

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. C. Härtel

**Prospektives Biomarker Screening zur Diagnose der Invasiven Aspergillose bei
pädiatrischen Hochrisikopatienten**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Julia Alexandra Hafner

aus Mainz

Würzburg, Oktober 2020



Referent: Prof. Dr. med. Matthias Eyrich

Koreferent: Prof. Dr. med. Oliver Kurzai

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2021

Die Promovendin ist Ärztin.

Für Barbara, Peter und Käthe

| | |
|--|-----------|
| A Einleitung | 1 |
| 1. Invasive Aspergillose..... | 1 |
| 1.1. Ätiologie | 1 |
| 1.2. Epidemiologie..... | 7 |
| 1.3. Klinik | 8 |
| 1.4. Diagnostik..... | 9 |
| 1.5. Therapie | 18 |
| 1.6. Prophylaxe | 21 |
| 2. Zielsetzung der Arbeit | 23 |
| B Material und Methoden | 24 |
| 1. Studiendesign..... | 24 |
| 2. Index-Tests und Referenzmethode | 25 |
| 2.1. Diagnostische Tests | 25 |
| 2.2. Diagnosestandard (Referenzmethode)..... | 26 |
| 2.3. Auswertung der Ergebnisse von GM-ELISA und Aspergillus-PCR..... | 27 |
| 3. Klinische Datenerhebung..... | 30 |
| 4. Computertomographie - Befundung | 33 |
| 5. Vergleich mit Daten einer Erwachsenenstudie..... | 33 |
| 6. Statistische Analyse | 34 |
| 6.1. Demographische Daten..... | 34 |
| 6.2. Assoziation zwischen CT, PCR und GM | 34 |
| 6.3. Ereigniszeitanalyse | 34 |
| C Ergebnisse | 36 |
| 1. Studiengruppen | 36 |
| 2. Demographische Charakteristika der Studiengruppen | 36 |
| 2.1. Geschlecht | 36 |
| 2.2. Alter | 36 |
| 2.3. Gewicht..... | 38 |
| 2.4. Grunderkrankungen | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5. Allogene Stammzelltransplantation..... | 39 |
| 2.6. Analyisierte Blutproben..... | 39 |
| Primäre Ergebnisparameter | 40 |
| 3. Diagnostische Güte der Index-Tests | 40 |
| 3.1. Darstellung der Testergebnisse nach Studiengruppen..... | 40 |
| 3.2. Diagnostische Gütekriterien | 40 |
| 4. Detaillierte Analyse der Index-Tests | 46 |
| 4.1. Detaillierte Analyse der Ergebnisse des GM- ELISA | 46 |
| 4.2. Detaillierte Analyse der Aspergillus-PCR..... | 49 |
| 4.3. Detaillierte kombinierte Analyse von Aspergillus-PCR und GM-ELISA | 50 |
| Sekundäre Ergebnisparameter..... | 53 |
| 5. Assoziation zwischen CT-, PCR- und GM-Positivität | 53 |
| 5.1. CT und Aspergillus-PCR..... | 53 |
| 5.2. CT und GM-ELISA | 54 |
| 5.3. CT und Aspergillus-PCR und GM-ELISA..... | 55 |
| 6. Ereigniszeitanalyse | 56 |
| 6.1. GM-ELISA | 56 |
| 6.2. Aspergillus PCR | 58 |
| 7. Antimykotika | 61 |
| 7.1. Detaillierte Darstellung der antimykotischen Prophylaxe bzw. empirischen Therapie | 61 |
| 7.2. Falsch-positive Proben und Aspergillus-wirksame Antimykotika..... | 63 |
| 7.3. Durchbruchinfektion unter antimykotischer Prophylaxe | 64 |
| 8. Longitudinale Analyse der vier PROB- Patienten..... | 65 |
| 8.1. Patient 1 | 65 |
| 8.2. Patient 2 | 67 |
| 8.3. Patient 3 | 69 |
| 8.4. Patient 4 | 71 |
| 8.5. Kombiniertes Biomarkerscreening zur Früherkennung der IA? | 72 |
| 9. Vergleich von erwachsenen und pädiatrischen Daten | 73 |

| | |
|--|------------|
| 9.1. GM-ELISA | 73 |
| 9.2. Aspergillus-PCR..... | 73 |
| D Diskussion | 75 |
| 1. Methodendiskussion | 75 |
| 1.1. Stichprobengröße und Power..... | 75 |
| 1.2. Referenzmethode | 75 |
| 1.3. Aspergillus-PCR..... | 77 |
| 1.4. Patientenklassifikation..... | 77 |
| 1.5. Probenmaterial..... | 77 |
| 1.6. Screening | 78 |
| 2. Ergebnisdiskussion | 79 |
| 2.1. Diagnostische Genauigkeit des kombinierten Biomarkerscreenings | 79 |
| 2.2. Diagnostische Genauigkeit der Indextests in der Einzelbeurteilung | 83 |
| 2.3. Bedeutung des Inkorporationsbias..... | 87 |
| 2.4. Einflüsse auf die diagnostische Genauigkeit der Indextests..... | 88 |
| 2.5. Durchbruchinfektionen | 92 |
| 2.6. Multivarianzanalyse..... | 94 |
| 2.7. GM-Index (GMI) als Surrogatmarker für das Outcome und Therapieansprechen | 95 |
| 3. Ausblick..... | 98 |
| E Zusammenfassung..... | 99 |
| F Literaturverzeichnis..... | 100 |
| G Abbildungsverzeichnis..... | 117 |
| H Tabellenverzeichnis | 120 |
| I Veröffentlichung der Ergebnisse der Arbeit..... | 122 |
| J Appendix..... | 124 |

A Einleitung

1. Invasive Aspergillose

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Diagnostik der Invasiven Aspergillose (im Folgenden als ‚IA‘ bezeichnet). Zunächst werden die theoretischen Hintergründe erläutert, wobei der Fokus auf pädiatrischen Patienten mit hämato-onkologischen Krankheitsbildern liegt.

Die IA gehört zur Gruppe der invasiven Pilzinfektionen (im Folgenden als ‚IFD‘ bezeichnet) und tritt fast ausschließlich bei immunkomprimierten Patienten auf. Sie stellt eine Hauptursache der infekassozierten Morbidität und Mortalität bei pädiatrischen Patienten mit hämato-onkologischer Grunderkrankung und/oder allogener Stammzelltransplantation (im Folgenden als ‚alloSZT‘ bezeichnet) dar (Hale et al., 2010, Mor et al., 2011).

1.1. Ätiologie

Erreger

Die IA wird durch Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* ausgelöst. Die ursächlichen Pathogene sind dabei, nach Häufigkeit geordnet, *Aspergillus fumigatus*, gefolgt von *Aspergillus flavus* und *niger* (Burgos et al., 2008, Wattier et al., 2015).

Der *Aspergillus*pilz ist ein Fadenpilz und wird den Askomyzeten (Schlauchpilzen) zugeordnet (Hahn, 2005). Typisch für den Pilz ist daher die sogenannte Myzelbildung. Das Myzel ist ein Geflecht, welches durch filamentöses Längenwachstum und Seitenverzweigungen der Hyphen (fadenartigen Zellen) entsteht. Von den Hyphen gehen die Fruktifikationsorgane, die sogenannten Konidienträger, aus. Diese produzieren an ihrer Spitze Konidien (Sporen), die der Fortpflanzung und Vermehrung über die Luft dienen. Die Sporen garantieren aufgrund ihrer Widerstandsfähigkeit die Verbreitung und Erhaltung des fungalen Genoms auch bei ungünstigen Umgebungsbedingungen (Osheroov and May, 2001).

Namensgebend war die Ähnlichkeit der sporentragenden Pilzbestandteile zum „Aspergill“ (s. Abbildung 1), einem liturgischen Instrument zum Besprengen mit Weihwasser (Bennett, 2009).

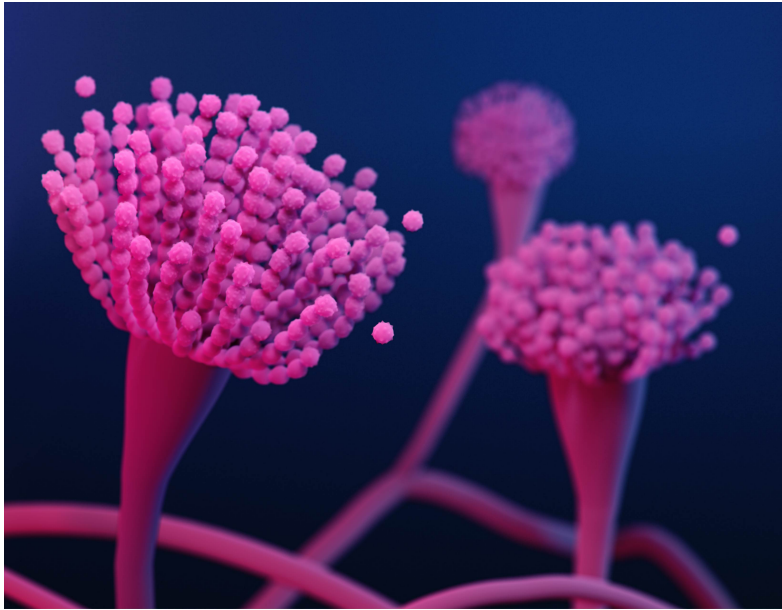


Abbildung 1. Abgebildet sind aspergillartige Pilzbestandteile, die sogenannten Konidienträger. Diese tragen die Sporen (Konidien), die für die Fortpflanzung und Vermehrung zuständig sind. Im Hintergrund sind Hyphen zu erkennen, die ein Geflecht, das Myzel, bilden und aus denen die Konidienträger hervorgehen. (CDC, 2019. Diese Abbildung ist der Öffentlichkeit frei zugänglich und daher frei von urheberrechtlichen Einschränkungen (lizenzfrei).)

Die saprophytischen Pilze finden sich ubiquitär in totem, organischem Material wie dem Erdboden, verrottendem Pflanzenmaterial (z.B. Biomüll oder Kompost) oder auch Baustellen (Herold, 2014). Blumenerde ist aus diesem Grunde in Krankenzimmern immunsupprimierter Patienten verboten.

Neben der Invasiven pulmonalen und extrapulmonalen Aspergillose kann der Pilz - auch bei Immunkompetenten - ein Aspergillom, eine Allergisch-bronchopulmonale Aspergillose und ein allergisches Asthma auslösen (Herold, 2014).

Pathophysiologie

Der Pilz *Aspergillus* ist ein fakultativ pathogener Keim und kann bei immunsupprimierten Patienten die schwere opportunistische Erkrankung der IA auslösen (Ben-Ami et al., 2010).

Die Sporen (Konidien) des *Aspergillus*-Pilzes befinden sich ubiquitär im Aerosol (Mullins, 1994), sodass ein Mensch wahrscheinlich täglich Hunderte von Sporen einatmet. Dennoch führt die Sporeninhalation nur in den seltensten Fällen zu einer IA. Dies liegt an der besonderen Pathogenese von opportunistischen Infektionen wie der IA,

die von einem Zusammenspiel zwischen Virulenzfaktoren des Pilzes und der Wirtsimmunität geprägt ist (Ben-Ami et al., 2010).

Die Pathogenitätsfaktoren der Sporen des hauptursächlichen Spezienkomplexes *Aspergillus fumigatus* [auf den wir uns hier schwerpunktmäßig konzentrieren] umfassen eine ausgeprägte Thermotoleranz, eine geringe Größe der pathogenen Konidien sowie Widerstandsfähigkeit gegenüber Desinfektionsmitteln (Hahn, 2005). Zudem haften die Konidien besonders gut an Bindegewebsbestandteilen und produzieren Proteasen.

Nach der exogenen Inhalation können die Sporen aufgrund ihrer geringen Größe die terminalen Luftwege und Alveolen erreichen (Schaffner et al., 1982, Hohl et al., 2005, Gersuk et al., 2006). Bei Immunkompetenten fungieren alveoläre Makrophagen als erste Abwehrlinie in den Atemwegen, indem sie die Konidien NADPH-Oxidase-abhängig phagozytieren. Entgehen die Konidien den ersten Abwehrmechanismen, können sie auskeimen und die gewebeinvasive Hyphenform ausbilden. Während dieses Wachstumsprozesses werden fungale Zellwandbestandteile (v.a. Beta-Glucan) auf der Oberfläche der auskeimenden Aspergillkonidien exprimiert, die von Mustererkennungsrezeptoren der Makrophagen (Pattern Recognition Receptors, PRR) insb. TLRs¹ und Dectin-1 erkannt werden. Dies setzt eine weiterführende Immunantwort in Gang und führt zur Rekrutierung von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, vornehmlich polymorphonukleäre Leukozyten (PMNLs) und TH1-Zellen. Diese sind im Vergleich zu den Makrophagen in der Lage nicht nur Konidien, sondern auch Hyphen zu bekämpfen, weshalb sie in dieser Phase eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr darstellen.

Aus den oben skizzierten Abwehrmechanismen des Wirtes lässt sich die Pathogenese der IA bei verschiedenen Grunderkrankungen nachvollziehen. Patienten mit einer gestörten Immunreaktion z.B. bei chronischer Granulomatose (angeborene Störung der NADPH-Oxidase) (Segal et al., 1998) oder prolongierter Neutropenie durch z.B. zytotoxische Chemotherapie (quantitativer und qualitativer Defekt der PMNLs und T-Zellen) haben eine eingeschränkte Möglichkeit die inhalierten Konidien zu bekämpfen und damit eine IA durch invasive Hyphen zu verhindern (Gerson et al., 1984).

¹ Toll-Like-Receptors.

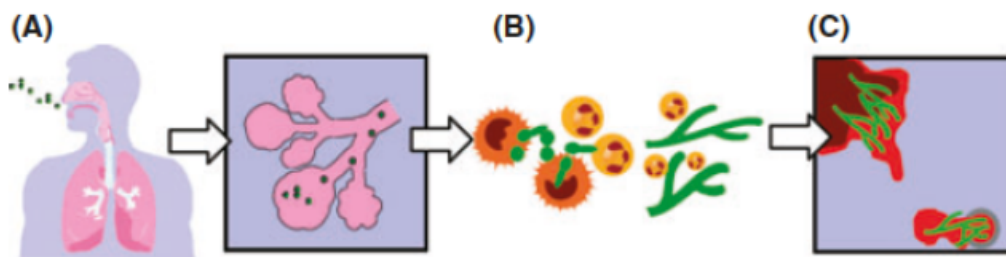


Abbildung 2. Pathogenese der Invasiven Aspergillose A: Inhalation der Konidien bis in die Alveolen. Dort keimen diese aus und bilden die Hyphen. B: Immunkompetenter Patient: Mono- und polynukleäre Zellen bekämpfen die keimenden Konidien und Hyphen. C: Immunsupprimierter Patient: Gefäßinvasives Wachstum der Hyphen, diese verursachen Thrombose, Hypoxie, Nekrose und Dissemination. (Ben-Ami et al., 2010. Verlagslizenz vorliegend.)

Wenn es der körpereigenen Immunabwehr aus o.g. Gründen nicht gelingt die Konidien bzw. die invasive Hyphenform abzutöten, keimen diese weiter aus und dringen fortschreitend in das Wirtsgewebe ein. Ein für die IA charakteristisches histopathologisches Merkmal ist dabei die Angioinvasion, bei der Hyphen die Blut-Luft-Schranke durchbrechen und in die pulmonalen Arteriolen eindringen (Ben-Ami et al., 2010). Als Konsequenz wird die Perfusion des von Aspergillus befallenen Lungenparenchyms gestört, was zu nachfolgender Ischämie und Gewebeinfarkten führt (Balloy et al., 2005). Widerspiegelt wird dies in der klassischen radiologischen Manifestation der IA, dem „Halo-Zeichen“, das eine zentrale Nekrosezone mit umgebender alveolärer Blutung darstellt (Shibuya et al., 2004). Durch die Angioinvasion (s. Abbildung 3) ist zudem eine hämatogene Dissemination der Hyphen bzw. Myzel möglich, die zu einem weiteren Organbefall führt.

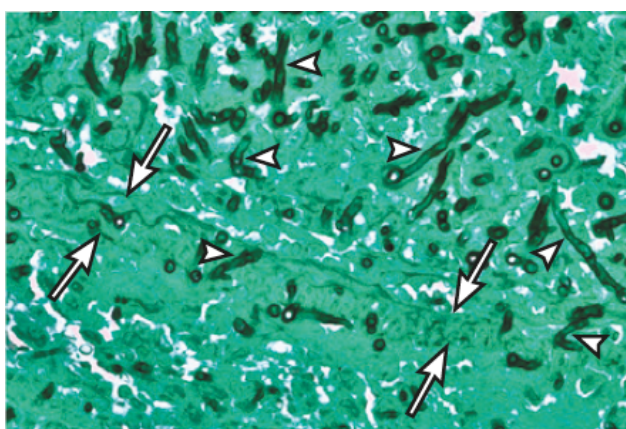


Abbildung 3. Die Pfeilköpfe zeigen die intravaskuläre Invasion durch die Hyphen von Aspergillus spp und die Pfeile den Gefäßverlauf des Wirtes an. (Reproduziert mit Genehmigung von Segal, 2009, Copyright Massachusetts Medical Society.)

Risikofaktoren

In pädiatrischen Kohorten entstehen invasive Pilzinfektionen in den meisten Fällen aufgrund des Vorhandenseins multipler prädisponierender Faktoren und nicht aufgrund eines einzelnen Risikos (Burgos et al., 2008). Kinder und Erwachsene teilen sich dabei die gleichen Risikofaktoren (Georgiadou et al., 2012).

Die Immunsuppression jedweder Genese stellt dabei den größten Risikofaktor für eine IFD dar. Patienten mit einem kompetenten Immunsystem erkranken normalerweise nicht an der IA, man nennt diese daher auch eine ‚opportunistische Infektion‘ (Herold, 2014).

Die Risikoabschätzung ist entscheidend zur Planung der Diagnostik, Therapie und Prophylaxe einer IFD. Aus diesem Grunde werden die Risikofaktoren (Wirtsfaktoren) auch in den Diagnoseleitlinien der EORTC/MSG als eines von drei Hauptdiagnosekriterien genannt (De Pauw et al., 2008).

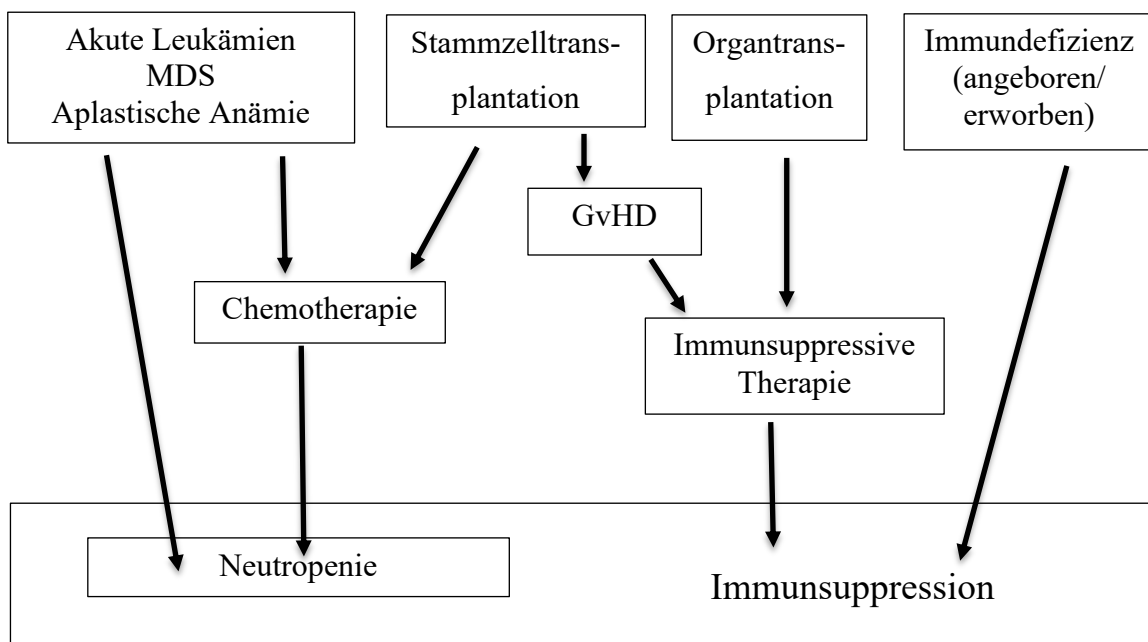


Abbildung 4. Übersicht über die einzelnen Risikofaktoren und deren Zusammenhänge. (Erstellt auf der Grundlage von Segal, 2009).

Eine Neutropenie ist definiert als ein Abfall auf eine Neutrophilenzahl von < 500 Zellen/ μl (McCullers et al., 2000, Burgos et al., 2008). Eine prolongierte Neutropeniedauer geht mit einem erhöhten Risiko für eine IFD einher (Hovi et al., 2000). Johnston et al., 2013 konnten zeigen, dass erst ab einer Neutropeniedauer von über zehn Tagen ein erhöhtes Risiko für eine IFD besteht, welches aber dann mit jedem Tag

ansteigt. Ähnliches konnte auch Gerson et al., 1984 in einer Erwachsenenkohorte darstellen. Der von Portugal et al., 2010 dargestellte D-Index vereint Höhe und Dauer der Neutropenie und kann somit als Maß für ein erhöhtes Risiko gelten.

Verschiedene Grunderkrankungen gehen aus unterschiedlichen Gründen mit einer Immunsuppression einher, dazu gehören hämato-onkologische Erkrankungen (Akute Leukämien, Myelodysplastisches Syndrom (MDS), Aplastische Anämie), eine autologe/allogene Stammzell- oder Organtransplantation, angeborene oder erworbene Immundefizienzen (chronische Granulomatose, Wiskott-Aldrich-Syndrom, schwerer kombinierter Immundefekt, Humanes Immundefizienz Virus (HIV) etc.) sowie Frühgeborene (Burgos et al., 2008).

Die Hauptrisikogruppe bilden dabei Patienten mit hämato-onkologischen Erkrankungen, allen voran die akute Leukämie. Diese hat im Vergleich zu anderen Krebsdiagnosen ein deutlich erhöhtes Risiko für IFD. Unter den akuten Leukämien gehen die Akute Myeloische Leukämie (im Folgenden als ‚AML‘ bezeichnet) und die Hochrisiko- oder Rezidiv-Akute Lymphatische Leukämie (im Folgenden als ‚ALL‘ bezeichnet) mit dem höchsten Risiko für eine IFD einher (Hale et al., 2010). Die Höhe und Dauer der Neutropenie und damit das Ausmaß der Immunsuppression hängt von der Intensität der Chemotherapie ab. So besteht bei der intensiven Induktionschemotherapie (besonders der AML) das höchste Risiko für eine IFD im Vergleich zu den Folgezyklen der Chemotherapie (Sung et al., 2009). Ein hohes Risiko haben ebenfalls refraktäre Leukämien, die multiple Chemotherapiezyklen benötigen (Segal, 2009).

Bei Empfängern einer Stammzelltransplantation gibt es drei Hochrisikoperioden. Die erste ist während der intensiven Konditionierungschemotherapie, die zu einer Neutropenie führt. Die anderen Risikozeiten sind während einer akuten bzw. einer chronischen (100 Tage nach SZT) GvHD aufgrund der notwendigen starken Immunsuppression mittels Hochdosiscorticosteroidtherapie oder T-Zell-Immunsuppressoren (Marty and Rubin, 2006). Hol et al., 2014 konnten zeigen, dass Patienten unter Hochdosis-Corticosteroidtherapie ein erhöhtes Risiko für IFD zeigen. Das Risiko steigt zudem mit der Dauer der Corticosteroidbelastung (Lai et al., 2005). Die IA ist zudem häufiger während einer GvHD-Episode als während der initialen Neutropenie. Eine wichtige Rolle spielt in diesem Zusammenhang die HLA-Kompatibilität zwischen

Empfänger und Spender. Ein bestehender HLA-Unterschied scheint ein wichtiger Indikator für die Inzidenz und Schwere einer GvHD sowie das damit verbundene IFD-Risiko zu sein (Segal, 2009). Zudem steigert eine T-Zell-Depletion des Transplantates zur Verringerung des GvHD-Risikos die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer IA aufgrund einer verzögerten Immunrekonstitution (van Burik et al., 2007).

Nach einer Organtransplantation haben insbesondere Patienten nach Lungentransplantation ein erhöhtes Risiko für eine IFD (Morgan et al., 2005) aufgrund einer fungalen Besiedlung der Atemwege vor Transplantation (Hadjiliadis et al., 2002). Das Risiko steigt wie bei der Stammzelltransplantation mit der Intensität der immunsuppressiven Therapie zur Verhinderung einer Abstoßung (Gavalda et al., 2005).

In ihrer Studienübersicht konnten Fisher et al., 2018 zeigen, dass das Alter der Kinder als einziger demographischer Wert einen Risikofaktor darstellt. Das Risiko für eine IFD steigt mit dem Alter an und zwar ab einem Grenzwert von 10 Jahren (Sung et al., 2009), je nach Studie. Es ist jedoch nicht eindeutig, ob Alter wirklich der Risikofaktor ist oder mit dem höheren Alter einhergehende Risikofaktoren wie z.B. intensivere Konditionierungsregime für das Risiko verantwortlich sind. Die Frühgeburtlichkeit stellt jedoch aufgrund des unreifen Immunsystems mit verminderter angeborener und erworbener Immunreaktion zum Geburtszeitpunkt einen klaren altersbezogenen Risikofaktor für eine IA dar (Melville and Moss, 2013). Die Immundefizienz der Frühgeborenen und Suszeptibilität für Infektionen wird durch die Corticosteroidtherapie zur Lungenreife und eine frühzeitige Immunreaktivierung bei intrauteriner Entzündung (Hauptursache von Frühgeburten) weiter reduziert.

