektionen durch diese Schimmelpilze werden unter dem Begriff der Mukormykose zusammengefasst. Typische Gattungen sind *Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor* und *Lichtheimia*. *Mucorales* werden für etwa 5 bis 15 % der IMIs verantwortlich gemacht (Lamoth and Calandra 2017). Aufgrund der schwierigen Diagnostik wird jedoch von einer höheren Dunkelziffer an Infektionen und Ko-Infektionen ausgegangen (Lewis et al. 2013). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass zwar spezifische Untersuchungsmethoden für den *Mucorales*-Nachweis entwickelt wurden, diese aber nur eingeschränkt in Kliniken verfügbar sind (Patterson and Donnelly 2019).

Tatsächlich muss davon ausgegangen werden, dass aufgrund der schwierigen Diagnose IMIs regelhaft übersehen und nicht spezifisch therapiert werden. Die hohe Dunkelziffer von IMIs ist durch mehrere Autopsiestudien eindeutig belegt (Dignani 2014). In solchen Erhebungen zeigte sich:

- Invasive Pilzinfektionen werden häufig erst post mortem diagnostiziert – Autopsiestudien weisen darauf hin, dass nahezu 50 % der Infektionen der Diagnose entgehen könnten (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 Anteil der *ante mortem* diagnostizierten IFIs in sechs Autopsie-Studien (1976–2008) lag bei 46 % (Dignani 2014).
- Eine Analyse von insgesamt 5863 Autopsien bei Intensivpatienten zeigte, dass die invasive Aspergillose zu den am häufigsten *ante mortem* nicht-erkannten Erkrankungen gehört (Winters et al. 2012).

Es besteht daher eine absolute Notwendigkeit, das Bewusstsein der behandelnden Ärzte für die Möglichkeit des Vorliegens einer IMI zu schärfen und anschließend die richtigen diagnostischen Methoden auszuwählen, um diese mit maximaler Sensitivität nachzuweisen.

2. Diagnostische Maßnahmen bei klinischem Verdacht auf eine invasive Schimmelpilzinfektion

Die Diagnose einer IMI ist schwierig, da die meisten klinischen Zeichen und Symptome, wie Fieber, Husten, vermehrte Sputumproduktion, pleuritische Schmerzen, Hämoptysen und Atemnot unspezifisch sind (Ruhnke et al. 2018). Treten solche Symptome bei einem Patienten auf, so sollte eine Einschätzung des Risikos bezüglich einer IMI erfolgen. Besitzt der Patient einen der o.g. Risikofaktoren, so muss eine diagnostische Abklärung frühzeitig initiiert werden (Patterson et al. 2016). Da kein Nachweisverfahren für sich alleine eine zufriedenstellende Sensitivität besitzt, umfasst die differenzialdiagnostische Aufarbeitung notwen-

digerweise die Kombination unterschiedlicher diagnostischer Methoden, vor allem bildgebender Verfahren (CT, MRT) sowie verschiedener Methoden zum Erregernachweis (Histopathologie, Mikroskopie, Kultur, Biomarker, PCR) (Arvanitis et al. 2014; Lass-Flörl and Cuenca-Estrella 2017).

Eine Übersicht zu verfügbaren diagnostischen Methoden und geeigneten Probenmaterialien gibt Tabelle 1 (Moura, Cerqueira, and Almeida 2018).

(Siehe hierzu auch CME-Modul

„Invasive *Aspergillus*- und *Mucor*-Infektionen: Herausforderungen und Therapieoptionen“.)

Tabelle 1: Übersicht der verfügbaren diagnostische Methoden zum Nachweis einer Schimmelpilzinfektionen und geeigneter klinischer Materialien (Moura, Cerqueira, and Almeida 2018)

| Verfahren | Methode | Geeignetes Probenmaterial |
|---|---|--|
| Bildgebung | (hochauflösende) Computertomographie (HRCT) | — |
| Mikroskopie | Direkte mikroskopische Untersuchung (z. B. Calcofluor-Färbung) Histologischer Nachweis | Biopsien, Punktate, respiratorische Materialien, keine Abstriche |
| Kultur | Anzucht der Erreger unter geeigneten Bedingungen | Biopsien, Punktate, respiratorische Materialien, keine Abstriche |
| Biomarker | Galactomannan (1→3)-β-D-Glucan | Serum, Plasma, BAL, (Liquor) |
| Nukleinsäure-amplifikations-techniken (NATs) | Amplifikationsteste, ggf. in Kombination mit Sequenzierungsmethoden | Biopsien, Punktate, respiratorische Materialien, keine Abstriche |

2.1 Bildgebende Verfahren

Die hochauflösende Computertomographie (HRCT) gilt als bestes bildgebendes Verfahren zur Diagnose einer IMI (Alexander et al. 2021). Konventionelle Röntgenuntersuchungen sind aufgrund der niedrigen Sensitivität zur Diagnose nicht geeignet (Godet, Elsendoorn, and Roblot 2012). Im HRCT lassen sich noduläre Infiltrate sowie typische IMI-Läsionen wie Halo-Zeichen, reverses Halo-Zeichen oder Luftsichelzeichen („air crescent sign“) nachweisen (Lamoth and Calandra 2017). Ein Halo ist dabei eine milchglasartige Transparenzminderung, die ein noduläres Infiltrat umgibt, während ein reverser Halo eine zentrale Milchglastrübung umgeben von einer dichteren Sichel oder einem Ring ist. Das Luftsichelzeichen entsteht in einem späten Stadium der Infektion durch nekrotischen Zerfall des Gewebes unter Bildung einer Kaverne mit einem sichelförmigen Lufteinschluss. Neben dem Nachweis IMI-typischer Läsionen lässt sich mit Hilfe einer CT-Untersuchung mit Kontrastmittel die räumliche Beziehung von Pilzläsionen und Gefäßen und somit das Blutungsrisiko ermitteln.

2.1.1 CT bei invasiver Aspergillose

Im CT-Bild ist auf morphologische Korrelate einer invasiven Aspergillose zu achten (Abb. 2). Einzelne oder wenige Noduli, die sich auf mehrere Lungenlappen verteilen sind ein stärkerer Hinweis als viele Noduli in einem lokalisierten Segment. Insbesondere das Halo-Zeichen ist im entsprechenden klinischen Setting stark hinweisend auf eine invasive Aspergillose (Alexander et al. 2021). Es ist jedoch zu beachten, dass kein radiologisches

Risikopatienten sollten bei entsprechender Symptomatik (z.B. Fieber) frühzeitig eine Computertomographie (CT) des Thorax erhalten, wenn die Symptome anderweitig nicht erklärt werden können und eine empirische antibakterielle Therapie über vier Tage unwirksam ist (Vehreschild and Huber 2018). Unter Umständen macht es jedoch Sinn, die Indikation zur CT-Untersuchung großzügiger zu stellen. Bei Patienten mit persistierender Granulozytopenie sollte ungeachtet der antibiotischen Behandlung ein Thorax-CT erfolgen (Ruhnke et al. 2018) und bei Hochrisikopatienten (z. B. Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie, AML) gehört ein CT-Thorax in vielen Einrichtungen zum Eingangsscreening nach Diagnosestellung (Stemler et al. 2020). Den Nutzen eines solchen Vorgehens zeigt eine prospektive Studie an hämatologisch-onkologischen Patienten, die zeigen konnte, dass 10 % der Patienten mit AML bereits bei Erstdiagnose an einer invasiven pulmonalen Aspergillose litten (Bitterman et al. 2019).

Zeichen pathognomonisch für eine IMI ist und dass sowohl noduläre Infiltrate als auch das Halo-Zeichen bei nicht-immunsupprimierten Patienten Ausdruck anderer Erkrankungen (Tumoren, Blutungen, Sarkoidose, Wegener-Granulomatose) sein können (Caillot et al. 2010; Lass-Flörl et al. 2007).

- Mikronoduläre (≤ 3 mm) und makronoduläre Infiltrate (3-30mm) (frühes Zeichen)
- Noduläre Infiltrate mit Halo-Zeichen (v.a. in Hämatologie, frühes Zeichen)
- Noduläre Infiltrate mit Luftsichelzeichen (v.a. in Hämatologie, spätes Zeichen)
- Noduläre Infiltrate mit „tree-in-bud“-Zeichen
- Hypodenses Zeichen und später Kavernenbildung
- Konsolidierungen
- Milchglasinfiltrate

Abbildung 2: Diagnostische Kriterien für das Vorliegen einer invasiven pulmonalen Aspergillose (IPA) im CT-Thorax (Alexander et al. 2021).

2.1.2 CT bei invasiver Mukormykose

Im CT-Bild ist auf morphologische Korrelate einer invasiven Aspergillose zu achten (Abb. 3). Einzelne oder wenige Noduli, die sich auf mehrere Lungenlappen verteilen sind ein stärkerer Hinweis als viele Noduli in einem lokalisierten Segment. Insbesondere das Halo-Zeichen ist im entsprechenden klinischen Setting stark hinweisend auf eine invasive Aspergillose (Alexander et al. 2021). Es ist jedoch zu beachten, dass kein

radiologisches Zeichen pathognomonisch für eine IMI ist und dass sowohl noduläre Infiltrate als auch das Halo-Zeichen bei nicht-immunsupprimierten Patienten Ausdruck anderer Erkrankungen (Tumoren, Blutungen, Sarkoidose, Wegener-Granulomatose) sein können (Caillot et al. 2010; Lass-Flörl et al. 2007).

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

Abbildung 3: Hinweise auf eine mögliche Mukormykose im Vergleich zur Aspergillose (Lamoth and Calandra 2017; Vehreschild and Huber 2018).

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

Bei radiologischem Verdacht auf eine IMI sollten die Patienten einer mikrobiologischen Untersuchung zugeführt werden. Pilztypische Infiltrate bei Patienten, die wenige oder keine IMI-Risikofaktoren haben, bedürfen immer einer weiterführenden Abklärung und sollten nie ausschließlich empirisch behandelt werden (Lass-Flörl et al. 2007).

