

CAT

Critically Appraised Topic

Analytische en klinische vergelijking van BAL galactomannan VS BAL PCR in de diagnostiek van invasieve pulmonaire aspergillose

Author: Marthe Vanrenterghem

Supervisor: Dr. Marijke Reynders

Search/methodology verified by: Dr. Marijke Reynders, Dr. A. Schauwvlieghe

Date: 21/09/2021

CLINICAL BOTTOM LINE

Invasieve pulmonaire aspergillose (IPA) is een van de meest voorkomende opportunistische infecties binnen de hemato - onco populatie en wordt geassocieerd met hoge mortaliteitscijfers. Daarnaast wordt IPA steeds meer gediagnosticeerd bij patiënten opgenomen op een intensive care unit (ICU), voornamelijk binnen een post-virale setting. Een snelle diagnose en opstart van adequate antifungale therapie wordt geassocieerd met een verbeterde outcome. Het stellen van een diagnose op basis van het klinisch beeld blijft echter moeilijk door de aspecifieke klinische presentatie. De European Organisation for Research and Treatment of Cancer and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) heeft recent de internationale consensusdefinities voor het stellen van een wetenschappelijke research diagnose van IPA geüpdatet (2020). Deze richtlijnen verdelen patiënten in een “proven”, “probable” of “possible” categorie op basis van onderliggende gastheerfactoren, radiologische – en mycologische criteria. Voor de revisie werden enkel de conventionele cultuur en serologische technieken, zoals galactomannan en 1,3-β-D-glucan aanvaard als voldoende robuuste technieken. Echter na jarenlange ervaring en standaardisatie van de moleculaire diagnostiek wordt een PCR voor *Aspergillus spp.* nu ook aanvaard binnen deze internationale richtlijn.

Het AZ Sint-Jan Brugge telt een grote hematologische – en intensieve afdeling waardoor men reeds jarenlange ervaring heeft met diagnostiek omtrent IPA. Naast het bepalen van galactomannan, de huidige “gouden standaard”, wordt al meer dan 7 jaar een PCR voor *Aspergillus fumigatus* uitgevoerd. Nu deze moleculaire techniek ook in de richtlijnen werd opgenomen leek het nuttig een retrospectieve studie uit te voeren waarbij de waarde van een enkelvoudig positief PCR resultaat werd onderzocht. Er werd een analyse van de Ct-waarden van deze PCR's uitgevoerd, en op basis daarvan werd een klinisch algoritme ontwikkeld. Tot op heden is de performantie en de waarde van een zwak positieve PCR test, zonder concordant resultaat van de galactomannan assay, nog onvoldoende duidelijk. Er dient een grotere studie te worden opgezet om een conclusie te vormen, met daarbij een kritische blik op de cut-off van de bekomen Ct-waarden.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Invasieve aspergillose is de meest voorkomende schimmelinfectie binnen een immuungedeprimeerde populatie, en is geassocieerd met een hoge mortaliteit en morbiditeit. *Aspergillus species* zijn wijd verspreid in de omgeving en na inhalatie van conidia kunnen deze sporen een breed spectrum van klinische syndromen en pulmonaire ziekten veroorzaken. Deze variëren van niet invasieve vormen zoals allergische – en chronische bronchopulmonaire aspergillose tot invasieve aspergillose en gedissemineerde infecties. Dit is afhankelijk van de interactie tussen de schimmel, een eventuele onderliggende longziekte en de immuunstatus van de patiënt. De bovenste luchtwegen, trachea, bronchi en longen zijn vaak primair betrokken door het inademen van conidia, terwijl bij een gedissemineerde infectie elk orgaan kan worden aangetast.^{1 2 3 4}

Mycologie en epidemiologie

Wereldwijd worden meer dan 250 *Aspergillus species* beschreven met verschillende subgenera. De meest voorkomende *Aspergillus* genera betrokken bij invasieve infecties zijn naast *A. fumigatus* ook *A. flavus*, *A. terreus* en *A. niger*.^{3 4 5}

Invasieve pulmonaire aspergillose (IPA) wordt het vaakst beschreven bij patiënten die een orgaantransplantatie ondergaan of patiënten met hematologische aandoeningen zoals acute leukemie of hematopoëtische stamceltransplantatie (HSCT) recipiënten. De beschreven risicofactoren omvatten onder andere verlengde neutropenie, immunosuppressieve therapie in het kader van graft-versus-host disease (GVHD), defecten in celgemedeerde immuniteit en corticosteroidtherapie. De duur en de ernst van de neutropenie zijn daarnaast bepalende risicofactoren voor het ontwikkelen van IA.^{2 3}

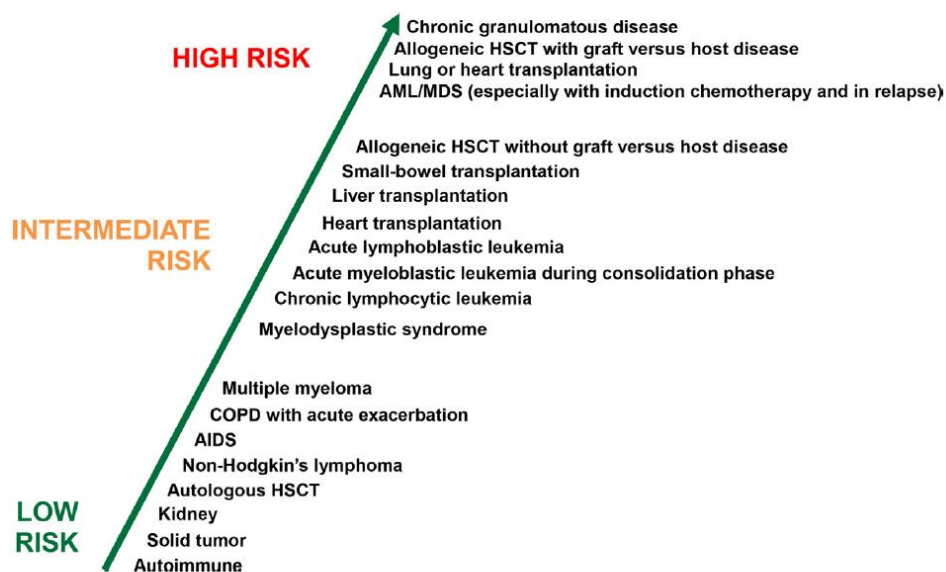


Fig. 1. Spectrum of risk for IA. (Data from Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, et al. Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(Suppl 1):i5–14.)

Cadena, J., Thompson, G. R. & Patterson, T. F. Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **30**, 125–142 (2016).³

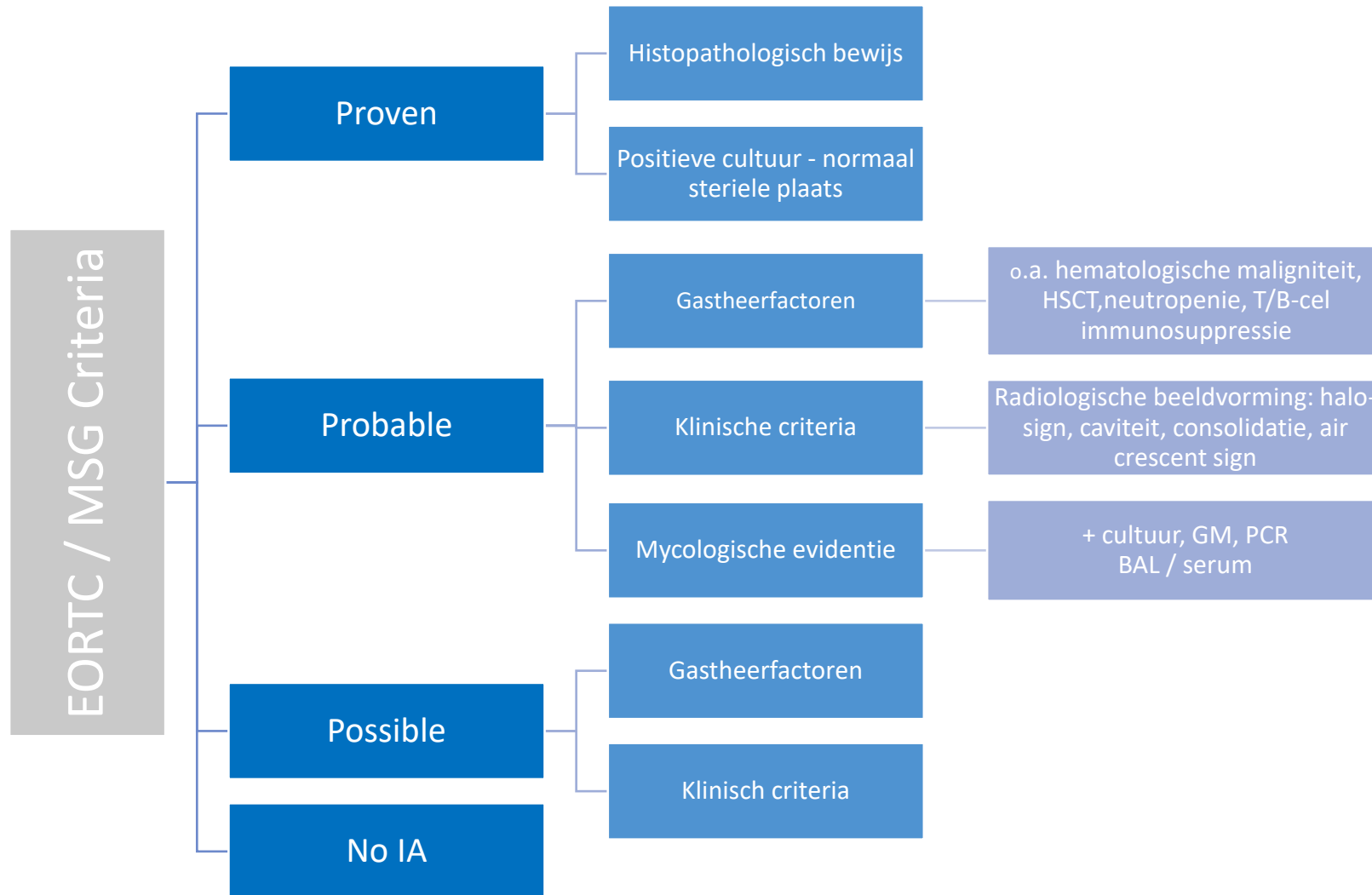
De laatste jaren wordt IPA ook steeds meer gediagnosticeerd in kritisch zieke niet-neutropene patiënten, zoals COPD – of patiënten op intensieve zorgen.^{1 2 3} Invasieve pulmonaire aspergillose wordt daarnaast geassocieerd met een post-virale setting, zoals post – influenza of COVID – 19. Influenza pneumonie bij patiënten opgenomen op intensieve zorgen is een onafhankelijke risicofactor voor het ontwikkelen van IPA met een hoge mortaliteitsratio.⁶

Een snelle diagnose en vroege opstart van antifungale systemische therapie wordt geassocieerd met een verbeterende klinische uitkomst en een verhoogde overlevingskans. Het stellen van een adequate diagnose blijft echter een grote uitdaging door de aspecifieke presentatie van klinische en radiologische kenmerken vooral in de vroege fase van de ziekte. IPA manifesteert zich klinisch door koorts, hoesten, pijn op de borst, dyspnee en/of hemoptoe. In neutropene patiënten treden deze symptomen echter vaak niet op de voorgrond, door de afwezigheid van een adequate inflammatoire respons. Op radiologische beeldvorming kan een specifiek “halo-sign” worden beschreven als handtekening van IA, voornamelijk in een gevorderd stadium, naast atypische kenmerken zoals diffuse pulmonaire infiltraten, cavitaire letsels of consolidaties. Er wordt beschreven dat tot bijna 2/3 van de *Aspergillus*-infecties ante-mortem niet gediagnosticeerd worden.^{7 8 9}

Diagnose

De atypische klinische en radiologische kenmerken van IA zorgen voor een moeilijke diagnosestelling, waardoor laboratoriumdiagnostiek in belangrijke mate kan bijdragen tot een adequate diagnose. De European Organisation for Research and Treatment of Cancer and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) ontwikkelde internationale consensus definities voor invasieve schimmelinfecties. Patiënten worden verdeeld in drie categorieën “proven”, “probable”, “possible” IA op basis van onderliggende klinische gastheerfactoren, radiologische – en mycologische criteria. Onderstaande tabel op pagina 3 toont een vereenvoudigd overzicht op basis waarvan patiënten in deze groepen worden onderverdeeld. Een gedetailleerde beschrijving van de definities werd in bijlage I toegevoegd. Deze definities zijn opgesteld voor classificatie binnen een research-setting en niet voor het nemen van klinische beslissingen. De EORTC/MSG-criteria en bijhorende werkgroepen bieden richtlijnen aan voor laboratoriumdiagnose op basis van cultuur, serologische – en moleculaire technieken.^{9 10}

In het AZ Sint-Jan Brugge wordt dagelijks diagnostiek uitgevoerd naar aanleiding van suggestieve klinische vermoedens van IPA. Samen met klinici wordt getracht een diagnose te stellen op basis van radiologische beeldvorming, klinische manifestaties en diagnostische laboratoriumresultaten. Reeds jarenlang (sinds begin 2014) wordt naast de conventionele kweek en galactomannan ook PCR voor *Aspergillus fumigatus* uitgevoerd op respiratoire stalen. Moleculaire technieken werden echter pas recent geïncorporeerd in de EORTC/MSG richtlijnen na een revisie in 2020. Nu PCR-bepalingen in de diagnostiek van IA hun meerwaarde bewezen hebben in verschillende studies, lijkt het nuttig om retrospectief de prestatie van deze test binnen ons labo te analyseren.