1.2. Epidemiologie

Die IA gehört gemeinsam mit der invasiven Candidose zu den häufigsten IFD und ist damit die häufigste invasive Schimmelpilzerkrankung. Die Bestimmung der natürlichen Inzidenz der IFD ist aufgrund weit verbreiteter antifungaler Prophylaxe und durch Fehlen eines universellen Diagnosealgorithmus erschwert und wird schätzungsweise mit 5,9/100 000 Fällen/Jahr angegeben (Ruhnke et al., 2015).

Bezogen auf die IA zeigten Daten von Kohortenstudien bei Patienten mit AML, Rezidiven einer akuten Leukämie sowie nach allogener Stammzelltransplantation die höchste Inzidenz mit einer Rate von ca. 10%. In dieser Hochrisikopopulation stellt

Aspergillus fumigatus die häufigste Ursache einer IFD dar (Ben-Ami et al., 2010). Eine deutlich niedrigere Inzidenz von <5% war bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom und nach autologer Stammzelltransplantation festzustellen (Groll et al., 2014).

Die Mortalitätsrate in den ersten Wochen einer bestehenden IA variiert zwischen 18% (signifikant erhöht verglichen mit 1% in derselben Kohorte immunsupprimierter Patienten ohne IA) (Zaoutis et al., 2006) und 30% (Wattier et al., 2015). Die langfristigen Sterberaten nach einer IA variieren von Studie zu Studie und liegen zwischen 50 und 90% (Burgos et al., 2008, Georgiadou et al., 2012, Abbasi et al., 1999). Eine allogene Stammzelltransplantation, insbesondere mit begleitender GvHD, ist mit einer hohen Mortalität (Letalitätsrate von ca. 80%) assoziiert (Burgos et al., 2008).

Die Erkrankung der IA hat auch eine nicht zu unterschätzende gesundheitsökonomische Bedeutung. Pädiatrische Patienten, die an einer IA erkrankten, hatten im Median einen signifikant längeren Krankenhausaufenthalt (16 Tage im Vgl. zu 3 Tage) und signifikant höhere Krankenhausrechnungen (49000 \$ im Vgl. zu 9000 \$) im Vergleich zu nicht-erkrankten, jedoch ebenfalls immunsupprimierten Patienten (Zaoutis et al., 2006).

1.3. Klinik

Die klinische Symptomatik der IA kann stark variieren. Dies liegt an der besonderen Pathogenese bei opportunistischen Infektionen, die von einer Interaktion zwischen den fungalen Pathogenen und dem Immunsystem des Wirtes geprägt ist (Casadevall and Pirofski, 2003).

Ähnlich wie bei Erwachsenen zeigen Kinder aufgrund von Neutropenie und immunmodulierenden Medikamenten häufig nur unspezifische und unzuverlässige Symptome, welche schwer von anderen Infektionen zu unterscheiden sind. Bei pädiatrischen Patienten mit hämato-onkologischen Erkrankungen und/oder Empfänger einer Stammzelltransplantation ist das antibiotikaresistente Fieber in der Neutropenie häufig das erste und teilweise einzige Symptom (Mor et al., 2011).

Die IA manifestiert sich in Kindern, wie auch in Erwachsenen, vornehmlich an der Lunge und den Nasennebenhöhlen (Burgos et al., 2008), da die Inhalation der Sporen die Haupteintrittspforte darstellt (Segal, 2009). Der pulmonale Befall präsentiert sich anhand folgender respiratorischer Symptome: Husten, Dyspnoe, Tachypnoe, Thoraxschmerzen

und/oder Sauerstoffbedarf. Jedoch liegen diese Symptome nur bei etwa der Hälfte der Patienten vor (Groll et al., 1999, Georgiadou et al., 2012, Abbasi et al., 1999). Eine Angioinvasion kann zu Lungeninfarkten führen, die sich als pleuritische Schmerzen oder Hämoptysen manifestieren (Segal, 2009).

Bei etwa 30% der Patienten mit einer pulmonalen Aspergillose kommt es zur Dissemination der Erkrankung, am häufigsten ins zentrale Nervensystem (Abbasi et al., 1999, Dotis et al., 2007). Diese ZNS-Aspergillose geht grundsätzlich mit einer erhöhten Mortalität einher, bei Kindern zeigen sich jedoch niedrigere Mortalitätsraten als bei Erwachsenen. Radiologisch zeigen sich dabei oft multiple Hirnabszesse, die aber nicht typischerweise mit Kopfschmerzen und Übelkeit, sondern eher mit einer Vigilanzminderung, Desorientiertheit, fokalen Krampfanfällen oder Hemiparesen einhergehen. Die ZNS-Aspergillose kann sich aber auch als Meningoenzephalitis oder hämorrhagischer Infarkt präsentieren.

Bei pädiatrischen Patienten wird im Gegensatz zu Erwachsenen zudem häufiger die kutane Aspergillose (Burgos et al., 2008) beschrieben. Diese kann sich als Papel, Macula, nekrotische Knötchen oder auch als Ulcus manifestieren (Georgiadou et al., 2012) und entweder durch lokale Infektion (z.B. durch einen zentralvenösen Zugang) oder eine hämatogene Streuung entstehen. Aus diesem Grunde kann die kutane Manifestation den Hinweis auf eine disseminierte Aspergillose geben (Abbasi et al., 1999, Burgos et al., 2008).

Selten wurde auch eine kardiale Beteiligung beschrieben, die sich mit Pleuraergüssen, intrakardialen Thromben und Endokarditis präsentieren kann (Burgos et al., 2008, Georgiadou et al., 2012, Abbasi et al., 1999).

1.4. Diagnostik

Die Diagnostik der IA stellt weiterhin eine besondere klinische Herausforderung dar. Aufgrund der Schwierigkeiten in der Früherkennung wird die Schimmelpilzinfektion (wenn überhaupt) häufig erst in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium erkannt und zählt zu den am häufigsten übersehenen Todesursachen (Dignani, 2014, Winters et al., 2012). Die Therapieinitiierung erfolgt daher oftmals erst bei bereits eingetretener Gewebeschädigung aufgrund hoher fungaler Last und resultiert in schlechtem Gesamtoutcome und hohen Mortalitätsraten (Kovanda et al., 2017). Eine frühzeitige und

sichere Diagnose stellt jedoch die entscheidende Grundlage für den frühen Startzeitpunkt einer wirksamen antifungalen Therapie, die Wahl des Antimykotikum und die Therapiedauer dar. Der Therapiebeginn ist dabei der am stärksten mit dem Outcome assoziierte Faktor (Caillot et al., 1997).

Die besondere Schwierigkeit in der Diagnosestellung einer IA ergibt sich aus der aktuellen Notwendigkeit mindestens drei unterschiedliche Befunde - klinisches Bild, mykologischer Erregernachweis und Bildgebung - zu kombinieren. Dies macht ein interdisziplinäres Vorgehen bei der Diagnose einer IA notwendig (von Lilienfeld-Toal et al., 2019). Erschwerend hinzu kommt die fehlende Spezifität von klinischen Symptomen und radiologischen Merkmalen sowie die eingeschränkte Sensitivität, Invasivität und z.T. lange Kulturdauer des direkten mykologischen Erregernachweises (Groll et al., 2014, Segal, 2009, Warris et al., 2019, Lehrnbecher et al., 2018). Eine endgültige Diagnose (proven IA), die einen Nachweis von *Aspergillus* in einem sterilen Material erfordert, ist somit nur selten möglich. Bei pädiatrischen Patienten kommt die erschwerte Gewinnung von Probenmaterial sowie die spärliche Studienlage zur Wirksamkeit von Biomarkern hinzu.

Diagnostischer Goldstandard

Ein Goldstandard zur definitiven Diagnose einer IA existiert nicht (Huppler et al., 2017). Als Surrogat-Parameter fungieren die Diagnosekriterien der „European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group“ (im Folgenden als ‚EORTC/MSG‘ bezeichnet), welche auch in unserer Studie als zusammengesetzter Referenzstandard benutzt wurden (De Pauw et al., 2008). Sie bieten einen Algorithmus, um den wahren Zustand des Patienten bzw. die Wahrscheinlichkeit einer vorliegenden IA beurteilen zu können und teilen die Patienten in vier Wahrscheinlichkeitskategorien auf: proven IA/ probable IA/ possible IA/ unclassified IA.

Proven: Histopathologischer, zytopathologischer oder mikroskopischer Nachweis von Hyphen und assoziierter Gewebedestruktion in sterilem Material. Nachweis von Schimmelpilzwachstum in einer Kultur eines sterilen Materials oder Blut. Das sterile Material muss durch Feinnadelaspiration oder Biopsie gewonnen worden sein und exkludiert die Bronchoalveoläre Lavage (im Folgenden als ‚BAL‘ bezeichnet).

Probable: Paralleles Vorliegen mind. eines Wirtsfaktors, eines klinischen Kriteriums und eines mykologischen Kriteriums.

Wirtsfaktoren:

- Neutropenie, definiert als <500 Neutrophile/mm für ≥ 10 Tage
- Zustand nach allogener Stammzelltransplantation
- Kortikosteroide $>0,3$ mg/kg/Tag Prednisolonäquivalent für > 3 Wochen
- T- Zellimmunsuppressiva in den letzten 90 Tagen
- Angeborene schwere Immundefizienz (wie CGD² oder SCID³)

Klinische Kriterien ⁴

- Pilzinfektion der unteren Atemwege - Vorliegen von einem der drei folgenden typischen Computertomographie (im Folgenden als ‚CT‘ bezeichnet) - Zeichen: dichte, genau umschriebene Läsion(en) mit oder ohne Halozeichen/ Luftsichelzeichen (Air crescent sign) / Kavernenbildung

Mykologische Kriterien

- Direkter Nachweis (Zytologie, direkte Mikroskopie, Kultur): Schimmelpilz in Sputum, BAL, Probe von Sinusaspirat
- Indirekter Nachweis (Nachweis von Antigen oder Zellwandbestandteilen): Detektion von Galactomannan-Antigen im Plasma, Serum, Liquor, BAL oder von β -D-Glucan im Serum

Possible: Vorliegen mind. eines Wirtsfaktors und eines klinischen Kriteriums, bei fehlendem mykologischen Kriterium.

Unclassified: Vorliegen oder Fehlen eines Wirtsfaktors bei Fehlen eines klinischen und mykologischen Kriteriums.

Mykologische Diagnostik- Mikroskopie und Kultur

Der Nachweis von *Aspergillus* spp. mittels Mikroskopie und Kulturanzucht gehört zu den Standardverfahren in der Diagnostik der IA und ermöglicht die Diagnose einer „proven

² Chronic granulomatous disease

³ Severe combined Immunodeficiency

⁴ Von den vielen klinischen Kriterien wird hier nur das eine genannt, da nur dieses auf unsere Patienten zutraf.

IA“ s.o. (Groll et al., 2014). Die Kultivierung von Aspergillusisolaten ermöglicht zudem eine genaue Identifizierung der Spezies sowie eine antifungale Empfindlichkeitsprüfung (Ruhnke et al., 2018).

Der Einsatz im klinischen Alltag wird jedoch durch die invasive Art der Probengewinnung (Biopsie, Feinnadelaspiration oder BAL), deren Risiken und Nebenwirkungen und der Notwendigkeit von Anästhesie bei pädiatrischen Patienten erschwert (Warris et al., 2019, Ruhnke et al., 2018). Die niedrige Sensitivität der Kulturanzucht (insbesondere bei Patienten unter antifungaler Medikation (Karthaus and Buchheidt, 2013)) und mikroskopischen Begutachtung von Proben aus dem Atemwegstrakt, die lange Durchlaufzeit sowie die schwierige Unterscheidung zwischen Aspergillus spp und anderen filamentösen Pilzen limitieren den Einsatz dieser Diagnostikmethoden zusätzlich (Segal, 2009).

Blutkulturen spielen in der Diagnostik der IA aufgrund niedriger Sensitivität und selten auftretenden Aspergillämien eine untergeordnete Rolle (De Pauw et al., 2008). Gleichwohl wird bei pädiatrischen Hochrisikopatienten die Kultivierung von Blutproben empfohlen (Kontoyiannis et al., 2000).

Mykologische Diagnostik - Biomarker (Biologische Marker)

Biomarker sind objektiv messbare und quantifizierbare Indikatoren eines normalen biologischen oder pathologischen Prozesses (Group, 2001). Sie werden im klinischen Kontext als Surrogatmarker zur Detektion einer Erkrankung, zur Beurteilung des Krankheitsausmaßes, als Prognoseparameter sowie zur Evaluation einer Intervention eingesetzt und sind meist schnell und günstig verfügbar.

Aufgrund der Schwierigkeiten in der frühzeitigen und sicheren Diagnosestellung mittels den als Goldstandard geltenden Methoden Kultur, Histo- und Zytopathologie war die Entwicklung von Aspergillus-spezifischen, kulturunabhängigen, quantitativen und nicht-invasiven Surrogatmarkern, sogenannten Biomarkern, ein Meilenstein in der Diagnostik der IA (Groll et al., 2014, Lehrnbecher et al., 2018). Studiendaten weisen den Biomarkern einen bedeutenden Stellenwert in der frühzeitigen Diagnose einer IA zu (Ambasta et al., 2015, Maertens et al., 2002).

Die entscheidenden Biomarker zur Detektion der IA sind die fungalen Zellwandkomponenten Galactomannan und β -D-Glucan (im Folgenden als ‚BDG‘ bezeichnet) sowie die fungale DNA (Lehrnbecher et al., 2016). Ihr Nachweis erfolgt in Blut, Bronchoalveolärer Lavage, Liquor oder Gewebebiopsien.

Der Nutzen von Biomarkern zur Diagnose der IA in pädiatrischen Hochrisikopopulationen wird aufgrund der spärlichen Studienlage jedoch hinterfragt (Groll et al., 2014, Buchheidt et al., 2016, Herbrecht et al., 2002b). Unterschiedliche zugrundeliegende Malignome und Therapien sowie eine differierende Immunität und Immunrestitution nach Chemotherapie von Kindern im Vergleich zu Erwachsenen lassen kaum einen Rückschluss von Erwachsenenendaten auf die Leistungseigenschaften der Biomarker bei Kindern zu (Sung et al., 2011).

Galactomannan

Galactomannan ist ein Aspergillus-spezifisches Antigen und Hauptbestandteil der fungalen Zellwand (Latge et al., 1994), welches während des invasiven Wachstums von fungalen Hyphen ins Blut abgegeben wird. In oben genannten Probenmaterialien wird das Galactomannanantigen mithilfe eines standardisierten und validierten FDA⁵-genehmigten Enzymgekoppelten Immunadsorptionsassays (im Folgenden als ‚ELISA‘ bezeichnet) (Platelia Aspergillusantigen, Bio-Rad, Marnes-la-Cocquette, Frankreich) nachgewiesen (Wheat and Walsh, 2008, Mennink-Kersten et al., 2004) und das Ergebnis als Galactomannanantigen-Index (im Folgenden als ‚GMI‘ bezeichnet) mit einem Cut-Off-Wert: $\geq 0,5$ dargestellt. Das Antigen stellt einen präzisen und verlässlichen Messwert zur Ermittlung der fungalen Antigenlast bei neutropenen Patienten mit hämato-onkologischen Erkrankungen dar (Wheat, 2006). Eine Positivität des GM-ELISA (im Folgenden als ‚GM‘ bezeichnet) zeigte sich in mehreren Studien bereits vor dem Beginn von klinischen Krankheitszeichen oder Detektion im CT (Patterson et al., 2016, Leroux and Ullmann, 2013, Maertens et al., 2007, Hayden et al., 2003).

Für Erwachsene gilt der Biomarker auf der Basis mehrerer Studienergebnisse (Pfeiffer et al., 2006, Arvanitis et al., 2014, Marchetti et al., 2012, Lamoth et al., 2012) als validiert, woraufhin der GM in die mykologischen Kriterien der EORTC/MSG-Diagnoseleitlinie (De Pauw et al., 2008), dem aktuellen diagnostischen Goldstandard, übernommen wurde.

⁵ U.S. Food and Drug Administration

Aufgrund von vergleichbarer Sensitivität und Spezifität in pädiatrischen Studien (Lehrnbecher et al., 2016) wird der GM als Screeninginstrument (zweimal wöchentlich) auch bei asymptomatischen pädiatrischen Hochrisikopatienten in der Neutropenie oder bei GvHD empfohlen (Warris et al., 2019, Groll et al., 2014). Bezüglich der Eignung des GM als Diagnostikum bei symptomatischen Kindern mit Fieber in der Neutropenie >96 Stunden oder anderweitigem klinischen Hinweis auf eine Pilzinfektion gibt es divergierende Empfehlungen (Lehrnbecher et al., 2017, Warris et al., 2019, Groll et al., 2014).

β-D-Glucan

BDG ist ein Zellwandbestandteil mehrerer pathogener Pilze, darunter *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Fusarium* spp. etc. und erlaubt daher die Detektion einer Vielzahl an Pilzen. Aufgrund einer hohen Spezifität (und hohen NPV) in Studien (Lamoth et al., 2012)) wird BDG für Erwachsene als Ausschlussmethode empfohlen und ist Teil der EORTC/MSG-Kriterien. Für den Einsatz als Screeningmethode zur frühzeitigen Detektion einer IA oder Diagnostikum zur Bestätigung einer Verdachtsdiagnose ist BDG bei pädiatrischen Patienten jedoch nicht empfohlen (Warris et al., 2019, Lehrnbecher et al., 2018). Dies beruht vornehmlich auf der sehr spärlichen Datenlage bezüglich des Einsatzes von BDG in pädiatrischen Populationen und der mangelhaften Leistung von BDG in den drei vorhandenen pädiatrischen Studien (Zhao et al., 2009, Badiee et al., 2012, Koltze et al., 2015).

Molekulare Biomarker

Die *Aspergillus*-Polymerase-Kettenreaktion (im Folgenden als ‚PCR‘ bezeichnet) ermöglicht die Detektion von fungalen Nukleinsäuren der *Aspergillus* spp. Die Methode erlaubt eine genauere Identifizierung des Pathogens auf der Speziesebene und die Detektion bereits kleiner Mengen an Genkopien sowie die Erkennung von Genen, die antimikrobielle Resistenzen übertragen. (Einsele and Loeffler, 2008) Die Real-time PCR ermöglicht die Quantifizierung der fungalen Viruslast als Hinweis auf die Krankheitsprogression in einer Probe und eine schnelle Pathogendetektion (Gupta et al., 2017).

In großen Kohortenstudien konnte der Nutzen der PCR für erwachsene Hochrisikopatienten nachgewiesen (Marchetti et al., 2012, Arvanitis et al., 2014, Springer et al., 2013) und der Test als Screeninginstrument empfohlen werden (White et al., 2006).

Die PCR wurde jedoch aufgrund fehlender Standardisierung und Validierung zum Zeitpunkt der Veröffentlichung nicht als mykologisches Kriterium in die EORTC/MSG-Kriterien (De Pauw et al., 2008) integriert. Mittlerweile gibt es für Erwachsene jedoch einen methodologischen Standard, der auf den Empfehlungen der Europäischen Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI) (White et al., 2011, White et al., 2015) beruht, weshalb die Inklusion der PCR aktuell reevaluiert wird. Aufgrund des breiten Spektrums an Sensitivitäten und Spezifitäten in pädiatrischen Studien und damit einhergehend fehlender Validierung gibt es in den aktuellen pädiatrischen Leitlinien (Warris et al., 2019, Groll et al., 2014) bisher keine Empfehlungen zum Einsatz der PCR als Screening- oder Diagnoseinstrument der IA in pädiatrischen Hochrisikopopulationen. Dies beruht auch auf der Tatsache, dass es keinen methodologischen Standard wie die EAPCRI-Empfehlungen für Kinder gibt. Dennoch wird die PCR vermehrt in pädiatrischen Settings eingesetzt (Warris et al., 2019).

Kombinierte Testung

In den Einzeltestungen zeigen die serologischen Tests GM und BDG niedrige positive prädiktive Werte, was ihnen eher eine Eignung als Ausschlusstest als zur Diagnose der IA zuspricht. Die Diagnosestellung mittels PCR wird durch geringe Mengen an fungaler DNA in Blutproben, insbesondere bei pädiatrischen Patienten, erschwert. Aufgrund der Limitationen der Biomarker in der Einzeltestung untersuchten mehrere Erwachsenenstudien (Rogers et al., 2013, Aguado et al., 2015, Morrissey et al., 2013) das Potential der kombinierten Biomarkertestung (GM und PCR) und wiesen eine höhere diagnostische Genauigkeit nach. Für diese Kombinationsstrategien liegen jedoch kaum pädiatrische Daten vor.

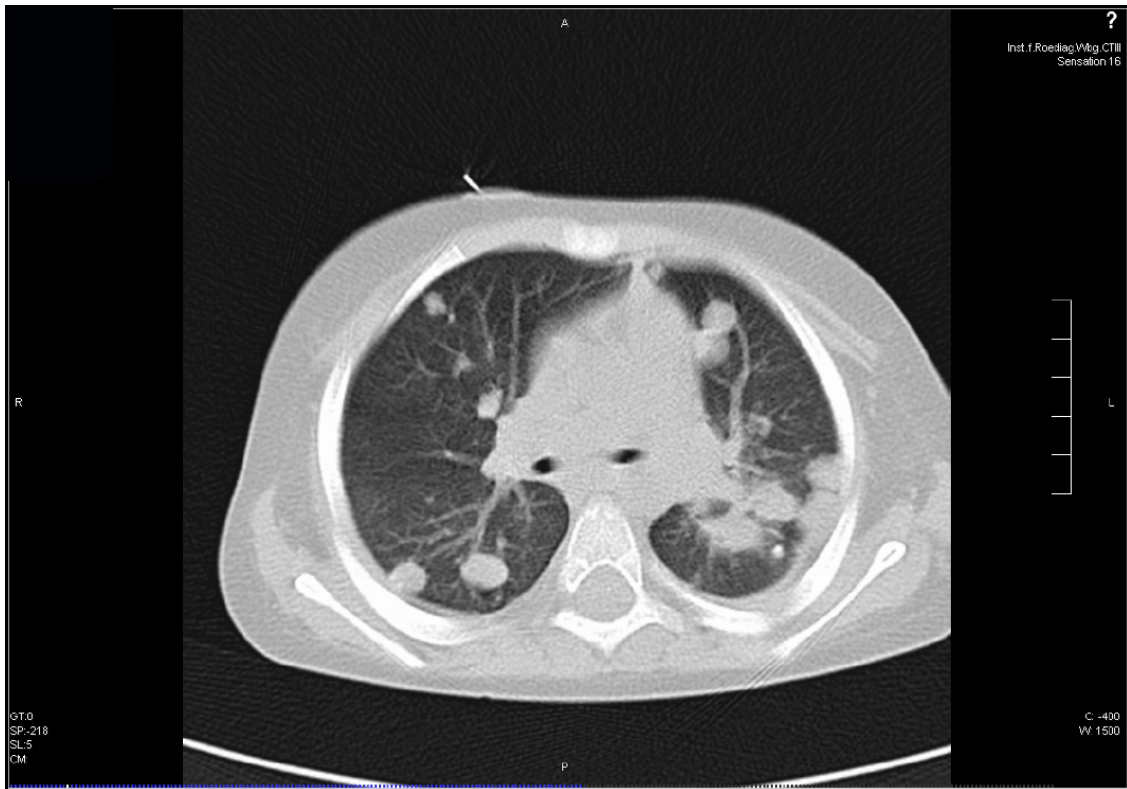


Abbildung 5. Typischer CT Thorax eines Kindes mit Invasiver pulmonaler Aspergillose. Zu sehen sind mehrere Raumforderungen - typische unspezifische Zeichen bei einer pädiatrischen IA. (Quelle: Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Würzburg.)

Eine weiterführende radiologische Abklärung sollte bei Hochrisikopatienten mit Neutropenie und therapieresistentem Fieber über 96 Stunden, bei respiratorischem klinischem Fokus oder positivem Serum-Galactomannan zur Detektion einer IA im Frühstadium durchgeführt werden (Groll et al., 2014, Warris et al., 2019). Die Computertomographie ist dabei dem Röntgen-Thorax aufgrund höherer Sensitivität bei neutropenen pädiatrischen Patienten vorzuziehen (Caillot et al., 1997, Warris et al., 2019).

Die Darstellung der IA im CT unterscheidet sich zwischen Erwachsenen und Kindern. In Erwachsenen-Studien konnte man bei der Mehrzahl der Fälle klassische radiologische Zeichen der IA wie das Halo-Zeichen, die Kavernenbildung oder das „Luftsichelzeichen“ erkennen (Geftter et al., 1985). Studien mit pädiatrischen Kohorten (Thomas et al., 2003, Burgos et al., 2008) zeigten hingegen nur selten die typischen IA-Zeichen und vielmehr unspezifische pulmonale Infiltrate wie z.B. Knötchen oder größere Raumforderungen,

weshalb auch atypische Infiltraten den Verdacht auf eine IA wecken sollten (Lehrnbecher et al., 2017, Groll et al., 2014).