2.2 Mikrobiologische Diagnostik

Die mikrobiologische und histopathologische Dokumentation der IMI ist sowohl für die Diagnose einer invasiven Schimmelpilzinfektion als auch für die Planung der optimalen Therapie von zentraler Bedeutung. Aufgrund Test-inhärenter

Limitierungen hinsichtlich Sensitivität und Spezifität wird eine Kombination verschiedener Nachweismethoden empfohlen (Donnelly et al. 2020; Lamoth 2016; Lamoth and Calandra 2017).

2.2.1 Schimmelpilznachweise mittels Mikroskopie

Gewebeproben von Patienten mit Verdacht auf IMI sollten nicht nur mittels Pilzkultur, sondern auch mikroskopisch untersucht werden (Ruhnke et al. 2018). Tatsächlich stellt der Nachweis von Gewebe-invasiven Pilzelementen in Kombination mit dem kulturellen Nachweis die Basis für die Diagnose einer gesicherten IMI dar. Eine Biopsie mit histopathologischer Untersuchung des Gewebes ist jedoch aufgrund bestehender Risiken bei der Materialgewinnung meist nicht möglich. In diesen Fällen muss sich die konventionelle Analytik auf den direkten mikroskopischen Erregernachweis sowie auf kulturelle Verfahren beschränken. Hierfür geeignetes Material stellen z. B. BAL und Liquor dar. Die klinische Wertigkeit anderer Materialien (Abstriche, Sputum) ist limitiert (Kelly, Pennington, and Limper 2020).

- Eine direkte Untersuchung auf Pilzmyzel-Elemente ist mittels Stilben-Färbung aus klinischen Proben (Biopsien/Gewebeproben, Liquor, BAL) möglich und empfohlen (Lamoth and Calandra 2017; Shah and Hazen 2013).
- *Aspergillus spp.* und *Mucorales* unterscheiden sich mikroskopisch (Septierung, Hyphendurchmesser, Winkel der Hyphenverzweigungen). In Direkt- bzw. histologischen Präparaten sind diese Charakteristika mitunter schwierig zu beurteilen und führen zu einem beträchtlichen Anteil von Fehlidentifizierungen (Lamoth and Calandra 2017; Shah and Hazen 2013; Tintelnot 2013).

2.2.2 Schimmelpilznachweise mittels kultureller Anzucht

Um die oben beschriebenen Limitierungen direkter mikroskopischer Verfahren auszugleichen, ist ein zweites essentielles Standbein der konventionellen Analytik der Versuch einer kulturellen Anzucht. Geeignet hierfür sind vor allem Gewebeproben, respiratorische Materialien (BAL, Bronchialsekret, Trachealsekret) und Liquor (Vehreschild and Huber 2018). Die Untersuchung von Abstrichen ist ungeeignet. Um eine erfolgreiche Anzucht sicherzustellen ist die Anlage spezieller Kulturplatten und die Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen notwendig. Aus diesem Grund ist darauf zu achten, dass eine Schimmelpilzdiagnostik parallel zur bakteriologischen Diagnostik gesondert angefordert werden muss. Schimmelpilze lassen sich, abhängig von der Spezies, häufig schon innerhalb von 48 h kulturell nachweisen. Die abschließende Bewertung ist jedoch erst nach mehrtägiger Inkubation (10–14 Tage) möglich.

- Eine Kultur der BAL-Proben sollte trotz nicht optimalen Sensitivität immer erfolgen, da durch die Möglichkeit einer Empfindlichkeitstestung wichtige Informationen für die optimale antimykotische Therapie gewonnen werden können. Sie wird in allen Fällen bei Verdacht auf IMI empfohlen (Vehreschild and Huber 2018).
- Die kulturelle Anzucht von *Mucorales* gelingt nur selten (Vehreschild and 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 and Calandra 2017).
- Wachstum von Schimmelpilzen (z. B. *Aspergillus* und *Mucorales spp.*) aus Atemwegsmaterialien von Patienten mit klinischen Zeichen einer IMI und prolongierter Granulozytopenie müssen unabhängig von der Erregerlast als möglicher Indikator einer Pilzpneumonie gewertet werden (Ruhnke et al. 2018).

- Kulturen aus Sekreten des unteren Respirationstraktes, die mittels Bronchoskopie und bronchoalveolärer Lavage (BAL) gewonnen werden, sind essenzieller Teil der IMI-Diagnostik, wobei die Ausbeute bei BAL-Diagnostik mit einer Sensitivität von nur 20 %–50 % nach aktuellen multizentrischen Studien gering ist (Kelly, Pennington, and Limper 2020; Lamoth and Calandra 2017; Maertens et al. 2016; Marr et al. 2015; Ullmann et al. 2018).

- Für die Diagnose einer gesicherten Schimmelpilzinfektion ist der kulturelle Erregernachweis aus sterilen Materialien notwendig. Bei nicht sterilen Materialien wie der BAL ist der kulturelle Nachweis ohne histopathologische Analytik nur Basis für die Diagnose einer möglichen Schimmelpilzinfektion (Boch et al. 2016; Donnelly et al. 2020).

Die morphologische Charakterisierung der angezüchteten Pilze basierend auf makroskopischer Untersuchung und Mikroskopie ist ein wichtiger Bestandteil der Speziesidentifikation. Jedoch wird diese aufgrund der nicht optimalen Standardisierbarkeit von Untersucher-unabhängigen Verfahren abgelöst. Hierzu zählen neben massenspektrometrischen Ansätzen (MALDI-TOF; (De Carolis et al. 2012; Normand et al. 2017) insbesondere molekulare Methoden (Freeman Weiss, Leon, and Koo 2021; Lamoth and Calandra 2017; Lass-Flörl 2019). Die molekulare Speziesidentifikation basiert auf der Amplifikation spezifischer Regionen des Erregergenoms und der Sequenzierung der resultierenden Amplifikate. Zielregionen sind nicht-kodierende ribosomale, *internal transcribed spacer* (ITS) Abschnitte sowie die für β -Tubulin oder Calmodulin kodierenden Gene (Lass-Flörl 2019). Diese Methodik ist jedoch nicht routinemäßig in jedem Labor verfügbar (Balajee et al. 2009; Lamoth and Calandra 2017).

2.2.3 Kultur-unabhängige Erregernachweise: Detektion von Zellwandbestandteilen (Antigen-Tests)

Unspezifische Symptome und radiologische Zeichen sowie fehlende Sensitivität bei konventionellen Kulturmethoden sind die Hauptschwierigkeiten bei der Diagnose der IMIs. Daher wurden Antigen-Nachweisverfahren in den letzten beiden Jahrzehnten zu einem der Eckpfeiler der Diagnostik invasiver Aspergillosen. Antigen-basierte, kulturunabhängige Verfahren haben das Ziel pilzspezifische Zellwandkomponenten nachzu-

2.2.3.1 Galactomannan (GM) und andere *Aspergillus*-Antigene

Als früher und sensitiver Marker einer invasiven Aspergillose hat sich der Nachweis von Galactomannan bewährt. Galactomannan ist ein Polysaccharid der Pilz-Zellwand und wird meist mittels eines Enzymimmunoassays (EIAs) nachgewiesen (Boch et al. 2016). Die Durchführung der Testung dauert ca. 2½ Stunden. Die Galactomannan-Assays sind für Serum- und BAL-Proben validiert (Lamoth and Calandra 2017).

Durch die Einführung der antifungalen Prophylaxe bei hämatologisch-onkologischen Patienten hat die Sensitivität der Bestimmung aus Serum deutlich abgenommen. In den letzten 10 Jahren hat man daher die Galactomannan-Messung aus

Epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass mit einer Zunahme von *Aspergillus*-Isolaten mit erworbenen Resistenzen gerechnet werden muss. Resistenzen gegenüber Azolen sind hierbei besonders relevant (Bassetti et al. 2020; Lestrade et al. 2019). Aus diesem Grund ist die kulturelle Anzucht nicht nur für die Speziesidentifikation relevant, sondern auch für die Möglichkeit einer Empfindlichkeitsprüfung. Diese basiert in den meisten Laboratorien auf den Empfehlungen der EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (Bassetti et al. 2020). Da die empfohlene Referenzmethode (Mikrodilution) technisch aufwendig ist, wird sie meistens durch einen Gradientendiffusionsassay (z. B. E-Test) ersetzt. Deren Bewertung ist nicht einfach, da die Ergebnisse bei Verwendung der Referenzmethode und der Gradientendiffusionsassays nicht immer übereinstimmen. Dennoch erscheint der Gradientendiffusionsassay ein geeignetes Testformat zu sein, welches die Erkennung von erworbenen Resistenzen gegenüber Azolen oder Amphotericin B möglich macht.

weisen. Die derzeit am häufigsten verwendeten Zielantigene sind das Galactomannan („*Aspergillus*-Antigen“) zum Nachweis von *Aspergillus* spp. und das nahezu panfungale (1→3)- β -D-Glucan zum Nachweis verschiedener Pilze, wie *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Pneumocystis jirovecii*, *Fusarium* spp. u. a. (Held 2015). Beide Antigene sind nicht für den direkten Nachweis von *Mucorales* geeignet (Boch et al. 2016).

BAL-Flüssigkeit favorisiert. Die Durchführung aus BAL ist gut geeignet für den Nachweis einer pulmonalen Aspergillose und hat eine höhere Sensitivität als Zytologie, Kultur oder transbronchiale Biopsien (Nguyen et al. 2011; Patterson and Donnelly 2019). Insbesondere im Vergleich zur Bestimmung aus Serum ist die Sensitivität des Galactomannan-Nachweises in BAL-Proben deutlich höher (47 % versus 85 %) (Patterson and Donnelly 2019). Dies wurde in zwei Meta-Analysen, die für die Galactomannan-Testung in BAL eine Sensitivität von 85–90 % und eine Spezifität von 90–95 % fanden, bestätigt (Guo et al. 2010; Lamoth 2016; Lamoth and Calandra 2017; Zou et al. 2012). An dieser Stelle muss jedoch erneut

darauf hingewiesen werden, dass sowohl mikroskopische, kulturelle als auch Antigennachweise aus BALs nicht zwischen einer Kolonisation und einer Infektion unterscheiden können. Zwar sprechen hohe Keimzahlen bzw. Antigenkonzentrationen für eine Infektion, aber eine Kolonisation ist nicht ausgeschlossen.