QUESTION(S)

- 1) Wat zijn de huidige routine laboratoriumtechnieken voor het opsporen van *Aspergillus spp.* in de diagnostiek van invasieve pulmonaire aspergillose?
- 2) Wat is de plaats van een enkelvoudige positief PCR resultaat van *Aspergillus fumigatus*, binnen een retrospectieve analyse van BAL-stalen, bij de hematologie-populatie van het AZ Sint-Jan Brugge?
- 3) Invasieve aspergillose & COVID-19 : was er een toename in prevalentie van IPA in post-virale setting?

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1. Haese, J. D. ' et al. Detection of Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples of Patients at Risk for Invasive Pulmonary Aspergillosis: Analytical and Clinical Validity. (2012) doi:10.1128/JCM.06423-11.
2. Moldoveanu, B., Gearhart, A. M., Jalil, B. A., Saad, M. & Guardiola, J. J. Pulmonary Aspergillosis: Spectrum of Disease. *Am. J. Med. Sci.* **361**, 411–419 (2021).
3. Cadena, J., Thompson, G. R. & Patterson, T. F. Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **30**, 125–142 (2016).
4. Arastehfar, A. et al. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: From basics to clinics. **100115**, (2021).
5. Cadena, J., Thompson, G. R. & Patterson, T. F. Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **35**, 415–434 (2021).
6. Schauwvlieghe, A. F. A. D. et al. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *Lancet Respir. Med.* **6**, 782–792 (2018).
7. Guegan, H. et al. Improving the diagnosis of invasive aspergillosis by the detection of *Aspergillus* in broncho-alveolar lavage fluid: Comparison of non-culture-based assays. *J. Infect.* **76**, 196–205 (2018).
8. Eigl, S. et al. Galactomannan testing and *Aspergillus* PCR in same-day bronchoalveolar lavage and blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Med. Mycol.* **55**, 528–534 (2017).
9. Siopi, M. et al. A prospective multicenter cohort surveillance study of invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies in greece: impact of the revised eortc/msgerc 2020 criteria. *J. Fungi* **7**, 1–11 (2021).
10. De Pauw, B. 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) C. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 1813–1821 (2008).
11. Boch, T. et al. Diagnosis of invasive fungal infections in haematological patients by combined use of galactomannan, 1,3-β-D-glucan, *Aspergillus* PCR, multifungal DNA-microarray, and *Aspergillus* azole resistance PCRs in blood and bronchoalveolar lavage samples: results of. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 862–868 (2016).
12. Neofytos, D. et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: Analysis of multicenter prospective antifungal therapy (PATH) alliance registry. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 265–273 (2009).
13. Kontoyiannis, D. P. et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: Overview of the transplant-associated infection surveillance network (TRANSNET) database. *Clin. Infect. Dis.* **50**, 1091–1100 (2010).
14. Horvath, J. A. & Dummer, S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am. J. Med.* **100**, 171–178 (1996).
15. Avni, T. et al. Diagnostic Accuracy of PCR Alone Compared to Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis: a Systematic Review. (2012) doi:10.1128/JCM.00942-12.
16. Hoenigl, M. et al. Performance of galactomannan, beta-d-glucan, aspergillus lateral-flow device, conventional culture, and pcr tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 2039–2045 (2014).
17. Mercier, T., Guldentops, E., Lagrou, K. & Maertens, J. Galactomannan, a surrogate marker for outcome in invasive aspergillosis: Finally coming of age. *Front. Microbiol.* **9**, 1–10 (2018).
18. Mercier, T. et al. Defining Galactomannan Positivity in the Updated EORTC/MSGERC Consensus Definitions of Invasive Fungal Diseases. *Clin. Infect. Dis.* **72**, S89–S94 (2021).
19. Heldt, S. et al. Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Hematological Malignancy Patients: Performance of Cytokines, Asp LFD, and *Aspergillus* PCR in Same Day Blood and Bronchoalveolar Lavage Samples HHS Public Access. *J Infect* **77**, 235–241 (2018).
20. Peter Donnelly, J. et al. 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**, 1367–1376 (2020).

21. Lamoth, F. Galactomannan and 1,3-B-D-Glucan Testing for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J. Fungi* (2016).
22. White, P. L. et al. Aspergillus Polymerase Chain Reaction: Systematic Review of Evidence for Clinical Use in Comparison with Antigen Testing. *Clin. Infect. Dis.* **61**, 1293–1303 (2015).
23. White, P. L. et al. Aspergillus Polymerase Chain Reaction-An Update on Technical Recommendations, Clinical Applications, and Justification for Inclusion in the Second Revision of the EORTC/MSGERC Definitions of Invasive Fungal Disease. *Clin. Infect. Dis.* **72**, S95–S101 (2021).
24. Maertens, J. A., Blennow, O., Duarte, R. F. & Muñoz, P. The current management landscape: Aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, ii23–ii29 (2016).
25. Pfeiffer, C. D., Fine, J. P. & Safdar, N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: A meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **42**, 1417–1427 (2006).
26. Zou, M. et al. Systematic review and meta-analysis of detecting Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive Aspergillosis. *PLoS One* **7**, (2012).
27. Guo, Y. L. et al. Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: A bivariate metaanalysis and systematic review. *Chest* **138**, 817–824 (2010).
28. Sun, W. et al. Evaluation of PCR on bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive aspergillosis: A bivariate metaanalysis and systematic review. *PLoS One* **6**, (2011).
29. Avni, T. et al. Diagnostic accuracy of PCR alone compared to galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: A systematic review. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3652–3658 (2012).
30. Mengoli, C., Cruciani, M., Barnes, R. A., Loeffler, J. & Donnelly, J. P. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **9**, 89–96 (2009).
31. Arvanitis, M. et al. PCR in Diagnosis of Invasive Aspergillosis: a Meta-Analysis of Diagnostic Performance. (2014) doi:10.1128/JCM.01365-14.
32. Resendiz-Sharpe, A. et al. Prevalence of voriconazole-resistant invasive aspergillosis and its impact on mortality in haematology patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **74**, 2759–2766 (2019).
33. Chong, G. M. et al. PCR-based detection of *Aspergillus fumigatus* Cyp51A mutations on bronchoalveolar lavage: A multicentre validation of the AsperGenius assay® in 201 patients with haematological disease suspected for invasive aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 3528–3535 (2016).
34. Scharmann, U. et al. Evaluation of three commercial PCR assays for the detection of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* from respiratory samples of immunocompromised patients. *J. Fungi* **7**, 1–10 (2021).
35. Chong, G. L. M. et al. Validation of a new *Aspergillus* real-time PCR assay for direct detection of *Aspergillus* and azole resistance of *Aspergillus fumigatus* on bronchoalveolar lavage fluid. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 868–874 (2015).
36. Heng, S. C. et al. Utility of bronchoalveolar lavage fluid galactomannan alone or in combination with PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in adult hematology patients: A systematic review and meta-analysis. *Crit. Rev. Microbiol.* **41**, 124–134 (2015).
37. White, P. L., Parr, C., Thornton, C. & Barnes, R. A. Evaluation of real-time PCR, galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and a novel lateral-flow device for diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1510–1516 (2013).
38. Mercier, T. et al. Lateral flow assays for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in adult hematology patients: A comparative multicenter study. *Med. Mycol.* **58**, 444–452 (2020).
39. Jenks, J. D., Miceli, M. H., Prattes, J., Mercier, T. & Hoenigl, M. The *Aspergillus* Lateral Flow Assay for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis: an Update. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **14**, 378–383 (2020).
40. Steensels, D. et al. Epidemiology and clinical impact of viral, atypical, and fungal respiratory pathogens in symptomatic immunocompromised patients: a two-center study using a multi-parameter customized respiratory Taqman® array card. doi:10.1007/s10096-019-03579-y.
41. Marr, K. A. et al. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **162**, 81–89 (2015).
42. van de Veerndonk, F. L. et al. COVID-19-associated *Aspergillus* tracheobronchitis: the interplay between viral tropism, host defence, and fungal invasion. *Lancet Respir. Med.* **9**, 795–802 (2021).
43. Verweij, P. E. et al. Taskforce report on the diagnosis and clinical management of COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Intensive Care Med.* (2021) doi:10.1007/s00134-021-06449-4.
44. Koehler, P. et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. *Lancet Infect. Dis.* **21**, e149–e162 (2021).
45. Prattes, J. et al. Diagnosis and treatment of COVID-19 associated pulmonary aspergillosis in critically ill patients: results from a European confederation of medical mycology registry. *Intensive Care Med.* 19–21 (2021) doi:10.1007/s00134-021-06471-6.
46. Mikulska, M. et al. Use of *Aspergillus fumigatus* real-time PCR in bronchoalveolar lavage samples (BAL) for diagnosis of invasive aspergillosis, including azole-resistant cases, in high risk haematology patients: The need for a combined use with galactomannan. *Med. Mycol.* **57**, 1–10 (2019).

Literatuurstudie

Sinds de revisie van de EORTC/MSG richtlijnen in 2020 kan de laboratoriumdiagnose van invasieve pulmonaire aspergillose (IPA) gesteld worden op basis van moleculaire, serologische en klassiek-microbiologische technieken. Door de wijdverspreide aanwezigheid van *Aspergillus species* in de omgeving en de constante inhalatie van conidia dienen diagnostische resultaten steeds in perspectief te worden geplaatst. De performantie van de verschillende gebruikte laboratoriumtesten werden in deze literatuurstudie onderzocht en naast elkaar geplaatst.