Weiterhin ist zu beachten, dass das Auftreten von Infiltraten von der Infektionsphase abhängig und oftmals nicht spezifisch für fungale Infektionen ist, sondern auch durch andere Pathogene oder eine zugrundeliegende Tumorerkrankung verursacht werden kann. (Caillot et al., 2001)

Diagnostisches Workup

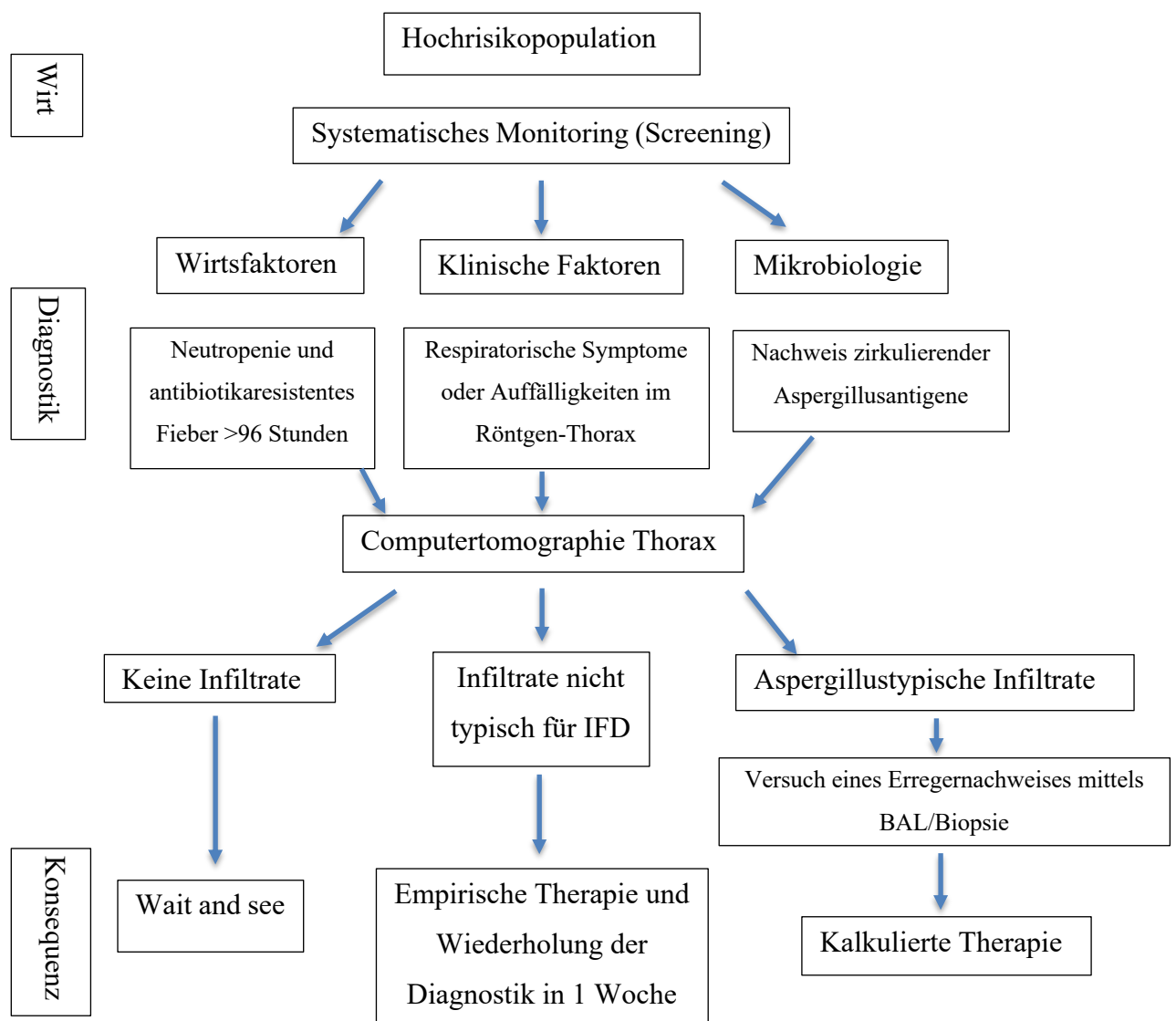


Abbildung 6. Klinisches Management von asymptomatischen Hochrisikopatienten und bei Verdacht auf eine IA. (Die Graphik wurde nach einer Abbildung von Mennink-Kersten et al., 2004 erstellt.)

1.5. Therapie

Empirische vs. Präemptive Therapie

Die empirische antifungale Therapie wird empfohlen bei pädiatrischen Hochrisikopatienten (AML, Rezidiv-Leukämie, alloSZT) mit prolongierter Neutropenie, antibiotikaresistentem, persistierendem (>96 Stunden) Fieber unklarer Genese (ohne klinischen, radiologischen, mikrobiologischen Hinweis auf IA). Dieser Fieber-gesteuerte Therapieansatz ermöglicht eine frühzeitige Therapie einer möglicherweise okkulten IA und konnte in Erwachsenenstudien die Inzidenz einer IA signifikant reduzieren (Goldberg et al., 2008). Die zugelassenen systemischen Antimykotika für diese Indikation sind Caspofungin und liposomales Amphotericin B⁶ (Maertens et al., 2010, Caselli et al., 2012). Es zeigten sich keine Unterschiede in der Wirksamkeit. Bei Patienten, die bereits eine antifungale Prophylaxe erhalten, wird ein Wechsel zu einer anderen Antimykotikaklasse empfohlen. Die empirische Therapie sollte bis zum Abklingen des Fiebers und der Neutropenie, bei weiterhin fehlendem Nachweis einer IA, fortgeführt werden.

Die präemptive antifungale Therapie wird empfohlen bei pädiatrischen Hochrisikopatienten (AML, Rezidiv-Leukämie, alloSZT) mit prolongierter Neutropenie und klinischem *oder* laborchemischem *oder* radiologischem Hinweis auf IA. Die präemptive Therapie ist ein Diagnostik-gesteuerter Ansatz und ermöglicht eine frühe Therapie einer IA bei den ersten Anzeichen ohne den potentiell unnötigen Einsatz von Antimykotika wie es bei der empirischen Therapie der Fall ist. Die wichtigste Grundvoraussetzung für diesen Ansatz ist die schnelle Verfügbarkeit von radiologischen und mykologischen Tests. Bei Patienten unter Aspergillus-wirksamer Prophylaxe, bei denen die Sensitivität der mykologischen Tests potentiell eingeschränkt sein könnte, ist die präemptive Therapie nicht zu empfehlen. Die empfohlenen Antimykotika für diese Indikationen entsprechen den Empfehlungen der kalkulierten Therapie (s.u.). Santolaya et al., 2018 konnten in einer ersten pädiatrischen Studie vorangegangene Daten aus Erwachsenenstudien bestätigen und nachweisen, dass die präemptive Therapie in ihrer Wirksamkeit der empirischen Therapie nicht unterlegen ist. Zudem zeigte sich ein signifikant reduzierter Gebrauch von Antimykotika (und damit geringere Kosten) ohne

⁶ Im Folgenden als ‚I-AmB‘ bezeichnet.

einen Anstieg in der Mortalität. Aufgrund der spärlichen Datenlage wird bei Kindern die empirische der präemptiven Therapie jedoch weiterhin vorgezogen (Lehrnbecher et al., 2018).

Kalkulierte Therapie - Primärtherapie

Eine kalkulierte Therapie wird bei Patienten nach der bestätigten Diagnose einer proven/probable IA eingeleitet.

Die Erstlinientherapie sollte nach der Diagnosestellung einer probable oder proven IA schnellstmöglich mit Voriconazol oder l-AmB begonnen werden. Voriconazol ist für Kinder >2 Jahre das Antimykotikum der Wahl (Walsh et al., 2008). Diese Empfehlung beruht auf Daten einer randomisiert-kontrollierten Studie einer Erwachsenenkohorte (Herbrecht et al., 2002a), die eine Überlegenheit von Voriconazol im Vergleich zu l-AmB darlegen. Nach 12 Wochen zeigten 53% der ‚Voriconazolpatienten‘ ein erfolgreiches Ansprechen im Vergleich zu 32% in der l-AmB-Gruppe. Es konnten ebenfalls deutlich höhere Überlebensraten (71% zu 58%) beobachtet werden. In mehreren pädiatrischen Studien (Wattier et al., 2015, Prasad et al., 2008) konnte gezeigt werden, dass diese Erkenntnisse auch bereits in die Therapien pädiatrischer Patienten inkorporiert wurden. Andere Therapieoptionen umfassen die Monotherapie mit Caspofungin, Itraconazol, Amphotericin B Lipidkomplex oder eine Kombinationstherapie aus Voriconazol/l-AmB mit Echinocandinen. Die Therapie der IA sollte mindestens 6-12 Wochen erfolgen, in jedem Falle aber bis zur Immunrestitution bzw. Zurückbildung der pulmonalen Läsionen (Walsh et al., 2008).

Weitere empfohlene Maßnahmen umfassen neben der antimykotischen Therapie die Kontrolle von zugrundeliegenden Risikofaktoren wie z.B. die Verbesserung der Neutropenie durch die Gabe von G-CSF⁷ oder einer Reduktion der immunsuppressiven Therapie. Ebenso können im Einzelfall chirurgische Interventionen die Therapie ergänzen.

Kalkulierte Therapie - Sekundärtherapie

Die Zweitlinientherapie wird bei einem Therapieversagen oder einer Unverträglichkeit gegenüber der Primärtherapie erwogen. In diesem Falle wird zuerst eine Spezies- und

⁷ Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor

Resistenzbestimmung des verursachenden Aspergillus Pilzes empfohlen. Dies hat den bedeutenden Grund, dass die Azol-Resistenz der Aspergillus Spezies zunimmt und eine häufige Ursache für einen ausbleibenden Therapieerfolg darstellt (Warris, 2015). Für die Zweitlinientherapie sollte zudem die Klasse der antifungalen Medikation gewechselt werden. Zu bevorzugen sind in diesem Falle Voriconazol (plus TDM) oder liposomales Amphotericin B, sofern die Patienten dem Medikament gegenüber therapienaiv sind. Weitere Möglichkeiten sind Caspofungin und Amphotericin B Lipidkomplex. Zu Kombinationstherapien gibt es keine verlässlichen Daten, weshalb diese nicht befürwortet werden. (Warris et al., 2019, Groll et al., 2014)

Resistenzen

Die IA wird am häufigsten durch Aspergillus fumigatus verursacht. Resistenzen dieses spezifischen Schimmelpilzes gegen Triazole, einem Hauptbestandteil der antimykotischen Therapie gegen IA, sind bereits seit Mitte der 1990er Jahre bekannt. In den letzten Jahren zeigt sich auch bei stammzelltransplantierten Patienten in Deutschland ein erhöhtes Vorkommen von Aspergillus-fumigatus-Isolaten mit Triazol-Resistenz und konsekutiv hohen Mortalitätsraten (Steinmann et al., 2015).

Beurteilung von Therapieansprechen und Outcome

Neben der Diagnose der IA stellt auch die Beurteilung des Therapieansprechens und Outcomes eine bedeutende klinische Herausforderung dar. Ursächlich ist die große Subjektivität, Nicht-Spezifität sowie fehlende Standardisierung bisheriger Parameter, wie den EORTC/MSG-Responsekriterien (Segal et al., 2008), die als derzeitiger Maßstab zur Evaluation des Outcomes gelten. Die frühzeitige Prognoseabschätzung hat aber entscheidende Implikationen für das Management und Gesamtüberleben erkrankter Patienten sowie für die Durchführung von klinischen Studien. Studiendaten von Erwachsenenpopulationen postulieren daher den Einsatz des GMI nicht nur als Surrogatmarker für die Diagnose, sondern auch als Aspergillus-spezifischen, objektiven und quantitativen Surrogatmarker für das Outcome und Therapieansprechen einer IA bei neutropenen Patienten mit hämato-onkologischer Grunderkrankung (Miceli et al., 2008, Woods et al., 2007, Nouer et al., 2011, Maertens et al., 2009, Mercier et al., 2018). Für pädiatrische Kohorten gibt es jedoch bisher kaum Daten.

1.6. Prophylaxe

Aufgrund der schwierigen diagnostischen und therapeutischen Situation (siehe oben) liegt ein Hauptaugenmerk auf der Prophylaxe der IA. Die Prophylaxe wird hierbei in eine pharmakologische Prophylaxe mittels Antimykotika und eine nicht-pharmakologische Prophylaxe wie z.B. Umkehrisolationen und spezielle Lüftungstechniken der Isolationszimmer (Sullivan et al., 2001) eingeteilt.

Primärprophylaxe

Eine Indikation für eine antimykotische Primärprophylaxe besteht grundsätzlich für alle Patienten, die aufgrund ihrer Grunderkrankung einer Hochrisikopopulation angehören (s. Definition in Tabelle 1). Grundsätzlich muss aber auch immer die lokale Epidemiologie und patientenspezifische Risikofaktoren (z.B. prolongierte Neutropenie) in die individuelle Risikoabschätzung miteinbezogen werden.

| Risikostratifizierung | Patientenpopulation |
|---------------------------------------|--|
| Hohes Risiko (IA-Inzidenz: >10 %) | AML |
| | Rezidiv einer akuten Leukämie |
| | AlloSZT |
| | Knochenmarksinsuffizienz mit prolongierter Granulozytopenie (MDS/Aplastische Anämie) |
| Niedrigeres Risiko (IA-Inzidenz: <5%) | ALL |
| | Non-Hodgkin Lymphom AutoSZT ⁸ |

Tabelle 1. Risiko für eine IA anhand der typischen Inzidenz für unterschiedliche hämato-onkologische Grunderkrankungen, basierend auf den Daten von Groll et al., 2014 und Lehrnbecher, 2015.

Bei Antimykotika unterscheidet man generell zwischen Aspergillus-wirksamen (Posaconazol, Itraconazol, Voriconazol, Amphotericin B, Micafungin) und nicht-Aspergillus-wirksamen Antimykotika (Fluconazol).

AlloSZT: Die antifungale Prophylaxe sollte ab der neutropenen Phase vor bis zum Engraftment nach Transplantation erwogen werden.

⁸ Autologe Stammzelltransplantation

Empfohlene Antimykotika sind Itraconazol (Kinder >2 Jahre), Posaconazol (Kinder >13 Jahre) und Voriconazol (Kinder >2 Jahre) und zudem als Alternative liposomales Amphotericin B oder Micafungin. Eher nicht empfohlen werden Caspofungin und aerosolisiertes liposomales Amphotericin B.

→ ohne GvHD: Mögliche Weiterführung der Prophylaxe bis zur kompletten Immunrekonstitution.

→ mit GvHD (und damit einhergehender verstärkter Immunsuppression): Eine Aspergillus-wirksame Prophylaxe mittels Posaconazol oder Voriconazol ist in jedem Falle empfohlen.

Leukämie: Die Empfehlung zur antimykotischen Prophylaxe besteht in jedem Fall für die AML und Rezidiv-Leukämien. Bei der ALL sollte eine individuelle Risikoabschätzung erfolgen. Die empfohlenen Antimykotika entsprechen denen vor/nach alloSZT s.o.

Knochenmarksinsuffizienzsyndrome: Für Patienten mit ausgeprägter und prolongierter Neutropenie gelten dieselben Empfehlungen wie bei der akuten Leukämie.

Bei Itraconazol, Posaconazol und Voriconazol ist grundsätzlich eine regelmäßige Bestimmung des Wirkspiegels (TDM⁹) mit Zielspiegeln im Erwachsenenbereich empfohlen. Ebenso sind potentielle Arzneimittelinteraktionen mit T-Zell-Immunsuppressoren zu beachten.

Sekundärprophylaxe

Die Rezidivrate nach stattgehabter IFD liegt bei ca. 30-50%, bei fortgesetzter Chemotherapie oder nachfolgender allogener Stammzelltransplantation (Maertens et al., 2011). Eine Prophylaxe mit Voriconazol, Itraconazol, Caspofungin oder liposomalem Amphotericin B wird daher bei weiterhin bestehender Immunsuppression empfohlen (Groll et al., 2014, Warris et al., 2019).

Durchbruchsinfektionen

Bei Durchbruchsinfektionen unter antifungaler Prophylaxe wird ein Klassenwechsel empfohlen. Bei vorheriger Aspergillus-wirksamer Azol-Prophylaxe soll Caspofungin

⁹ Therapeutic Drug Monitoring

(Maertens et al., 2004) oder IAmB als empirische/ präemptive Therapie verwendet werden (Warris et al., 2019).

Limitationen

Die Aspergillus-wirksame Prophylaxe ist jedoch umstritten. Einerseits aufgrund der hohen Kosten und Nebenwirkungsraten bei fraglichem Effekt, andererseits aufgrund der Häufung falsch-negativer Ergebnisse bei Durchbruchinfektionen unter Prophylaxe (Maertens et al., 2008, Gonzalez et al., 2008). Als Gegenentwurf wird die präemptive Therapie diskutiert (Details siehe A5). Zudem wird die weit verbreitete antimykotische Prophylaxe mit den steigenden Azol-Resistenzen in Verbindung gebracht (s. A5).

2. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die diagnostische Genauigkeit des kombinierten Biomarkerscreenings zur Detektion der IA in einer pädiatrischen Hochrisikokohorte zu untersuchen. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass die Diagnose der IA bei Kindern eine klinische Herausforderung darstellt und der in Erwachsenenstudie gezeigte Nutzen von Biomarkerkombinationen bisher nicht in pädiatrischen Kohorten validiert wurde. Um dies zu erreichen, wurden pädiatrische Hochrisikopatienten mit hämato-onkologischer Grunderkrankung und/oder alloSZT einem standardisierten und intensivierten (zweimal wöchentlichen) Screening auf eine IA mittels eines Galactomannanantigen-ELISA und einer Aspergillus-PCR unterzogen. Ziel der hier dargestellten retrospektiven Studie war

- die Bestimmung der diagnostischen Genauigkeit der Biomarker Galactomannan und fungale DNA in Kombination und in der Einzelevaluation.
- die Ermittlung des potentiellen Einsatzes der Biomarkerkombination als Frühwarnsystem.
- die Untersuchung des Einflusses von antifungaler Prophylaxe und empirischer Therapie auf die diagnostische Genauigkeit der Biomarkertestung.
- die Beschreibung des Galactomannanantigen-Index als Surrogatmarker für das Outcome.

B Material und Methoden

1. Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelte es sich um eine Diagnostikstudie zur Beurteilung der diagnostischen Güte von zwei Screeningverfahren zum Nachweis von *Aspergillus* spp. bei pädiatrischen Patienten mit einer Hochrisikokonstellation für eine Invasive Aspergillose (IA). Die Studie beruhte auf einer Kooperation zwischen der Stammzelltransplantationsstation der Kinderklinik und der Arbeitsgruppe Prof. J. Löffler der Medizinischen Klinik II. Sie bestand aus einer retrospektiven Analyse der beiden Indextests mit konsekutiver Erhebung und Auswertung von klinischen Daten der Patienten, die mit den genannten Referenzmethoden überwacht worden waren.

Ein Ethikvotum war nicht notwendig, da die Tests im Rahmen der Routinediagnostik und nicht speziell aus Studiengründen durchgeführt wurden.

Seit 2012 wurden alle pädiatrischen Patienten, die sich aufgrund der unmittelbaren Vorbereitung auf eine alloSZT in der Abteilung für pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation der Universitätskinderklinik Würzburg (genauer gesagt: Station Schatzinsel) befanden, im Rahmen der Routinediagnostik einem Screening auf *Aspergillus* spp. unterzogen. Das Screening erfolgte gleichzeitig mittels der diagnostischen Tests *Aspergillus*-PCR (PCR) und Galactomannan-Antigen-ELISA (GM).

Die Probenentnahme für das Screening erfolgte zweimal wöchentlich und begann in den ersten Tagen nach Aufnahme auf die Station Schatzinsel. Bei den stammzelltransplantierten Patienten bedeutete dies im Median 14 Tage vor alloSZT mit einer Spannweite von 68 Tagen. Die Probenentnahme endete mit der Entlassung oder dem Tod des Patienten, im Median in 40 Tagen nach alloSZT bei einer Spannweite von 233 Tagen und bei nicht-stammzelltransplantierten Patienten im Mittelwert nach 39 ± 17 Tagen.

Alle Proben wurden im molekularbiologisch-infektiologischen Labor der Medizinischen Klinik II der Universitätsklinik Würzburg durch die AG Löffler prospektiv ausgewertet. Aus jeder Probe wurden am selben Tag beide Tests durchgeführt. Für die Testung

vorgesehen war die Verwendung von Serumproben. Falls diese nicht verfügbar waren, wurden die Tests mit EDTA-Plasma-Proben durchgeführt, um die Datenerhebung aufrechtzuerhalten. Die Testmethode blieb über die gesamte Beobachtungsdauer unverändert. Den Durchführenden des Tests waren zu keinem Zeitpunkt klinische Daten oder Ergebnisse der Referenzmethode bekannt.

Im Juli 2015 wurden unter Berücksichtigung der Einschlusskriterien:

- Probenanzahl insgesamt: >2 Proben
- durchgängige Durchführung des GM

12 Patienten ausgeschlossen und die verbliebenen 39 Patienten in die Studie für die retrospektive Datenanalyse eingeschlossen.

2. Index-Tests und Referenzmethode

“Der wesentliche Unterschied [einer Diagnostikstudie] zu den klassischen Beobachtungsstudien besteht darin, dass nicht zwei Gruppen (zum Beispiel Exponierte vs. Nicht- Exponierte) verglichen werden, sondern von jedem Individuum zwei Werte [Test und Referenz] in ihrer Übereinstimmung betrachtet werden“ (Herkner and Müllner, 2011).

2.1. Diagnostische Tests

In unserer Studie untersuchten wir zwei Index-Tests, den Galactomannanantigen-ELISA und die Aspergillus-PCR, die getrennt und kombiniert in ihrer Güte beurteilt werden sollten. Der GM und die PCR wurden in aliquoten Teilen derselben Patientenprobe durchgeführt. Die Durchführenden der Tests hatten zum Zeitpunkt der Testung keine Informationen über klinische Symptome oder Ergebnisse anderer diagnostischer Methoden.

Galactomannanantigen- ELISA

Zum Nachweis des Galactomannan-Antigens wurde ein ELISA (Platelia Aspergillus EIA; Bio-Rad, München, Deutschland) aus Serum durchgeführt. A priori wurde der Optische Dichtewert (OD)-Index von $\geq 0,5$ als Cut-Off-Wert definiert. Ein GM-Index (GMI) $\geq 0,05$ definierte damit einen positiven GM-ELISA. Eine einzige positive Probe

war ausreichend um den Patienten als GM-positiv zu klassifizieren. Der Galactomannan-Index wurde als kontinuierliche Variable gewertet.

Aspergillus-PCR

Die DNA wurde aus einer 1 ml zellfreien Blutfraktion (Serum) mittels des QIAmp Ultrasens virus kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert (Springer et al., 2013). Das Protokoll stimmte mit den Empfehlungen der EAPCRI (European Aspergillus PCR Initiative Recommendations) für Serum überein, um den höchsten diagnostischen Standard zu gewährleisten (White et al., 2011). Die real-time PCR, die eine interne Kontrolle beinhaltet, wurde so durchgeführt wie kürzlich beschrieben (Springer et al., 2016). Für jede positive Probe wurde der PCR Cq-Wert (cycle quantification value) mitangegeben. Der Wert ist die PCR-Zyklus-Nummer, an dem die Reaktionskurve der Probe die Grenzwertlinie schneidet. Der Cq-Wert ist invers zur Menge der Ziel-Nukleinsäure in der Probe. Beim Resultat der Aspergillus-PCR handelt es sich um eine binäre Variable.

2.2. Diagnosestandard (Referenzmethode)

Die Referenzmethode (=gegenwärtiger diagnostischer Goldstandard) zur Beurteilung der diagnostischen Güte unserer beiden Index-Tests waren die, bereits in A 4 detailliert dargelegten, Diagnosekriterien “Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the EORTC/MSG Consensus Group” (De Pauw et al., 2008). Diese fungieren als diagnostischer Algorithmus und ermitteln die Wahrscheinlichkeit einer Invasiven Aspergillus Infektion. Die Leitlinie unterteilt Patienten dabei in vier Kategorien: proven IA/probable IA/possible IA/unclassified IA. In unserer Studie konnten wir keinen Patienten als „proven IA“ klassifizieren, da man hierfür steriles Material für den direkten Nachweis von *Aspergillus fumigatus* mittels mikroskopischer Analyse oder Kultur benötigt. Die höchste Klassifikationsstufe der Patienten unserer Studie entsprach damit der Kategorie „probable“, welche das parallele Vorliegen eines Wirtsfaktors, sowie eines klinischen und eines mykologischen Kriteriums verlangt.

2.3. Auswertung der Ergebnisse von GM-ELISA und Aspergillus-PCR

Anwendung der EORTC/MSG- Kriterien – Studiengruppen

Wir haben in unserer Studie die EORTC/MSG-Kriterien (De Pauw et al., 2008) genutzt, um anhand unserer Datenbank (siehe B3.) die Studienpatienten retrospektiv in drei Studiengruppen einzuteilen: (1) wahrscheinliche IA („probable“) und (2) mögliche IA („possible“) sowie (3) ohne Hinweise für eine IA („unclassified“).

Die Gruppe (3) wurde in unserer Studie als Kontrollgruppe angesehen.

Die Gruppe der Patienten, die als „probable“ klassifiziert wurde, wird im Folgenden als „PROB“ bezeichnet. Dementsprechend bezeichnet „POS“ die als „possible“ eingestuft Patienten und „UNCLASS“ die nicht-klassifizierten. Alle Studienpatienten wurden nach der Referenzmethode klassifiziert. Die Durchführenden der Studie, die die Einteilung der Patienten vornahmen, waren bezüglich der Testergebnisse der Patienten nicht-verblindet.

Retrospektive Validierung der klinischen Index-Tests

Die Auswertung der Ergebnisse der diagnostischen Tests zur Bestimmung der diagnostischen Gütekriterien wurde mithilfe von Vierfeldertafeln (2x2-Tabellen s. Abbildung 7) vorgenommen. Hierbei wurden die Testergebnisse an den Ergebnissen der Referenzmethode validiert. Alle initial eingeschlossenen Patienten wurden in die Berechnung inkludiert.

Beide Index-Tests lieferten ein binäres Ergebnis - Test positiv (T+) oder Test negativ (T-). Ein einmaliges positives Testergebnis reichte aus um den Patienten als T+ für den jeweiligen Test zu klassifizieren.

Die in 2.2. beschriebene Referenzmethode diente zur Ermittlung des „wahren Zustand des Patienten“ und damit der Einteilung der Patienten in K+ (Krankheit sprich IA liegt vor) und K- (Krankheit sprich IA liegt nicht vor).