Die EIA-basierten Galactomannan-Assays haben den Nachteil, dass die Bestimmung meist nur zwei bis dreimal pro Woche erfolgt. Bis zur Ergebnismitteilung können daher im ungünstigsten Fall 3–4 Tage vergehen. Eine zeitnahe Testung von *Aspergillus*-Antigenen lässt sich mit Hilfe immunochromatographischer Schnelltests realisieren. Zwei dieser sog. „Lateral Flow Assays“ (LFA) sind mittlerweile kommerziell erhältlich. Sie detektieren Galactomannan bzw. ein extrazelluläres Glykoprotein-Antigen das während des *Aspergillus*-Wachstums in den Spitzen der Hyphen gebildet wird (Patterson and Donnelly 2019). Die Durchführung kann in jedem Labor erfolgen und dauert weniger als eine Stunde. Da der Testablauf eine Inkubation bei 100–120 °C und einen Zentrifugationsschritt beinhaltet, handelt es sich aber um keine echten „point-of-care“-Tests. Lediglich eine klare, flüssige BAL kann in einem der beiden Assays laut Hersteller direkt auf dem Teststreifen eingesetzt werden. Die diagnostische Leistungsfähigkeit der *Aspergillus*-Schnelltests aus BAL und Serum ist mit der des herkömmlichen Galactomannan-EIA vergleichbar (Jenks, Miceli, et al. 2020; Jenks, Prattes, et al. 2020). Es empfiehlt sich unbedingt, insbesondere für schwach-positive Ergebnisse, ein digitales Ablesegerät zu verwenden (Mercier et al. 2020). Die Schnelltests stellen eine echte Alternative zur bisherigen Testung dar und ermöglichen auch außerhalb großer Kliniken eine zeitnahe Antigendiagnostik.

Die Testung auf Galactomannan erfolgt entweder Symptomgetriggert oder als Screening. Insbesondere bei Hochrisikopatienten ohne Schimmelpilzprophylaxe wird ein Screening mit zweimal wöchentlicher Bestimmung des Galactomannans als ratsam bewertet (Ruhnke et al. 2018).

Ein positiver *Aspergillus*-Galactomannan-Test unterstützt bei einer entsprechenden klinischen oder radiologischen Befundkonstellation die Diagnose einer invasiven *Aspergillus*-Infektion. Zudem hat die Galactomannan-Bestimmung auch prognostischen Nutzen, denn erhöhte Galactomannan-Werte bei Diagnosestellung und steigende oder stationäre Werte unter Therapie sind für den weiteren Verlauf des Patienten ungünstig (Miceli et al. 2008).

Bei der Verwendung von Galactomannan als Biomarker müssen auch Fallstricke beachtet werden. Es existieren bestimmte Medikamente, wie z. B. Piperacillin/Tazobactam, die zu falsch-positiven Serumwerten führen können. Mittlerweile scheint das Problem für das Originalpräparat behoben zu sein, aber Generika können nach wie vor die Galactomannan-Werte beeinflussen (Demiraslan et al. 2017). Aufgrund möglicher falsch-positiver Ergebnisse sollten daher alle erhöhten Galactomannan-Werte stets mit einer neuen Probe kontrolliert werden. Zudem schließt ein negativer Befund eine Aspergillose nicht sicher aus, da es bei einer Infektion nicht zu einem ständigen Vorhandensein von Antigenen im Blut kommt. Bei weiter bestehendem klinischem Verdacht und negativem Galactomannan-Ergebnis sollte der Test daher in kurzen Zeitabständen wiederholt werden (Arvanitis et al. 2014; Lamoth and Calandra 2017; Lass-Flörl and Cuenca-Estrella 2017). Obwohl die Galactomannan-EIAs zum Nachweis von *Aspergillus* entwickelt worden sind, kann es zu Kreuzreaktionen mit anderen Pilzen, wie z. B. *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. und *Candida* spp. kommen (Aigner et al. 2019; Tortorano et al. 2012). Die Spezifität der Galactomannan-Testung kann durch Kombination mit einer *Aspergillus*-spezifischen PCR gesteigert werden (Lamoth 2016; Patterson and Donnelly 2019; Tong, Shen, and Xu 2018).

Da *Mucorales* kein Galactomannan besitzen, ist es für deren Nachweis ungeeignet. Ein negativer Galactomannan-Test erhöht jedoch bei starkem klinischem Verdacht auf eine IMI die Wahrscheinlichkeit einer Mukormykose (Lamoth and Calandra 2017). Auch ein positiver Galactomannan-Test schließt eine Mukormykose als Ursache nicht sicher aus, da Doppelinfektionen mit *Aspergillus* vorkommen können. (Vehreschild and 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).

2.2.3.2 (1→3)-β-D-Glucan

(1→3)-β-D-Glucan (BDG) ist ein Hauptbestandteil der Zellwand nahezu aller Pilze. Lediglich *Mucorales* produzieren kein BDG und auch *Cryptococcus neoformans* und *Blastomyces dermatitidis* können nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Bei Patienten mit invasiven Mykosen oder solchen mit hohem Risiko eine invasive Mykose zu entwickeln ist BDG im Serum nachweisbar. Das Ergebnis lässt jedoch keine eindeutige Unterscheidung zwischen Infektionen mit *Aspergillus* oder anderen Pilzen (z. B. *Pneumocystis jirovecii*, *Candida* spp.) zu (Held 2015).

Der BDG-Nachweis erfolgt über eine Limulus-Amöbozyten-Lysat-Reaktion. Die Testdurchführung dauert ca. 1 Stunde. Es existieren mittlerweile mehrere Assays, die teilweise auch mit einzelnen Patientenproben durchgeführt werden können, so dass eine Testung auch außerhalb großer Zentren möglich ist. Trotzdem ist die Verfügbarkeit der BDG-Testung in Deutschland gering und es existieren nur ein wenige Labore, die eine BDG-Bestimmung anbieten.

Basierend auf den Ergebnissen von vier großen Meta-Analysen werden eine Sensitivität von 60–80 % und eine Spezifität von 80–90 % bei Bestimmung aus Serum angegeben (Lamoth and Calandra 2017). Es scheint also, dass die diagnostische Leistungsfähigkeit von BDG und Galactomannan ähnlich ist. Ein direkter Vergleich beider Biomarker bei hämatologischen Patienten mit invasiver Aspergillose erbrachte jedoch eine Sensitivität von 77 % für BDG und 60 % für Galactomannan. Im Gegensatz dazu betrug die Spezifität von BDG 87 % und die von Galactomannan 97 % (Pini et al. 2016). Diese Zahlen decken sich auch mit unseren eigenen Erfahrungen nach denen BDG aus Serum der etwas sensitivere Biomarker ist und Galactomannan eine höhere Spezifität aufweist.

Während Galactomannan mittlerweile vorwiegend aus BAL bestimmt wird, ist eine Bestimmung von BDG aus BAL nicht sinnvoll. BAL-Proben sind meist mit Sprosspilzen kontaminiert. Diese werden jedoch durch den panfungalen BDG-Assay detektiert, was zu einer inakzeptabel niedrigen Spezifität von 67 % bei der Diagnose der invasiven Aspergillose führt (Rose et al. 2014). Wie weiter oben erwähnt, können auch Galactomannan-Tests eine Kreuzreaktivität mit *Candida* spp. aufweisen. Diese macht sich jedoch erst bei höheren *Candida*-Konzentrationen ($\geq 10^4$ /ml) mit falsch-positiven Ergebnissen bemerkbar macht (Aigner et al. 2019). Mittlerweile gibt es auch Daten zu einer Kombination der Galactomannan-Testung aus BAL und der BDG-Testung aus Serum. Durch die Kombination konnte die Sensitivität im Vergleich zu den Einzelbestimmungen gesteigert werden (Boch et al. 2018).

Die Anzahl von Störfaktoren, die zu diagnostisch falsch-positiven Ergebnissen führen kann, ist bei den BDG-Assays höher als bei den Galactomannan-Assays. Glucan gelangt entweder

beim Aufreinigungsprozess in die Substanzen (z. B. fraktionierte Blutprodukte) oder wird aus den Stoffen freigesetzt (z. B. aus Bauchtüchern bei Operationen) (Finkelman 2020). Da es Unterschiede zwischen verschiedenen Herstellern und Chargen gibt, ist es im Einzelfall schwierig zu beurteilen, welchen Einfluss die Störfaktoren wirklich haben. Gesicherte Störfaktoren der BDG-Bestimmung sind die Verabreichung von intravenösen Immunglobulinen, Humanalbumin und Erythrozytenkonzentraten sowie größere Operationen (Held and Wagner 2011; Liss et al. 2016; Lo Cascio et al. 2015). Auch Infektionen durch Nokardien und *Pseudomonas aeruginosa* wurden mit erhöhten BDG-Werten in Zusammenhang gebracht (Mennink-Kersten, Ruegebrink, and Verweij 2008). Die BDG-Werte normalisieren sich im Allgemeinen innerhalb von 3–7 Tagen wieder (Held and Wagner 2011; Kana-mori et al. 2009).

Ein fehlender BDG-Nachweis oder Nachweise in niedriger Konzentration haben einen hohen negativ prädiktiven Wert für eine invasive Pilzinfektion. Daher wird neben der Strategie einen positiven BDG-Test als Hinweis auf eine invasive Aspergillose zu werten, zunehmend der hohe negativ prädiktive Wert der BDG-Bestimmung benutzt, um diese auszuschließen.

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 and Calandra 2017).