Conventionele cultuur en histo-pathologisch onderzoek van respiratoire stalen

Een “proven” invasieve schimmelinfectie volgens de EORTC/MSG criteria vereist een bewijs van hyfae op een histopathologisch biopt of een bewezen positieve cultuur met *Aspergillus species* genomen van een normaal steriele plaats, niet via een BAL-procedure.¹¹ De conventionele cultuur en het rechtstreeks onderzoek op schimmeldraden blijven hierdoor essentieel binnen de diagnostiek. Verschillende studies bewijzen echter de lage sensitiviteit van beide testen, waardoor een negatief resultaat met een suggestieve kliniek de diagnose niet uitsluit.^{12 13} Indien de kweek positief wordt is dit vaak met een aanzienlijke vertraging of reeds in een later stadium van de ziekte.¹¹ De positief predictieve waarde (PPV) is daarnaast ook afhankelijk van de gastheerfactoren en de klinische presentatie. De hoogste PPV werd gemeten bij neutropene patiënten en post – HSCT, of patiënten met een actieve hematologische maligniteit.¹⁴ Daarnaast is het nemen van een biopt als bewijs van hyfae vaak complex, door de vaak aanwezige trombopenie en de risico's verbonden aan een invasieve procedure. Deze factoren verklaren daarbij ook de lage prevalentie van “proven” IA cases.¹⁵

Serologische bio-markers

Om de diagnose van invasieve pulmonaire aspergillose te kunnen stellen worden daarnaast niet - cultuur gebaseerde assays gebruikt. Deze technieken steunen enerzijds op antigen-detectie zoals galactomannan en beta-1,3-D-glucan of op basis van moleculaire technieken zoals PCR. De detectie van galactomannan (GM), een polysaccharide en majeure component van de celwand, dat vrijgesteld wordt bij de groei van *Aspergillus spp.*, wordt op heden gebruikt als gouden standaard.^{4 16} De Platelia *Aspergillus* enzyme immuno assay (GM-EIA; Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-coquette, France), is de meest gebruikte kit in de routine, deze werd in 2003 goedgekeurd door de US Food and Drug Administration (FDA) en is opgenomen in de EORTC/MSG richtlijnen. De test werkt volgens een “double-sandwich” enzyme immuno assay dat gebruikt maakt van het monoclonaal IgM-antilichaam EB-A2. Dit antilichaam detecteert verschillende epitopen op de galactofuranose zijketens die gelinkt zijn aan de grotere polysaccharide ruggengraat. Het resultaat van de GM-EIA wordt uitgedrukt in optical density index (ODI).^{4 11 17 18}

De optical density index wordt berekend door een vergelijking van de optische densiteit van het patiëntstaal met twee gestandaardiseerde samples in de testkit. De bekomen index is op die manier een continue variabele, waardoor verschillende cut-off's gehanteerd kunnen worden afhankelijk van de klinische setting. Een lagere cut-off zorgt voor een hogere sensitiviteit, en zal eerder gebruikt worden binnen een screenings-setting. Hogere cut-off waarden impliceren een hoge diagnostische waarschijnlijkheid. De kit werd gevalideerd door de producent met een ODI van 0,5. De nieuwe definities van de EORTC/MSG stellen echter binnen een studiesetting een ODI van 1,0 voor. Op die manier wordt de probabiteit van het hebben van een IA significant verhoogd t.o.v. de eerder lagere cut-off.¹⁸

Verschillende studies en meta-analyses rapporteren vaak een verschillende sensitiviteit en specificiteit. Naast de cut-off waarde speelt de patiëntenpopulatie daarbij een invloedrijke rol. De meeste studies werden uitgevoerd binnen een hematologische patiëntenpopulatie, die een hoog risico hebben op het ontwikkelen van IA, zeker na allogene stamceltransplantatie, inductie chemotherapie of bij een acute myeloïde leukemie (AML). De sensitiviteit van deze GM-assay in bloed blijkt het hoogst binnen deze neutropene patiënten. De gevoeligheid van de test is duidelijk lager in andere populaties, die typisch niet neutropeen zijn zoals patiënten op intensieve diensten. Daarnaast is de sensitiviteit significant verlaagd bij patiënten onder antifungale therapie, zowel in profylactische – of therapeutische dosis.¹⁸

Sinds 2011 is het gebruik van de GM Platelia *Aspergillus* assay, naast op serum, ook gevalideerd op BAL vchten. Verschillende meta-analyses beschrijven een voldoende sensitieve test voor de diagnose van IPA, zowel bij hematologische – als niet-hematologische patiënten.¹ De detectie van GM op BAL blijkt daarnaast performanter dan analyses op serum, en toont een hogere sensitiviteit en specificiteit.¹⁹ De optimale cut-off waarde blijft ook in BAL vchten voor discussie zorgen. Jorien D'Haese et al. analyseerden de performantie van GM op BAL in BAL stalen aan de hand van verschillende cut-off indices. De meest optimale ODI werd gevonden op 0,8 met een sensitiviteit van 86.4% en een specificiteit van 90.7%.¹¹

Een recente publicatie van Toine Mercier et.al (2021) toonde gelijkaardige resultaten met, zoals verwacht, de hoogste sensitiviteit bij de laagste cut-off van 0.5, gepaard met de laagste specificiteit (0.89 – 0.92). Het hoger instellen van de cut-off waarde op 1,0 zorgde voor een excellente specificiteit met nog steeds een voldoende hoge sensitiviteit. (tabel 2) De EORTC guidelines van 2019 opteerden daarbij ook voor het instellen van een cut-off index op 1,0. Patiënten onder antifungale therapie vertonen, gelijkaardig aan serum of plasma, een verminderde gevoeligheid van galactomannan detectie op BAL ¹⁸

CUT-OFF	Sensitiviteit	Specificiteit
0.5 ODI	0.82 - 0.87	0.89 – 0.92
1.0 ODI	0.75 – 0.86	0.94 – 0.95
1.5 ODI	0.70 – 0.92	0.95 – 0.98
2.0 ODI	0.61 – 0.84	0.95 – 0.96
Hematologische maligniteit		
ja	0.85	0.91
nee	0.87	0.89
Antifungale therapie of profylaxe		
ja	0.76 – 0.85	0.89
nee	0.91	0.89

Tabel 2: Mercier T. et al Clin Infect Dis 2021;72(Suppl 2): S89-S94

Recente studies tonen daarnaast ook de meerwaarde aan van de detectie van GM in cerebrospinaal vocht (CSV) voor de diagnose van IA van het centraal zenuwstelsel. ^{4 20}

1,3-β-D-glucan

Naast GM-EIA wordt de 1,3-β-D-glucan test (BDG), geïncorporeerd als microbiologisch criterium in de EORTC/MSG richtlijnen. Deze testen detecteren 1,3-β-D-glucan, een celwand specifiek polysaccharide, aanwezig bij de meeste schimmels, met uitzondering van Zygomycetes (o.a. Mucoralesstammen) en Cryptococci. De BDG-assay is dus niet specifiek voor de diagnose van IA maar heeft een complementaire rol in de diagnose van invasieve candidiase of Pneumocystis jirovecii pneumonie.

De Fungitell assay (Associates of Cape Cod Inc. (East Falmouth, MA, USA)) werd goedgekeurd door de FDA en wordt uitgevoerd op serum. Binnen een hoog-risico hematologische patiëntenpopulatie blijkt BDG een gelijkaardige performantie te tonen als GM-EIA met een vrij lage sensitiviteit van 60%-80% en een specificiteit van ≥ 90%. Bij twee opeenvolgende positieve resultaten verhoogt de specificiteit tot 95%-99%, met slechts een klein verlies in sensitiviteit. De belangrijkste troef van de test is de hoge negatief predictieve waarde, waardoor een negatief resultaat een trigger kan zijn voor het stoppen van antifungale therapie. ²¹

PCR

Moleculaire diagnostiek zoals PCR wordt al meer dan 20 jaar gebruikt binnen de diagnosestelling van IA. Deze PCR-testen werden echter tot 2020 geweerd uit de EORTC/MSG richtlijnen door een tekort aan gestandaardiseerde commerciële testplatformen en een klinisch gelimiteerde validatie en standaardisatie van de test. De European *Aspergillus* PCR initiative (EAPCRI) leverde daarvoor grote inspanningen om deze tekortkomingen weg te werken. Er werden onder andere geblindeerde QC-panels aangeleverd, *Aspergillus* DNA werd geïdentificeerd en richtlijnen voor standaardisatie van de extractie werden beschreven en verspreid.²² Sinds de herziening van de consensus definities van de EORTC/MSG in 2020 wordt de *Aspergillus* PCR daardoor als een voldoende robuuste methode aanvaard op serum, plasma, volbloed en BAL-vochten.²³ Om een positieve PCR als mycologisch criterium te laten gelden binnen de diagnose van probable IPA dienen twee opeenvolgende testen op BAL of serum / plasma / volbloed positief te zijn. Beide specimen types mogen ook gecombineerd worden, indien deze afzonderlijke testen beiden een positief resultaat aantonen, geldt dit eveneens als mycologisch bewijs.²⁰

Gezien eveneens bloed – als BAL stalen gevalideerd werden om PCR testen op uit te voeren, is het aanbevolen staaltype afhankelijk van het klinisch beoogde doel. Bij een suggestieve diagnose van IPA wordt aangeraden een BAL af te nemen want indien positief, draagt dit bij tot een adequate diagnose door de hoge specificiteit van de test. Het uitvoeren van PCR testen op bloed, maakt eerder deel uit van een screeningsmethode, waarbij de hoge sensitiviteit van de test zorgt voor de mogelijkheid van excluderen van negatieve resultaten. Deze hoge NPV werd consistent in verschillende studies gedocumenteerd waardoor de meerwaarde van het uitvoeren van deze test wordt benadrukt.²⁴ De specificiteit van PCR op BAL blijkt significant ($p < 0.0001$) hoger dan op bloed.²²

White et al. vergeleken de performantie van o.a. GM en PCR voor de detectie van IA door een uitgebreide literatuurreview met meta-analyse. Bij het vergelijken van GM-EIA en PCR op BAL-stalen blijkt de sensitiviteit tussen beide methoden niet significant verschillend. De specificiteit van BAL PCR blijkt wel consistent hoger in alle meta-analyses, wat bijdraagt tot een betere bruikbaarheid qua diagnostische test.²² De performantie van PCR blijkt, net zoals voor GM-EIA, verminderd onder antifungale therapie.¹¹

ASSAY²²

	GM-EIA				PCR				
	Leeflang	Pfeiffer ²⁵	Zou ²⁶	Guo ²⁷	Tuon	Sun ²⁸	Avni ²⁹	Mengoli ³⁰	Arvanitis ³¹
Parameter	Serum		BAL		BAL			Bloed	
Sensitiviteit,%	79.3	79.3	83.6	85.7	78.4	79.6	76.8	88.0	84.0
Specificiteit,%	80.5	86.3	89.4	89.0	93.7	94.1	94.5	75.0	76.0
PPV,%	30.3	46.9	64.4	66.7	74.1	79.2	79.9	36.7	41.3
NPV,%	97.3	96.5	95.9	96.0	94.9	94.2	93.4	97.4	95.9

PCR testen kunnen een meerwaarde bieden tegenover andere antigenetests, omdat ze de mogelijkheid bieden tot op genus – en speciesniveau een schimmel te identificeren. Daarnaast kunnen ze bijdragen bij het opsporen van azole-resistentie gezien de aanbevolen eerstelijns therapie, bestaande uit voriconazole en isavuconazole, bedreigd wordt met een toenemende triazoleresistentie in *Aspergillus fumigatus*. De azoleresistentie wordt meestal veroorzaakt door mutaties in het Cyp51A-gen, dat het 14- α -demethylase enzyme codeert waardoor lanosterol wordt omgezet in ergosterol, een noodzakelijke hoofdcomponent van de fungale celwandmembraan. De werking van antifungale therapie steunt op het binden en blokkeren van deze enzymfunctie waardoor membraaninstabiliteit wordt gecreeërd en rechtstreeks aanleiding geeft tot fungale celdood.^{32 33 34}

De triazole-resistentie cijfers, vooral beschreven voor *Aspergillus fumigatus*, stijgen over de laatste jaren. De prevalentie varieert tussen 3,2% - 36,3%, afhankelijk van de regio en het land en eventuele onderliggende ziekten, zoals mucoviscidosepatiënten waarbij een hogere prevalentie van triazoleresistentie wordt beschreven.

Een recente multicohort studie uitgevoerd in Belgische en Nederlandse ziekenhuizen toonde een hoge prevalentie van voriconazole- resistente *A. fumigatus* (20,2 %) gebaseerd op positieve culturen afkomstig van hematologiepatiënten. Daarbij werd een verhoogde mortaliteit beschreven van deze casussen in niet- ICU patiënten. De werkelijke impact van deze meer resistente fungi op de mortaliteit is nog niet volledig opgehelderd, verschillende case reports in hematologiepatiënten beschrijven een mortaliteitsratio variërend tussen 50 – 100%.