Die diagnostischen Gütekriterien wurden hierbei für zwei Definitionen (jeweils für beide Tests und die Tests in Kombination) berechnet:

- (1) **K+** = Studiengruppe PROB und **K-** = Studiengruppe POS und UNCLASS
- (2) **K+** = Studiengruppe PROB und POS und **K-** = Studiengruppe UNCLASS

| Testresultat der Index-Tests | Wahrer Zustand des Patienten | | |
|---------------------------------|---|---|------------|
| | Krankheit liegt vor (K+) | Krankheit liegt nicht vor (K-) | |
| Test positiv (T+) | Richtig positives Resultat (True positive = TP) | Falsch positives Resultat (False positive = FP) | PPV |
| Test negativ (T-) | Falsch negatives Resultat (False negative = FN) | Richtig negatives Resultat (True negative = TN) | NPV |
| | Sensitivität | Spezifität | |

Abbildung 7. Vierfeldertafel zur Berechnung der diagnostischen Gütekriterien.

Daraus hervorgehend konnten die folgenden diagnostischen Parameter (Gütekriterien) für beide diagnostische Tests einzeln sowie in Kombination mithilfe nachstehender Berechnung bestimmt werden:

Prävalenz = Vortestwahrscheinlichkeit: Anteil der Erkrankten in Studienpopulation

Sensitivität: $TP/(TP+FN)$ = Anteil der Richtig-Test-Positiven unter allen Erkrankten

Spezifität: $TN/(FP+TN)$ = Anteil der Richtig-Test-Negativen unter allen Gesunden

Positiver prädiktiver Wert (PPV): $TP/(TP+FP)$ = Anteil der Erkrankten unter allen Richtig-Test-Positiven

Negativer prädiktiver Wert (NPV): $TN/(FN+TN)$ = Anteil der Gesunden unter allen Richtig-Test-Negativen

DOR¹⁰: $(TP \times TN + 0,5) / (FP \times FN + 0,5)$ = Quote der Wahrscheinlichkeiten einer Test-Positivität unter allen Kranken relativ zu allen Gesunden

Richtig-Klassifikationsrate (Accuracy): $TP+TN/(TP+FP+TN+FN)$ = Anteil der richtigen Vorhersagen unter allen Testergebnissen

Mit der Software (<http://araw.mede.uic.edu/cgi-bin/testcalc.pl>) und (<http://statpages.info/ctab2x2.html>) wurden zudem mithilfe der Vortest-

¹⁰ Diagnostic Odds Ratio

Wahrscheinlichkeit die positiven und negativen Likelihood Ratios und anhand des Fagan Nomogramms auch die zugehörigen Nachtest-Wahrscheinlichkeiten berechnet.

Für jeden diagnostischen Parameter wurde das Konfidenzintervall mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit = Alpha = 0,05 berechnet.

Detaillierte Analyse der Index-Tests

Die ROC¹¹-Kurve wurde erstellt, um die Fähigkeit des GM-Index (klassifizierende kontinuierliche Variable), eine positive Aspergillus-PCR-Probe (binäre Referenzvariable) vorherzusagen, zu evaluieren. Jeder der 534 Probenstage (an dem beide Tests durchgeführt wurden) ergab einen Punkt auf der ROC-Kurve mit einem spezifischen Sensitivitäts- und Spezifitätswert (Wertepaar) sowie einem zugehörigen Wert der klassifizierenden Variable (GMI = möglicher Cut-Off-Wert). Der Youden-Index = (Sensitivität + Spezifität) – 1 wurde für jeden Punkt auf der ROC-Kurve berechnet. Durch diesen konnte der beste Cut-Off-Wert (GMI) zur Vorhersage einer negativen oder positiven Aspergillus-PCR durch die Berechnung des maximalen Wertepaares ermittelt werden. Der Youden-Index ist die maximale vertikale Distanz zwischen der ROC-Kurve und der Diagonallinie. Die AUC (= Area under the curve) wurde als Maß für die Qualität des Klassifikators berechnet. Dabei wird die ROC-Kurve mit der Diagonallinie verglichen, deren Wert 0,5 ist und gleichbedeutend ist mit einer fehlenden Klassifikationsfähigkeit des Testes.

Die Rolle des GMI als Surrogatmarker für das Outcome/Therapieansprechen in der PROB-Gruppe wurde evaluiert. Der GMI wurde als abhängige Variable, das Outcome/Therapieansprechen als unabhängige Variable klassifiziert. Das klinische Outcome und das GMI-basierte Outcome wurden an Tag 42 (nach Beginn der antifungalen Therapie der IA) erfasst. Überleben wurde als erfolgreiches klinisches Outcome und Tod an der IA als Versagen gewertet. Erfolg nach dem GMI-basierten Outcome wurde als konstant negativer GMI (<0,5) über zwei Wochen nach dem ersten negativen GMI ohne neue pulmonale und extrapulmonale Läsionen und Versagen durchgehend positiven GMI ohne Normalisierung definiert (Woods et al., 2007).

¹¹ Receiver operating characteristic

Das Therapieansprechen wurde ebenfalls an Tag 42 mittels GMI-basiertem Ansprechen (Kriterien entsprechen denen des GMI-basierten Outcomes) und den als Standard geltenden Responsekriterien der EORTC/MSG-Consensus Group (Segal et al., 2008) beurteilt. Letztere definieren Erfolg als Überleben an Tag 42 plus komplettes (Auflösung aller der IA zurechenbaren Symptome und Krankheitsanzeichen) oder partielles Ansprechen (Verbesserung der IA zurechenbaren Symptome, Krankheitsanzeichen und radiologischen Abnormitäten (>25%) sowie Reduktion der fungalen Last festgestellt durch eine negative Kultur oder quantitativen, validierten Labormarker). Versagen wird als stabile (Überleben an Tag 42 und keine Verbesserung der IA) oder fortschreitende Erkrankung (definiert als Verschlechterung von klinischen, radiologischen oder mykologischen Kriterien) oder Tod festgelegt. Studienendpunkte waren der Grad der Übereinstimmung abhängiger und unabhängiger Variablen sowie die Zeit zur Evaluation des Outcome. Ein Patient aus der PROB-Gruppe wurde wegen lost to follow-up und ein weiterer wegen unklaren Therapiebeginns ausgeschlossen.

Weitere Analysen umfassten die Betrachtungen der Anzahl der positiven Proben pro Studiengruppe und für den einzelnen Patienten; der Mittelwert des positiven GMI und Cq-Wertes im Vergleich zwischen den Studiengruppen; die Länge der anhaltenden Positivität des GM, PCR und kombiniert. Berechnet wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen (\pm) oder die Konfidenzintervalle.

3. Klinische Datenerhebung

Die klinischen Patientendaten wurden retrospektiv aus den täglichen Patientendokumentationen, Arztbriefen, Laborergebnissen und den CT- Befunden der 39 Patienten erhoben. Zur Verwaltung dieser Daten wurde eine eigene Datenbank mit dem Programm Filemaker¹² erstellt. Die Pseudonymisierung der Patienten wurde dabei durch zugewiesene Patientennummern gewährleistet.

Die Datenbank bestand aus fünf Teilen (Details siehe Appendix)

¹² FileMaker, Inc., 5201 Patrick Henry Drive, Santa Clara, California 95054, USA. FileMaker ist eine Marke von FileMaker, Inc., eingetragen in den USA und anderen Ländern.

(1) Stammdaten/Diagnose, (2) Risikofaktoren, (3) Mikrobiologie, (4) Klinik/Diagnostik, (5) Medikamente/Ernährung.

Jeder Teil enthielt patientenspezifische Variablen (s. Tabelle 2).

Für jeden Probenstag, an dem das Screening auf *Aspergillus* spp. durchgeführt wurde, ist ein fünfteiliger Datensatz mit allen Variablen für jeden Patienten angelegt worden. Insgesamt erhoben wir 543 Datensätze (bei 543 untersuchten Blutproben) für alle 39 Patienten.

Die Datenbank wurde nach Erstellung zur besseren statistischen Auswertbarkeit in eine Excel-Tabelle überführt. Einige Variablen wurden nicht von der Datenbank in die Excel-Tabelle und damit nicht in die Auswertung übernommen. Folgend sind nur Variablen angegeben, die in die Auswertung miteingeflossen sind:

| | Binäre Variablen | Kontinuierliche Variablen |
|------------------------------------|---|--|
| 1. Stammdaten/ Diagnose | Geschlecht (m/w) | Gewicht (kg) |
| | | Alter (Jahre) |
| | | Patientennummer |
| 2. Risikofaktoren | Neutropenie (ja/nein) ¹³ | Dauer der Neutropenie (in Tagen) ¹⁴ |
| | Kortikosteroide (ja/nein) ¹⁵ | Dauer der Kortikosteroide ¹⁶ -Einnahme (Tage) |
| | T-Zell-Immunsuppressor (ja/nein) ¹⁷ | |
| | Stammzelltransplantation (ja/nein) | Tage seit SZT (Tage) |
| | Angeborene Immundefizienz (ja/nein) | |
| 3. Mikrobiologie | CMV ¹⁸ (positiv/negativ) | |
| | Andere Herpesviren ¹⁹ (positiv/negativ) | |
| | Respiratorische Viren ²⁰ (positiv/negativ) | |
| | Aspergillus-PCR (positiv/negativ) | PCR quantification cycle Wert (Cq-Wert) |

¹³ Wie definiert in den EORTC/MSG Kriterien: Neutrophile <500/µl > 10 Tage.

¹⁴ Definition der Neutropenie = Neutrophile <500/µl.

¹⁵ Wie definiert in den EORTC/MSG Kriterien: 0,3mg Prednisolonäquivalent/kgKG/Tag für >21 Tage. 1 mg Prednisolon entspricht 0,14 mg Dexamethason bzw. 4 mg Hydrocortison.

¹⁶ Nur wenn 0,3mg Prednisolonäquivalent/kgKG/Tag.

¹⁷ Wie definiert in den EORTC/MSG Kriterien: Cyclosporin, Tacrolimus, Mycophenolat-Mofetil in den letzten 90 Tagen.

¹⁸ Definiert als DNA- Detektion in Plasma.

¹⁹ Herpes simplex Virus 1 oder 2, Humanes Herpesvirus 6, Epstein-Barr-Virus, Varizella- Zoster-Virus.

²⁰ Adenoviren, Influenzavirus, Parainfluenzavirus, Coronavirus, Rhinovirus.

| | GM- ELISA (pos./neg.) | GM-ELISA Index |
|-------------------------------------|---|----------------------|
| 4. Klinik/ Diagnostik | Pulmonale Symptome (ja/nein) | |
| | Fieber ²¹ (ja/nein) | |
| | Husten (ja/nein) | |
| | Tachykardie (ja/nein) | |
| | Sauerstoffbedarf (ja/nein) | |
| | Tachypnoe (ja/nein) | |
| | Mucositis (ja/nein) | |
| | GvHD Darm (ja/nein) | |
| | GvHD Leber (ja/nein) | |
| | GvHD Haut (ja/nein) | |
| | CT ²² (positiv/negativ) | |
| | | C- reaktives Protein |
| | | CD3/μl |
| | | CD4/μl |
| | | CD8/μl |
| | | Naive CD4 |
| | | CD19/μl |
| | | CD16/CD56/μl |
| | | Leukozyten/μl |
| | | Monozyten/μl |
| | | Neutrophile/μl |
| | | Lymphozyten/μl |
| 5. Medikation/ Ernährung | Itraconazol (ja/nein) | |
| | Fluconazol (ja/nein) | |
| | Ambisome ²³ (ja/nein) | |
| | Voriconazol (ja/nein) | |
| | Posaconazol (ja/nein) | |
| | Caspofungin (ja/nein) | |
| | Flucytosin (ja/nein) | |
| | Aspergillus-wirksame Medikation (ja/nein) | |

Tabelle 2. Dargestellt sind die fünf Teile der Datenbank mit ihren jeweiligen patientenspezifischen klinischen Variablen, die in die Auswertung miteingeschlossen wurden.

²¹ Definiert als >38,5°C oder >38°C über 4 Stunden.

²² CT-Positivität nach den EORTC/MSG-Kriterien definiert.

²³ Prophylaxe oder Therapie mit liposomalem Amphotericin B.

Kategoriale Variablen waren: Datum der Probenentnahme, Geburtsdatum des Patienten, Diagnose, Tag der SZT.

Die klinischen Variablen wurden zur Einteilung der Patienten nach den EORTC/MSG-Kriterien (s. B 2.2), zur Beurteilung der diagnostischen Güte der Index-Tests (s. C 3), für die longitudinale Verlaufsbeobachtung (s. C 8) der PROB-Patienten sowie für die Kovariantenanalyse im Rahmen der Ereigniszeitanalyse (s. C 6) und die Analyse der Antimykotika (s. C 7) verwendet.

4. Computertomographie - Befundung

Insgesamt lagen uns 69 computertomographische Aufnahmen von 33/39 unserer Patienten vor. Diese sind während des stationären Aufenthaltes (während der Screening Periode) des Patienten im Rahmen der klinischen Versorgung entstanden. Die häufigsten Gründe für ein CT waren: CT als Routineuntersuchung am Aufnahmetag (Status vor SZT) oder CT bei pulmonaler Symptomatik.

Die Aufnahmen wurden als low-Dose CT und in Inspiration durchgeführt. Die Röhrenspannung des CTs wurde alters- und gewichtsadaptiert und betrug zwischen 80 und 120 kV (30 bis 50 mA) mit Dosisreduktion durch eine CareDose 4D gesteuerte Modulation der Röhrenspannung. Alle CT- Bilder wurden mit einem 64- Schicht- Computertomographen (Siemens Sensation 64; Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland) erstellt.

Die erste Befundung der CTs zum Zeitpunkt des stationären Aufenthalts der Patienten wurde durch den Radiologen der Kinderklinik vorgenommen. Im Rahmen unserer Studie ließen wir ausgewählte CTs von zwei unabhängigen Gutachtern zur Bestätigung nachbefunden. Diese Gutachter verfügten über keinerlei klinische sowie mykologische Informationen der Patienten. Die Positivität eines CTs wurde nach den Kriterien der EORTC/MSG siehe B 2. (De Pauw et al., 2008) definiert.

5. Vergleich mit Daten einer Erwachsenenstudie

In einer kürzlich publizierten Studie unserer Arbeitsgruppe (Springer et al., 2016) wurden erwachsene Hochrisikopatienten ähnlich wie unsere pädiatrischen Patienten mittels der Biomarker-Tests GM und PCR auf IA gescreent. Diese Daten wurden mit den pädiatrischen Testergebnissen verglichen, um etwaige Unterschiede zwischen beiden

Altersgruppen zu erkennen. Die Erwachsenen waren genau wie die pädiatrischen Patienten anhand der EORTC- Klassifikation in probable, possible und unclassified eingeteilt worden, was die Vergleichbarkeit erleichterte. Die Durchführung des GM wie auch der PCR war identisch zu unserer Studie ebenso wie der Cut-Off-Wert des GM und des Cq-Wertes der PCR.

6. Statistische Analyse

Die statistischen Methoden wurden mit Stata 14.1 (StataCorp, College Station, TX, USA), R Version 3.2.3 (R Foundation, Wien, Österreich) und Excel durchgeführt.

6.1. Demographische Daten

Die demographischen Daten (s. C2) der Patienten wurden folgendermaßen ausgewertet: Die Variable Alter folgte einer Normalverteilung und wurde deshalb mit Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Die Variable Gewicht folgte keiner Normalverteilung, weshalb in diesem Falle der Median berechnet wurde.

6.2. Assoziation zwischen CT, PCR und GM

Im Rahmen der Frequenzanalyse wurde jeder Patient mit mindestens einem positiven CT als CT-positiv und jeder Patient ohne ein positives CT als CT-negativ gewertet. Die Sensitivität und Spezifität sowie PPV/NPV wurden in dieser Darstellung nochmals für beide Tests berechnet. In diesem Falle wurde jedoch ein positives CT als Referenzmethode zur Definition von „K+ = IA liegt vor“ gewertet. Ein einmaliges positives Testergebnis reichte wieder aus um den Patienten als T+ für den jeweiligen Test zu klassifizieren. Zur Ermittlung der Assoziation zwischen CT-Positivität, positiver PCR und positivem GM (s. C6) wurde der Pearsons Chi-Quadrat Unabhängigkeitstest verwendet.

6.3. Ereigniszeitanalyse

Für die grafische Darstellung der Ereigniszeitanalyse (s. C7) in Form des Kaplan-Meier Schätzers wurde für jeden Patienten eine neue Variable erstellt, die den genauen Beobachtungszeitraum vom Tag der Einweisung ins Krankenhaus in Tagen festlegte. Zudem wurden zwei Ereignisvariablen für jeden Patienten bestimmt:

1) Der Tag der binären Zustandsänderung der Aspergillus-PCR von negativ zu positiv (positives PCR-Ereignis).

2) Der Tag der ersten Konversion der kontinuierlichen Variable GM- ELISA zu einem positiven Assay (positives GM-Ereignis).

Im Rahmen der Ereigniszeitanalyse wurde eine Varianzanalyse durchgeführt, um den Einfluss von X = binäre bzw. kontinuierliche Variablen (= unabhängige Variablen, beeinflussender Faktor) vgl. Abbildung 9 (B3) auf die beiden oben genannten Y= Ereignisvariablen (abhängige Variablen) zu ermitteln. Dies geschah bei binären und kontinuierlichen Variablen mithilfe der semiparametrischen Cox Regression als Hazard Ratio und als Bestätigung mit dem nicht-parametrischen Log-rank-Test für alle binären Variablen. Die binären Kovarianzen wurden dabei als während der ganzen Beobachtungsperiode zeitlich invariant und die kontinuierlichen als zeitlich veränderlich angesehen.

Der Methodenteil wurde auf der Grundlage der STARD (Standards for Reporting Diagnostic Accuracy Studies) -Richtlinien (Bossuyt et al., 2015) und der Elemente des QUADAS-2-Instrument für das qualitative Assessment diagnostischer Genauigkeitsstudien (Whiting et al., 2011) erstellt.

C Ergebnisse

1. Studiengruppen

| Studiengruppen nach EORTC/MSG – Kriterien | Patientenanzahl (%) |
|--|----------------------------|
| Proven | 0 |
| Probable (PROB) | 4 (10%) |
| Possible (POS) | 2 (5%) |
| Unclassified (UNCLASS) | 33 (85%) |

Tabelle 3. Übersicht über die Patientenanzahl der drei Studiengruppen nach Zuordnung durch die EORTC/MSG-Kriterien.

2. Demographische Charakteristika der Studiengruppen

2.1. Geschlecht

Insgesamt gab es 25 männliche und 14 weibliche Patienten. In der PROB-Gruppe und der POS-Gruppe gab es nur männliche Patienten (100%). In der UNCLASS-Gruppe dahingegen 19 männliche (58%) und 14 weibliche Patienten (42%).

2.2. Alter

Das durchschnittliche Alter der gesamten Stichprobe betrug 10 Jahre mit einer Standardabweichung von 5,7 und einem Maximum von 21 Jahren und einem Minimum von 0,3 Jahren. In der PROB-Gruppe betrug der Altersmittelwert 14 Jahre mit einer Standardabweichung (SD) von 5,5. Ebenfalls über dem gesamten Mittelwert befand sich die POS-Gruppe mit einem durchschnittlichen Alter von 13,5 Jahren (SD 10,6). Die UNCLASS-Patienten hatten einen Mittelwert von 9 Jahren mit einer Standardabweichung von 5,7 und waren damit von allen drei Gruppen dem gesamten Mittelwert am nächsten.

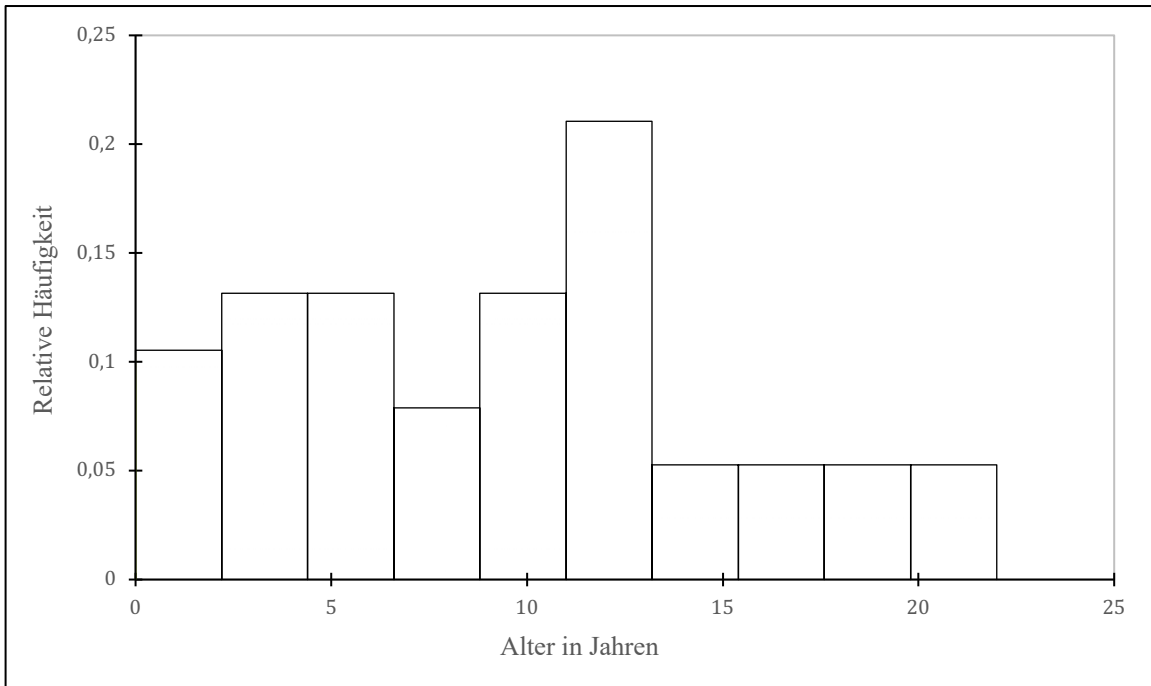


Abbildung 8. Histogramm zur relativen Häufigkeitsverteilung des Alters der untersuchten Patienten.

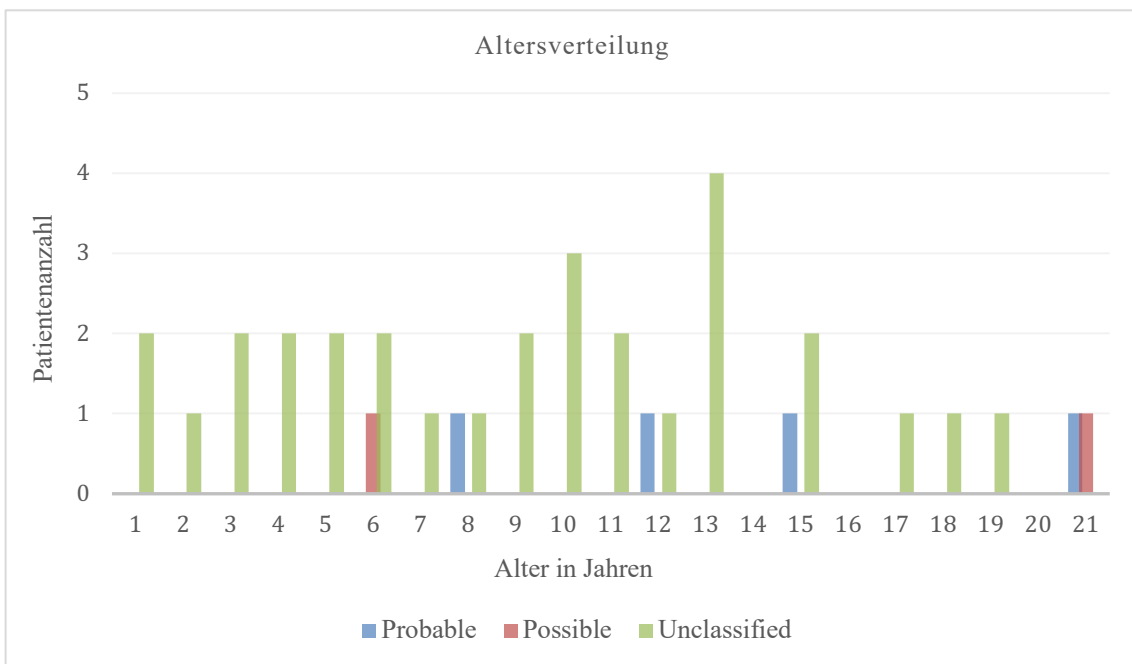


Abbildung 9. Altersverteilung nach Studiengruppen.

2.3. Gewicht

Das Gesamtgewicht der Studienkohorte betrug im Median 30,5 Kilogramm. In der PROB-Gruppe betrug der Median 35,1 kg, in der POS-Gruppe 47,3 kg und in der UNCLASS-Gruppe 29,5 kg.

2.4. Grunderkrankungen

Zu den Hauptgrunderkrankungen zählen die Akute Lymphatische Leukämie (ALL), das Myelodysplastische Syndrom (MDS) sowie die Akute Myeloische Leukämie (AML).

Bei den Erkrankungen, die unter „Andere“ zusammengefasst sind, handelt es sich um Chronisch Myeloische Leukämie (CML), Hodgkin Lymphom, Diamond-Blackfan Anämie, Thalassämie, Neuroblastom, Fanconi-Anämie, Adrenoleukodystrophie, schwere aplastische Anämie, Omenn Syndrom (n = jedes 1).