In zunehmendem Maße werden auch andere Materialien auf das Vorhandensein fungaler Biomarker untersucht. Falls-erien gibt es z. B. zur Verwendung von Liquor bei v. a. invasive ZNS-Mykosen. Sowohl Galactomannan als auch BDG zeigen bei ZNS-Mykosen aus Liquor eine höhere Sensitivität als aus Serum und eine Bestimmung aus diesem Material erscheint daher sinnvoll (Lyons et al. 2015; Mikulska et al. 2013). Sowohl EORTC/MSG als auch ECIL-Gremien haben daher den Einsatz der Galactomannan-Testung zur Diagnose der zerebralen Aspergillose validiert (Sensitivität 88 %, Spezifität 96 %) (Chong et al. 2016; Lamoth 2016)

Fazit Galactomannan- und BDG-Test:

- Pilzantigenbestimmungen sind ein wichtiger Bestandteil der Diagnostik invasiver Aspergillosen. Für *Mucorales*-Infektionen existieren keine Biomarker.
- Sowohl die Galactomannan- als auch die BDG-Testung sind von Bedeutung für die Routine-Diagnose der invasiven Aspergillose bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen während der Hochrisikoperiode (z. B. Neutropenie oder nach allogener HSCT).
- Die Bewertung ist limitiert bei anderen Patientengruppen wie Organtransplantat-Empfängern oder bei nicht-neutropenischen Patienten, bei denen die Prävalenz der invasiven Aspergillose geringer und die Sensitivität der Testergebnisse vermindert ist.
- Bei Hochrisikopatienten kann Galactomannan- oder BDG-Monitoring (einmal oder zweimal pro Woche) hilfreich sein für die frühe Entdeckung einer invasiven Aspergillose (Lamoth 2016).
- Die Bestimmung des Galactomannan sollte aus BAL und die des BDG aus Serum erfolgen. Die Testung von Liquor ist außerhalb der Validierung ebenfalls möglich.
- Eine Kombination beider Parameter kann die Sensitivität erhöhen.
- *Aspergillus*-Schnelltests stellen eine Alternative zur klassischen Galactomannan-Testung dar.
- Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen Störfaktoren berücksichtigt werden, die zu falsch-positiven Biomarker-Werten führen.

2.2.4 Schimmelpilznachweise mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, in einem klinischen Material kultur-unabhängig mikrobielle DNA oder RNA zu amplifizieren und hierüber nachzuweisen. Der Nachweis von DNA oder RNA eines Erregers kann auf eine Infektion hinweisen. Im Vergleich zu konventionellen Verfahren des Erregernachweises ist die PCR durch eine höhere Geschwindigkeit bis zum Vorliegen eines Ergebnisses gekennzeichnet. Zudem ist die Methode potentiell durch eine hohe Spezifität

2.2.4.1 *Aspergillus*-PCR

Für die *Aspergillus*-Diagnostik kommen *Aspergillus*-spezifische Primer zur Anwendung, aber auch panfungale Primer, mit deren Hilfe *Aspergillus*-Arten ebenfalls nachgewiesen werden können. 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 and Hanson 2016). Aufgrund fehlender Standardisierung und Validierung sind PCR-Verfahren, deren Stellenwert seit vielen Jahren Gegenstand von Diskussionen ist, bisher nur für den Nachweis in mikroskopisch positiven Paraffinschnitten als Kriterium für eine nachgewiesene Aspergillose festgelegt worden (Donnelly et al. 2020; Rogers 2020). 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 and 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 and Huber 2018).

Um eine Aufnahme der *Aspergillus*-PCR in die EORTC/MSG-Guideline zu erreichen, wurde die European *Aspergillus* PCR Initiative (EAPCRI) gegründet. Ziel von 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 and 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. Wäh-

rend 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 betrug diese Parameter bei Zentren mit abweichenden Protokollen 57,7 %, 77,2 % und 8,9 % (Patterson and Donnelly 2019; White et al. 2010).

Faktoren mit dem größten Einfluss auf die analytische Performance einer PCR waren die Art des Zellaufschlusses, die Methodik der Nukleinsäureextraktion sowie die Verwendung einer internen Kontroll-PCR. Viele der Probleme könnten sich durch die zunehmende Verfügbarkeit kommerzieller Testsysteme lösen (Rath and Steinmann 2018).

Die Ergebnisse des letzten Cochrane-Reviews zeigen, dass die PCR eine moderate diagnostische Genauigkeit für das invasive Aspergillose-Screening aufweist, aber einen hohen negativen prädiktiven Wert hat. Dieser macht es möglich, die Diagnose einer invasiven Aspergillose zumindest als weniger wahrscheinlich anzunehmen (Aguado et al. 2015; Cruciani et al. 2019; Patterson and Donnelly 2019; Ruhnke et al. 2018). Ein ungenügender positiver prädiktiver Wert limitiert jedoch die Möglichkeiten, die PCR zur Sicherung der Diagnosestellung bei niedriger Prävalenz der Erkrankung einzusetzen. Der Einsatz einer *Aspergillus*-PCR kann jedoch helfen, Schwächen der Antigen-basierten Analytik auszugleichen (Aguado et al. 2015; Patterson and 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).

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) kann als hinweisend für eine invasive Aspergillose bewertet werden (Ruhnke et al. 2018).
- Studien legen nahe, dass molekulare Diagnostikmethoden in Kombination mit Antigen-Detektion erfolgen sollen (Ruhnke et al. 2018). Hierdurch kann es gelingen, Patienten mit falsch-positiven Antigentesten zu identifizieren (Urabe et al. 2017).
- Die PCR hat nicht nur das Potenzial, eine invasive Aspergillose 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 and White 2016).
- Ein positiver PCR-Test trotz antimykotischer Behandlung identifiziert möglicherweise Patienten mit Break-through-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).

2.2.4.2 Mucorales-PCR

Wie bei der Aspergillose stehen für Mucorinfektionen PCR-Verfahren mit wechselnder Sensitivität und Spezifität für den Erregernachweis aus Atemwegsmaterial und Biopsien zur Ver-

fügung (Baldin et al. 2018; Guegan et al. 2020; Scherer et al. 2018; Vehreschild and Huber 2018).

Fazit Mucorales-PCR

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

Multiplex-PCR zum Nachweis von Schimmelpilzen

Da die Infektionserreger der IMI nicht nur *Aspergillus fumigatus*, sondern auch andere Schimmelpilze wie z. B. *Fusarium* spp. oder *Scedosporium* 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, konnten für den Nachweis von Non-Aspergillus-Schimmelpilzen entwickelt werden (Boch et al. 2015; Ruhnke et al. 2018).

Kommerziell verfügbare Testsysteme können bis zu 21 verschiedene Pilzerreger und Bakterien identifizieren, auch wenn die Patienten mit hämatologischen malignen Erkrankungen mit Antiinfektiva bei febriler Granulozytopenie behandelt werden. Diese Testsysteme wurde nicht nur bei Patienten mit hämatologischen Malignomen, sondern auch bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) eingesetzt. (Ruhnke et al. 2018).

3. Was ist erforderlich zur Diagnosestellung?

Die Sicherheit der IMI-Diagnose wird meist in Kategorien angegeben, z. B. als bewiesene (*proven*), wahrscheinliche (*probable, putative*) oder mögliche (*possible*) IMI. Die meisten Definitionen wurden jedoch entwickelt, um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen klinischen Studien zu gewährleisten und nicht um eine Therapieindikation abzuleiten. Trotzdem werden sie im klinischen Alltag benutzt, um die Diagnosesicherheit abzuschätzen. Da das klinische Bild und die Aussagekraft der diagnostischen Verfahren stark vom Patientenkollektiv abhängen, existieren mittlerweile mehrere Klassifikationen für hämatologisch-onkologische Patienten

(EORTC/MSG-Kriterien, (Donnelly et al. 2020)), Intensivpatienten im Allgemeinen (AspICU-Kriterien, (Blot et al. 2012)) und Intensivpatienten mit COVID-19 (ECMM/ISHAM-Kriterien, (Koehler et al. 2021)). Allen diesen Klassifikationen ist gemeinsam, dass eine IMI als bewiesen gilt, wenn man die Erreger in einem primär sterilen Material (z. B. Lungenbiopsie, Liquor) nachweist und klinische oder radiologische Zeichen einer Infektion von dieser Lokalisation vorliegen. Bei den Kriterien für eine wahrscheinliche und eine mögliche IMI unterscheiden sich die Klassifikationen teils erheblich. Die Kriterien sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Verschiedene Klassifikationen für eine wahrscheinliche (*probable* bzw. *putative*) invasive pulmonale Aspergillose nach EORTC/MSG, AspICU und ECMM/ISHAM-Kriterien für CAPA (Blot et al. 2012; Donnelly et al. 2020; Koehler et al. 2021).