Behandeling van triazole resistente *A. fumigatus* bestaat uit liposomaal amfotericine B of combinatietherapie van een echinocandine met een triazole.³² Omwille van de lage sensitiviteit en positiviteitsratio (26%) van positieve *A. fumigatus* culturen, blijft de azoleresistentie echter vaak ondetecteerbaar/ongekend. Met deze stijgende resistentiecijfers werd gezocht naar een snelle en toegankelijke manier om tegelijkertijd de diagnose van IPA en de detectie van mogelijke azole-resistente stammen te kunnen stellen. Er werden enkele commerciële assays ontwikkeld en gevalideerd die in staat zijn de meest voorkomende resistentiemechanismen op te sporen aan de hand van moleculaire technieken.³³

Eenzijds werd de AsperGenius® multiplex PCR uitgetest, een tweedelige assay, waarbij men naast de relevante species, de meest voorkomende resistentie-geassocieerde mutaties (TR34/L98H en TR46/Y121F/T289A) kan identificeren. De diagnostische performantie van deze AsperGenius® PCR op BAL stalen, afkomstig van patiënten met een hematologische maligniteit, blijkt goed met een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 84% en 80%.^{33 35} Daarnaast wordt de MycoGENIE® *Aspergillus fumigatus* RT-PCR kit (Adamtech, Pessac, France) vaak in de literatuur beschreven. Deze assay spoort naast het *A. fumigatus* 28S rRNA gen, de TR34/L98H mutatie op.³⁴

Conclusie: een combinatie van beide testen verhoogde de sensitiviteit en specificiteit van de testen

De atypische klinische presentatie van IPA in combinatie met de significant verminderde sensitiviteit van niet-cultuur gebaseerde testmethoden zoals GM-EIA bij patiënten onder antifungale chemoprophylaxe pleiten voor het combineren van verschillende testmethoden. Hoewel GM-EIA als standaard routinebepaling wordt gebruikt, blijkt het combineren met een *Aspergillus spp.* PCR te resulteren in een significante stijging van de sensitiviteit.⁷ Verschillende studies beschrijven deze verhoging van de sensitiviteit bij het combineren van GM-EIA en PCR tot 84 - 100% in vergelijking met de enkelvoudige analyses. Hierbij wordt een optimale sensitiviteit beschreven zonder verlies aan specificiteit.^{7 8 11 16 29 36}

Avni et al. concludeerde dat wanneer een *Aspergillus* PCR werd uitgevoerd naast de bepaling van GM-EIA op BAL dat de sensitiviteit significant verbeterde van 89% met GM alleen, tot 97% met GM en PCR gecombineerd. Daarnaast wordt een zeer hoge NPV van 99% beschreven waardoor een enkelvoudige negatieve GM-EIA of PCR-test de diagnose van IPA met een hoge probabiliteit (>98%) kan uitsluiten.²⁹ Gelijkaardige resultaten werden verkregen in de studie van Hoenigl. et al waarbij de testcombinatie van BAL GM (cut-off van 1.0 ODI) en/of een positieve PCR resulteerde in de hoogste positieve diagnostic odds ratio (DOR).¹⁶

Performantie karakteristieken (%)¹⁶

	Sensitiviteit (n=10)	Specificiteit (n=41)	PPV	NPV	DOR (95% CI)
GM ODI >1.0	70	98	88	93	93.3 (8.5-1.030)
PCR	70	100	100	93	161 (7.5-3.445)
GM ODI >1.0 en/of PCR	100	98	91	100	567 (21.5-14,95)

Het combineren van verschillende testmethoden blijkt dus vooral relevant bij patiënten met een hoog risico op IPA onder antifungale therapie waarbij een BAL wordt uitgevoerd. De kosten – effectiviteit moet daarbij nog verder worden onderzocht, om te bepalen indien het standaard combineren van zowel PCR als GM moet deel uitmaken van de routineonderzoeken.³⁶

Lateral flow assay

Zoals eerder beschreven bieden GM-EIA en PCR een meer sensitieve test dan een conventionele cultuur of rechtstreeks onderzoek, waardoor snel en adequaat antifungale therapie kan worden gestart. Een nadeel van deze testen is de hoge kost van de analyse en de nood aan gespecialiseerde toestellen voor o.a. moleculaire diagnostiek. Om kosten-efficiënt te werken wordt hierdoor vaak in batch geanalyseerd. De analyse vraagt daarnaast een significante hands-on time wat kan resulteren in een lange turn-around time (TAT).

Recent werden daardoor twee “lateral flow assays” (LFA) ontwikkeld als snelle, eenvoudige en goedkope aanvullende test voor de diagnose van IPA. AspLFD (OLM Diagnostics, Newcastle Upon Tyne, UK [LFD]) en sōna *Aspergillus* galactomannan LFA (IMMY, Norman, OK, USA; [LFA]) zijn twee CE-gelabeld testen die in minder dan één uur resultaat geven. De immunochromatografische methode maakt gebruik van een monoclonaal antilichaam (MAb), bij AspLFD is dat via het monoklonaal antilichaam “JF5”, dat bindt aan extracellulaire glycoproteïnen gesecreteerd tijdens de groei van *Aspergillus* spp. Dit Mab is zeer specifiek voor *Aspergillus* species en veroorzaakt geen kruisreacties met andere klinisch relevante schimmels of gisten zoals candidiasis of mucormycose. Sōna *Aspergillus* GM LFA (IMMY assay) werkt op basis van de detectie van GM. ^{4 37 38 39}

Een grote multicenter retrospectieve studie uitgevoerd in België en Nederland analyseerde BAL-vochten van meer dan 200 hematologiepatiënten op deze twee CE gemarkeerde lateral flow devices. Binnen de proven IPA patiënten toonden beide testen een gelijkaardige performantie. Bij de analyse van zowel proven als probable IPA cases, werd een identieke specificiteit van beide testen beschreven, maar een hogere sensitiviteit (0.83 VS 0.69, $p=0.008$) en een hogere NPV (0.89 VS 0.82 $p=0.009$) voor de LFA IMMY assay. Diagnostische performantie, voornamelijk bij zwak positieve resultaten, kan verhoogd worden door een digitale reader te gebruiken. Vergelijking van deze LFA, bij patiënten met een hematologische maligniteit, toont een vergelijkbare sensitiviteit en specificiteit t.o.v. GM op BAL-vochten. De sensitiviteit verhoogt daarnaast door combinatiediagnostiek met PCR of andere inflammatoire markers zoals triacetylfusarinine C. ^{4 38}

De goede performantie van beide testen toont de meerwaarde als snelle screeningstest van deze lateral flow assay met een korte TAT. De test toonde daarnaast een excellente negatief predictieve waarde wanneer uitgevoerd op BAL vochten. Confirmatie bij een positieve LFA door andere diagnostische methoden zoals GM, PCR of cultuur wordt absoluut aangeraden. ^{37 38 39}



Mercier et al. ³⁸ Links: OLM diagnostics Asp LFD - Rechts IMMY Sōna *Aspergillus* galactomannan LFA

Huidige diagnostische workflow AZ Sint-Jan

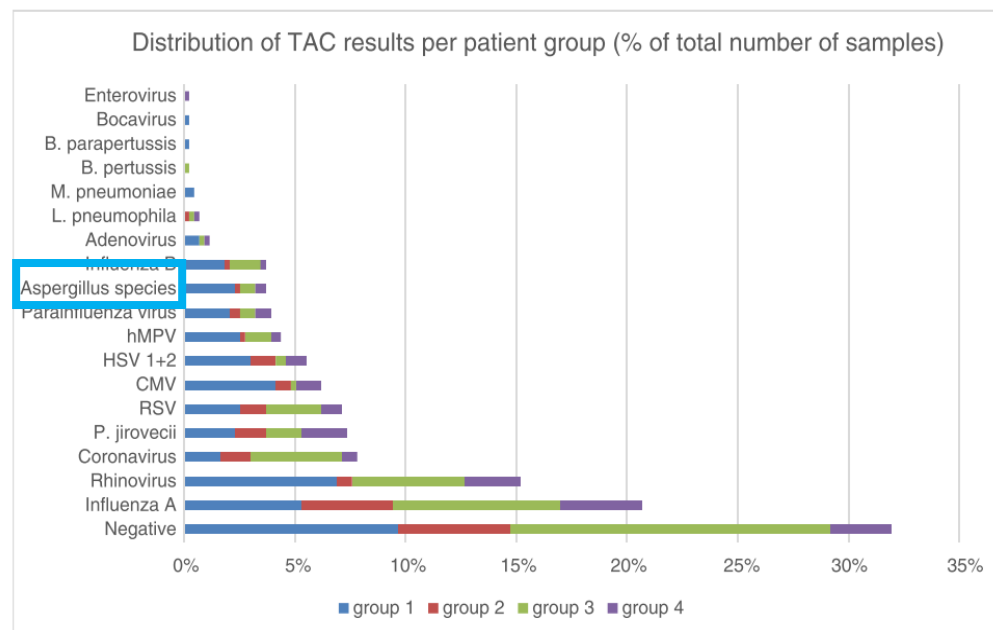
De GM-EIA wordt in het AZ Sint-Jan Brugge dagelijks meermaals uitgevoerd met de Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay (GM-EIA; Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-coquette, France). De test wordt uitgevoerd op serum en BAL-vochten. De ingestelde ODI is afhankelijk van het staaltipe, bij een eerste positief resultaat wordt het staal bij een volgende run herhaald en bevestigd. Bij een positieve GM op BAL wordt aangeraden om in parallel serum af te nemen en de resultaten te interpreteren aan de hand van bijkomende mycologische resultaten (o.a. conventionele kweek).

Bij een klinisch vermoeden van invasieve pulmonale aspergillose wordt aangeraden een BAL-staal te nemen. Binnen de hematologiepopulatie wordt daarnaast wekelijks /of tweemaal per week (eerste 100 dagen post-allo Tx) een screening gedaan van GM op serum. Bij vermoeden van IPA, dient het serumstaal eveneens aangevuld te worden met een BAL.

Staaltipe	ODI	interpretatie
Serum	<0,50	Negatief
	≥0,50	Positief
BAL	<1,0	Negatief
	≥1,0	Positief

De fungale DNA detectie van *Aspergillus fumigatus* met PCR maakt standaard deel uit van het in house ontwikkelde respiratoir screeningspaneel dat sinds 2013 gebruikt wordt in AZ Sint-Jan Brugge. Dit paneel wordt aangevraagd bij elk vermoeden van laag respiratoire infecties of binnen een zoektocht naar het oorzakelijk agens van een pneumonie, koorts van ongekende oorsprong of onverklaarde longletsels. De TaqMan Low Density Array card (TAC) is een micro-array techniek waarmee 48 specifieke real-time PCR's in parallel worden uitgevoerd voor de detectie van 22 respiratoire DNA/RNA virussen, 9 bacteriën en 2 fungi, waaronder *Aspergillus fumigatus*. Met deze TAC[®] werd een retrospectieve epidemiologische cohortstudie uitgevoerd door Deborah Steensels et al. met data uit 2014 – 2015 waarbij de prevalentie van respiratoire virussen in immunogecompromitteerde patiënten werd onderzocht in twee tertiaire ziekenhuizen, waaronder AZ Sint-Jan (Brugge - Oostende). De prevalentie van detectie van *A. fumigatus* op de gebruikte TAC[®] kaart was 3,7%. De positiviteitsratio voor *Aspergillus species* was hoger bij BAL-vochten dan in nasofaryngeale wissers en de gemiddelde Ct - waarde was 32.0 (19.0 – 38.0).⁴⁰

Fig. 1 TAC results per patient group (% of total number of samples)



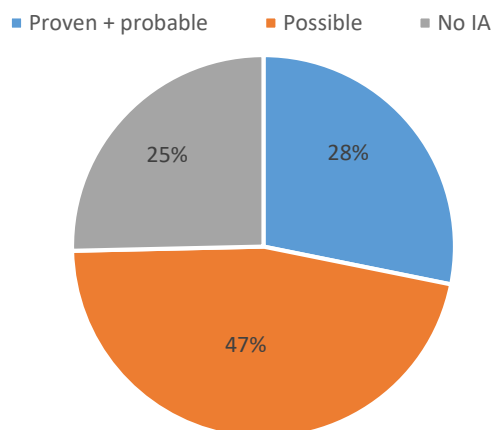
Retrospectieve studie

A. Wat is de plaats van een enkelvoudig positief PCR resultaat voor *Aspergillus fumigatus* binnen de hematologiepopulatie van het AZ Sint-Jan Brugge ?

Er werd een retrospectieve studie uitgevoerd op BAL-stalen afgenomen bij hematologiepatiënten tussen 2014 en 2021. Het doel was om de concordantie tussen stalen, waarop zowel GM-EIA als PCR werd uitgevoerd, te bepalen en daarnaast de waarde van een enkelvoudig positief PCR resultaat te evalueren.

Patiënten werden op basis van hun aanwezige gastheerfactoren (o.a. hematologische maligniteit, recente neutropenie, HSCT), klinische evidenties (radiologisch suspect) en mycologische criteria volgens de EORTC/MSG richtlijnen opgedeeld binnen vier voorgestelde categorieën: “proven”, “probable”, “possible” of “no” IA. De volledige definities van deze gastheerfactoren, klinische kenmerken en mycologische criteria zijn terug te vinden in bijlage I.