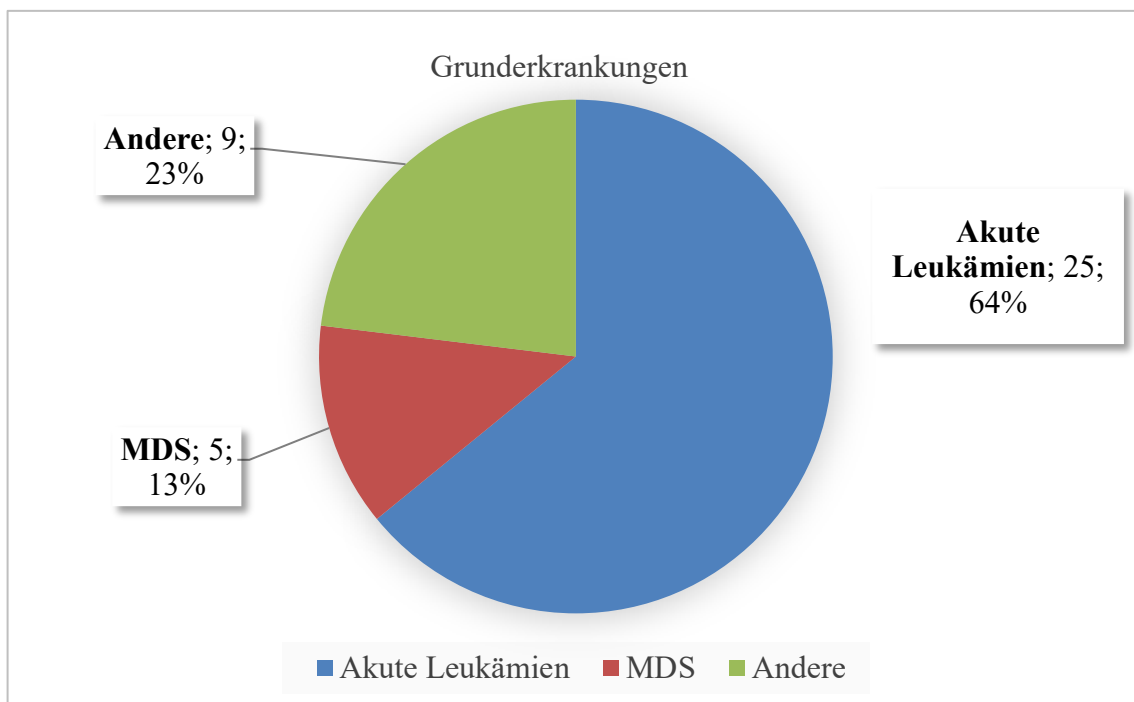


Abbildung 10. Verteilung der Grunderkrankungen der Studienpatienten.

Alle Patienten der PROB-Gruppe litten unter einem Rezidiv, drei davon unter einem ALL-Rezidiv und der vierte unter einem AML-Rezidiv. Die Patienten der POS- Gruppe litten beide unter einer ALL, einer davon unter einem Rezidiv. Damit litten alle 6 Patienten der PROB- und POS-Gruppe unter einer akuten Leukämie (100%). In der UNCLASS-Gruppe waren es hingegen nur 19/33 (58%).

2.5. Allogene Stammzelltransplantation

Während des Screeningzeitraumes erhielten 34 Patienten eine allogene Stammzelltransplantation. Von den fünf Patienten, die keine alloSZT erhielten, hatten vier Patienten ein ALL-Rezidiv mit Blastenpersistenz unter Rezidiv-Chemotherapie, weshalb bei Therapie-Refraktärität eine alloSZT als nicht zielführend erachtet wurde. Bei dem fünften Patienten mit ALL konnte durch eine Blinatumomab-Therapie eine Knochenmarksremission erreicht werden, was eine alloSZT nicht mehr notwendig machte.

Von den Patienten der PROB-Gruppe erhielten nur zwei eine alloSZT eines 9/10 passenden Fremdspenders, zwei davon fielen unter das oben genannte Ausschlusskriterium der Therapie-Refraktärität. Alle Patienten der POS-Gruppe sowie 30/33 UNCLASS- Patienten wurden stammzelltransplantiert.

2.6. Analysierte Blutproben

Von 39 Patienten wurden insgesamt 543 Blutproben ausgewertet. Im Mittel hatte jeder Patient $14 \pm 6,2$ Proben. In der PROB-Gruppe gab es im Mittel $19,8 \pm 9,5$ Proben pro Patienten, insgesamt waren es 77. Davon wurden 74 Proben sowohl durch die Aspergillus-PCR als auch durch das GM-ELISA analysiert. Bei einem Patienten wurden drei Proben nicht auf das GM-Antigen untersucht. In der POS-Gruppe hatte ein Patient 16 und der andere 6 Proben, bei beiden wurden alle Proben durch beide Tests analysiert. Jeder UNCLASS-Patient hatte im Mittelwert $13,5 \pm 6$ Proben, insgesamt waren es 444 Proben in dieser Gruppe. Bei 7/444 Proben wurde kein GM durchgeführt und bei 2/444 anderen Proben keine PCR. Bei 435 Proben wurden also beide Tests durchgeführt.

Insgesamt wurden bei 12 Proben nicht beide Index-Tests durchgeführt. Dies wird in der nachfolgenden Auswertung mitberücksichtigt.

Primäre Ergebnisparameter

3. Diagnostische Güte der Index-Tests

3.1. Darstellung der Testergebnisse nach Studiengruppen

| Einstufung der Patienten | Anzahl der Patienten mit mind. 1 positivem Testresultat für angegebenen Test/ Gesamtanzahl (%) | | |
|---------------------------------------|--|--------------------|--------------|
| | GM | PCR | GM und PCR |
| Patienten mit probable IA, n = 4 | 4 / 4 (100%) | 4 / 4 (100%) | 4 / 4 (100%) |
| Patienten mit possible IA, n = 2 | 0 / 2 (0%) | 2 / 2 (100%) | 0 / 2 (0%) |
| Patienten mit unclassified IA, n = 33 | 4 / 33 (12,1%) | 14 / 33 (42,4%) | 0 / 33 (0%) |

Tabelle 4. Anzahl der Patienten mit positivem GM und/oder PCR- Resultat und jeweilige EORTC/MSG-Einstufung der Patienten.

In Tabelle 4 sind alle 39 Patienten dargestellt, die nach der Referenzmethode in drei Studiengruppen eingeteilt wurden mit ihren jeweiligen Testresultaten im GM-ELISA (GM) sowie in der Aspergillus-PCR (PCR).

Alle vier Patienten der PROB-Gruppe zeigten bei beiden Tests positive Testresultate. Dahingegen waren die zwei POS-Patienten nur in der PCR positiv, aber nie im GM. Patienten der UNCLASS-Gruppe wiesen sowohl positive GM- wie auch PCR-Resultate vor, jedoch waren bei keinem Patienten im Laufe der Studienzeit beide Tests positiv. Damit war die PROB-Gruppe die einzige, bei der alle Patienten in beiden Tests z.T. auch gleichzeitig positive Testergebnisse hatten.

3.2. Diagnostische Gütekriterien

PROB-Gruppe = K+

In der folgenden Darstellung der Ergebnisse wurden die PROB-Patienten als K+ (IA liegt vor) und POS- und UNCLASS-Patienten als K- gewertet (IA liegt nicht vor).

Die Prävalenz und damit die Vortest-Wahrscheinlichkeit der IA in dieser Darstellung betrug 0,1 [0,0-0,2].

Die Zeiten von Beginn des Screenings bis zur erstmaligen Konversion der Biomarker von negativ zu positiv in der PROB-Gruppe war für GM (49 ± 39 Tage) bzw. PCR (46 ± 40 Tage) vergleichbar.

| Testresultat | Wahrer Zustand des Patienten laut Referenzmethode | | |
|--------------------------|---|------------------------------|-----------|
| | IA liegt vor (K+) | IA liegt nicht vor (K-) | |
| Test positiv (T+) | 4 Richtig-positiv | 4 Falsch-positiv | 8 |
| Test negativ (T-) | 0 Falsch-negativ | 31 Richtig-negativ | 31 |
| | 4 | 35 | 39 |

Abbildung 11. Vierfeldertafel für die Auswertung der Ergebnisse des GM-ELISA. GM-ELISA positiv = Test positiv (T+).

Der **GM-ELISA** kam auf eine Sensitivität von 1,0 [KI 0,4-1,0] bei 4 Richtig-Positiven Patienten von 4 Erkrankten. Die Spezifität lag bei 0,9 [KI 0,8-0,9] bei 31 Richtig-Negativen unter 35 Gesunden (Falsch-Positiv-Rate 11%). Der positive prädiktive Wert errechnete sich auf 0,5 [KI 0,2-0,8] bei 4 Richtig-Positiven und 4 Falsch-Positiven. Der negative prädiktive Wert lag bei 1,0 [KI 0,9-1,0] bei 0 Falsch-Negativen Patienten und DOR bei 249.

Ein positives GM-Testergebnis zeigte eine positive Likelihood Ratio (LR+) von 8,8 [KI 2,9-18] bei einer Nachtestwahrscheinlichkeit von 50% [KI 25-67%]. Demnach sind 1 in 2 Patienten mit positivem Test krank. Bei einem negativen Testergebnis lag die negative Likelihood Ratio bei 0,0 [KI 0,01-1,6] mit einer Nachtestwahrscheinlichkeit von 0,0% [KI 0-15%]. 1 von 1 Patient mit negativem Test sind gesund. Die Richtigklassifikationsrate (= "Accuracy") lag bei 0,9 [KI 0,8-0,9].

| Testresultat | Wahrer Zustand des Patienten laut Referenzmethode | | |
|--------------------------|---|------------------------------|-----------|
| | IA liegt vor (K+) | IA liegt nicht vor (K-) | |
| Test positiv (T+) | 4 Richtig-positiv | 16 Falsch-positiv | 20 |
| Test negativ (T-) | 0 Falsch-negativ | 19 Richtig-negativ | 19 |
| | 4 | K- | 39 |

Abbildung 12. Vierfeldertafel für die Auswertung der Ergebnisse der Aspergillus- PCR. Aspergillus-PCR positiv = Test positiv (T+).

Die **Aspergillus-PCR** kam auf eine Sensitivität von 1,0 [KI 0,4-1,0] bei ebenfalls 4 Richtig-Positiven unter 4 Erkrankten. Die Spezifität belief sich auf 0,5 [KI 0,48-0,54] bei 19 Richtig-Negativen unter 35 Gesunden. Dementsprechend lag auch der positive prädiktive Wert bei 0,2 [KI 0,1-0,4] aufgrund von 16 Falsch-Positiven und 4 Richtig-Positiven. Der negative prädiktive Wert wurde mit 1,0 [KI 0,8-1,0] berechnet bei keinen Falsch-Negativen Patienten. Die DOR lag bei 153.

Ein positives PCR- Testergebnis zeigte eine positive Likelihood Ratio (LR+) von 2,2 [KI 1,5-3,1] bei einer Nachtestwahrscheinlichkeit von 20% [KI 12-26%]. Demnach sind 1 von 5 Patienten mit positivem Test krank. Bei einem negativen Testergebnis lag die negative Likelihood Ratio bei 0,0 [KI 0,0-2,6] mit einer Nachtestwahrscheinlichkeit von 0,0% [KI 0-23%]. 1 von 1 Patient mit negativem Test sind gesund. Die Richtigklassifikationsrate (= "Accuracy") lag bei 0,59 [KI 0,57-0,59].

| Testresultate | Wahrer Zustand des Patienten laut Referenzmethode | | |
|---------------------------|---|------------------------------|-----------|
| | IA liegt vor (K+) | IA liegt nicht vor (K-) | |
| Tests positiv (T+) | 4 Richtig-positiv | 0 Falsch-positiv | 4 |
| Tests negativ (T-) | 0 Falsch-negativ | 35 Richtig-negativ | 35 |
| | 4 | 35 | 39 |

Abbildung 13. Vierfeldertafel für die kombinierte Auswertung der Ergebnisse des GM-ELISA und der Aspergillus-PCR. GM ELISA und Aspergillus PCR positiv = Test positiv (T+).

Die Kombination der beiden diagnostischen Tests **Galactomannan-Antigen-ELISA und Aspergillus-PCR** ergab eine kombinierte Sensitivität von 1,0 [KI 0,5-1,0], da bei allen 4 PROB-Patienten beide Tests positiv waren. Kein Patient der POS- oder der UNCLASS-Gruppe war positiv im GM und in der PCR, was eine kombinierte Spezifität von 1,0 [KI 0,9-1,0] ergibt. Der gemeinsame positive prädiktive Wert lag genau wie der negative prädiktive Wert gleichfalls bei 1,0 [KI PPV 0,5-1,0 und KI NPV 0,9-1,0] bei keinem falsch-positiven oder falsch-negativen Patienten. Damit hatte die Kombination beider Tests eine diagnostische Gesamtgenauigkeit von 100%. Die DOR lag bei 281.

Ein positives GM und PCR-Testergebnis zeigt eine positive Likelihood Ratio (LR+) von Inf [KI 4,1-Inf] bei einer Nachtestwahrscheinlichkeit von 100% [KI 32-100%]. Demnach sind 1 von 1 Patient mit positivem Test krank. Bei einem negativen Testergebnis lag die negative Likelihood Ratio bei 0,0 [KI 0,0-1,4] mit einer Nachtestwahrscheinlichkeit von 0% [KI 0-14%]. 1 von 1 Patient mit negativem Test sind gesund. Die Richtigklassifikationsrate (= "Accuracy") lag bei 1,0 [KI 0,9-1,0].

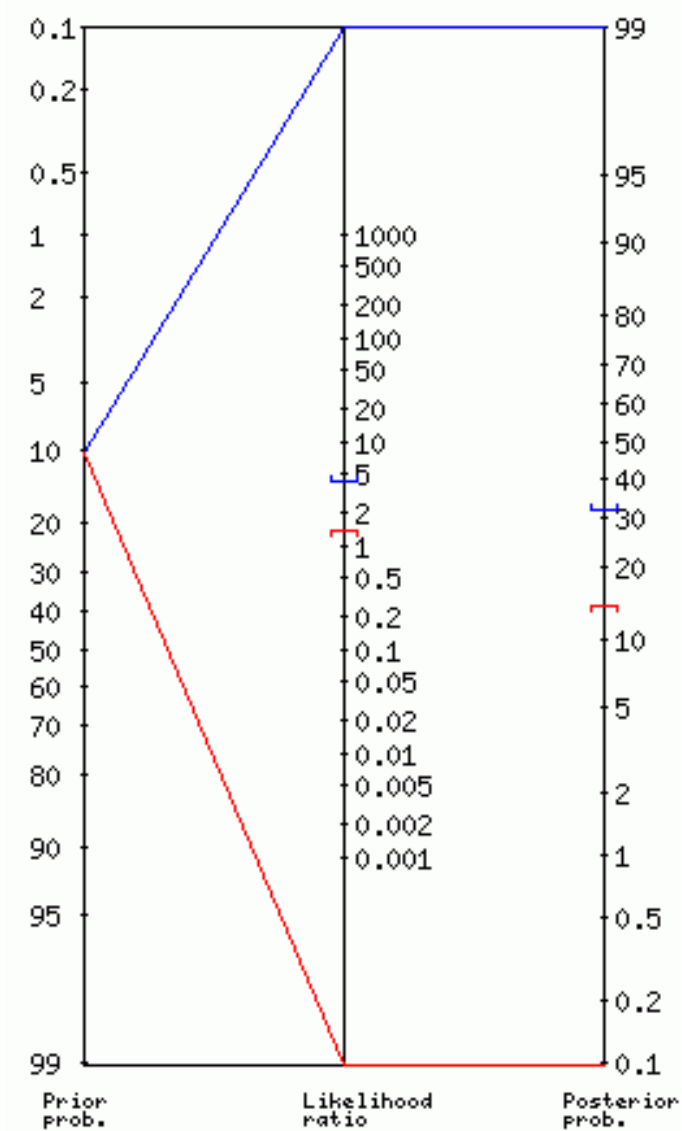


Abbildung 14. Fagan Nomogramm. In unserer Studienpopulation gehen wir von einer Vortestwahrscheinlichkeit von 10% aus. Die Likelihood Ratios für die Kombination von beiden klinischen Tests sind Inf und 0,0. Eine Fortsetzung der Linien ergibt die Nachtest-Wahrscheinlichkeit, also die Wahrscheinlichkeit, dass die Diagnose vorliegt, nachdem der Test durchgeführt wurde.

PROB- und POS-Gruppe = K+

Nachfolgend werden sowohl die PROB- als auch die POS-Gruppe als K+ gewertet. Die UNCLASS-Gruppe wird weiterhin als K- klassifiziert.

Die Prävalenz und damit die Vortestwahrscheinlichkeit der IA in dieser Darstellung betrug 15,4%.

Bei Betrachtung des **GM-ELISA** verringerte sich die Sensitivität von 1 auf 0,7 [KI 0,3-0,9], da keiner der POS-Patienten eine positive GM-Probe hatte. Deshalb fiel ebenso der negative prädiktive Wert von 1 auf 0,96 [KI 0,8-1,0]. Die Spezifität (0,9 [KI 0,8-0,9]) und der positive prädiktive Wert (0,5 [KI 0,2-0,8]) blieben gleich. DOR betrug 13,7. Ein positives GM-Testergebnis zeigte eine positive Likelihood Ratio (LR+) von 5,5 [KI 1,9-16] bei einer Nachtestwahrscheinlichkeit von 50% [KI 25-74%]. Demnach sind 1 in 2 Patienten mit positivem Test krank. Bei einem negativen Testergebnis lag die negative Likelihood Ratio bei 0,4 [KI 0,1-1,2] mit einer Nachtestwahrscheinlichkeit von 6% [KI 2-18%]. 1 von 1 Patient mit negativem Test sind gesund. Die Richtigklassifikationsrate (= "Accuracy") lag bei 0,9 [KI 0,7-0,9] und die Falschklassifikationsrate damit bei 0,2 [KI 0,1-0,3].

Die **Aspergillus-PCR** hatte weiterhin eine Sensitivität von 1 [KI 0,6-1], da alle PROB- und POS-Patienten positive PCR-Testergebnisse hatten. Der positive prädiktive Wert stieg dadurch leicht an von 0,2 auf 0,3 [KI 0,1-51]. Die Spezifität verbesserte sich ebenfalls und lag bei 0,6 [KI 0,5-0,6] im Vergleich zu vorherigen 0,5, was jedoch alleine an der kleineren Gruppe der Gesunden (K-) liegt. Der negative prädiktive Wert blieb gleichbleibend bei 1 [KI 0,8-1]. Ein positives PCR-Testergebnis zeigte eine positive Likelihood Ratio (LR+) von 2,4 [KI 1,4-3,4] bei einer Nachtestwahrscheinlichkeit von 30% [KI 20-68%]. Demnach sind 1 in 3,3 Patienten mit positivem Test krank. Bei einem negativen Testergebnis lag die negative Likelihood Ratio bei 0,0 [KI 0,0-1,8] mit einer Nachtestwahrscheinlichkeit von 0,0% [KI 0-25%]. 1 von 1 Patient mit negativem Test sind gesund. Die Richtigklassifikationsrate (= "Accuracy") lag bei 0,6 [KI 0,5-0,6].

In der kombinierten Beurteilung des **GM- und PCR-Testes** sank die Sensitivität von 1 auf 0,7 [KI 30-67], da nur die PROB-Patienten, nicht aber die POS-Patienten positive Resultate beider Tests vorwiesen. Damit sinkt ähnlich wie beim GM-Test auch der negative prädiktive Wert von 1 auf 0,9 [KI 0,8-99]. Spezifität und PPV bleiben gleich.

Die DOR ergab 265. Ein positives GM- und PCR-Testergebnis zeigte eine positive Likelihood Ratio (LR+) von Inf [KI 2,6-723] bei einer Nachtestwahrscheinlichkeit von 100% [KI 32-100%]. Demnach sind 1 in 1 Patient mit positivem Test krank. Bei einem negativen Testergebnis lag die negative Likelihood Ratio bei 0,3 [KI 0,1-1,0] mit einer Nachtestwahrscheinlichkeit von 6% [KI 2-15%]. 1 von 1 Patient mit negativem Test sind gesund. Die Richtigklassifikationsrate (= "Accuracy") lag bei 0,95 [KI 0,8-0,95].

4. Detaillierte Analyse der Index-Tests

4.1. Detaillierte Analyse der Ergebnisse des GM- ELISA

Anzahl der positiven Proben pro Studiengruppe und pro Patient

In der PROB-Gruppe wurden bei 74 Proben insgesamt 38 positive GM-Testergebnisse erfasst (51%, KI 40-62%). In der POS-Gruppe gab es 0/22 positive Proben und in der Gruppe der UNCLASS 9 positive Resultate bei 437 Proben zu verzeichnen (2%, KI 1,1-3,9%).

Jeder der vier Patienten der PROB-Gruppe hatte im Mittelwert $9,5 \pm 3,6$ positive Proben (Spannweite 8). Die positiven GM-Proben machten durchschnittlich $64 \pm 37\%$ (Spannweite 79%) aller Proben eines Patienten aus. Die 33 Patienten der UNCLASS-Gruppe kamen im Mittelwert auf $0,3 \pm 0,8$ positive GM-Proben pro Patient (Spannweite 4). Bei den vier GM-positiven UNCLASS-Patienten waren im Mittelwert $1,8 \pm 5,5\%$ (Spannweite 17%) aller Proben des einzelnen Patienten positiv für das Galactomannanantigen.

Länge der anhaltenden Positivität des GM-ELISA bei PROB und UNCLASS

Bei den vier pädiatrischen PROB-Patienten beobachteten wir eine langanhaltende Positivität des GM-Tests mit einem Mittelwert von 44,8 Tagen $\pm 36,8$ und einer Spannweite von 81. Bei den vier GM-positiven UNCLASS-Patienten war der GM hingegen im Mittelwert nur 4,5 Tage $\pm 3,8$ lang hintereinander positiv mit einer Spannweite von 9.

Mittelwert des GM-Index (GMI) bei positiven Proben von PROB und UNCLASS

Zur Erinnerung: Der Index zur Definition eines positiven GM-Tests lag bei $\geq 0,05$. In der PROB-Gruppe zeigte sich bei insgesamt 38 positiven GM-Proben ein Index-Mittelwert von $3,1 \pm 2,7$ mit einer Spannweite von 0,5 bis maximal 9,8. Im Vergleich wies die

UNCLASS-Gruppe mit insgesamt 9 falsch-positiven GM-Proben einen Index- Mittelwert von $1,5 \pm 1$ mit einem Minimum von 0,5 und einem Maximum von 3,9 vor. Es zeigte sich ein Unterschied in der Höhe des Index- Mittelwertes zwischen der PROB- und der UNCLASS-Gruppe mit einer Differenz von 1,6, ebenso wie im Maximalwert mit einer Differenz von 5,8.

Falsch-positiver GM-ELISA

Vier Patienten aus der UNCLASS-Gruppe (Kontrollgruppe) wiesen ein falsch-positives GM-Ergebnis vor. Keiner der Patienten erfüllte zum Zeitpunkt der Positivität die Kriterien einer IA.

Patient 1 hatte zwei falsch-positive Proben (1,7 und 0,5) nach Engraftment/Tag 23 post-alloSZT. Zur Zeit der Probenentnahme bekam der Patient Meropenem und litt unter einer GvHD des Darms \circ^3 sowie einer Mukositis.

Patient 2 hatte ebenfalls zwei falsch-positive Proben (0,6 und 0,9) unter Behandlung mit Meropenem, kurz nach der alloSZT. Der Patient litt an einer Mukositis und einer GVHD \circ^1 des Darmes.

Patient 3 hatte vier falsch-positive Proben (3,9; 1,4; 1,5; 1,9) kurz vor Entlassung bei kompletter Remission und wurde während der ersten Positivprobe mit Meropenem und bei den anderen drei Proben mit Penicillin behandelt. Der Patient litt zudem unter einer Mukositis.

Patient 4 hatte eine falsch-positive Probe (1,0) kurz vor Entlassung. Der Patient litt zu diesem Zeitpunkt unter einer Mukositis. Er erhielt keine antibiotische Therapie.

GM- Index als Surrogatmarker für Outcome und Therapieansprechen

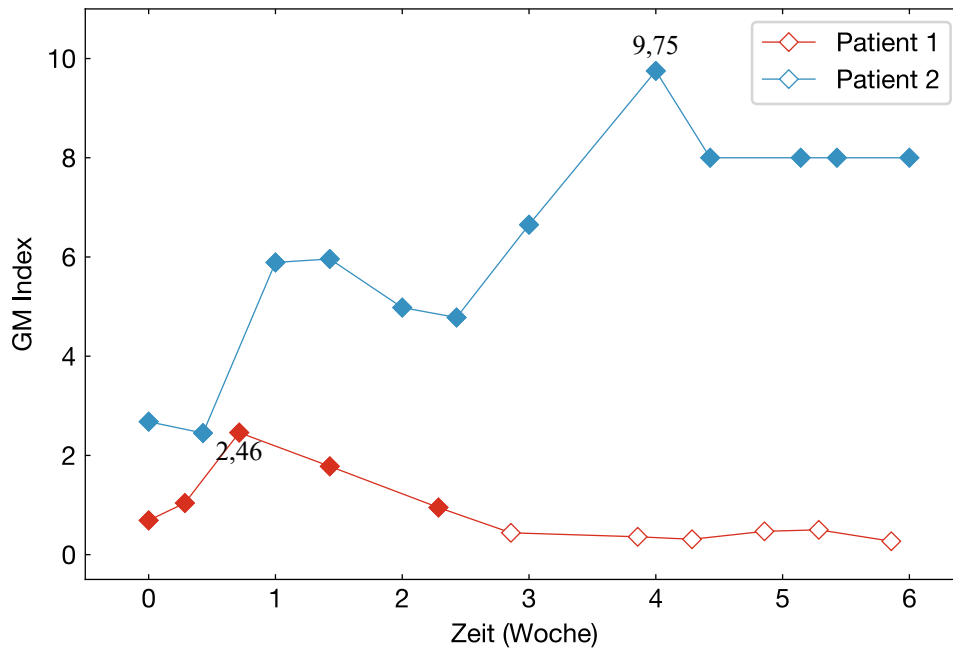


Abbildung 15. Dargestellt ist die Kinetik der GM-Indizes von zwei PROB-Patienten während der probable IA. Die positiven GM-Tests während der Erkrankung an IA sind durch ausgefüllte Rauten markiert. Der Höchstwert jedes Patienten wurde an entsprechender Stelle ergänzt. Tag 0 entspricht dem Tag des Beginns der antifungalen Therapie nach IA-Diagnose.