| Klassifikation | EORTC/MSG | AspICU | ECMM/ISHAM-CAPA |
|--|--|---|---|
| Patientenkollektiv | Hämatologisch-onkologische Patienten | Intensivpatienten | Intensivpatienten mit COVID-19 |
| Prädispositionen (<i>host factors</i>) | <ul style="list-style-type: none"> – Neutropenie – Hämatologisches Malignom – HSZT – Organtransplantation – Längere Einnahme von Corticosteroiden – T-Zell- oder B-Zell-Immunsuppressiva – Angeborener schwerer Immundefekt – Akute GvHD des Darms, der Lunge oder der Leber refraktär auf Corticosteroide | <ul style="list-style-type: none"> – Neutropenie – Hämato-onkologisches Malignom unter Chemotherapie – Einnahme von Corticosteroiden – Angeborener oder erworbener Immundefekt oder Kultureller Nachweis (+ oder ++) aus BAL mit positiver Mikroskopie | COVID-19 |
| Klinische Faktoren | | <ul style="list-style-type: none"> – Fieber für 3 d, trotz geeigneter Antibiose – Ungeklärtes, erneutes Fieber, nach einem fieberfreien Intervall von ≥ 48 h trotz Antibiose – Dyspnoe – Hämoptysen – Pleurareiben oder Pleuritissschmerzen – Verschlechterung einer respiratorischen Insuffizienz trotz Antibiose und künstlicher Beatmung | <ul style="list-style-type: none"> – Fieber für 3 d, trotz geeigneter Antibiose – Ungeklärtes, erneutes Fieber, nach einem fieberfreien Intervall von ≥ 48 h trotz Antibiose – Hämoptysen – Pleurareiben oder Pleuritissschmerzen – Verschlechterung einer respiratorischen Insuffizienz (z.B. Tachypnoe oder steigender O₂-Bedarf) |
| Bildgebung | Nur CT-Thorax: <ul style="list-style-type: none"> – Noduläre Infiltrate +/- Halo – Luftsichelzeichen – Kaverne – keilförmige oder segmentale Konsolidierung | Jedes Infiltrat im CT- oder Röntgen-Thorax | Pulmonales Infiltrat oder kavernoöses Infiltrat |
| Kultur/Mikroskopie | Kultureller oder mikroskopischer Nachweis von Schimmelpilzen in respiratorischen Materialien | Kultureller Nachweis aus unterem Respirationstrakt | Kultureller oder mikroskopischer Nachweis von Schimmelpilzen in BAL |
| Biomarker | Galactomannan AI <ul style="list-style-type: none"> – in Serum <u>oder</u> BAL $\geq 1,0$ AI – in Serum $\geq 0,7$ <u>und</u> BAL $\geq 0,8$ | Galactomannan AI <ul style="list-style-type: none"> – in Serum $\geq 0,5$ – in BAL $\geq 1,0$ | Galactomannan IA oder LFA AI <ul style="list-style-type: none"> – in Serum $\geq 0,5$ – in BAL $\geq 1,0$ |
| <i>Aspergillus</i> -PCR | ≥ 2 positive PCRs aus Serum, BAL oder Serum + BAL | — | <ul style="list-style-type: none"> ≥ 2 positive PCRs aus Serum ≥ 1 positive PCR aus BAL mit ct-wert < 36 Zyklen ≥ 1 positive PCRs aus Serum und BAL |

4. Abschließende Bewertung / Fazit

Diagnostik / Nachweis invasiver *Aspergillus*-Infektionen

- Bildgebende Verfahren (Computertomographie), mikrobiologische Untersuchungen (direkte Mikroskopie, Kultur, Pilz-Biomarker, PCR) sowie Histopathologie sind die Säulen der IMI-Diagnostik (Lamoth and 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, einschließlich bildgebender Verfahren, Biomarkern (Galactomannan und BDG) und molekularen Methoden (PCR) (Lamoth 2016; Lamoth and Calandra 2017).
- Eine Kombination verschiedener Methoden mit 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 and 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).

Für die Diagnose der invasiven Mukormykose stehen deutlich weniger Testverfahren zur Verfügung als für die Diagnose der invasiven Aspergillose (Cornely et al. 2019), (Ruhnke et al. 2018). Die folgende Zusammenfassung berücksichtigt u. a.

Parameter, die in der „*Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis*“ zu Diagnose und Management der Mukormykose genannt werden (Cornely et al. 2019).

Diagnostik / Nachweis invasiver Mukormykose

- Risikopatienten sind solche mit schlecht kontrolliertem Diabetes mellitus, hämato-onkologischen Erkrankungen, Stammzell- oder Organtransplantation.
- Bildgebende Verfahren (CT oder MRT) sind unbedingt empfohlen zur Diagnosestellung und um das Ausmaß der Erkrankung zu bestimmen.
- Das reverse Halo-Zeichen oder ein Gefäßabbruch in der CT-Angiographie der Lunge sind bei hämatologischen Malignomen oder nach Stammzell-Transplantation hinweisend auf eine pulmonale Mukormykose
- Die Histopathologie und die direkte Mikroskopie mit optischen Aufhellern kann Pilzhyphen in Geweben nachweisen. Wie sicher die Unterscheidung zwischen *Aspergillus* spp. und *Mucorales* mit dieser Methode ist, ist unklar. Aus diesem Grund muss unbedingt eine Kultur, PCR oder *in-situ*-Hybridisierung stattfinden.
- Die Kultur ist zur Identifizierung und Resistenztestung unersetzbar. Eine zu starke Homogenisierung des Gewebes beim Kulturansatz ist zu vermeiden, da die *Mucorales* dabei zerstört werden. Die Kultur muss bei 30 und 37 °C erfolgen.

Fortsetzung nächste Seite

Diagnostik / Nachweis invasiver Mukormykose

- Die Resistenztestung dient in erster Linie zur Gewinnung epidemiologischer Daten. Die Empfehlung für eine Behandlung basierend auf der Resistenztestung wird nur marginal unterstützt. Sie ist aber in Fällen von Therapieversagen sinnvoll.
- Molekulare Methoden zum Erregernachweis werden, aufgrund der mangelnden Standardisierung der PCR-Verfahren, nur marginal empfohlen. Die Untersuchung frischer Biopsate sollte der von Paraffin-eingebetteten Materialien bevorzugt werden.
- Die Identifizierung auf Spezies-Ebene mittels molekularer Methoden wird stark unterstützt. Alternativ kann eine massenspektrometrische Identifizierung erfolgen (mäßige Empfehlung).
- Der Nachweis von DNA in Serum und anderen Körperflüssigkeiten stellt eine vielversprechende Methode für die Zukunft dar.

Literatur

- Aguado, J. M., L. Vazquez, M. Fernandez-Ruiz, T. Villaescusa, I. Ruiz-Camps, P. Barba, J. T. Silva, M. Batlle, C. Solano, D. Gallardo, I. Heras, M. Polo, R. Varela, C. Vallejo, T. Olave, J. Lopez-Jimenez, M. Rovira, R. Parody, M. Cuenca-Estrella, Pcraga Study Group, Group Spanish Stem Cell Transplantation, Microbiology Study Group of Medical Mycology of the Spanish Society of Clinical, Diseases Infectious, and Diseases Spanish Network for Research in Infectious. 2015. 'Serum galactomannan versus a combination of galactomannan and polymerase chain reaction-based *Aspergillus* DNA detection for early therapy of invasive aspergillosis in high-risk hematological patients: a randomized controlled trial', *Clin Infect Dis*, 60: 405–14.
- Ahmadikia, K., S. J. Hashemi, S. Khodavaisy, M. I. Getso, N. Alijani, H. Badali, H. Mirhendi, M. Salehi, A. Tabari, M. Mohammadi Ardehali, M. Kord, E. Roilides, and S. Rezaie. 2021. 'The double-edged sword of systemic corticosteroid therapy in viral pneumonia: A case report and comparative review of influenza-associated mucormycosis versus COVID-19 associated mucormycosis', *Mycoses*.
- Aigner, M., M. Wanner, P. Kreidl, C. Lass-Flörl, and M. Lackner. 2019. 'Candida in the Respiratory Tract Potentially Triggers Galactomannan Positivity in Nonhematological Patients', *Antimicrob Agents Chemother*, 63.
- Alexander, B. D., F. Lamoth, C. P. Heussel, C. S. Prokop, S. R. Desai, C. O. Morrissey, and J. W. Baddley. 2021. 'Guidance on Imaging for Invasive Pulmonary Aspergillosis and Mucormycosis: From the Imaging Working Group for the Revision and Update of the Consensus Definitions of Fungal Disease from the EORTC/MSGERC', *Clin Infect Dis*, 72: S79–S88.
- Arvanitis, M., P. D. Ziakas, I. M. Zacharioudakis, F. N. Zervou, A. M. Caliendo, and E. Mylonakis. 2014. 'PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance', *J Clin Microbiol*, 52: 3731–42.
- Baddley, J. W., J. M. Stephens, X. Ji, X. Gao, H. T. Schlamm, and M. Tarallo. 2013. 'Aspergillosis in Intensive Care Unit (ICU) patients: epidemiology and economic outcomes', *BMC Infect Dis*, 13: 29.
- Balajee, S. A., A. M. Borman, M. E. Brandt, J. Cano, M. Cuenca-Estrella, E. Dannaoui, J. Guarro, G. Haase, C. C. Kibbler, W. Meyer, K. O'Donnell, C. A. Petti, J. L. Rodriguez-Tudela, D. Sutton, A. Velegriaki, and B. L. Wickes. 2009. '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*, 47: 877–84.
- Baldin, C., S. S. M. Soliman, H. H. Jeon, S. Alkhazraji, T. Gebremariam, Y. Gu, V. M. Bruno, O. A. Cornely, H. L. Leather, M. W. Sugrue, J. R. Wingard, D. A. Stevens, J. E. Edwards, Jr., and A. S. Ibrahim. 2018. 'PCR-Based Approach Targeting *Mucorales*-Specific Gene Family for Diagnosis of Mucormycosis', *J Clin Microbiol*, 56.
- Barnes, R. A., and P. L. White. 2016. 'PCR Technology for Detection of Invasive Aspergillosis', *J Fungi (Basel)*, 2.
- Barnes, R. A., P. L. White, C. O. Morton, T. R. Rogers, M. Cruciani, J. Loeffler, and J. P. Donnelly. 2018. 'Diagnosis of aspergillosis by PCR: Clinical considerations and technical tips', *Med Mycol*, 56: 60–72.
- Bassetti, M., and E. Bouza. 2017. 'Invasive mould infections in the ICU setting: complexities and solutions', *J Antimicrob Chemother*, 72: i39–47.
- Bassetti, M., A. Vena, E. Bouza, M. Peghin, P. Munoz, E. Righi, F. Pea, M. Lackner, and C. Lass-Flörl. 2020. 'Antifungal susceptibility testing in *Candida*, *Aspergillus* and *Cryptococcus* infections: are the MICs useful for clinicians?', *Clin Microbiol Infect*, 26: 1024–33.
- Bitterman, R., E. Hardak, M. Raines, A. Stern, T. Zuckerman, Y. Ofra, N. Lavi, L. Guralnik, A. Frisch, O. Nudelman, M. Paul, and I. Oren. 2019. 'Baseline Chest Computed Tomography for Early Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Hemato-oncological Patients: A Prospective Cohort Study', *Clin Infect Dis*, 69: 1805–08.
- Blot, S. I., F. S. Taccone, A. M. Van den Abeele, P. Bulpa, W. Meersseman, N. Brusselaers, G. Dimopoulos, J. A. Paiva, B. Misset, J. Rello, K. Vandewoude, D. Vogelaers, and I. C. U. Study Investigators. 2012. 'A clinical algorithm to diagnose invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients', *Am J Respir Crit Care Med*, 186: 56–64.
- Boch, T., M. Reinwald, P. Postina, O. A. Cornely, J. J. Vehreschild, C. P. Heussel, W. J. Heinz, M. Hoenigl, S. Eigl, T. Lehrnbecher, J. Hahn, B. Claus, M. Lauten, G. Egerer, M. C. Müller, S. Will, N. Merker, W. K. Hofmann, D. Buchheidt, and B. Spiess. 2015. 'Identification of invasive fungal diseases in immunocompromised patients by combining an *Aspergillus* specific PCR with a multifungal DNA-microarray from primary clinical samples', *Mycoses*, 58: 735–45.
- Boch, T., M. Reinwald, B. Spiess, T. Liebrechts, P. Schellongowski, P. Meybohm, P. M. Rath, J. Steinmann, F. Trinkmann, S. Britsch, J. D. Michels, C. Jabbour, W. K. Hofmann, and D. Buchheidt. 2018. 'Detection of invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients by combined use of conventional culture, galactomannan, 1-3-beta-D-glucan and *Aspergillus* specific nested polymerase chain reaction in a prospective pilot study', *J Crit Care*, 47: 198–203.
- Boch, T., B. Spiess, O. A. Cornely, J. J. Vehreschild, P. M. Rath, J. Steinmann, W. J. Heinz, J. Hahn, S. W. Krause, M. G. Kiehl, G. Egerer, T. Liebrechts, M. Koldehoff, M. Klein, F. Nolte, M. C. Mueller, N. Merker, S. Will, M. Mossner, H. Popp, W. K. Hofmann, M. Reinwald, and D. Buchheidt. 2016. '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*, 22: 862–68.