Indeling patiëntenpopulatie volgens
EORTC/ MSG richtlijnen
n = 71 (100%)

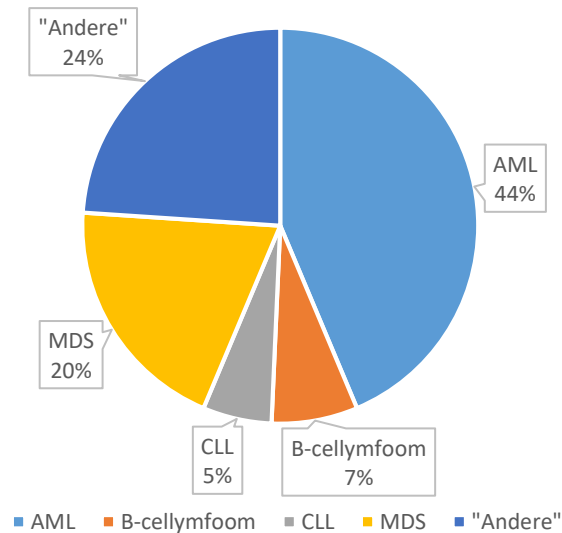


Er werden in totaal 71 BAL-stalen geselecteerd van immuungecompromitteerde hematologiepatiënten, waarbij op hetzelfde staal GM-EIA en *Aspergillus fumigatus* PCR (onderdeel van de respiratoire multiplex) aangevraagd was. Bij één patiënt werd een “proven” invasieve aspergillose bewezen door het aantonen van hyfae op een histopathologisch biopt. 19 patiënten voldeden aan de criteria voor een “probable” IA en 33 patiënten werden als “possible” geassocieerd. Voor de overige 18 patiënten kon op basis van deze criteria geen evidentie voor een IA worden aangetoond. Een gedetailleerd overzicht van de verdeling en de kenmerken van deze patiëntenpopulatie is terug te vinden in de tabel op pagina 15.

Gastheerfactoren

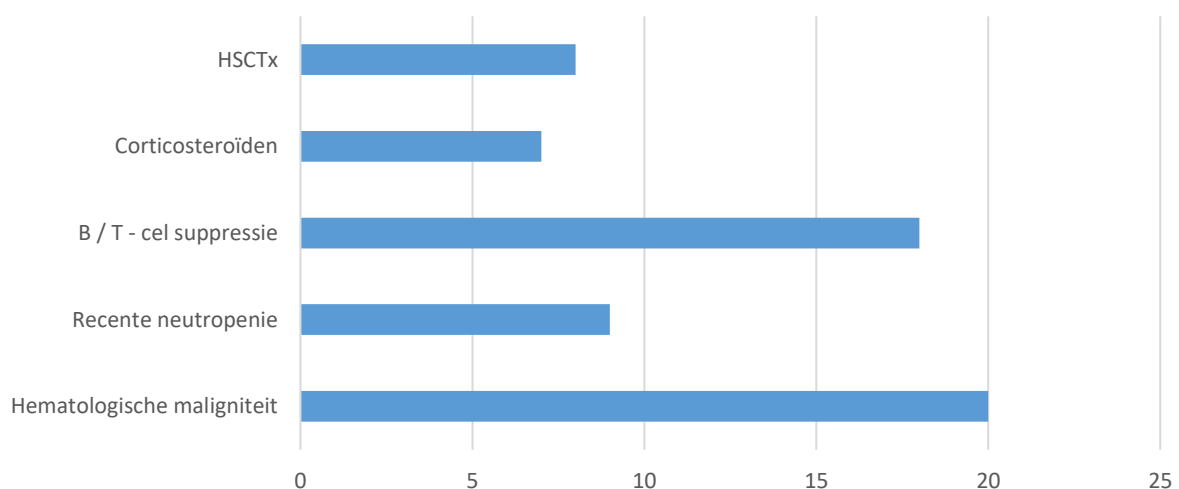
Van deze onderzochte hematologiepopulatie (N=71) was de meest voorkomende hematologische maligniteit acute myeloïde leukemie (44%). 30% (21/71) van deze patiëntenpopulatie onderging in het verleden een hematopoëtische stamceltransplantatie (HSCT). (Tabel p15)

Verdeling hematologische maligniteit (N=71)



Bij patiënten ingedeeld in de "probable" categorie hadden 9/19 patiënten (47%) recent een periode van neutropenie doorgemaakt, gedefinieerd door de EORTC/MSG als $<0.5 \times 10^9$ neutrofielen/L of <500 neutrofielen/mm³ voor >10 dagen, gerelateerd aan de start van de invasieve schimmelinfectie.²⁰ Naast de aanwezigheid van een actieve – of recente hematologische maligniteit, was de behandeling met B – of T– celsuppressietherapie de meest frequent gerapporteerde gastheerfactor bij de "proven + probable" IA (90%) en "possible" (94%) categorie. Een verlengde kuur van corticosteroïden in een therapeutische dosis van ≥ 0.3 mg/kg corticosteroïden voor ≥ 3 weken in de afgelopen 60 dagen wordt eveneens beschouwd als een risicofactor voor het ontwikkelen van een IPA.²⁰

Gastheerfactoren Proven / Probable (n = 20)



Klinische criteria

De indeling van een pulmonaire aspergillose op basis van klinisch-radiologische kenmerken, wordt gemaakt aan de hand van bepaalde patronen aanwezig op computertomografie (CT). Voor deze studie konden we enkel afgaan op de beschreven commentaren door de dienst radiologie bij de verschillende CT-beelden. De vaakst voorkomende commentaar, en daarbij ook de minst specifieke, was het beschrijven van lobaire consolidaties. Een typische caviteit werd bij 7/71 patiënten beschreven (9,9%), lesies met – of zonder aanwezigheid van een halo-sign bij 22/71 patiënten (31%).

Mycologische evidenties

In deze studie hadden we voornamelijk interesse in de aanwezige mycologische evidenties en de verdeling tussen positieve GM-EIA en PCR resultaten.

11% van de BAL-stalen (8/71) testte positief voor galactomannan (ODI >1,0). De patiënten met een positieve GM hadden allen een hematologische maligniteit, radiologisch suggestieve tekens passend bij een IA, en er waren verschillende gedefinieerde gastheerfactoren (zoals een recente neutropenie, ...) aanwezig. Er werd bijgevolg voldaan aan de criteria passend bij een “proven” of “probable” IA. Alle patiënten werden behandeld met antifungale therapie, met als eerste keuze voriconazole, gevolgd door de combinatietherapie caspofungine (CAS) + voriconazole (VOR). Deze laatste combinatietherapie wordt gebaseerd op de studie van Marr et al., waarbij combinatietherapie met voriconazole en een echinocandine in bepaalde subsets van de onderzoekspopulatie leidde tot een verbeterde survival.⁴¹ De schimmelkweek en het rechtstreeks onderzoek (RO) op schimmels waren bij alle stalen negatief.

6/71 (8%) patiënten testten enkel positief op PCR *Aspergillus fumigatus* zonder positieve GM (op BAL). Eén patiënt testte daarbij wel positief voor GM op serum. Alle patiënten, waarbij deze PCR positief was, werden effectief behandeld voor een invasieve pulmonaire aspergillose. Drie patiënten kregen monotherapie met voriconazole of ambisome, drie patiënten kregen een combinatietherapie (CAS + VOR of CAS + Amfotericine B). De schimmelkweek en het RO waren hier eveneens negatief.

Bovenstaande patiënten met een enkelvoudig positief PCR resultaat werden in onze analyse allen geïncludeerd in de “probable” categorie o.b.v. de vernieuwde guidelines hierboven beschreven. De indeling in deze “probable” IPA groep, is echter niet volledig volgens de EORTC/MSG richtlijnen 2020, omdat een positieve *Aspergillus* PCR in tweevoud uitgevoerd diende te worden. In het labo van AZ Sint-Jan Brugge werd een positieve PCR echter nooit herhaald, voornamelijk door de hoge kostprijs van moleculaire diagnostiek en de duidelijke en sigmoïdale amplificatiecurve. Daarnaast gebeurt ook een brede alternatieve diagnostiek om andere mogelijke causale agentia, die vergelijkbare longletsels (bv. *Nocardia* spp., atypische mycobacteriën) geven, op te sporen. Hierdoor werden patiënten met één positief testresultaat op de PCR *Aspergillus fumigatus* in onze studie binnen de groep “proven of probable” IA geïncludeerd werden.

Bij 6/71 patiënten was er een concordantie tussen de resultaten van GM-EIA en PCR, waarbij beide testen positief waren op de afgenomen BAL-samples. De evidentie voor de aanwezigheid van een IPA werd versterkt door de concordantie tussen beide testen, alle patiënten werden met antifungale therapie behandeld. De schimmelkweek was bij 3/6 stalen positief voor *Aspergillus fumigatus*.

Bij 51/71 patiënten kon geen mycologisch bewijs (negatieve cultuur, galactomannan of PCR) aangetoond worden op het afgenomen broncho-alveolair lavagevocht. Op basis van de aanwezige radiologisch suggestieve tekens en de vastgestelde gastheerfactoren werden 33 patiënten van deze populatie in de “possible” groep onderverdeeld. Zonder mycologisch bewijs van een fungale infectie, werden toch 17 patiënten behandeld met antifungale therapie (52%).

De grote variatie in aspect en samenstelling van een BAL, afgenomen om mycologische evidentie te kunnen aantonen, zorgt echter nog regelmatig voor een onduidelijke performantie van de GM-EIA. Het uitvoeren van een BAL-afname blijkt vaak een moeilijke procedure en dient zo gestandaardiseerd mogelijk te gebeuren. Uit ervaring binnen het ziekenhuis blijkt echter dat niet alle BAL-afnames volgens eenzelfde protocol gebeuren. BAL-stalen worden door pediaters, pneumologen of intensivisten afgenomen. Deze laatste artsen nemen echter vaak een “mini”-BAL af, voornamelijk bij patiënten aan Optiflow met een hoog risico op acute respiratoire deterioratie en diepe desaturatie, waardoor niet steeds het gewenste volume in het labo ontvangen wordt en geanalyseerd kan worden.

Bij 18 patiënten werd geen enkele evidentie van IA gevonden. Twee patiënten werden, op empirische basis, toch met antifungale therapie, behandeld. Bij de andere patiënten werd een alternatieve focus van de respiratoire infectie gevonden. 6/18 patiënten bleken een *Pneumocystis jirovecii* pneumonie te hebben ontwikkeld. Bij vijf patiënten werd de klinische diagnose van een bacteriële pneumonie gesteld en twee patiënten bleken positief voor influenza-B.