Beide Patienten 2/2 (100%) zeigten eine Seropositivität (Baseline-GMI >0,5) des Serum-GMIs bei Diagnosestellung. Bei Patient 1 lag der Baseline-GMI bei 0,7 und bei Patient 2 bei 2,7. Der Tag der Diagnosestellung entsprach in beiden Fällen dem Tag des Beginns der Aspergillus-wirksamen antifungalen Therapie.

In der ersten Beobachtungswoche (bis Tag 7) zeigte Patient 1 einen Anstieg von 1,8 GMI-Einheiten ab Baseline-GMI bei bereits beginnender Deszension des GMI ab Tag 5. Patient 2 wies bis Tag 7 einen Anstieg um 3,2 GMI-Einheiten mit fortschreitender Aszension des GMI auf. An Tag 14 zeigte Patient 1 erstmalig eine Serokonversion von positivem zu negativem GMI und blieb bis Tag 42 fortwährend seronegativ. Eine fortschreitende Aszension mit persistierender Seropositivität bis GMI 9,8 ließ sich bei Patient 2 erkennen.

In der Beurteilung des Outcomes an Tag 42 nach Beginn der antifungalen Therapie zeigte Patient 1 ein erfolgreiches klinisches Outcome (Überleben) und wurde bei persistierend negativen GMI-Werten >2 Wochen nach dem letzten negativen GMI auch nach den GMI-basierten Outcomekriterien als Erfolg klassifiziert. Patient 2 wurde aufgrund eines Exitus letalis als klinisches Versagen und bei bis zu seinem Tod persistierend positiven und sogar ansteigenden GMI-Werten auch nach den GMI-basierten Outcomekriterien als Versagen gewertet. Eine Autopsie wurde nicht durchgeführt.

Das Therapieansprechen wurde ebenfalls nach Tag 42 beurteilt. Nach den EORTC/MSG-Kriterien wurde Patient 1 aufgrund eines fehlenden aktuellen CTs in Woche 6 und größtenproredienten pulmonalen Läsionen im letzten CT in Woche 4 trotz Beseitigung aller klinischer Symptome und negativer antifungaler Biomarker als Versagen gewertet. Nach den GMI-basierten Responsekriterien, die den Outcomekriterien entsprechen, konnte Patient 1 nach >2 Wochen dauernder Seronegativität nach erstem negativen GMI an Tag 14 als Erfolg klassifiziert werden. Die Zeit bis zum Ansprechen, definiert nach den GMI-basierten Kriterien, war 28 Tage. Patient 2 wurde bei Größenprogredienz der pulmonalen Läsionen, klinischer Verschlechterung und Tod an Tag 42 als Versagen nach den EORTC/MSG-Kriterien gewertet. Aufgrund persistierend positiven (und sogar steigenden) GMI-Werten wurde Patient 2 nach den GMI-basierten Kriterien ebenfalls als Versagen klassifiziert.

4.2. Detaillierte Analyse der Aspergillus-PCR

Anzahl der positiven Proben pro Studiengruppe und pro Patient

Die PROB- Gruppe hatte 29 positive PCR-Ergebnisse bei 77 Proben (38%, KI 25-46%), die POS- Gruppe zwei positive Proben bei 22 Proben (9%) und die UNCLASS- Gruppe 22 positive Proben auf 442 Proben (5%, KI 2,4 – 6,1%).

Bei der Betrachtung der PCR erhielten wir bei der PROB-Gruppe eine durchschnittliche positive Probenanzahl pro Patient von $7,3 \pm 4,5$ positiven Proben (Spannweite 9). Die POS-Gruppe kam nur auf eine mittlere Probenanzahl von 1 positiver PCR- Probe pro Patient. Betrachten wir die UNCLASS-Patienten, dann kam jeder Patient im Mittelwert auf $0,7 \pm 1,1$ positive Proben (Spannweite 4).

Alle PROB- und POS-Patienten waren PCR-positiv sowie 14/33 der UNCLASS-Patienten. Der Anteil der positiven Proben an der Gesamtheit der Proben des einzelnen Patienten betragen im Mittelwert $51 \pm 39\%$ (Spannweite 82%) bzw. $12 \pm 7,8\%$ (Spannweite 11%) bzw. $5,9 \pm 11\%$ (Spannweite 37,8).

Mittelwert des Aspergillus-PCR-Cq-Wertes von PROB, POS und UNCLASS

In der PROB-Gruppe zeigte sich bei 29 positiven Proben ein Mittelwert der PCR-Cq-Werte von $41,9 \pm 4,4$ mit einer Spannweite von 20,9. In der POS-Gruppe lag der Mittelwert von 2 positiven Proben bei $47,1 \pm 2,9$ (Spannweite 4,1) und bei der UNCLASS-Gruppe mit 22 positiven Proben bei $44,6 \pm 6,1$ (Spannweite 22,8). Die Differenz zwischen der PROB- und der UNCLASS- Gruppe betrug 2,7.

Höhe des Cq-Wertes und klinischer Verlauf der UA

Die Cq-Werte (Wert der Schwellenüberschreitung) waren in der PROB-Gruppe deutlich niedriger im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Je niedriger der Cq-Wert, desto höher die Anzahl der Kopien. Es ist also davon auszugehen, dass die Cq-Werte einen Rückschluss auf die Schwere der Erkrankung (= Anzahl der fungalen Komponenten) zulassen. Der Verlauf des Cq-Wertes war jedoch im Vergleich zum GMI nicht mit dem klinischen Verlauf zu korrelieren.

4.3. Detaillierte kombinierte Analyse von Aspergillus-PCR und GM-ELISA

ROC- Kurvenanalyse

Mittels der ROC-Kurve wurde die Beziehung zwischen dem GM-Index als klassifizierende Variable und der Aspergillus-PCR als binäre Referenzvariable untersucht.

Der maximale Youden Index „J“ (rote Linie) lag bei 49,9%. Damit wies er auf einen Cut-Off-Wert von $\geq 0,4$ für den GMI hin, mit einer zugehörigen Sensitivität von 0,55 und einer Spezifität von 0,95. Der Wert $\geq 0,4$ stellte damit den besten Grenzwert zur Vorhersage einer negativen oder positiven Aspergillus-Probe dar. Dies bedeutet, dass ein GMI von $\geq 0,4$ eine positive PCR mit einer Sensitivität von 55% und einer Spezifität von 95% vorhersagt. Der Wert von $\geq 0,4$ liegt nahe am häufigsten gebrauchten Cut-Off-Wert von 0,5 und niedriger als andere populäre Grenzwerte von 1,0 und 1,5.

Ein Maß für die Güte des Tests ist die Fläche unter der Kurve (AUC: Area under the curve). Diese lag in unserer Studie bei 0,7336 mit einem Standardfehler von 0,0465 und einem 95% - Konfidenzintervall (CI): 0,64233 – 0,82475. Der Kurvenverlauf war weit von einer symmetrischen Form entfernt. Der Wert der AUC war jedoch signifikant, da er über dem Wert von 0,5 lag.

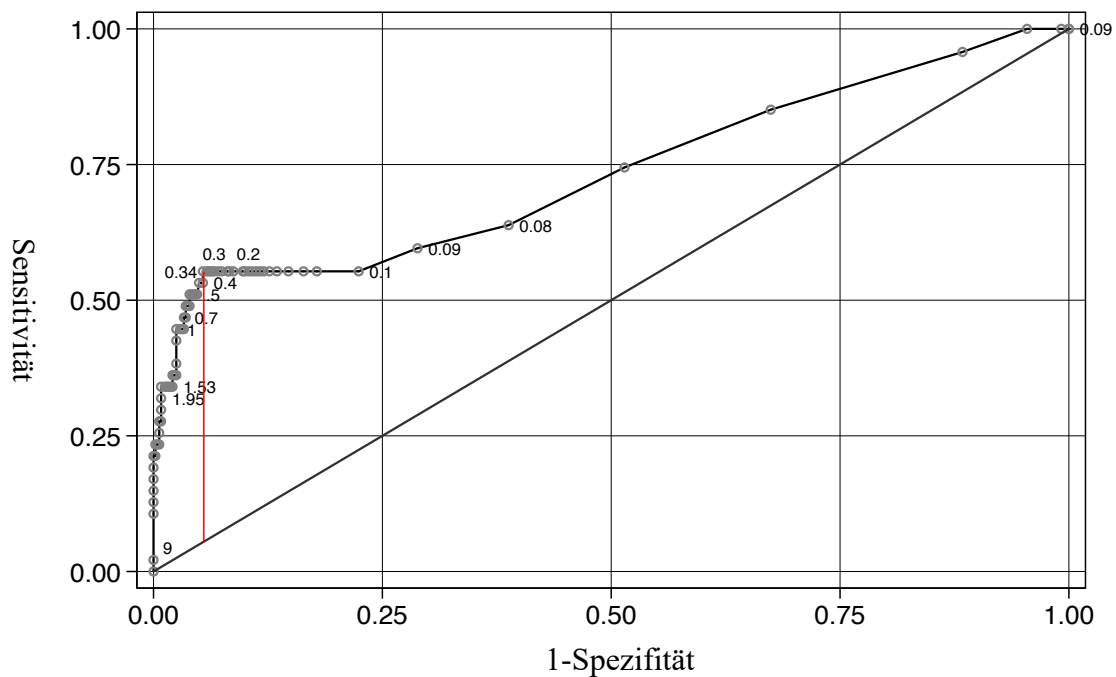


Abbildung 16. ROC-Kurve mit Sensitivität auf Y-Achse und 1-Spezifität (Falsch-Positiv-Rate) auf X-Achse, die gegeneinander aufgetragen wurden mit repräsentativen Werten des GM-Index. Die Diagonallinie entspricht einer AUC von 0,5 und gilt als Referenz. Die rote Linie (Youden-Index) ist die maximale vertikale Distanz zwischen der ROC-Kurve und der Diagonallinie.

Anzahl der gleichzeitig positiven Proben in der PROB-Gruppe

Die PROB-Gruppe zeigte eine gleichzeitige Positivität von GM und PCR in 25/74 Proben (34%). Im Mittelwert hatte jeder Patient der PROB-Gruppe im Mittelwert $6,3 \pm 5,2$ Proben, die gleichzeitig GM- und PCR-positiv waren. Dies entsprach im Mittelwert einem Anteil von $45 \pm 38,8\%$ an der Gesamtheit aller Proben eines Patienten.

Länge der dualen Positivität von GM-ELISA und Aspergillus-PCR

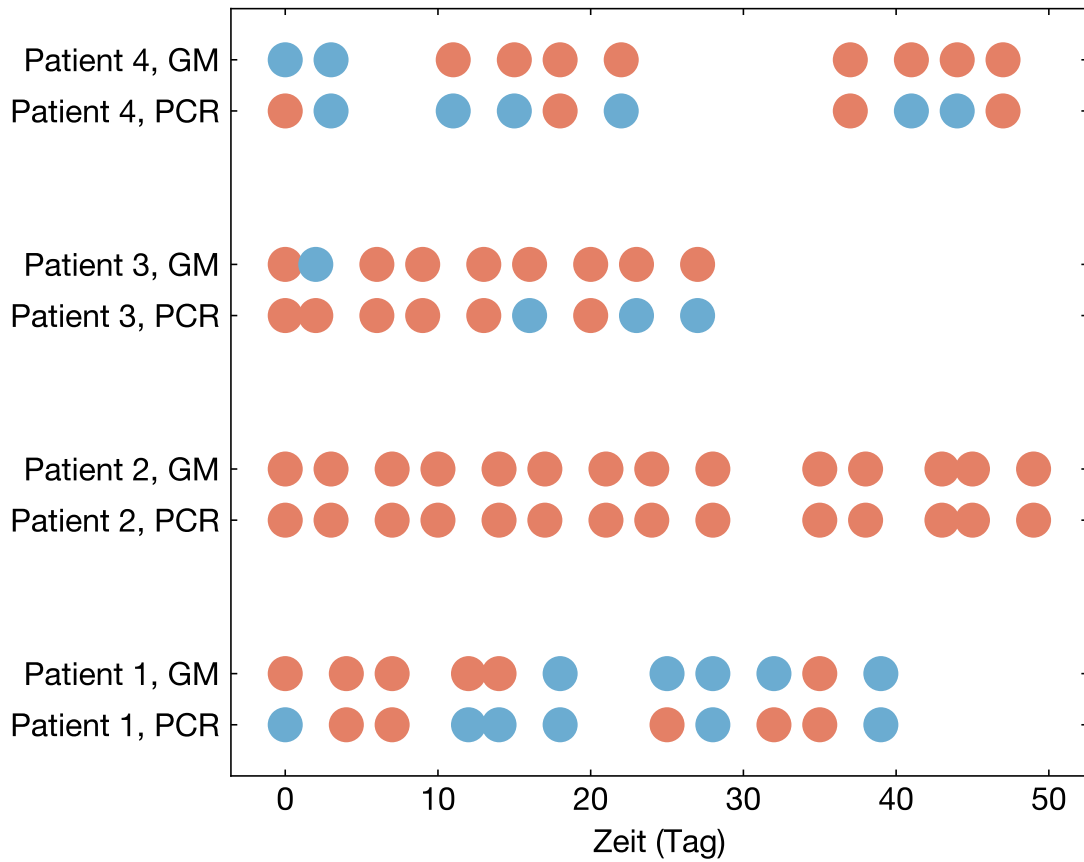


Abbildung 17. Dargestellt ist der Zeitraum, an denen die Proben der vier PROB-Patienten eine kombinierte Positivität aufwiesen. Jeder Punkt entspricht einem Probestag. Ein positives Ergebnis ist in rot, ein Negatives in blau gekennzeichnet. Bei Patient 1, 3 und 4 wurden alle Probestage mit ausschließlich negativen Ergebnissen vor/nach dem oben dargestellten Zeitraum ausgeschlossen.

Sekundäre Ergebnisparameter

5. Assoziation zwischen CT-, PCR- und GM-Positivität

In dieser Darstellung wird der spezielle Fokus auf das positive CT als Nachweisinstrument für eine Invasive Lungen-Aspergillose und die Korrelation mit den beiden Index-Tests gelegt.

Die Verteilung der positiven CTs gleicht der Einteilung nach EORTC- Kategorien, da das positive CT in allen Fällen das ausschlaggebende Kriterium für die Einteilung in die drei Studiengruppen war. Dementsprechend gab es nur in der PROB- und der POS- Gruppe, also bei 6 Patienten, CTs mit pilztypischen Lungeninfiltraten. In der PROB- Gruppe mit 4 Patienten gab es 13 positive CTs bei insgesamt 20 CTs (65%). Die POS- Gruppe mit 2 Patienten wies 3 positive bei 6 CTs auf (50%).

Insgesamt wurden bei 33 unserer 39 Patienten CTs angefertigt mit n= 69. 6 Patienten wurden als CT-positiv und 27 als CT-negativ gewertet.

5.1. CT und Aspergillus-PCR

| Testresultat | Wahrer Zustand des Patienten laut CT | | |
|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-----------|
| | IA liegt vor (K+) = CT+ | IA liegt nicht vor (K-) = CT- | |
| Test positiv (T+) | 6 Richtig-positiv | 10 Falsch-positiv | T+ |
| Test negativ (T-) | 0 Falsch-negativ | 17 Richtig-negativ | T- |
| | 6 | 27 | 33 |

Abbildung 18. Aspergillus-PCR. Vierfeldertafel zur Bestimmung der diagnostischen Gütekriterien der PCR bei CT als Referenzmethode.

Alle 6 Patienten mit positivem CT hatten ebenfalls ein positives PCR-Ergebnis, woraus sich eine Sensitivität und NPV von 100% für die PCR ergibt. Allerdings hatten von den 27 Patienten mit negativem CT-Ergebnis 10 ebenfalls ein falsch-positives PCR-Ergebnis,

was mit einer Spezifität von 63% und einem positiven prädiktiven Wert von 37,5% einhergeht.

Der Pearson-Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest zeigte eine signifikante Korrelation zwischen dem CT und der Aspergillus-PCR (Pearson-Chi-Quadrat [1 Freiheitsgrad] = 7,7917, P = 0,005).

5.2. CT und GM-ELISA

| Testresultat | Wahrer Zustand des Patienten laut CT | | |
|--------------------------|--------------------------------------|------------------------------|-----------|
| | IA liegt vor (K+) =CT+ | IA liegt nicht vor (K-) =CT- | |
| Test positiv (T+) | 4 Richtig-positiv | 3 Falsch-positiv | 7 |
| Test negativ (T-) | 2 Falsch-negativ | 24 Richtig-negativ | 26 |
| | 6 | 27 | 33 |

Abbildung 19. GM-ELISA. Vierfeldertafel zur Bestimmung der diagnostischen Gütekriterien der GM-ELISA bei CT als Referenzmethode.

Von den 6 Patienten mit einem positiven CT hatten 4 davon ein positives GM- Ergebnis, was einer Sensitivität von 66% und NPV von 92% entsprach. Bei 3 falsch-positiven GM- Ergebnissen bei 27 Patienten mit negativem CT lag die Spezifität bei 89% und der positive prädiktive Wert bei 57%. Die Korrelation zwischen GM-ELISA und CT war ebenfalls signifikant mit einem Pearson-Chi-Quadrat [1 Freiheitsgrad] = 9,0659 und P = 0,003.

5.3. CT und Aspergillus-PCR und GM-ELISA

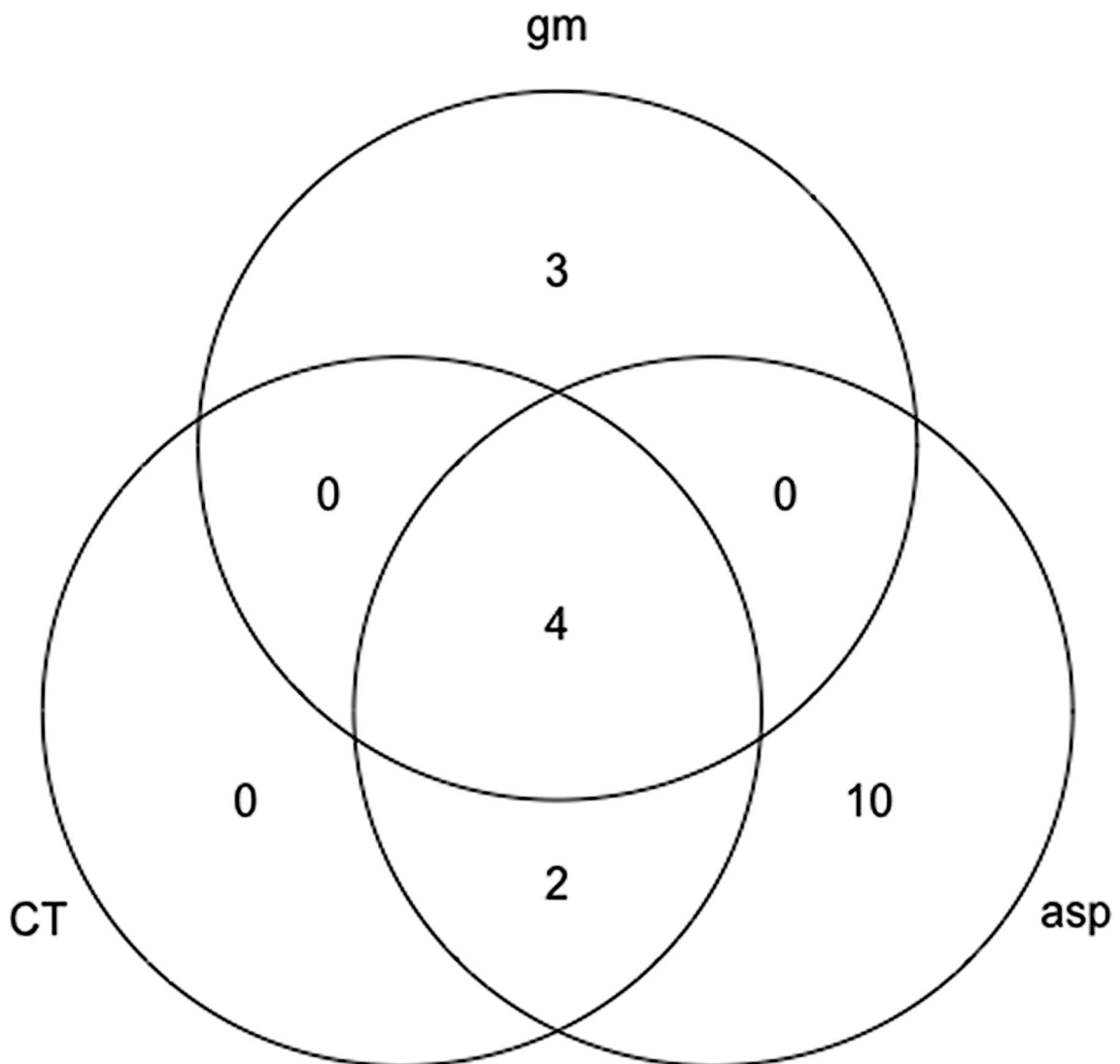


Abbildung 20. Venn-Diagramm stellt die Beziehung zwischen der CT-basierten Diagnostik der Aspergillose (CT), einem positiven Aspergillus-PCR-Resultat (asp) und einem positiven GM-ELISA (gm) her. Alle 6 positiven CTs wurden von der Aspergillus-PCR entdeckt (Sensitivität 100%), hingegen nur 4/6 vom GM-ELISA (Sensitivität 67%). Die Aspergillus-PCR hatte aber 10 falsch-positive Ergebnisse (PPV 37,5%) und die GM-ELISA nur 3/27 (PPV 57%).

6. Ereigniszeitanalyse

6.1. GM-ELISA

Kaplan-Meier-Schätzer

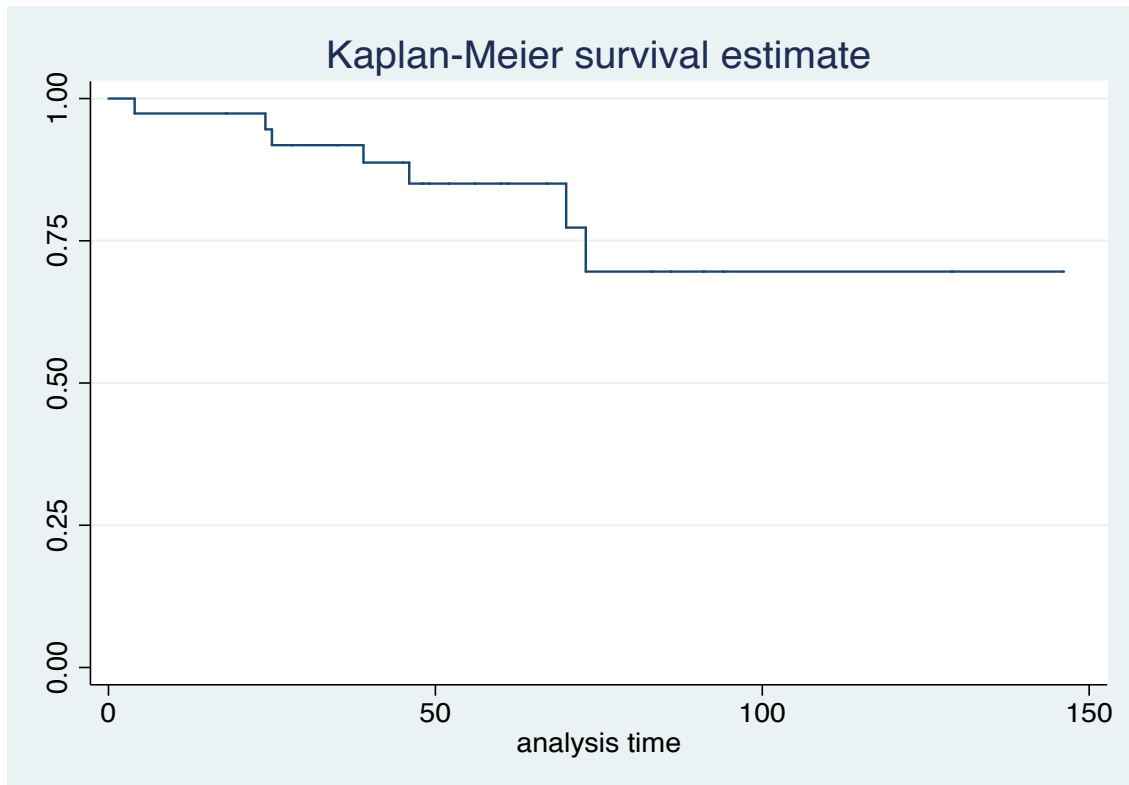


Abbildung 21. Dargestellt ist die Aufrechterhaltung des GM-negativen Status bzw. das Zeitintervall bis zum relevanten Ereignis: die erste Konversion des GM-ELISA von negativ zu positiv eines Patienten (zu erkennen an Stufe nach unten). Y- Achse: $S(t)$ Wahrscheinlichkeit testnegativ zu bleiben. X- Achse: Die Analysezeit ist dargestellt als Tage ab Krankenhauseinweisung. Jede Stufe symbolisiert einen Patienten mit Konversion zur Testpositivität.

Der Kaplan-Meier-Schätzer gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass eine Konversion von negativem zu positivem GM-ELISA (im Folgenden als ‚GM-Ereignis‘ bezeichnet) zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht eintritt. Zu Beginn der Studienphase ist das Wahrscheinlichkeit der Testnegativität bei 0,95 aufgrund nur eines Patienten mit Konversion zur Testpositivität. Das Risiko stieg mit der Studiendauer aufgrund von 7 Patienten mit positiven GM-Ergebnissen. An Tag 100 lag die Wahrscheinlichkeit für eine Testnegativität bei 0,7.