Caillot, D., V. Latrabe, A. Thiebaut, R. Herbrecht, S. De Botton, A. Pigneux, F. Monchecourt, L. Mahi, S. Alfandari, and J. F. Couaillier. 2010. 'Computer tomography in pulmonary invasive aspergillosis in hematological patients with neutropenia: an useful tool for diagnosis and assessment of outcome in clinical trials', *Eur J Radiol*, 74: e172–5.

Chamilos, G., M. Luna, R. E. Lewis, G. P. Bodey, R. Chemaly, J. J. Tarrand, A. Safdar, Raad, II, and D. P. Kontoyiannis. 2006. '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*, 91: 986–9.

Chitasombat, M. N., and D. P. Kontoyiannis. 2015. 'The 'cephalosporin era' of triazole therapy: isavuconazole, a welcomed newcomer for the treatment of invasive fungal infections', *Expert Opin Pharmacother*, 16: 1543–58.

Chong, G. M., J. A. Maertens, K. Lagrou, G. J. Driessen, J. J. Cornelissen, and B. J. Rijnders. 2016. 'Diagnostic Performance of Galactomannan Antigen Testing in Cerebrospinal Fluid', *J Clin Microbiol*, 54: 428–31.

Chong, W. H., and K. P. Neu. 2021. 'The Incidence, Diagnosis, and Outcomes of COVID-19-associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA): A Systematic Review', *J Hosp Infect*.

Cornely, O. A., A. Alastruey-Izquierdo, D. Arenz, S. C. A. Chen, E. Dannaoui, B. Hochhegger, M. Hoenigl, H. E. Jensen, K. Lagrou, R. E. Lewis, S. C. Mellinshoff, M. Mer, Z. D. Pana, D. Seidel, D. C. Sheppard, R. Wahba, M. Akova, A. Alanio, A. M. S. Al-Hatmi, S. Arikan-Akdagli, H. Badali, R. Ben-Ami, A. Bonifaz, S. Bretagne, E. Castagnola, M. Chayakulkeeree, A. L. Colombo, D. E. Corzo-Leon, L. Drgona, A. H. Groll, J. Guinea, C. P. Heussel, A. S. Ibrahim, S. S. Kanj, N. Klimko, M. Lackner, F. Lamoth, F. Lanternier, C. Lass-Floerl, D. G. Lee, T. Lehrnbecher, B. E. Lmimouni, M. Mares, G. Maschmeyer, J. F. Meis, J. Meletiadis, C. O. Morrissey, M. Nucci, R. Oladele, L. Pagano, A. Pasqualotto, A. Patel, Z. Racil, M. Richardson, E. Roilides, M. Ruhnke, S. Seyedmousavi, N. Sidharthan, N. Singh, J. Sinko, A. Skiada, M. Slavin, R. Soman, B. Spellberg, W. Steinbach, B. H. Tan, A. J. Ullmann, J. J. Vehreschild, Mjgt Vehreschild, T. J. Walsh, P. L. White, N. P. Wiederhold, T. Zaoutis, A. Chakrabarti, and Ecm M. S. G. Global Guideline Writing Group Mucormycosis. 2019. 'Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium', *Lancet Infect Dis*, 19: e405–e21.

Cornely, O. A., S. Arikan-Akdagli, E. Dannaoui, A. H. Groll, K. Lagrou, A. Chakrabarti, F. Lanternier, L. Pagano, A. Skiada, M. Akova, M. C. Arendrup, T. Boekhout, A. Chowdhary, M. Cuenca-Estrella, T. Freiburger, J. Guinea, J. Guarro, S. de Hoog, W. Hope, E. Johnson, S. Kathuria, M. Lackner, C. Lass-Flörl, O.

Lortholary, J. F. Meis, J. Meletiadis, P. Munoz, M. Richardson, E. Roilides, A. M. Tortorano, A. J. Ullmann, A. van Diepeningen, P. Verweij, G. Petrikos, Microbiology European Society of Clinical, Group Infectious Diseases Fungal Infection Study, and Mycology European Confederation of Medical. 2014. 'ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013', *Clin Microbiol Infect*, 20 Suppl 3: 5–26.

Cruciani, M., C. Mengoli, R. Barnes, J. P. Donnelly, J. Loeffler, B. L. Jones, L. Klingspor, J. Maertens, C. O. Morton, and L. P. White. 2019. 'Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people', *Cochrane Database Syst Rev*, 9: CD009551.

De Carolis, E., B. Posteraro, C. Lass-Flörl, A. Vella, A. R. Florio, R. Torelli, C. Girmenia, C. Colozza, A. M. Tortorano, M. Sanguinetti, and G. Fadda. 2012. '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*, 18: 475–84.

Demiraslan, H., M. A. Atalay, E. Eren, K. Demir, L. Kaynar, A. N. Koc, and M. Doganay. 2017. 'Assessing the risk of false positive serum galactomannan among patients receiving piperacillin/tazobactam for febrile neutropenia', *Med Mycol*, 55: 535–40.

Dignani, M. C. 2014. 'Epidemiology of invasive fungal diseases on the basis of autopsy reports', *F1000Prime Rep*, 6: 81.

Donnelly, J. P., S. C. Chen, C. A. Kauffman, W. J. Steinbach, J. W. Baddley, P. E. Verweij, C. J. Clancy, J. R. Wingard, S. R. Lockhart, A. H. Groll, T. C. Sorrell, M. Bassetti, H. Akan, B. D. Alexander, D. Andes, E. Azoulay, R. Bialek, R. W. Bradsher, S. Bretagne, T. Calandra, A. M. Caliendo, E. Castagnola, M. Cruciani, M. Cuenca-Estrella, C. F. Decker, S. R. Desai, B. Fisher, T. Harrison, C. P. Heussel, H. E. Jensen, C. C. Kibbler, D. P. Kontoyiannis, B. J. Kullberg, K. Lagrou, F. Lamoth, T. Lehrnbecher, J. Loeffler, O. Lortholary, J. Maertens, O. Marchetti, K. A. Marr, H. Masur, J. F. Meis, C. O. Morrissey, M. Nucci, L. Ostrosky-Zeichner, L. Pagano, T. F. Patterson, J. R. Perfect, Z. Racil, E. Roilides, M. Ruhnke, C. S. Prokop, S. Shoham, M. A. Slavin, D. A. Stevens, G. R. Thompson, J. A. Vazquez, C. Viscoli, T. J. Walsh, A. Warris, L. J. Wheat, P. L. White, T. E. Zaoutis, and P. G. Pappas. 2020. 'Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium', *Clin Infect Dis*, 71: 1367–76.

Finkelman, M. A. 2020. 'Specificity Influences in (1->3)-beta-d-Glucan-Supported Diagnosis of Invasive Fungal Disease', *J Fungi (Basel)*, 7.

Freeman Weiss, Zoe, Armando Leon, and Sophia Koo. 2021. 'The Evolving Landscape of Fungal Diagnostics, Current and Emerging Microbiological Approaches', *Journal of Fungi*, 7: 127.