Demografische patiëntentabel (p15) - hematologiepopulatie

Patiëntkarakteristieken		totaal (n=71)	Proven + Probable IA (n=20)	Possible IA (n=33)	no IA(=18)
Geslacht	Man	47 (66%)	15 (75%)	18 (55%)	14 (78%)
	Vrouw	24 (34%)	5 (25%)	15 (45%)	4 (22%)
Leeftijd	Mediaan	69		69	70
Onderliggende hematologische maligniteit	AML	31 (46%)	9 (45%)	17 (52%)	4 (22%)
	B-cellymfoom	5 (7%)	0 (0%)	3 (9%)	2 (11%)
	CLL	4 (6%)	2 (10%)	1 (3%)	1 (6%)
	MDS	14 (20%)	2 (10%)	6 (18%)	6 (33%)
	"Andere"	17 (24%)	7 (35%)	6 (18%)	5 (28%)
Autologe HSCT		21 (30%)	8 (40%)	10 (30%)	3 (17%)
Antifungale therapie	"Any"	38 (54%)	19 (95%)	17 (52%)	2 (11%)
	AMB	1 (1%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)
	CAS	3 (4%)	0 (0%)	3 (9%)	0 (0%)
	NOX	1 (1%)	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)
	VOR	20 (28%)	10 (50%)	8 (24%)	2 (11%)
	CAS + AMB	3 (4%)	2 (10%)	1 (3%)	0 (0%)
	CAS + NOX	2 (3%)	1 (5%)	1 (3%)	0 (0%)
	CAS + VOR	5 (7%)	4 (20%)	1 (3%)	0 (0%)
	ISA + AMB	1 (1%)	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)
	AMB + CAS + VOR	2 (3%)	1 (5%)	1 (3%)	0 (0%)
Mycologische criteria	GM	8 (11%)	8 (40%)	0 (0%)	0 (0%)
	1 PCR-test	6 (8%)	6 (30%)	0 (0%)	0 (0%)
	GM + PCR	6 (8%)	6 (30%)	0 (0%)	0 (0%)
	No evidence	51 (72%)	0 (0%)	33 (100%)	18 (100%)

Discussie

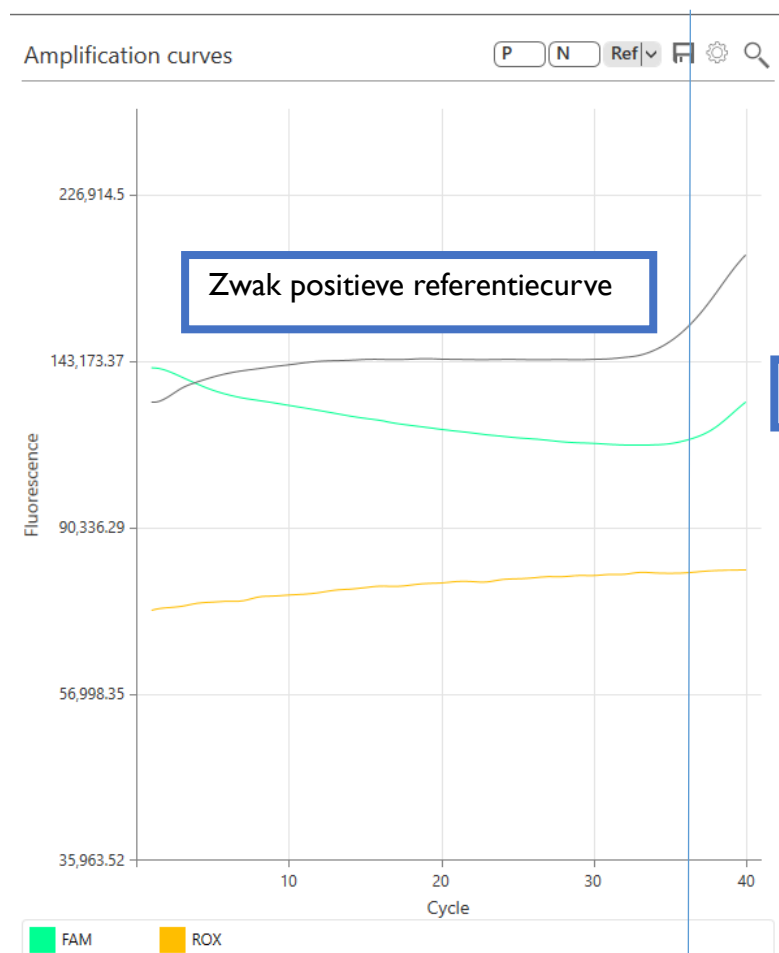
In deze studie werden uiteindelijk slechts zes enkelvoudige positieve PCR-stalen geïncubeerd met een negatieve galactomannan. De waarde van deze positieve PCR is tot dusver nog steeds onduidelijk. Alle patiënten met een positief resultaat voor de *Aspergillus fumigatus* PCR werden met antifungale therapie behandeld. Een outcome van de eventueel onbehandelde patiënten, kon hier dus niet worden onderzocht. Een andere logische verklaring voor het behandelen van deze patiënten, is de gevolgde redenering van de behandelend hematoloog, dat een onbehandelde aspergillose in deze setting een erg hoge mortaliteit kent.

Omdat de diagnostische waarde van deze solitaire PCR nog niet 100% helder was, werden de Ct (Cycle-treshold) – waarden van deze 6 stalen opnieuw bekeken en geïnterpreteerd aan de hand van FastFinder® analysis. Alle Ct-waarden varieerden tussen Ct 32.0 en Ct 37.0. De detectielimiet, waarbij de *Aspergillus fumigatus* PCR, gerapporteerd werd, lag tot op heden op Ct 39.0. De resultaten van de PCR tussen Ct 35.0 en Ct 39.0 werden allen klinisch becommentarieerd als “zwak positief, met twijfelachtige betekenis, mogelijk contaminatie bij afname of verwerking van het staal”. Een PCR met een Ct-waarde ≤ 35.0 wordt als positief gerapporteerd. Echter bij een kritische analyse van de verschillende curves, ligt een staal met een cycle threshold van 37.0, nog een stuk onder de “zwak-positieve” referentie-curve. Daarbij moest beslist worden wat de klinische betekenis was van een zwak positieve PCR voor *Aspergillus fumigatus*, met een hoge Ct-waarde.

Een voordeel van moleculaire analyses op BAL en de gevonden positieve resultaten, is dat er een mogelijkheid is om aan de hand van o.a. de AsperGenius® kit de gevoeligheid van de schimmel te kunnen analyseren. Echter op deze zwak-geladen stalen is de kans quasi nihil dat er betrouwbaar naar azoleresistentie zou kunnen gezocht worden ten gevolge van de gelimiteerde analytische gevoeligheid bij lage Ct-waarden.

Analyse Ct-waarden : stalen positieve PCR en negatieve GM

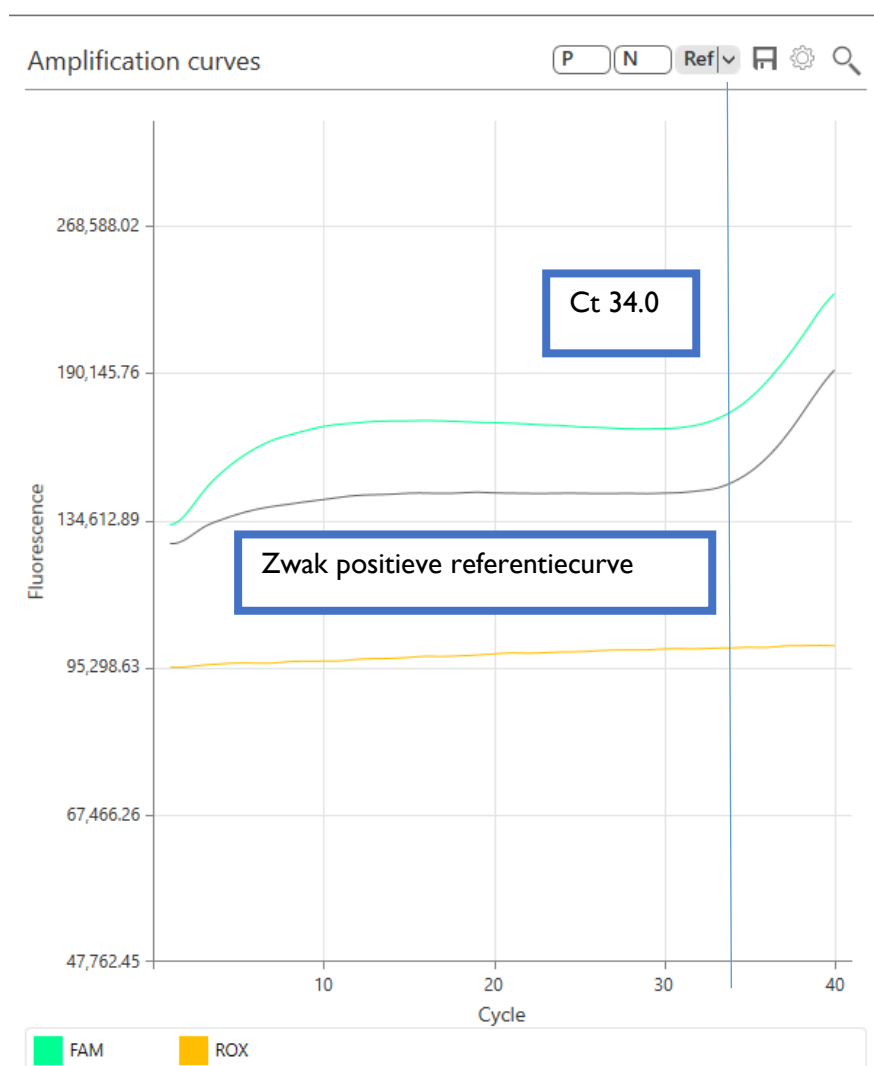
PCR <i>Aspergillus fumigatus</i>	Ct-waarde	GM-EIA (ODI)
Zwak positief	35.0	0,42
Zwak positief	37.0	0,10
Positief	32.0	0,38
Zwak positief	37.0	0,97
Zwak positief	35.0	0,06
Zwak positief	35.0	0,81



De Ct - waarden van de positieve PCR-resultaten, waarbij eveneens de GM assay positief was, werden ook uitgezocht. Alle resultaten hadden een Ct-waarde ≤ 35.0 , waarvan drie met een opvallend lage Ct-waarde (≤ 26.0). Deze lagere Ct – waarden dragen bij tot een meer duidelijke interpretatie van de PCR. Gezien hier een Ct 35.0 resulteerde in een positieve GM-EIA van 3,08, lijkt onze sinds jaren gebruikte klinische cut-off voor positiviteit van Ct 35.0 niet onlogisch.

Analyse Ct-waarden : stalen positieve PCR en positieve GM

PCR <i>Aspergillus fumigatus</i>	Ct-waarde	GM-EIA (ODI)
Positief	34.0	>5.0
Positief	22.0	>5.0
Positief	26.0	>5.0
Positief	25.0	>5.0
Positief	34.0	2,1
Zwak positief	35.0	3,08



Op basis van deze (beperkte) retrospectieve studie, werd de “klinische cut-off” van een zwak positieve *Aspergillus fumigatus* PCR opnieuw in vraag gesteld. Bovenstaand voorbeeld, waarbij de PCR een Ct 34.0 voor *Aspergillus fumigatus* aangeeft, toont een duidelijk positieve sigmoïdale curve, resulterend in een positieve klinisch commentaar:

“Positief: Aspergillair DNA duidelijk aantoonbaar. Te toetsen aan galactomannan test, schimmelkweek en rechtstreeks onderzoek op BAL, kliniek (COPD, ICU, hemato,...), beeldvorming en eventuele risicofactoren op invasieve pulmonaire aspergillose; een uitgesproken kolonisatie is echter niet uitgesloten.”

De curve met Ct 37.0 voor de detectie *Aspergillus fumigatus* toont slechts heel lichtjes een sigmoïdale stijging. Hierbij dient in vraag te worden gesteld, of dit eveneens een positief resultaat dient te weerspiegelen. Bij deze “zwak positieve” curve wordt op heden onderstaand commentaar bijgevoegd, waarbij het werkelijk klinisch belang in vraag wordt gesteld:

“Zwak positief: Zwak signaal, mogelijk van beperkt klinisch belang. Het kan hier gaan om dragerschap of contaminatie uit de omgeving; maar anderzijds tevens om een vroege fase van invasieve pulmonaire aspergillose in risicopopulaties (hemato-onco, ICU, post-influenza infectie, HD corticosteroiden, therapie met “biologicals”, COPD,...). Te toetsen aan Ag GM resultaat in BAL (en serum waar geïndiceerd), kliniek, beeldvorming, risicofactoren en eventueel andere aanvullende onderzoeken.”

We zagen echter, ondanks het bijhorend commentaar met de nadruk op het twijfelachtig belang van de positieve PCR, dat in onze studie alle patiënten (6/71) met een enkelvoudig zwak positief PCR resultaat toch behandeld werden met antifungale therapie. Daardoor werd besloten op het rapport **“twijfelachtig”** weer te geven in plaats van “zwak positief” met bijhorend bovenstaand commentaar omtrent het mogelijk eerder beperkt klinisch belang. Er werd een algoritme opgesteld waarbij wordt voorgesteld dat bij een positieve PCR op de respiratoire multiplex, de galactomannan assay onmiddellijk dient worden bij-aangevraagd. In kader van het klinisch beeld en de CT-scan dient te worden beslist of er enerzijds antifungale therapie moet worden ingesteld of anderzijds er een mogelijkheid is om af te wachten en radiologisch op te volgen.

Als laatste werd geprobeerd de performantie van de verschillende testen te gaan analyseren, om op basis van dit resultaat, de meerwaarde van de PCR aan te tonen. Echter gezien de geïncludeerde patiënten in deze retrospectieve studie werden ingedeeld in de verschillende groepen (proven, probable, possible IA) op basis van de mycologische uitkomst, werd hier gestoten op een incorporation bias. Een secundaire analyse op basis van een andere gebruikte techniek (zoals LFA) zou een oplossing kunnen bieden, echter deze test wordt in het labo van AZ Sint-Jan Brugge niet routinematig uitgevoerd o.w.v hoge uitvoeringsfrequentie van de GM assay.