Multivarianzanalyse

| Kovarianz | chi ² (1) | P | Risiko |
|-------------------------------------|----------------------|--------|----------|
| Kortikosteroide EORTC ²⁴ | 3.89 | 0.0485 | Erhöhung |
| Andere Herpesviren | 7.40 | 0.0065 | Erhöhung |
| Caspofungin | 4.03 | 0.0447 | Erhöhung |
| CT Positivität | 4.33 | 0.0375 | Erhöhung |

Tabelle 5. GM-Ereignis Nicht-parametrische Log Rank Analyse. Abhängige Variable/Ereignis: GM Konversion von negativ zu positiv. Risikofaktoren wurden durch Ereigniszeitanalyse evaluiert. The Chi-Quadrat (1 Freiheitsgrad) ist angegeben als chi² (1). P = Wahrscheinlichkeit, dass Nullhypothese – kein Effekt- zutrifft. Risiko = Richtung des Effekts, Reduktion oder Erhöhung der Inzidenz des relevanten Ereignisses (GM Konversion von negativ zu positiv).

Die Cox-Regression wies nur für die CT-Positivität einen fast signifikanten Einfluss auf das GM- Ereignis nach. Im Log Rank-Test zeigten alle vier aufgelisteten Kovarianzen einen signifikanten Einfluss auf das GM-Ereignis. Sowohl Kortikosteroide, andere Herpesviren, Caspofungin und CT-Positivität erhöhten das Risiko für ein GM-Ereignis. Keiner der kontinuierlichen Variablen zeigte eine signifikante Rolle.

| | | |
|--------------------------|------------|----------|
| Kortikosteroide EORTC | beobachtet | erwartet |
| nein | 3 | 5.26 |
| ja | 4 | 1.74 |
| total | 7 | 7.00 |
| Andere Herpesviren | beobachtet | erwartet |
| nein | 0 | 3.59 |
| ja | 7 | 3.41 |
| total | 7 | 7.00 |
| Caspofungin | beobachtet | erwartet |

²⁴ Definition der Kortikosteroide nach den EORTC-Kriterien: 0,3mg Prednisolonäquivalent/kgKG/Tag für >21 Tage

| | | |
|----------------|------------|----------|
| nein | 3 | 5.27 |
| ja | 4 | 1.73 |
| total | 7 | 7.00 |
| CT Positivität | beobachtet | erwartet |
| nein | 3 | 4.91 |
| ja | 3 | 1.09 |
| total | 6 | 6.00 |

Tabella 6. GM-Ereignis. Evaluation der Risikofaktoren durch Ereigniszeitanalyse. Details der beobachteten und erwarteten Ereignisse.

6.2. Aspergillus PCR

Kaplan-Meier-Schätzer

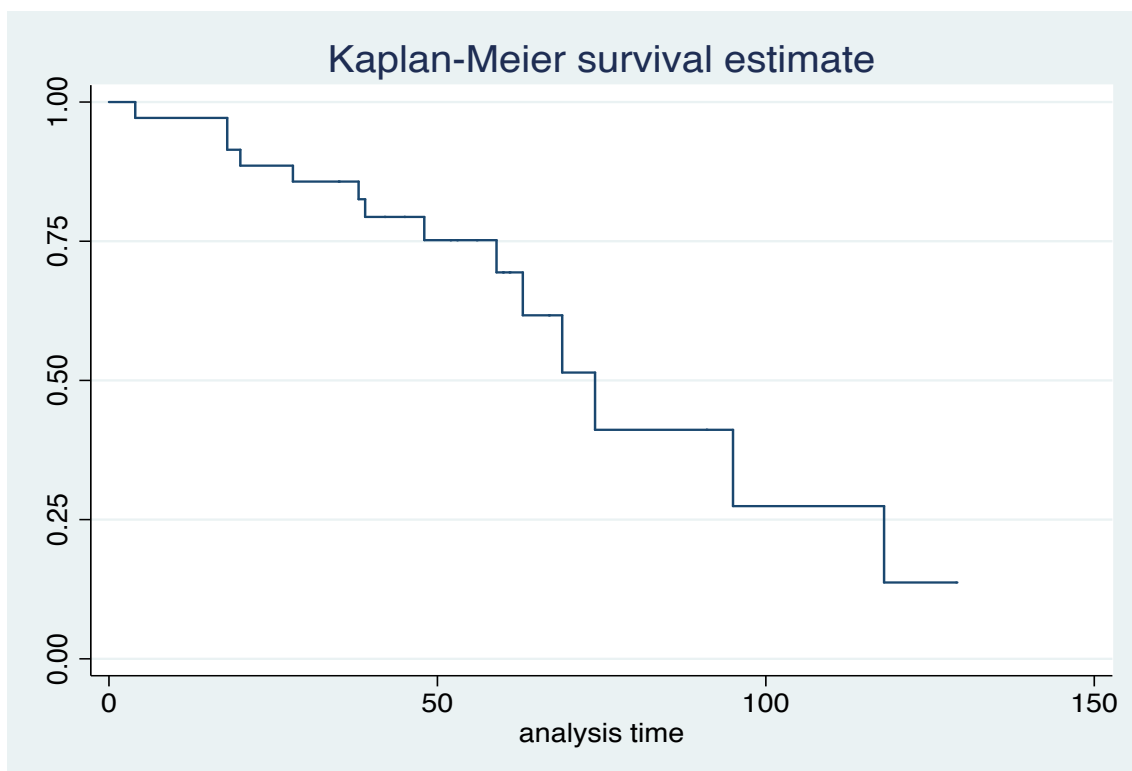


Abbildung 22. Dargestellt ist die Aufrechterhaltung des PCR-negativen Status bzw. das Zeitintervall bis zum relevanten Ereignis: die erste Konversion der Aspergillus-PCR von negativ zu positiv eines Patienten (zu erkennen an Stufe nach unten). Y-Achse: $S(t)$ Wahrscheinlichkeit testnegativ zu bleiben. X-Achse: Die Analysezeit ist dargestellt als Tage ab Krankenhauseinweisung.

Der Kaplan-Meier-Schätzer gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass eine Konversion von negativer zu positiver Aspergillus-PCR (im Folgenden als ‚PCR-Ereignis‘ bezeichnet) in einem Zeitintervall nicht eintritt. Die Kurve zeigte bereits zu Beginn einen Abfall bei der Analysezeit 0, da 4 Patienten bereits bei Aufnahme ins Krankenhaus PCR positiv waren. Die Wahrscheinlichkeit testnegativ zu bleiben, lag an diesem Punkt für die anderen Patienten bei 0,9. Von den verbliebenen 35 Patienten zeigten 14 im Verlauf ein positives PCR-Ereignis. An Tag 100 lag die Wahrscheinlichkeit der Testnegativität daher nur noch bei 0,3.

Multivarianzanalyse

| Kovarianz | Haz. Ratio | Std. Err. | z | P>z | 95% Konf. Intervall | |
|----------------|------------|-----------|-------|-------|---------------------|--------|
| Ambisome | 0.219 | 0.139 | -2.39 | 0.017 | 0.063 | 0.762 |
| CT Positivität | 3.520 | 2.320 | 1.91 | 0.056 | 0.967 | 12.810 |
| Tachykardie | 0.092 | 0.106 | -2.07 | 0.039 | 0.010 | 0.882 |

Tabelle 7. Semiparametrische Cox Regression. Abhängige Variable/Ereignis: Konversion der Aspergillus PCR von negativ zu positiv.

| | chi2(1) | P | Risiko |
|----------------|---------|--------|-----------|
| Ambisome | 6.91 | 0.0086 | Reduktion |
| CT Positivität | 4.13 | 0.042 | Erhöhung |
| Tachykardie | 6.85 | 0.0089 | Reduktion |

Tabelle 8. Non-parametrische Log Rank Analyse. Abhängige Variable/Ereignis: Konversion der Aspergillus PCR von negativ zu positiv. Risikofaktoren wurden durch Ereigniszeitanalyse evaluiert. The Chi-Quadrat (1 Freiheitsgrad) ist angegeben als chi2 (1). P = Wahrscheinlichkeit, dass Nullhypothese – kein Effekt- zutrifft. Risiko = Richtung des Effekts, Reduktion oder Erhöhung der Inzidenz des relevanten Ereignisses (Aspergillus PCR Konversion von negativ zu positiv).

Die Cox Regression zeigte einen signifikanten Einfluss der unabhängigen Variablen Ambisome (P=0,017), Tachykardie (P=0,039) auf das PCR-Ereignis (=abhängige Variable). Beide reduzierten das Risiko eines PCR-Ereignisses mit einer HR < 1.

Die CT-Positivität (P=0,056) wies den Trend eines Einfluss (Erhöhung des Risikos für ein PCR- Ereignis) auf die abhängige Variable auf.

Der Log-Rank-Test bestätigte die in der Cox-Regression gefundenen Effekte und bewies im Vergleich zur Cox-Regression eine klare Signifikanz der CT-Positivität (P= 0,042). Keiner der kontinuierlichen Variablen zeigte eine signifikante Rolle.

| CT Positivität | beobachtet | erwartet |
|----------------|------------|----------|
| nein | 8 | 10.35 |
| ja | 4 | 1.65 |
| total | 12 | 12.00 |
| Ambisome | beobachtet | erwartet |
| nein | 5 | 1.81 |
| ja | 9 | 12.19 |
| total | 14 | 14.00 |
| Tachykardie | beobachtet | erwartet |
| nein | 1 | 0.12 |
| ja | 13 | 13.88 |
| total | 14 | 14.00 |

Tabelle 9. Aspergillus-PCR-Ereignis. Evaluation der Risikofaktoren durch Ereigniszeitanalyse. Details der beobachteten und erwarteten Ereignisse.

7. Antimykotika

7.1. Detaillierte Darstellung der antimykotischen Prophylaxe bzw. empirischen Therapie

Übersicht über die Antimykotika

Alle Patienten erhielten aufgrund ihrer Klassifizierung als Hochrisikopatienten für invasive Pilzinfektionen während des gesamten Studienzeitraumes eine antimykotische Prophylaxe.

| | PROB (n=4) | POS (n=2) | UNCLASS (n=33) |
|-------------|------------|-----------|----------------|
| Itraconazol | 0 | 2 | 25 |
| Fluconazol | 2 | 2 | 25 |
| Ambisome | 3 | 2 | 26 |
| Voriconazol | 3 | 0 | 2 |
| Posaconazol | 4 | 0 | 3 |
| Caspofungin | 4 | 1 | 4 |

Tabelle 10. Übersicht über die Antimykotika und die Anzahl der Patienten, die dieses jeweilige Medikament erhalten haben. Eine Mehrfachwertung eines Patienten ist möglich.

Unsere 39 Studienpatienten erhielten Fluconazol (74%) und/oder die explizit Aspergillus-wirksamen Medikamente Itraconazol (69%), liposomales Amphotericin B = Ambisome (79%), Caspofungin (23%), Posaconazol (18%) und Voriconazol (13%) als Prophylaxe und/oder empirische Therapie. 87% der Patienten bekamen durchgängig oder zu bestimmten Zeitpunkten Aspergillus-wirksame Prophylaxe oder empirische Therapie (5 Patienten der UNCLASS-Gruppe erhielten nie Aspergillus-wirksame Medikation). 97% erhielten Ambisome, 13% Voriconazol, 13% Posaconazol und 17% Caspofungin.

In der PROB-Gruppe erhielten die Patienten im Durchschnitt 99 ± 84 Tage antifungale Prophylaxe und empirische Therapie, in der POS-Gruppe 35 ± 33 Tage und in der UNCLASS-Gruppe 27 ± 28 Tage.

Die 39 Patienten erhielten über den gesamten Behandlungszeitraum 1-5 verschiedene Antimykotika. In der PROB-Gruppe erhielten die Patienten 3-5 verschiedene antifungale Wirkstoffe und in der POS-Gruppe 3-4. In der UNCLASS-Gruppe gab es 2 Patienten mit nur einem Wirkstoff, 12 Patienten mit 2, 15 Patienten mit 3, 3 Patienten mit 4 und einen Patienten mit 5 verschiedenen antimykotischen Medikamenten im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes. In der PROB-Gruppe erhielten alle Patienten (außer zu Beginn) mindestens zwei bis maximal drei Antimykotika gleichzeitig. In der POS-Gruppe bekam ein Patient (1/2) und in der UNCLASS-Gruppe erhielten drei Patienten (3/33) maximal zwei Antimykotika parallel. Allen anderen Patienten wurde zu jedem Zeitpunkt nur ein antifungales Medikament verabreicht.

Prophylaxe

Alle Patienten (n=39) unserer Hochrisiko-Studienkohorte erhielten antimykotische Prophylaxe unabhängig von ihrer Neutrophilenzahl. In der PROB-Gruppe erfolgte bei Hochrisikokonstellation die Gabe von Aspergillus-wirksamer Medikation als Prophylaxe. In der POS- und der UNCLASS-Gruppe erhielten die meisten Patienten zur Prophylaxe Itraconazol oder Fluconazol. 4 Patienten der UNCLASS-Gruppe erhielten eine Aspergillus-wirksame Medikation als Prophylaxe.

Therapie

Die antimykotische Therapie wurde bei allen Gruppen mit Aspergillus-wirksamen Medikamenten durchgeführt. Die Umstellung von Prophylaxe auf Therapie erfolgte entweder durch eine Dosiserhöhung desselben Medikaments und/oder durch Hinzunahme eines oder Wechsel auf ein adäquates Aspergillus-wirksames Medikament. Die Gründe für die Initiierung einer empirischen Therapie bestanden in der PROB-Gruppe in dem dringenden Verdacht auf eine probable IA (Genaueres siehe C 8), in der POS-Gruppe bei Verdacht auf possible IA und in der UNCLASS-Gruppe bei Fieber in der Neutropenie, anhaltenden Fieberschüben, pulmonaler Symptomatik und/oder erhöhten Entzündungswerten ohne Infektfokus.

7.2. Falsch-positive Proben und Aspergillus-wirksame Antimykotika

| | Positiver GM-Test | Positiver PCR-Test | Duale Positivität von GM+PCR |
|---|-------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Kinder mit UNCLASS - IA unter anti- <i>Aspergillus</i> Prophylaxe oder empirischer Therapie, n = 28 | 1 / 28 (3,6%) | 3 / 28 (10,7%) | 0 / 28 (0%) |
| | 4 / 28 (14,3%) | | |
| Kinder mit UNCLASS - IA außerhalb von anti- <i>Aspergillus</i> Prophylaxe oder empirischer Therapie, n = 28 | 3 / 28 (10,7%) | 8 / 28 (28,6%) | 0 / 28 (0%) |
| | 11 / 28 (39,3%) | | |
| Kinder mit UNCLASS - IA ohne anti- <i>Aspergillus</i> Prophylaxe empirische Therapie, n = 5 | 0 / 5 (0%) | 3 / 5 (60%) | 0 / 5 (0%) |

Tabelle 11. Darstellung der Patienten mit falsch-positiven GM- und PCR Proben der UNCLASS-Gruppe in zeitlichem Zusammenhang zur Aspergillus-wirksamen Prophylaxe oder Therapie.

In dieser Auswertung werden nur die 33 UNCLASS-Patienten (Kontrollgruppe) betrachtet, um zu evaluieren, ob der Gebrauch von Aspergillus-wirksamer Prophylaxe bzw. empirischer Therapie einen Einfluss auf die Falsch-Positivität der beiden Biomarker-Analysen hat. 28/33 erhielten zu einem Zeitpunkt ihres Krankenhausaufenthaltes eine Aspergillus-wirksame Prophylaxe oder empirische Therapie. 5/33 bekamen zu keiner Zeit anti-Aspergillus wirksame Medikamente. So entstanden drei Beobachtungsgruppen: (1) Patienten unter Aspergillus-wirksamer Medikation, (2) Patienten nach der Einnahme Aspergillus-wirksamer Antimykotika und (3) unbehandelte Patienten.

Im direkten Vergleich zwischen Gruppe (1) und (3) zeigte sich in Gruppe (1) während der Einnahme von Aspergillus-wirksamer Medikation eine deutlich geringere Rate von Patienten mit falsch-positiven Testergebnissen (14% [95% KI, 6 bis 32%]) als in Gruppe (3), der unbehandelten Population (60% [95% KI, 23 bis 88%]). Dieser Trend war

signifikant mit $p = 0,0519$. In Gruppe (2) wiesen 39% [95% KI, 15 bis 41%]) der Patienten einen falsch-positiven Test nach ihrer Prophylaxe-/Behandlungsperiode auf und damit fast dreimal so viele (39% vs. 14%) wie in Gruppe (1) während der Einnahme von Aspergillus-wirksamer Prophylaxe/Therapie.

7.3. Durchbruchinfektion unter antimykotischer Prophylaxe

Alle PROB-Patienten entwickelten ihre IA unter Aspergillus-wirksamer Prophylaxe. Patient 1 unter Caspofungin, Patient 2 und Patient 3 unter liposomalem Amphotericin B und Patient 4 unter Caspofungin und Posaconazol.

8. Longitudinale Analyse der vier PROB- Patienten

8.1. Patient 1

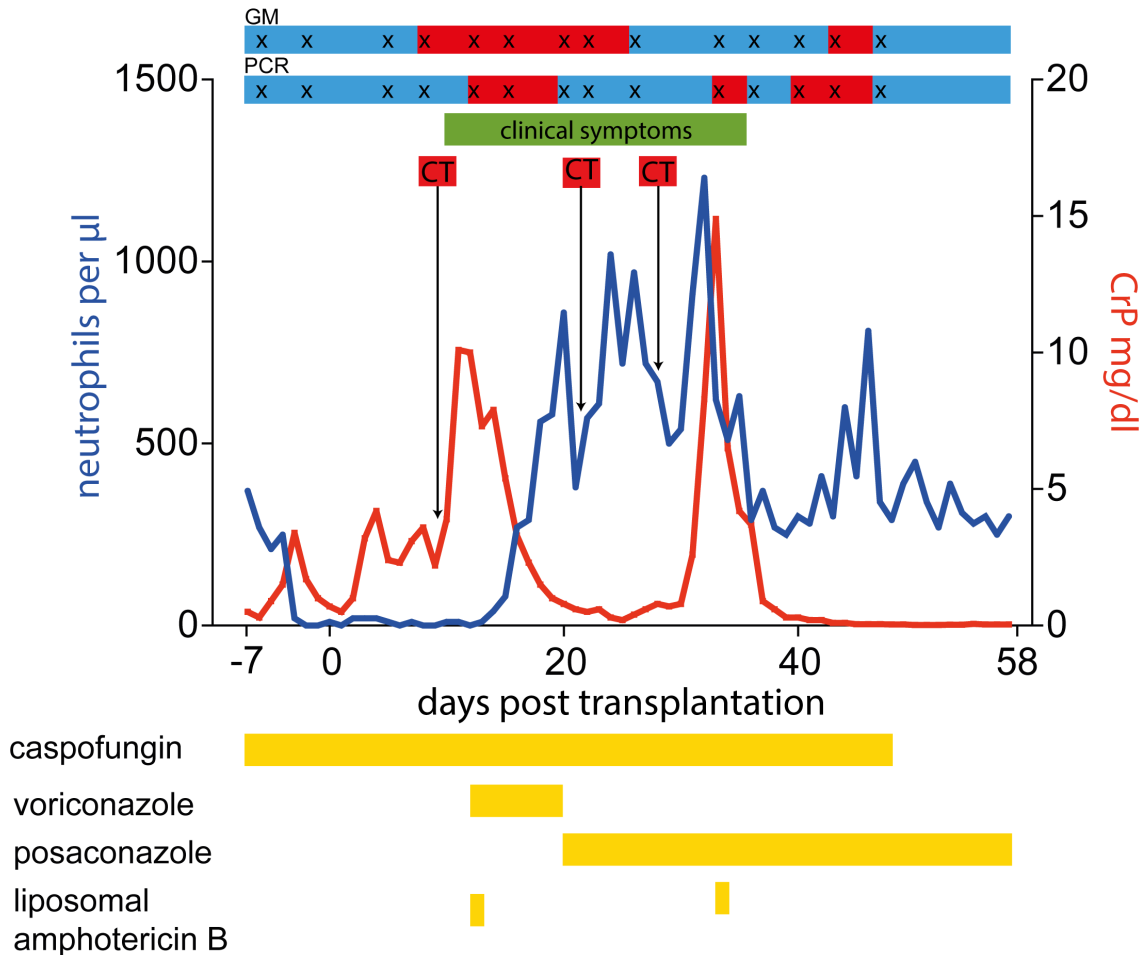


Abbildung 23. Repräsentativer Krankheitsverlauf des Patienten 1 mit Invasiver Aspergillose bei AML. Der rote Graph zeigt den Verlauf des C-reaktiven Proteins (CRP) und der blaue den Neutrophilenverlauf über die Zeit. Ebenfalls abgebildet sind die Ergebnisse der beiden Indextests und der CTs (blau= negativ, rot=positiv), das Vorhandensein klinischer Symptome (Leisten über den Graphen) wie auch die antifungale Medikation (Leisten unter den Graphen).

Der 12-jährige Patient 1 litt unter einem therapierefraktären AML-Rezidiv und wurde aus diesem Grunde einer allogenen Stammzelltransplantation (an Tag 98) von einem 9/10 passenden Fremdspender mit Klasse II Mismatch behandelt. Der Patient wies mit prolongierter Neutropenie, SZT, T-Zell-Immunsuppressiva >90 Tage und Kortikosteroide >21 Tage (>0,3mg P.Ä./kgKG) vier entscheidende Risikofaktoren (EORTC- Wirtsfaktoren) für eine IA vor.

Bei Aufnahme in die Klinik zeigte der Patient keine klinischen Auffälligkeiten, auch das CT war blande. Der Patient erhielt zu Beginn seines Krankenhausaufenthaltes Ambisome

als antimykotische Prophylaxe (40mg). Ab 43 Tage vor SZT zeigte der Patient bei prolongierter Neutropenie intermittierende Fieberschübe mit trockenem Husten. Aus diesem Grunde wurde ihm zusätzlich zu den Ambisomen (110mg) Voriconazol (400 mg) verabreicht. Danach erhielt er nur noch Posaconazol und ab vier Wochen vor der Transplantation durchgehend Caspofungin (50mg). Zwei durchgeführte CTs in dieser Zeit waren negativ. In der Aplasie, ungefähr an Tag + 9 nach erfolgter Transplantation entwickelte er hohes Fieber, Tachypnoe, Husten, Sättigungsabfälle, Sauerstoffbedarf und zeigte in der Auskultation deutliche Zeichen eines pulmonalen Geschehens. Das CrP stieg rapide an. Im durchgeführten CT an Tag +10 war sodann ein neu aufgetretener, solitärer Rundherd im linken Unterlappen zu sehen, der mit einem Pilzinfiltrat vereinbar war. Das Pilzinfiltrat war damit unter Aspergillus-wirksamer Medikation entstanden. Ziemlich genau mit Beginn der Symptome wurde an Tag +8 zuerst das GM positiv und dann an Tag +11 auch die PCR. Der Index des GM nahm weiter zu und erreichte mit einem Wert von 2,46 am Tag + 14 sein Maximum. Die intensivierte antimykotische Therapie mit Caspofungin wurde an Tag +11 um Voriconazol und an Tag +17 um Posaconazol (800mg, 1200 mg, 1400mg) ergänzt. Weitere CTs an Tag + 21 und + 27 bestätigten den leicht größenprogreredienten, bekannten Rundherd, jedoch ohne Hinweise auf neue Herde. Die PCR wurde bereits an Tag + 19 negativ, der ELISA an Tag + 21. Auch die klinischen Symptome bildeten sich langsam zurück, persistierten mit Fieber und Husten aber noch bis zum Tag + 29. Es ist daher davon auszugehen, dass die IA des Patienten nach circa 20 Tagen und mit neutrophiler Regeneration ausgestanden war. Interessant ist, dass der Patient später in der Rekonvaleszenz Phase abermals positive GM- und PCR-Proben hatte, jedoch ohne klinische Symptome, aber in Zusammenhang mit neu aufgetretener Neutropenie. Am Ende verstarb der Patient aufgrund einer Progression seiner Grunderkrankung ohne klinische Zeichen einer IA.

8.2. Patient 2

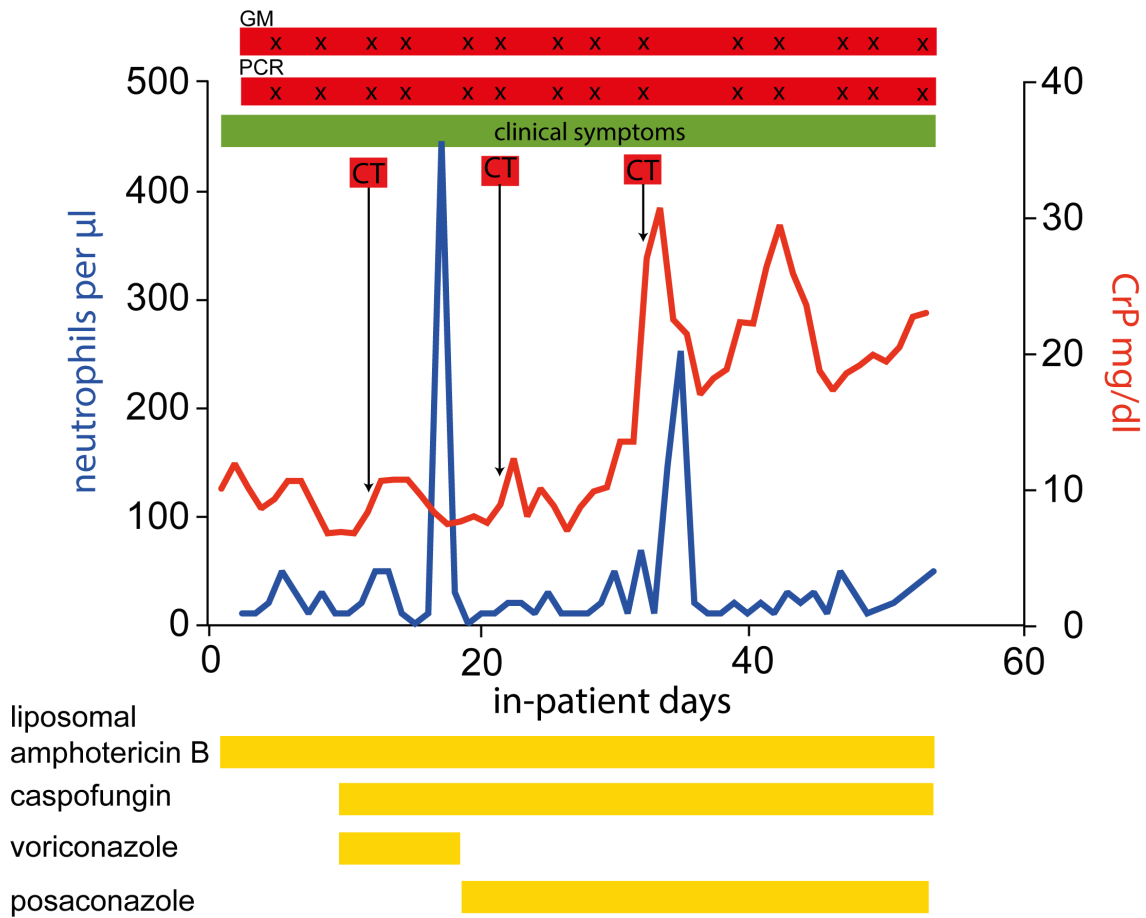


Abbildung 24. Krankheitsverlauf von Patient 2 mit Invasiver Aspergillose bei AL.