- Garg, D., V. Muthu, I. S. Sehgal, R. Ramachandran, H. Kaur, A. Bhalla, G. D. Puri, A. Chakrabarti, and R. Agarwal. 2021. 'Coronavirus Disease (Covid-19) Associated Mucormycosis (CAM): Case Report and Systematic Review of Literature', *Mycopathologia*, 186: 289–98.
- Godet, C., A. Elsendoorn, and F. Roblot. 2012. 'Benefit of CT scanning for assessing pulmonary disease in the immunodepressed patient', *Diagn Interv Imaging*, 93: 425–30.
- Godoy, M. C., C. Viswanathan, E. Marchiori, M. T. Truong, M. F. Benveniste, S. Rossi, and E. M. Marom. 2012. 'The reversed halo sign: update and differential diagnosis', *Br J Radiol*, 85: 1226–35.
- Guegan, H., X. Iriart, M. E. Bougnoux, A. Berry, F. Robert-Gangneux, and J. P. Gangneux. 2020. 'Evaluation of MucorGenius(R) mucorales PCR assay for the diagnosis of pulmonary mucormycosis', *J Infect*, 81: 311–17.
- Guo, Y. L., Y. Q. Chen, K. Wang, S. M. Qin, C. Wu, and J. L. Kong. 2010. 'Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review', *Chest*, 138: 817–24.
- Held, J. 2015. '(1,3)- β -D-Glucan: Ein fungaler Biomarker mit Potenzial und Fallstricken', *Der Mikrobiologe*, Heft 3.
- Held, J., and D. Wagner. 2011. 'beta-d-Glucan kinetics for the assessment of treatment response in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia', *Clin Microbiol Infect*, 17: 1118–22.
- Jenks, J. D., M. H. Miceli, J. Prattes, T. Mercier, and M. Hoenigl. 2020. 'The *Aspergillus* Lateral Flow Assay for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis: an Update', *Curr Fungal Infect Rep*: 1–6.
- Jenks, J. D., J. Prattes, J. Frank, B. Spiess, S. R. Mehta, T. Boch, D. Buchheidt, and M. Hoenigl. 2020. 'Performance of the Bronchoalveolar Lavage Fluid *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay with Cube Reader for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis: a Multicenter Cohort Study', *Clin Infect Dis*.
- Kanamori, H., K. Kanemitsu, T. Miyasaka, K. Ameku, S. Endo, T. Aoyagi, K. Inden, M. Hatta, N. Yamamoto, H. Kunishima, H. Yano, K. Kaku, Y. Hirakata, and M. Kaku. 2009. 'Measurement of (1-3)-beta-D-glucan derived from different gauze types', *Tohoku J Exp Med*, 217: 117–21.
- Kelly, B. T., K. M. Pennington, and A. H. Limper. 2020. 'Advances in the diagnosis of fungal pneumonias', *Expert Rev Respir Med*, 14: 703–14.
- Koehler, P., M. Bassetti, A. Chakrabarti, S. C. A. Chen, A. L. Colombo, M. Hoenigl, N. Klimko, C. Lass-Flörl, R. O. Oladele, D. C. Vinh, L. P. Zhu, B. Boll, R. Bruggemann, J. P. Gangneux, J. R. Perfect, T. F. Patterson, T. Persigehl, J. F. Meis, L. Ostrosky-Zeichner, P. L. White, P. E. Verweij, O. A. Cornely, Mycology European Confederation of Medical, Mycology International Society for Human Animal, Group Asia Fungal Working, Infocus Latam Isham Working Group, Isham Pan Africa Mycology Working Group, Microbiology European Society for Clinical, Group Infectious Diseases Fungal Infection Study, Escmid Study Group for Infections in Critically Ill Patients, Microbiology Interregional Association of Clinical, Chemotherapy Antimicrobial, Nigeria Medical Mycology Society of, Association Medical Mycology Society of China Medicine Education, Haematology Infectious Diseases Working Party of the German Society for, Oncology Medical, Microbiology Association of Medical, and Canada Infectious Disease. 2021. 'Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance', *Lancet Infect Dis*, 21: e149–e62.
- Lamoth, F. 2016. 'Galactomannan and 1,3-beta-d-Glucan Testing for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis', *J Fungi (Basel)*, 2.
- Lamoth, F., and T. Calandra. 2017. 'Early diagnosis of invasive mould infections and disease', *J Antimicrob Chemother*, 72: i19–i28.
- Lass-Flörl, C. 2019. 'How to make a fast diagnosis in invasive aspergillosis', *Med Mycol*, 57: S155–S60.
- Lass-Flörl, C., and M. Cuenca-Estrella. 2017. 'Changes in the epidemiological landscape of invasive mould infections and disease', *J Antimicrob Chemother*, 72: i5–i11.
- Lass-Flörl, C., G. Resch, D. Nachbaur, A. Mayr, G. Gastl, J. Auberger, R. Bialek, and M. C. Freund. 2007. 'The value of computed tomography-guided percutaneous lung biopsy for diagnosis of invasive fungal infection in immunocompromised patients', *Clin Infect Dis*, 45: e101–4.
- Lestrade, P. P., R. G. Bentvelsen, Afad Schouwvlieghe, S. Schalekamp, Wjfm van der Velden, E. J. Kuiper, J. van Paassen, B. van der Hoven, H. A. van der Lee, W. J. G. Melchers, A. F. de Haan, H. L. van der Hoeven, B. J. A. Rijnders, M. T. van der Beek, and P. E. Verweij. 2019. 'Voriconazole Resistance and Mortality in Invasive Aspergillosis: A Multicenter Retrospective Cohort Study', *Clin Infect Dis*, 68: 1463–71.
- Lewis, R. E., L. Cahyame-Zuniga, K. Leventakos, G. Chamilos, R. Ben-Ami, P. Tamboli, J. Tarrand, G. P. Bodey, M. Luna, and D. P. Kontoyiannis. 2013. 'Epidemiology and sites of involvement of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: a 20-year autopsy study', *Mycoses*, 56: 638–45.
- Lichtenstern, C., C. Herold, M. Mieth, T. Brenner, S. Decker, C. J. Busch, S. Hofer, S. Zimmermann, M. A. Weigand, and M. Bernhard. 2015. 'Relevance of *Candida* and other mycoses for morbidity and mortality in severe sepsis and septic shock due to peritonitis', *Mycoses*, 58: 399–407.

- Liss, B., O. A. Cornely, D. Hoffmann, V. Dimitriou, and H. Wisplinghoff. 2016. '1,3-ss-D-glucan concentrations in blood products predict false positive post-transfusion results', *Mycoses*, 59: 39–42.
- Lo Cascio, G., R. Koncan, G. Stringari, A. Russo, A. Azzini, A. Ugolini, M. Ligozzi, E. Polati, G. Cornaglia, E. Concia, and V. Schweiger. 2015. 'Interference of confounding factors on the use of (1,3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive candidiasis in the intensive care unit', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 34: 357–65.
- Lyons, J. L., K. T. Thakur, R. Lee, T. Watkins, C. A. Pardo, K. A. Carson, B. Markley, M. A. Finkelman, K. A. Marr, K. L. Roos, and S. X. Zhang. 2015. 'Utility of measuring (1,3)-beta-d-glucan in cerebrospinal fluid for diagnosis of fungal central nervous system infection', *J Clin Microbiol*, 53: 319–22.
- Maertens, J. A., Raad, II, K. A. Marr, T. F. Patterson, D. P. Kontoyiannis, O. A. Cornely, E. J. Bow, G. Rahav, D. Neofytos, M. Aoun, J. W. Baddley, M. Giladi, W. J. Heinz, R. Herbrecht, W. Hope, M. Karthaus, D. G. Lee, O. Lortholary, V. A. Morrison, I. Oren, D. Selleslag, S. Shoham, G. R. Thompson, 3rd, M. Lee, R. M. Maher, A. H. Schmitt-Hoffmann, B. Zeiher, and A. J. Ullmann. 2016. '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*, 387: 760–9.
- Marr, K. A., H. T. Schlamm, R. Herbrecht, S. T. Rottinghaus, E. J. Bow, O. A. Cornely, W. J. Heinz, S. Jagannatha, L. P. Koh, D. P. Kontoyiannis, D. G. Lee, M. Nucci, P. G. Pappas, M. A. Slavin, F. Queiroz-Telles, D. Selleslag, T. J. Walsh, J. R. Wingard, and J. A. Maertens. 2015. 'Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis: a randomized trial', *Ann Intern Med*, 162: 81–9.
- Meersseman, W., K. Lagrou, J. Maertens, and E. Van Wijngaerden. 2007. 'Invasive aspergillosis in the intensive care unit', *Clin Infect Dis*, 45: 205–16.
- Mellinghoff, S. C., J. Panse, N. Alakel, G. Behre, D. Buchheidt, M. Christopheit, J. Hasenkamp, M. Kiehl, M. Koldehoff, S. W. Krause, N. Lehnert, M. von Lilienfeld-Toal, A. Y. Lohnert, G. Maschmeyer, D. Teschner, A. J. Ullmann, O. Penack, M. Ruhnke, K. Mayer, H. Ostermann, H. H. Wolf, and O. A. Cornely. 2018. '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*, 97: 197–207.
- Mennink-Kersten, M. A., D. Ruegebrink, and P. E. Verweij. 2008. 'Pseudomonas aeruginosa as a cause of 1,3-beta-D-glucan assay reactivity', *Clin Infect Dis*, 46: 1930–1.
- Mercier, T., A. Dunbar, E. de Kort, A. Schauwvlieghe, M. Reynders, E. Guldentops, N. M. A. Blijlevens, A. G. Vonk, B. Rijnders, P. E. Verweij, K. Lagrou, and J. Maertens. 2020. 'Lateral flow assays for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in adult hematology patients: A comparative multicenter study', *Med Mycol*, 58: 444–52.
- Miceli, M. H., M. L. Graziutti, G. Woods, W. Zhao, M. H. Kocoglu, B. Barlogie, and E. Anaissie. 2008. 'Strong correlation between serum aspergillus galactomannan index and outcome of aspergillosis in patients with hematological cancer: clinical and research implications', *Clin Infect Dis*, 46: 1412–22.
- Mikulska, M., E. Furfaro, V. Del Bono, A. M. Raiola, C. Di Grazia, A. Bacigalupo, and C. Viscoli. 2013. '(1-3)-beta-D-glucan in cerebrospinal fluid is useful for the diagnosis of central nervous system fungal infections', *Clin Infect Dis*, 56: 1511–2.
- Moazam, S., C. P. Eades, E. G. Muldoon, C. B. Moore, M. D. Richardson, and R. Rautemaa-Richardson. 2020. 'Positive *Aspergillus* PCR as a marker of azole resistance or sub-therapeutic antifungal therapy in patients with chronic pulmonary aspergillosis', *Mycoses*, 63: 376–81.
- Moura, S., L. Cerqueira, and A. Almeida. 2018. 'Invasive pulmonary aspergillosis: current diagnostic methodologies and a new molecular approach', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 37: 1393–403.
- Nguyen, M. H., H. Leather, C. J. Clancy, C. Cline, M. A. Jantz, V. Kulkarni, L. J. Wheat, and J. R. Wingard. 2011. '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 Marrow Transplant*, 17: 1043–50.
- Normand, A. C., C. Cassagne, M. Gautier, P. Becker, S. Ranque, M. Hendrickx, and R. Piarroux. 2017. 'Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases', *BMC Microbiol*, 17: 25.
- Pardo, E., V. Lemiale, D. Mokart, A. Stoclin, A. S. Moreau, L. Kerhuel, L. Calvet, S. Valade, A. De Jong, M. Darmon, and E. Azoulay. 2019. 'Invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with hematological malignancies', *Intensive Care Med*, 45: 1732–41.
- Patterson, T. F., and J. P. Donnelly. 2019. 'New Concepts in Diagnostics for Invasive Mycoses: Non-Culture-Based Methodologies', *J Fungi (Basel)*, 5.
- Patterson, T. F., G. R. Thompson, 3rd, D. W. Denning, J. A. Fishman, S. Hadley, R. Herbrecht, D. P. Kontoyiannis, K. A. Marr, V. A. Morrison, M. H. Nguyen, B. H. Segal, W. J. Steinbach, D. A. Stevens, T. J. Walsh, J. R. Wingard, J. A. Young, and J. E. Bennett. 2016. 'Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America', *Clin Infect Dis*, 63: e1–e60.