AFT = antifungale therapie

Algoritme PCR *Aspergillus fumigatus*

Positieve PCR Ct > 35,0

Bijaanvraag: GM-EIA

Positief

**CT Thorax
Klinische evaluatie**

**Start antifungale
therapie**

Zwak positief

Negatief

**Radiologische
opvolging - CT Thorax**

**Afwachtende
houding AFT**

Twijfelachtig

Positieve PCR Ct ≤ 35,0

(Bijaanvraag: GM-EIA)

**CT Thorax
Klinische evaluatie**

**Start antifungale
therapie**

Positief

B. Invasieve pulmonaire aspergillose & COVID-19: analyse van invasieve Aspergillose in de post-virale setting

De meest beschreven – en onderzochte populatie van IPA is de hemato-onco populatie. De laatste jaren wordt IPA daarnaast steeds meer gediagnosticeerd als respiratoire superinfectie bij patiënten opgenomen op intensieve zorgen (IZ). Respiratoire virussen zijn in staat onmiddellijke schade aan het luchtwegepitheel te veroorzaken, waardoor *Aspergillus spp.* eenvoudiger in de weefsels kunnen binnendringen.⁴⁴ Virale infecties, zoals influenza, blijken dan ook een onafhankelijke risicofactor voor het ontwikkelen van invasieve aspergillose, dit wordt gedefinieerd als influenza – geassocieerde invasieve aspergillose (IAPA). IAPA wordt gerapporteerd bij patiënten met onderliggende gastheerfactoren, zoals beschreven door de EORTC/MSG, maar daarnaast ook bij voorheen gezonde individuen. De incidentieratio bedraagt 19% van de patiënten opgenomen met influenza op IZ. Er wordt een 90-dagen mortaliteit beschreven van 51%, bij patiënten zonder IAPA bedraagt deze 28%.^{42 43}

Naast influenza, is COVID-19 als virale infectie op heden omnipresent. Sinds de start van de pandemie werden verschillende casussen beschreven van COVID-19 geassocieerde pulmonaire aspergillose (CAPA).⁴⁵ De mortaliteitsratio blijkt gelijkaardig met IAPA, Paul Verwije et al. beschrijven een ratio van 52%. De incidentie van CAPA varieert tussen 3 – 33% en komt het vaakst voor bij mechanisch geventileerde patiënten. Deze incidentieratio varieert voornamelijk door de afwezigheid van een eenduidige consensus definitie voor CAPA.⁴³ Het stellen van deze diagnose en het classificeren van patiënten met CAPA blijkt ingewikkeld door de frequente afwezigheid van gastheerfactoren naast typische radiologische beeldvorming en mycologische evidenties waarop de EORTC/MSG criteria gebaseerd zijn. Het aantonen van IPA met daarbij objectieve mycologische evidenties werd daarbij ook bemoeilijkt door een verminderd gebruik van bronchoscopie tijdens de eerste golf van de coronapandemie (december 2019 – juni 2020). Er was onduidelijkheid over de gevaren van aërosolblootstelling tijdens de procedure en de directe infectieuze gevolgen voor de uitvoerende arts en de patiënt. Hierdoor werden bronchusaspiraten, sputa en hoog respiratoire stalen gebruikt voor de detectie van galactomannan of een *Aspergillus* PCR. Hieruit volgt dat het onderscheid tussen *Aspergillus* kolonisatie en een eventuele invasieve schimmelinfectie zeer moeilijk te maken valt. Deze staaltypes zijn daarnaast niet gevalideerd voor het uitvoeren van GM-EIA en PCR waardoor een adequate interpretatie van de resultaten bemoeilijkt wordt. Daarnaast kan, door het gebrek aan uitvoeren van een bronchoscopie, het macroscopisch aspect van de luchtwegmucosa niet worden gevisualiseerd waardoor de (macroscopische) diagnose van invasieve *Aspergillus* tracheobronchitis (IATB) niet kan worden gesteld.⁴⁴

Een recente publicatie van Verwije et al., waarbij 28 internationale experts zochten naar verdere inzichten binnen de epidemiologie, diagnose en management van CAPA, moet zorgen voor een praktische handleiding voor het management van COVID-19 geassocieerde pulmonaire aspergillose. Ze beschreven dat bronchoscopische evaluatie en het nemen van een BAL veilig kan gebeuren bij patiënten met COVID-19. De prevalentie van CAPA wordt voornamelijk gerapporteerd in mechanisch geventileerde patiënten, echter het uitvoeren van invasieve procedures wordt ook maar slechts zelden gedaan bij niet-geventileerde patiënten. De risicofactoren voor het ontwikkelen van CAPA werden gerapporteerd door vier verschillende studies en bestonden enerzijds uit de aanwezigheid van een langdurige corticosteroïdenkuur en daarnaast uit het vooraf bestaan van chronisch structurele longziekten.⁴³

In het huidige management van COVID-19 patiënten is een 10 – daagse corticosteroïdentherapie met dexamethasone de hoeksteen, dit sinds de publicatie van de RECOVERY trial. Rechtstreeks volgt daaruit een verhoogd risico voor het ontwikkelen van CAPA. Echter, het blijft onduidelijk of een Sars-CoV-2 infectie op zich de grootste risicofactor is voor het ontwikkelen van CAPA of het aanwenden van deze beschreven corticosteroïdentherapie.⁴³

Deze expertengroep stelden een algoritme op waarbij onverklaarbare klinische deterioratie of een o.a. positieve sputumcultuur / bronchusaspiraats met *Aspergillus fumigatus*, suggestieve CT beelden of een positieve serum GM duidelijke triggers moet zijn om een BAL uit te voeren. Een positieve cultuur van een diep staal, positieve PCR of een BAL GM ODI >1,0 wordt geassocieerd met een ontwikkelde CAPA superinfectie. Antifungale therapie dient bij een positieve diagnose te worden opgestart met als eerstelijns therapie voriconazole. Isavuconazole en posaconazole kunnen in deze setting gebruik worden, echter met minder evidentie. Er wordt geen standaard antifungale profylaxe aanbevolen bij geventileerde COVID-19 patiënten.⁴³

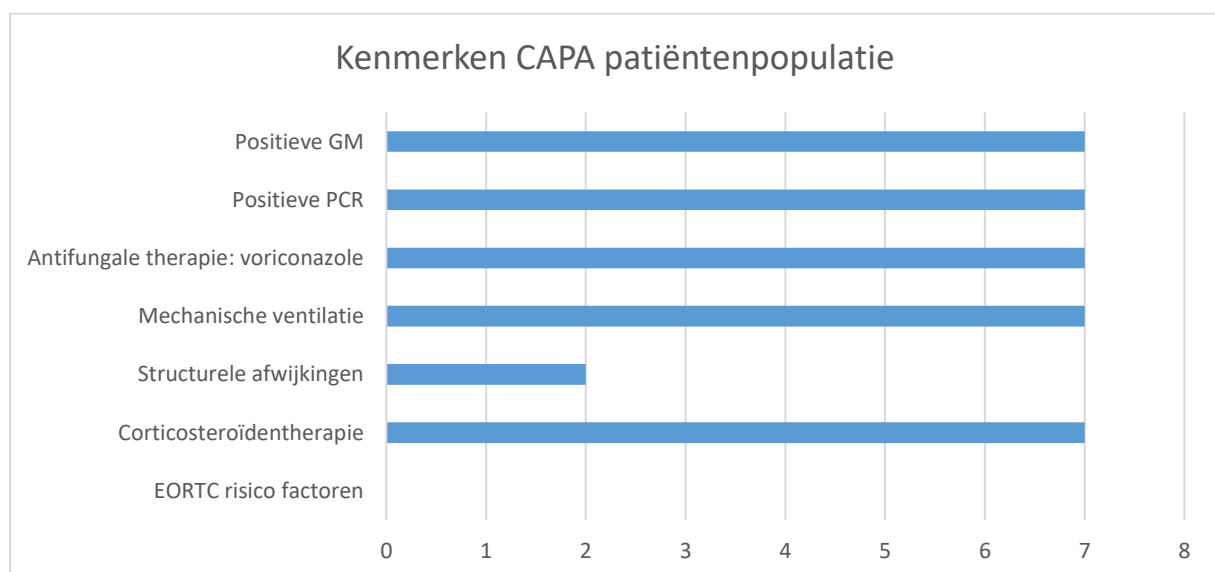
Analyse van onze patiëntenpopulatie op intensieve zorgen

In het AZ Sint-Jan Brugge werd bij 40 COVID-19 patiënten, tussen februari 2020 en april 2021, een BAL-staal afgenomen. Daarvan testten 7 stalen positief (17,5%) voor GM op BAL (met een ODI cut-off van 1,0). Alle waarden varieerden tussen een ODI index van 1,88 en >5,0. Daarnaast werd bij deze studiegroep een respiratoire multiplex ingezet, waarbij alle patiënten (7/7) concordant testten met de *Aspergillus fumigatus* PCR. De Ct-waarden van deze stalen varieerden allen tussen Ct 26,91 en Ct 35,0. De concordantie tussen deze resultaten, en de duidelijk lagere Ct waarden bij 5/7 stalen, vormen een conclusief resultaat voor het diagnosticeren van een CAPA.

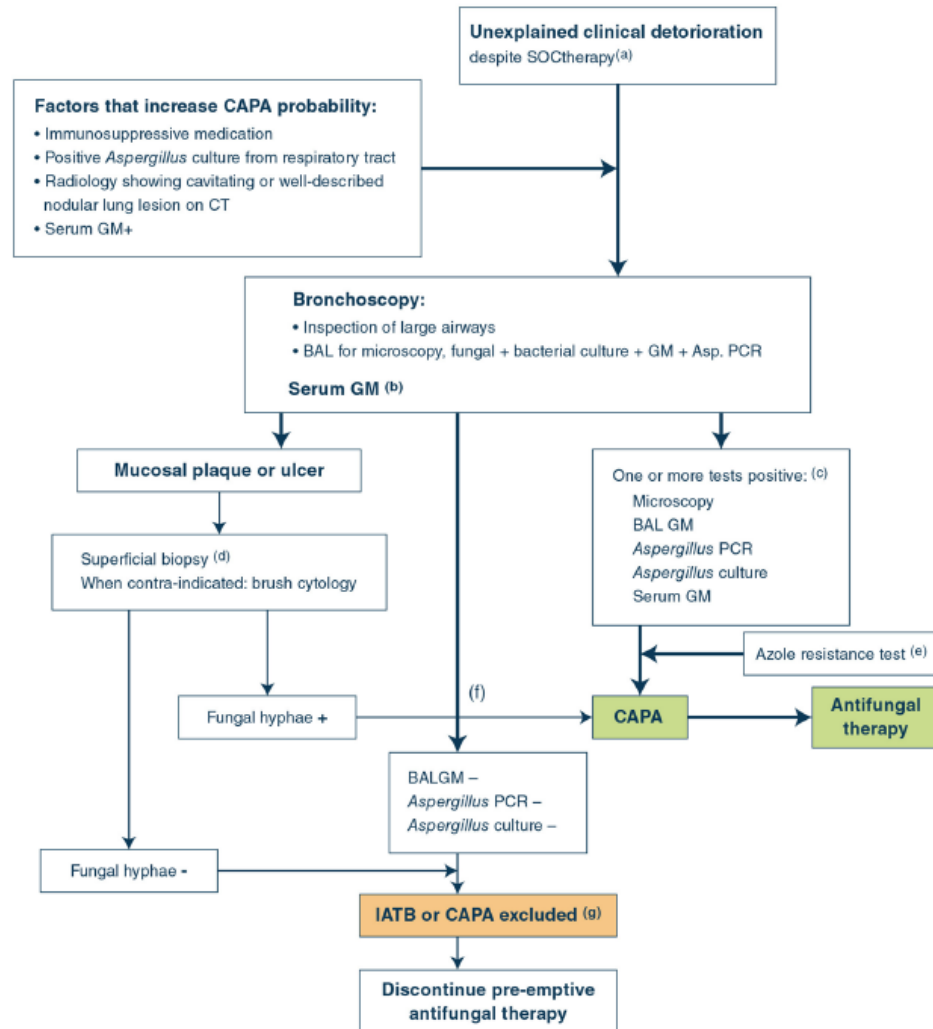
Analyse Ct-waarden : stalen positieve PCR en positieve GM

PCR <i>Aspergillus fumigatus</i>	Ct-waarde	GM-EIA (ODI)
Positief	29,25	1,81
Zwak positief	35,0	1,97
Positief	34,27	2,12
Positief	26,91	>4
Positief	30,97	>5
Positief	26,81	>5
Positief	30,69	>4

Bij deze patiënten was een voorgaande positieve GM op een bronchusaspiraats (surveillancestaal) de trigger voor het uitvoeren van een BAL. Alle patiënten uit deze subgroep werden mechanisch geventileerd en kregen voorheen minstens 10 dagen therapie met dexamethasone. Bij één patiënt werd een suggestief halo-sign beschreven, bij alle anderen werden aspecifieke radiologische bevindingen beschreven zoals matglasverdichtingen, consolidaties en infiltraten. Deze patiënten werden allemaal met voriconazole behandeld, de spiegels werden met therapeutisch drug monitoring (TDM) tweemaal per week opgevolgd. Geen van de patiënten hadden een gastheerfactor beschreven in de EORTC/MSG criteria, en slechts twee patiënten hadden vooraf bestaand structureel bronchiaal lijden (astma en COPD gold IV).