- Pini, P., C. Bettua, C. F. Orsi, C. Venturelli, F. Forghieri, S. Bigliardi, L. Faglioni, F. Luppi, L. Serio, M. Codeluppi, M. Luppi, C. Mussini, M. Girardis, and E. Blasi. 2016. 'Evaluation of serum (1 → 3)-beta-D-glucan clinical performance: kinetic assessment, comparison with galactomannan and evaluation of confounding factors', *Infection*, 44: 223–33.
- Powers-Fletcher, M. V., and K. E. Hanson. 2016. 'Molecular Diagnostic Testing for *Aspergillus*', *J Clin Microbiol*, 54: 2655–60.
- Rath, P. M., and J. Steinmann. 2018. 'Overview of Commercially Available PCR Assays for the Detection of *Aspergillus* spp. DNA in Patient Samples', *Front Microbiol*, 9: 740.
- Rijnders, B. J. A., Afad Schauwvlieghe, and J. Wauters. 2020. 'Influenza-Associated Pulmonary Aspergillosis: A Local or Global Lethal Combination?', *Clin Infect Dis*, 71: 1764–67.
- Rogers, T. R. 2020. 'Defining Invasive Fungal Diseases for Clinical Research: A Work in Progress', *Clin Infect Dis*, 71: 1377–78.
- Rose, S. R., S. Vallabhajosyula, M. G. Velez, D. P. Fedorko, M. J. VanRaden, J. C. Gea-Banacloche, and M. S. Lionakis. 2014. 'The utility of bronchoalveolar lavage beta-D-glucan testing for the diagnosis of invasive fungal infections', *J Infect*, 69: 278–83.
- Ruhnke, M., G. Behre, D. Buchheidt, M. Christopheit, A. Hamprecht, W. Heinz, C. P. Heussel, M. Horger, O. Kurzai, M. Karthaus, J. Löffler, G. Maschmeyer, O. Penack, C. Rieger, V. Rickerts, J. Ritter, M. Schmidt-Hieber, N. Schuelper, S. Schwartz, A. Ullmann, J. J. Vehreschild, M. von Lilienfeld-Toal, T. Weber, and H. H. Wolf. 2018. '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*, 61: 796–813.
- Schauwvlieghe, Afad, B. J. A. Rijnders, N. Philips, R. Verwijs, L. Vanderbeke, C. Van Tienen, K. Lagrou, P. E. Verweij, F. L. Van de Veerdonk, D. Gommers, P. Spronk, Dcjj Bergmans, A. Hoedemackers, E. R. Andrinopoulou, Chsb van den Berg, N. P. Juffermans, C. J. Hodiament, A. G. Vonk, P. Depuydt, J. Boelens, J. Wauters, and group Dutch-Belgian Mycosis study. 2018. 'Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study', *Lancet Respir Med*, 6: 782–92.
- Scherer, E., X. Iriart, A. P. Bellanger, D. Dupont, J. Guitard, F. Gabriel, S. Cassaing, E. Charpentier, S. Guenounou, M. Cornet, F. Botterel, S. Rocchi, A. Berceanu, and L. Millon. 2018. 'Quantitative PCR (qPCR) Detection of *Mucorales* DNA in Bronchoalveolar Lavage Fluid To Diagnose Pulmonary Mucormycosis', *J Clin Microbiol*, 56.
- Schubert, S.
- Wieser, A. 2013. 'Molekulare Methoden in der mikrobiologischen Diagnostik', *Biospektrum*, 7: 743–47.
- Shah, A. A., and K. C. Hazen. 2013. 'Diagnostic accuracy of histopathologic and cytopathologic examination of *Aspergillus* species', *Am J Clin Pathol*, 139: 55–61.
- Skiada, A., F. Lanternier, A. H. Groll, L. Pagano, S. Zimmerli, R. Herbrecht, O. Lortholary, G. L. Petrikos, and Leukemia European Conference on Infections in. 2013. 'Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with hematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3)', *Haematologica*, 98: 492–504.
- Stemler, J., C. Bruns, S. C. Mellinghoff, N. Alakel, H. Akan, M. Ananda-Rajah, J. Auberger, P. Bojko, P. H. Chandrasekar, M. Chayakulkeeree, J. A. Cozzi, E. A. de Kort, A. H. Groll, C. H. Heath, L. Henze, M. Hernandez Jimenez, S. S. Kanj, N. Khanna, M. Koldehoff, D. G. Lee, A. Mager, F. Marchesi, R. Martino-Bufarull, M. Nucci, J. Oksi, L. Pagano, B. Phillips, J. Prattes, A. Pyrpasopoulou, W. Rabitsch, E. Schalk, M. Schmidt-Hieber, N. Sidharthan, P. Soler-Palacin, A. Stern, B. Weinbergerova, A. El Zakhem, O. A. Cornely, and P. Koehler. 2020. 'Baseline Chest Computed Tomography as Standard of Care in High-Risk Hematology Patients', *J Fungi (Basel)*, 6.
- Tintelnot, K. 2013. '[Differential diagnosis for detection of hyphae in tissue]', *Pathologie*, 34: 503–10.
- Tong, T., J. Shen, and Y. Xu. 2018. 'Serum galactomannan for diagnosing invasive aspergillosis in pediatric patients: A meta-analysis', *Microb Pathog*, 118: 347–56.
- Tortorano, A. M., M. C. Esposito, A. Prigitano, A. Grancini, C. Ossi, C. Cavanna, and G. L. Cascio. 2012. 'Cross-reactivity of *Fusarium* spp. in the *Aspergillus* Galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay', *J Clin Microbiol*, 50: 1051–3.
- Tudesq, J. J., O. Peyrony, V. Lemiale, and E. Azoulay. 2019. 'Invasive Pulmonary Aspergillosis in Nonimmunocompromised Hosts', *Semin Respir Crit Care Med*, 40: 540–47.
- Ullmann, A. J., J. M. Aguado, S. Arikan-Akdagli, D. W. Denning, A. H. Groll, K. Lagrou, C. Lass-Flörl, R. E. Lewis, P. Munoz, P. E. Verweij, A. Warris, F. Ader, M. Akova, M. C. Arendrup, R. A. Barnes, C. Beigelman-Aubry, S. Blot, E. Bouza, R. J. M. Bruggemann, D. Buchheidt, J. Cadranet, E. Castagnola, A. Chakrabarti, M. Cuenca-Estrella, G. Dimopoulos, J. Fortun, J. P. Gangneux, J. Garbino, W. J. Heinz, R. Herbrecht, C. P. Heussel, C. C. Kibbler, N. Klimko, B. J. Kullberg, C. Lange, T. Lehrnbecher, J. Löffler, O. Lortholary, J. Maertens, O. Marchetti, J. F. Meis, L. Pagano, P. Ribaud, M. Richardson, E. Roilides, M. Ruhnke, M. Sanguinetti, D. C. Sheppard, J. Sinko, A. Skiada, Mjgt Vehreschild, C. Viscoli, and O. A. Cornely. 2018. 'Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline', *Clin Microbiol Infect*, 24 Suppl 1: e1–e38.

Urabe, N., S. Sakamoto, G. Sano, J. Suzuki, A. Hebisawa, Y. Nakamura, K. Koyama, Y. Ishii, K. Tateda, and S. Homma. 2017. 'Usefulness of Two *Aspergillus* PCR Assays and *Aspergillus* Galactomannan and beta-d-Glucan Testing of Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Chronic Pulmonary Aspergillosis', *J Clin Microbiol*, 55: 1738–46.

Vehreschild, JJ, and K Huber. 2018. "Invasive *Aspergillus*- und *Mucor*-Infektionen: Herausforderungen und Therapieoptionen." In: Pfizer CME Med Learning: Pfizer.

White, P. L., S. Bretagne, L. Klingspor, W. J. Melchers, E. McCulloch, B. Schulz, N. Finnstrom, C. Mengoli, R. A. Barnes, J. P. Donnelly, J. Loeffler, and P. C. R. Initiative European *Aspergillus*. 2010. 'Aspergillus PCR: one step closer to standardization', *J Clin Microbiol*, 48: 1231–40.

Winters, B., J. Custer, S. M. Galvagno, Jr., E. Colantuoni, S. G. Kapoor, H. Lee, V. Goode, K. Robinson, A. Nakhasi, P. Pronovost, and D. Newman-Toker. 2012. 'Diagnostic errors in the intensive care unit: a systematic review of autopsy studies', *BMJ Qual Saf*, 21: 894–902.

Zou, M., L. Tang, S. Zhao, Z. Zhao, L. Chen, P. Chen, Z. Huang, J. Li, L. Chen, and X. Fan. 2012. 'Systematic review and meta-analysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis', *PLoS One*, 7: e43347.