Proposed clinical guidance for the management of CAPA



(a) SOC = Standard of care. The SOC of COVID-19 is likely to change in the future but for now it includes thromboembolic prophylaxis, therapy with dexamethasone, and anti-IL-6 when available, exclusion of pulmonary embolism with CT. Other causes of clinical respiratory deterioration may also need to be excluded: pneumothorax, atelectasis, progressive pulmonary fibrosis.

(b) Serum GM is generally negative but increases the probability of CAPA if positive in combination with positive BAL GM. Positive serum GM might be associated with poor outcome.

(c) Multiple positive *Aspergillus* test results increase the probability of CAPA and reduces the likelihood of a false-positive result.

(d) May require temporarily stopping anticoagulation 24 hrs before the procedure.

(e) Azole resistance testing is recommended in regions with known triazole resistance or in patients failing triazole therapy.

(f) Formally, only when septate hyphae size 2.5 to 4.5 μm in diameter are seen AND the presence of *Aspergillus* DNA is documented as well, the infection is classified as proven CAPA. However, the presence of hyphae compatible with *Aspergillus* suffices to start antifungal therapy.

(g) IATB, Invasive *Aspergillus* tracheobronchitis; CAPA, COVID-19 associated pulmonary aspergillosis.

COMMENTS

Op basis van deze analyse, concluderen we dat tot op heden de waarde van een enkelvoudig zwak positief PCR, met daarbij hoge Ct-waarden (≥ 35.0), nog niet duidelijk is. De resultaten uit onze studie in de hematologiepopulatie pleitten tegen een directe behandeling met antifungale therapie, ondanks de aanwezigheid van een heel laat signaal in de *Aspergillus fumigatus* PCR (cf. tussen Ct 35.0 – Ct 39.0). We zien echter, ondanks het bijhorend klinisch commentaar van een eerder twijfelachtig belang, dat bij alle patiënten effectief het diagnosepad van een IPA wordt gevolgd. De ingestelde antifungale behandeling brengt echter eveneens heel wat neveneffecten mee. Anderzijds werd geconfirmeerd dat alle positieve PCR resultaten ($Ct \leq 35.0$) correleerden met een positieve galactomannan, wijzend op een goede klinische interpretatie om het patiëntmanagement te leiden.

Er werd een algoritme ontwikkeld, die in de komende maanden klinisch gevalideerd zal worden, waarbij de verantwoordelijke microbioloog samen met de behandelde hematoloog / intensivist steeds het resultaat van de PCR kritisch in vraag zal stellen en op basis van bijkomende resultaten (GM-EIA, CT en kliniek) de meest adequate therapie zal aanraden.

Grotere multicentrische studies in de toekomst moeten verder onderzoek voeren naar de waarde van het enkelvoudige zwak positief PCR resultaat en de daarbij horende relevante klinische cut-off om een antifungale behandeling op te starten.

Daarnaast werd duidelijk dat IPA in de COVID-19 ICU populatie duidelijk aanwezig is. Literatuurgegevens tonen dat CAPA een belangrijke risicofactor vormt met een significante toename in mortaliteit, waarmee we in de pandemie ook geconfronteerd werden. Intensivisten en pneumologen dienen bedacht te zijn op het aanwezige risico.

TO DO/ACTIONS

- 1) Er dienen multicentrische studies te gebeuren om de waarde van een enkelvoudige zwak positieve PCR voor *Aspergillus fumigatus* aan te tonen. Daarbij moet worden onderzocht welke Ct-waarde een invasieve pulmonaire aspergillose impliceert en wanneer antifungale therapie dient te worden opgestart.
- 2) Klinische validatie van het opgesteld algoritme binnen AZ Sint-Jan Brugge tussen de verantwoordelijke microbiologen en de klinici. (pneumologen/hematologen/intensivisten)

ATTACHMENTS

Attachment I :

Peter Donnelly, J. *et al.* 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**, 1367–1376 (2020).

Table 1. Criteria for Proven Invasive Fungal Disease

Fungus	Microscopic Analysis: Sterile Material	Culture: Sterile Material	Blood	Serology	Tissue Nucleic Acid Diagnosis
Molds ^a	Histopathologic, cytopathologic, or direct microscopic examination ^b of a specimen obtained by needle aspiration or biopsy in which hyphae or melanized yeast-like forms are seen accompanied by evidence of associated tissue damage	Recovery of a hyaline or pigmented mold by culture of a specimen obtained by a sterile procedure from a normally sterile and clinically or radiologically abnormal site consistent with an infectious disease process, excluding BAL fluid, a paranasal or mastoid sinus cavity specimen, and urine	Blood culture that yields a mold ^c (eg, <i>Fusarium</i> species) in the context of a compatible infectious disease process	Not applicable	Amplification of fungal DNA by PCR combined with DNA sequencing when molds are seen in formalin-fixed paraffin-embedded tissue
Yeasts ^a	Histopathologic, cytopathologic, or direct microscopic examination of a specimen obtained by needle aspiration or biopsy from a normally sterile site (other than mucous membranes) showing yeast cells, for example, <i>Cryptococcus</i> species indicating encapsulated budding yeasts or <i>Candida</i> species showing pseudohyphae or true hyphae ^d	Recovery of a yeast by culture of a sample obtained by a sterile procedure (including a freshly placed [<24 hours ago] drain) from a normally sterile site showing a clinical or radiological abnormality consistent with an infectious disease process	Blood culture that yields yeast (eg, <i>Cryptococcus</i> or <i>Candida</i> species) or yeast-like fungi (eg, <i>Trichosporon</i> species)	Cryptococcal antigen in cerebrospinal fluid or blood confirms cryptococcosis	Amplification of fungal DNA by PCR combined with DNA sequencing when yeasts are seen in formalin-fixed paraffin-embedded tissue
Pneumocystis	Detection of the organism microscopically in tissue, BAL fluid, expectorated sputum using conventional or immunofluorescence staining	Not applicable	Not applicable	Not applicable	Not applicable
Endemic mycoses	Histopathology or direct microscopy of specimens obtained from an affected site showing the distinctive form of the fungus	Recovery by culture of the fungus from specimens from an affected site	Blood culture that yields the fungus	Not applicable	Not applicable

Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; PCR, polymerase chain reaction.

^aIf culture is available, append the identification at the genus or species level from the culture results.

^bTissue and cells submitted for histopathologic or cytopathologic studies should be stained using Grocott-Gomori methenamine silver stain or periodic acid Schiff stain to facilitate inspection of fungal structures. Whenever possible, wet mounts of specimens from foci related to invasive fungal disease should be stained with a fluorescent dye (eg, calcofluor or blankophor).

^cRecovery of *Aspergillus* species from blood cultures rarely indicates endovascular disease and almost always represents contamination.

^d*Trichosporon* and yeast-like *Geotrichum* species and *Blastoschizomyces capitatus* may also form pseudohyphae or true hyphae.

Table 2. Probable Invasive Pulmonary Mold Diseases

Host factors	
Recent history of neutropenia ($<0.5 \times 10^9$ neutrophils/L [<500 neutrophils/ mm^3] for >10 days) temporally related to the onset of invasive fungal disease	
Hematologic malignancy ^a	
Receipt of an allogeneic stem cell transplant	
Receipt of a solid organ transplant	
Prolonged use of corticosteroids (excluding among patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis) at a therapeutic dose of ≥ 0.3 mg/kg corticosteroids for ≥ 3 weeks in the past 60 days	
Treatment with other recognized T-cell immunosuppressants, such as calcineurin inhibitors, tumor necrosis factor- α blockers, lymphocyte-specific monoclonal antibodies, immunosuppressive nucleoside analogues during the past 90 days	
Treatment with recognized B-cell immunosuppressants, such as Bruton's tyrosine kinase inhibitors, eg, ibrutinib	
Inherited severe immunodeficiency (such as chronic granulomatous disease, STAT 3 deficiency, or severe combined immunodeficiency)	
Acute graft-versus-host disease grade III or IV involving the gut, lungs, or liver that is refractory to first-line treatment with steroids	
Mycological evidence	
Any mold, for example, <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Scedosporium</i> species or Mucorales recovered by culture from sputum, BAL, bronchial brush, or aspirate	
Microscopic detection of fungal elements in sputum, BAL, bronchial brush, or aspirate indicating a mold	
<i>Tracheobronchitis</i>	
<i>Aspergillus</i> recovered by culture of BAL or bronchial brush	
Microscopic detection of fungal elements in BAL or bronchial brush indicating a mold	
<i>Sino-nasal diseases</i>	
Mold recovered by culture of sinus aspirate samples	
Microscopic detection of fungal elements in sinus aspirate samples indicating a mold	
<i>Aspergillosis only</i>	
<i>Galactomannan antigen</i>	
Antigen detected in plasma, serum, BAL, or CSF	
Any 1 of the following:	
Single serum or plasma: ≥ 1.0	
BAL fluid: ≥ 1.0	
Single serum or plasma: ≥ 0.7 and BAL fluid ≥ 0.8	
Clinical features	
<i>Pulmonary aspergillosis</i>	
The presence of 1 of the following 4 patterns on CT:	
Dense, well-circumscribed lesions(s) with or without a halo sign	
Air crescent sign	
Cavity	
Wedge-shaped and segmental or lobar consolidation	
<i>Other pulmonary mold diseases</i>	
As for pulmonary aspergillosis but also including a reverse halo sign	
<i>Tracheobronchitis</i>	
Tracheobronchial ulceration, nodule, pseudomembrane, plaque, or eschar seen on bronchoscopic analysis	
<i>Sino-nasal diseases</i>	
Acute localized pain (including pain radiating to the eye)	
Nasal ulcer with black eschar	
Extension from the paranasal sinus across bony barriers, including into the orbit	
<i>Central nervous system infection</i>	
1 of the following 2 signs:	
Focal lesions on imaging	
Meningeal enhancement on magnetic resonance imaging or CT	
CSF: ≥ 1.0	
<i>Aspergillus PCR</i>	
Any 1 of the following:	
Plasma, serum, or whole blood 2 or more consecutive PCR tests positive	
BAL fluid 2 or more duplicate PCR tests positive	
At least 1 PCR test positive in plasma, serum, or whole blood and 1 PCR test positive in BAL fluid	
<i>Aspergillus</i> species recovered by culture from sputum, BAL, bronchial brush, or aspirate	
Probable invasive fungal diseases (IFD) requires the presence of at least 1 host factor, a clinical feature and mycologic evidence and is proposed for immunocompromised patients only, whereas proven IFD can apply to any patient, regardless of whether the patient is immunocompromised. Probable IFD requires the presence of a host factor, a clinical feature, and mycologic evidence. Cases that meet the criteria for a host factor and a clinical feature but for which mycological evidence has not been found are considered possible IFD. (1,3)-beta-D glucan was not considered to provide mycological evidence of any invasive mold disease.	
Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; CSF, cerebrospinal fluid; CT, computed tomography; PCR, polymerase chain reaction.	
^a Hematologic malignancy refers to active malignancy, in receipt of treatment for this malignancy, and those in remission in the recent past. These patients would comprise largely acute leukemias and lymphomas, as well as multiple myeloma, whereas patients with aplastic anemia represent a more heterogeneous group of individuals and are not included.	

Peter Donnelly, J. et al. 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**, 1367–1376 (2020).