Patient 2 ist ein 15-jähriger Junge mit einem therapierefraktären c-ALL-Rezidiv, der in unser Zentrum zur Blinatumomab²⁵ Gabe als Vorbereitung auf eine nachfolgende alloSZT überwiesen wurde. Bei Aufnahme wies der Patient bei prolongierter Neutropenie einen entscheidenden Wirtsfaktor (s. A 1.4) auf. Die überweisende Klinik hatte bereits die Verdachtsdiagnose IA gestellt, daher bekam der Patient seit dem ersten Tag Ambisome (60mg) als Prophylaxe. Der Patient zeigte bei Aufnahme jedoch keine pulmonale Symptomatik oder Fieber. Die CrP-Erhöhung mit Fieber an Tag 5 ließ sich durch eine Staphylokokken-Sepsis erklären.

An Tag 5 und 8 waren im ersten Aspergillus-Screening bereits PCR und GM positiv (1,06 bzw. 1,53).

An Tag 12 kam es zu einer klinischen Verschlechterung des Patienten mit Husten,

²⁵ Bispezifischer Antikörper

Thoraxschmerzen und Fieber bei ansteigendem CRP. Daraufhin wurde das erste CT durchgeführt, welches multiple pilztypische Rundherde (Knötchen mit 2,3cm Durchmesser) in beiden Lungenlappen zeigte. Die Dosis der Ambisome wurde daraufhin auf die therapeutische Dosis von 170mg hochgesetzt. Im induzierten Sputum zeigte sich an demselben Tag die PCR positiv, ebenso war auch Mucorales-DNA nachweisbar. PCR und GM (Serumprobe) waren an diesem Tag ebenfalls weiterhin beide positiv mit steigenden GM-Werten (2,68). Im Verlauf verschlechterte sich der Zustand des Patienten weiter bei Tachydyspnoe, Tachykardie und auskultatorischen Rasselgeräuschen und abgeschwächtem Atemgeräusch. Die antimykotische Therapie wurde daher um Caspofungin (50mg) und kurzzeitig Voriconazol (400mg) erweitert. An Tag 19 zeigte sich ein steigender GMI von 5,89, woraufhin Voriconazol durch Posaconazol (800mg) ersetzt wurde. An Tag 22 stieg der GMI weiter auf 5,96 und bei zunehmendem Husten mit Blutbeimengung und abgeschwächtem AG wurde ein erneutes CT durchgeführt, welches eine deutliche Größenprogredienz der Läsionen zeigte. Im weiteren Verlauf verschlechterte sich der Zustand des Patienten weiter bei progredienter pulmonaler Symptomatik. Die antimykotische Therapie wurde daraufhin durch eine Dosiserhöhung eskaliert - Ambisome (300mg), Caspofungin (70mg) und Posaconazol (900mg). Zwischen Tag 22 und Tag 30 sank der GMI zwischenzeitlich auf 4,78, stieg jedoch mit dem CrP- Spiegel an Tag 33 rapide an von 6,65 (Tag 33) auf maximal 9,75 an Tag 40. Ein erneutes CT an Tag 33 zeigte eine weitere leichtgradige Progredienz der pilztypischen Läsionen. Im weiteren Verlauf blieb der GMI stets >8 bei steigender DNA-Last in der real-time PCR. Im weiteren Verlauf verschlechterte sich die pulmonale Situation bis zur zunehmenden respiratorischen Insuffizienz und ansteigendem Sauerstoffbedarf. Unter supportiver Therapie verstarb der Patient an Tag 54 an der IA vor einer alloSZT.

8.3. Patient 3

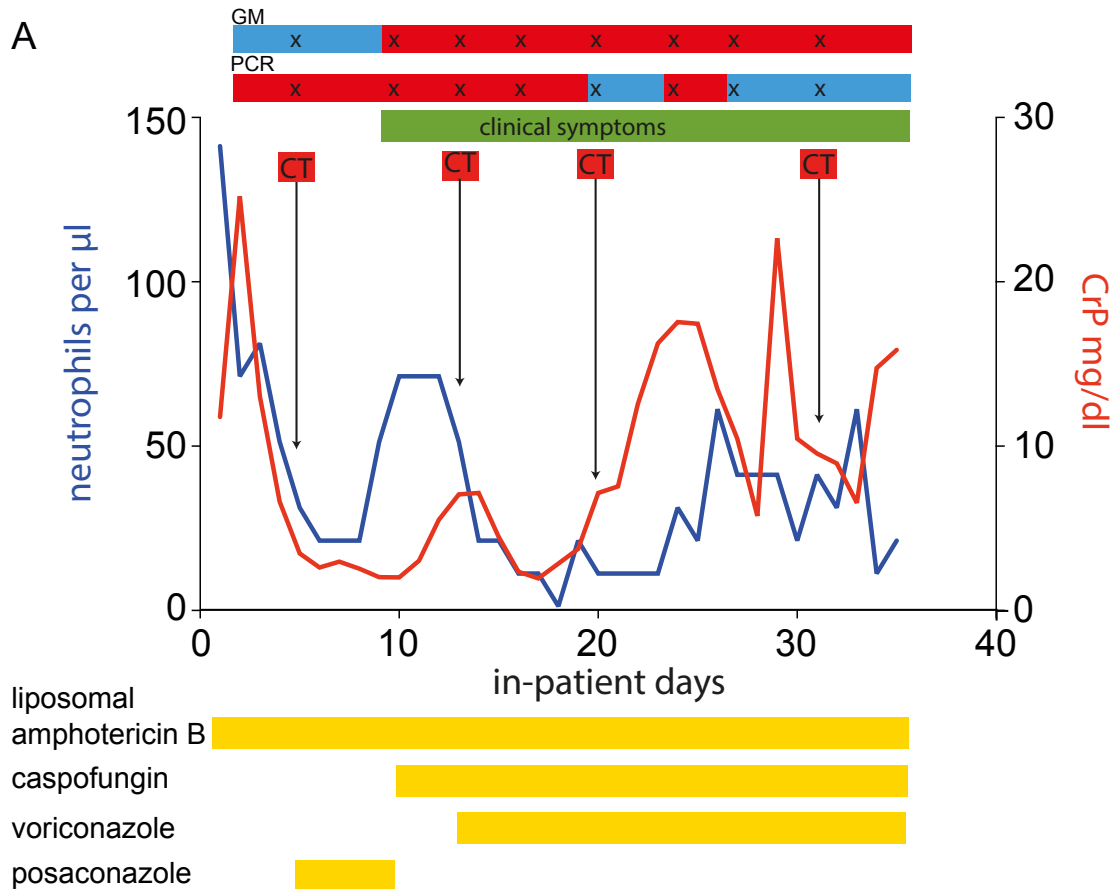


Abbildung 25. Krankheitsverlauf von Patient 3 mit Invasiver Aspergillose bei AL.

Patient 3 ist ein 8-jähriger Junge mit einem therapierefraktären c-ALL-Rezidiv, der in unser Zentrum zur Remissionsinduktion mittels Blinatumomab-Behandlung überwiesen wurde mit dem Ziel eine sich anschließende allogene Stammzelltransplantation zu ermöglichen. Bei Aufnahme in unsere Klinik zeigte sich der Patient bei prolongierter Neutropenie und Kortikosteroideinnahme über 21 Tage bereits positiv für zwei Wirtsfaktoren nach den EORTC/MSG-Kriterien (s. B2.2). Der Patient zeigte bei Aufnahme keine pulmonalen Symptome.

Die hohen CrP-Werte bei Aufnahme wurden durch eine E. Coli-Sepsis hervorgerufen, die unter erweiterter antibiotischer Therapie abklang.

Trotz bereits bei stationärer Aufnahme eingeleiteter antifungaler Prophylaxe mit liposomalem Amphotericin B (50mg), zeigte das erste CT an Tag 3 pilztypische Lungeninfiltrate im rechten Unterlappen. An Tag 5 konnte in der durchgeführten

bronchoalveolären Lavage (BAL) Aspergillus-Antigen nachgewiesen werden (GM >5,5, PCR positiv) bei jedoch fehlendem Pilzwachstum in der Kultur. Daraufhin wurde der Patient mit Ambisome (105mg) und Posaconazol (400mg) bzw. Caspofungin (55mg) in therapeutischer Dosierung behandelt. Klinisch hatte der Patient keine pulmonale Symptomatik oder Fieber. An Tag 6 zeigte sich in der ersten Durchführung beider Index-Tests nur eine positive PCR bei negativem GM.

An Tag 8 und 9 litt der Patient unter Fieber und Tachykardie. Am Folgetag zeigten sich erstmalig beide Tests positiv (GM 0,67). Bei erneutem Fieberanstieg, Tachykardie und steigendem CRP sowie reduziertem Allgemeinzustand wurde an Tag 12 ein erneutes CT angefertigt, aufgrunddessen eine Größenprogredienz der pilztypischen Infiltrate festgestellt wurde. Am selben Tag zeigte sich auch ein steigender GMI (1,07) bei positiver PCR. Die antifungale Therapie mit Ambisomen (140mg) und Caspofungin (50mg) wurde mit Voriconazol (400mg) ergänzt, woraufhin der Patient entfieberte. An Tag 17 war erneut ein steigender GMI (3,33) bei weiterhin positiver PCR zu verzeichnen, jedoch bei fallenden Entzündungswerten.

Um den Tag 20 verschlechterte sich der Zustand des Patienten bei erneutem Fieberanstieg auf 39,5°C, Sauerstoffbedarf von 2-3l während des Tages, Tachysypnoe (bis maximal 35/min), rechtsseitigen thorakalen Schmerzen, Tachykardie und steigenden Entzündungsparametern sowie Auffälligkeiten in der pulmonalen Auskultation (Rasselgeräuschen, abgeschwächtem Atemgeräusch, Pleurareiben). Das daraufhin durchgeführte CT zeigte eine leichtgradige Progression der vorbekannten Läsionen. Die Dosierung der Ambisome wurde von 140mg auf 175mg eskaliert. Der GM- Index sank am selben Tag auf 2,52 bei erstmals negativer PCR. An Tag 25 zeigte sich bei bestehender klinischer Symptomatik eine erneute duale Positivität der Index-Tests (GM 1,95). Im weiteren Verlauf verbesserte sich die pulmonale Symptomatik leicht bei fluktuierenden Entzündungswerten und weiterhin positivem GM (Tag 28: 1,91; Tag 32: 1,28) bei fortwährend negativer PCR. Das Fieber blieb konstant bestehen. An Tag 32 hatte der Patient erneut einen erhöhten Sauerstoffbedarf und ein abgeschwächtes Atemgeräusch links. Das daraufhin durchgeführte CT zeigte neue Dystelektasen links bei Größenprogredienz der pilztypischen Infiltrate trotz antimykotischer Dreifachtherapie.

Bei Blastenschub unter der Blinatumomab-Therapie befand sich der Patient in einer rein palliativen Situation und wurde an Tag 35 in die Heimatklinik zurückverlegt, wo er an seiner Grunderkrankung verstarb.

8.4. Patient 4

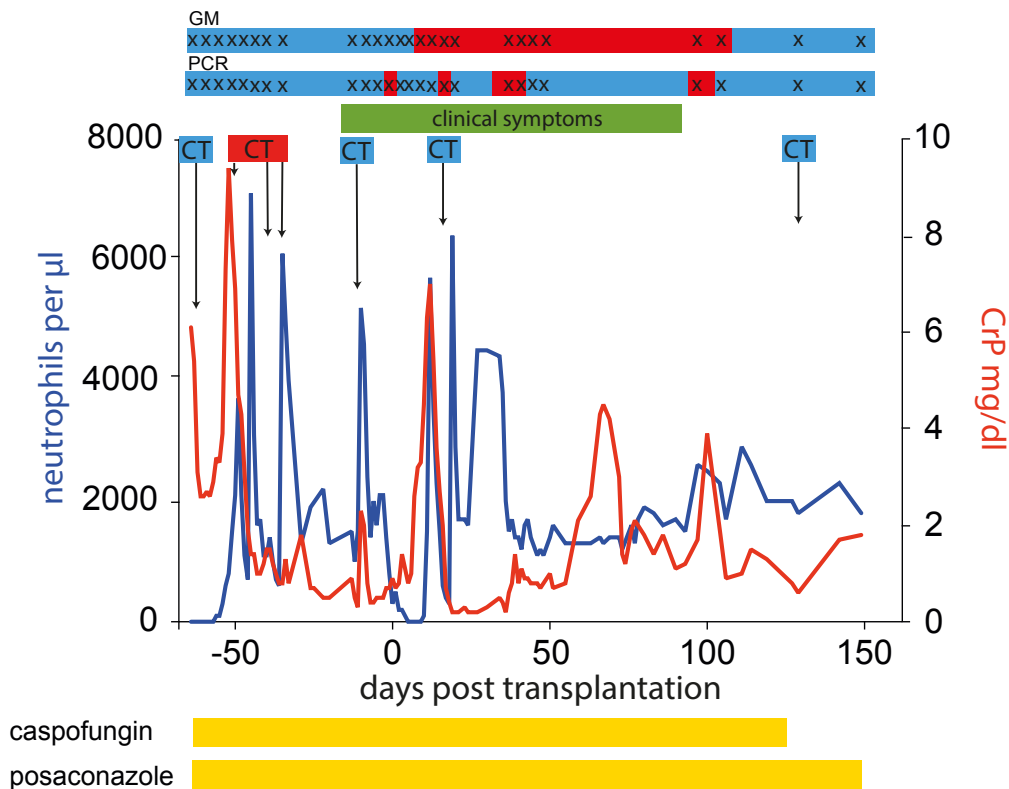


Abbildung 26. Krankheitsverlauf von Patient 4 mit Invasiver Aspergillose bei ALL.

Patient 4 ist ein 22-jähriger Junge mit Erstdiagnose einer BCR-ABL positiver ALL vor 6 Jahren. Während der ersten antileukämischen Therapie entwickelte der Patient eine schwere Mucorpnemonie, welche eine prolongierte antifungale Therapie und schlussendlich eine Lobektomie des rechten Lungenunterlappens nötig machte. Danach erfolgte die erste alloSZT. Nach fünf Jahren zeigte der Patient ein Knochenmarksrezidiv. Während der Induktionstherapie zeigte der Patient unter prolongierter Hochdosiscorticoidtherapie in der Aplasie antibiotikaresistentes Fieber mit steigenden Infektparametern. Bei schlechtem Ansprechen auf eine breite intravenöse antibiotische Therapie wurde ein CT Thorax durchgeführt, welches neue pilzsuspekte Verschattungen zeigte. Die bis zu diesem Zeitpunkt dauerhaft durchgeführte antimykotische Therapie mit

Posaconazol wurde daraufhin um Caspofungin erweitert. Die zur Erregerdiagnostik durchgeführte BAL gelang kein Erregernachweis. Bei weiter steigenden Entzündungswerten zeigte ein erneutes CT Thorax den Progress der vermuteten Pilzpneumonie, woraufhin die antimykotische Therapie um Flucytosin ergänzt wurde. Darunter war bildgebend und laborchemisch ein deutliches Ansprechen zu verzeichnen. Der Patient erhielt eine zweite T-Zell-depletierte PBSC Transplantation eines 9/10 nicht-verwandten Spenders. Nach der alloSZT zeigten sich intermittierend positive PCR-Ergebnisse und/oder positive GM-Resultate. In zeitlichem Zusammenhang entwickelte der Patient Fieber und erhöhte Entzündungswerte, die sich unter breiter antibiotischer Therapie rückläufig zeigten. Im CT Thorax waren keine Infiltrate mehr nachweisbar. Abgesehen von der fungalen Infektion gestaltete sich die zweite alloSZT komplikationslos und der Patient ist krankheitsfrei seit mehr als vier Jahren.

8.5. Kombiniertes Biomarkerscreening zur Früherkennung der IA?

Die Zeit von Beginn des Screenings bis zur Positivität der Biomarker zeigte sich vergleichbar zwischen GM und PCR mit 49 ± 39 Tagen bzw. 46 ± 40 Tagen.

Zeit zwischen kombinierter Positivität der Indextests und Diagnose nach der Referenzmethode

Patient 1: Positivität des GM 2 Tage vor Klassifikation als probable. Positivität von GM+PCR 2 Tage nach Klassifikation als probable durch positives CT.

Patient 2: Kombinierte Positivität 7 Tage vor Klassifikation als probable durch positives CT.

Patient 3: Kombinierte Positivität in der BAL 1 Tag nach Klassifikation als probable durch positives CT. Positivität der PCR 2 Tage nach positivem CT. Kombinierte Serumpositivität 5 Tage nach Diagnosestellung durch die Referenzmethode.

Patient 4: Nicht festzulegen, s. Methodendiskussion.

Zeit zwischen PCR/GM-Positivität und Auftreten von klinischen Symptomen

Patient 1: Positivität des GM 1 Tag vor Beginn der klinischen Symptomatik. Kombinierte Positivität 2 Tage nach pilztypischen Symptomen.

Patient 2: Kombinierte Positivität 7 Tage vor Beginn der klinischen Symptomatik.

Patient 3: Kombinierte Positivität 10 Tage vor Beginn der pilztypischen Symptomatik.

Patient 4: Nicht festzulegen, s. Methodendiskussion.

9. Vergleich von erwachsenen und pädiatrischen Daten

Die Daten einer Erwachsenenstudie unserer Arbeitsgruppe (Springer et al., 2016) wurden retrospektiv mit den pädiatrischen Daten (Daten zum Vergleich in nachfolgender Klammer angegeben) unserer Studie verglichen.

9.1. GM-ELISA

Die Erwachsenenkohorte kam auf insgesamt 30 (47) positive GM-Proben, wobei 19 (38) positive Proben auf die PROB-Gruppe und 11 (9) auf die UNCLASS-Gruppe entfielen.

Jeder erwachsene Patient der PROB-Gruppe hatte im Mittelwert 2,11 (9,5) positive Proben mit einem Minimum von 1 (6) und Maximum von 4 (14). Bei den Patienten der UNCLASS-Gruppe kam jeder Patient auf eine positive Probenanzahl im Mittelwert von 0,6 (0,3) mit einem Minimum von 0 (0) und einem Maximum von 3 (4).

In der erwachsenen PROB-Gruppe zeigte sich ein GMI-Mittelwert von $1,5 \pm 1,5$ ($3,1 \pm 2,7$) und in der UNCLASS-Gruppe von $1,3 \pm 1,1$ ($1,5 \pm 1,0$). Die Differenz zwischen der PROB- und UNCLASS- Gruppe betrug 1,2.

9.2. Aspergillus-PCR

Insgesamt gab es bei den Erwachsenen 48 (53) positive PCR-Proben. Die PROB-Gruppe kam dabei auf 17 (29), die POS-Gruppe auf 4 (2) und die UNCLASS-Gruppe auf 27 (22) positive Proben.

Jeder erwachsene Patient der PROB-Gruppe hatte im Mittelwert 1,9 (7,3) positive Proben mit einem Minimum von 0 (5) und Maximum von 3 (14). In der erwachsenen POS-Gruppe kam jeder Patient auf 0,7 (1) und in der UNCLASS-Gruppe auf 1,5 (0,7) positive Proben im Mittelwert mit einem Minimum von 0 (0) und einem Maximum von 4 (4).

Die POS-Gruppe zeigte einen PCR-Cq-Wert im Mittelwert von $42,9 \pm 6,3$ ($41,9 \pm 4,4$), die POS-Gruppe von $40,6 \pm 1,8$ ($47,1 \pm 2,9$) und die UNCLASS-Gruppe von $44,0 \pm 5,1$ ($44,6 \pm 6,1$). Die Differenz zwischen der PROB- und UNCLASS- Gruppe betrug 1,2.

| Biomarker | EORTC/MSG Klassifikation | |
|------------------|--|--|
| | % der Patienten mit probable IA <i>n</i> = 14 (4) | % der Patienten mit possible IA <i>n</i> = 36 (2) |
| ≥1 positiver GM | 100,0 (100) | 0,0 (0) |
| ≥1 positive PCR | 92,9 (100) | 41,7 (100) |
| ≥2 positive PCRs | 71,4 (100) | 5,6 (0) |

Tabelle 12. Daten einer Erwachsenenstudie (Springer et al., 2016), die durch die Ergebnisse unserer pädiatrischen Studie (in Klammern) ergänzt wurden.

D Diskussion

1. Methodendiskussion

1.1. Stichprobengröße und Power

Die Prävalenz der Invasiven Aspergillose (IA) ist allgemein sehr niedrig (s. A 1.2.), jedoch bei pädiatrischen Patienten nochmals deutlich geringer als bei vergleichbaren Erwachsenenkohorten. Diese geringen Fallzahlen bargen eine gewisse Problematik für das Studiendesign, da die Inzidenz in einem Studienzeitraum schwer zu kalkulieren ist. Aus diesem Grunde berechneten wir bei der Studienplanung keine Stichprobengrößen zum Erreichen einer bestimmten statistischen Power, sondern wählten einen realitätsbasierten Ansatz. Vor diesem Hintergrund beendeten wir die Datenerhebung nach drei Jahren nicht nach einem statistischen Cut-Off-Wert, sondern nach dem Erreichen einer aussagekräftigen Inzidenz von fast 10% (4/39). In jedem Falle stellt die geringe statistische Power eine bedeutende Limitation unserer Studie dar und minimiert die statistische Aussagekraft unserer Ergebnisse. Bei jedoch sehr spärlicher Datenlage, besonders in pädiatrischen Kohorten, sind wir dennoch überzeugt, dass die Ergebnisse dieser Arbeit entscheidende Tendenzen aufgezeigt haben, auf denen in Folgestudien aufgebaut werden kann.

1.2. Referenzmethode

Die Referenzmethode zur Beurteilung der Güte von diagnostischen Verfahren ist normalerweise der geltende Goldstandard zur Detektion einer bestimmten Erkrankung. Eine methodologische Limitation in allen Biomarkerstudien ist das Fehlen eben dieses wahren Goldstandards zur definitiven Diagnose der IA (Huppler et al., 2017). Als Surrogat-Goldstandard gelten die EORTC/MSG-Diagnosekriterien (De Pauw et al., 2008), die auch in unserer Studie als Referenzmethode verwendet wurden. Dies kann zur Verzerrung (Über- oder Unterschätzung) bei der Beurteilung neuer diagnostischer Verfahren führen, da es keine akkurate Klassifikation in IA/keine IA ermöglicht. Eine bedeutende Schwäche stellt die Tatsache dar, dass der hier evaluierte Indextest GM-ELISA (GM) Teil der mykologischen Kriterien der Referenzmethode ist und eine probable IA definiert. Dieser Inkorporationsbias (Missklassifikationsbias) wird daher zu einer Überschätzung der Performanceleistung des GM führen (Reid et al., 1995). Dies ist

insbesondere relevant für unsere Studie, die nur probable IA und keine proven IA-Fälle, welche GM-unabhängig definiert werden, aufweisen kann. Die Aspergillus-PCR (PCR) wurde aufgrund fehlender Validierung und Standardisierung nicht in die mykologischen Kriterien inkludiert, was zu einer erniedrigten Sensitivität der Referenzmethode und Unterschätzung der Leistungseigenschaft führen kann. Die Inklusion wird aufgrund aktueller Empfehlungen der EAPCRI²⁶ zurzeit reevaluiert (White et al., 2015). Die EORTC-MSG-Kriterien, insbesondere die klinischen Kriterien, unterliegen in Teilen einer subjektiven Interpretation und wurden in unserer Studie insbesondere aufgrund der strengen Indikationsstellung für ein CT bei Kindern nicht für alle Studienpatienten erhoben, was in einem Verifikationsbias und damit einhergehend in einer Überschätzung der Sensitivität resultieren kann. In Ermangelung eines standardisierten Vorgehens bei der CT-Befundung lässt sich trotz verblindeter Beurteilung durch mehrere Gutachter ein Missklassifikationsbias nicht sicher ausschließen. Eine weitere Limitation unserer Studie hinsichtlich der Referenzmethode ist, dass die EORTC/MSG-Kriterien prinzipiell für Erwachsene und nicht für Kinder konzipiert wurden. (Anantasit et al., 2018) konnten in einer Studie zeigen, dass die EORTC/MSG-Kriterien bei Kindern eine hohe Sensitivität (100%) bei jedoch niedriger Spezifität (33%) aufweisen. Insbesondere aufgrund der spärlichen pädiatrischen Daten zur computertomographischen Darstellung der IA (Buchheidt et al., 2016) mangelt es an spezifischen radiologischen Definitionen einer IA für Kinder. In den meisten vergleichbaren pädiatrischen Studien (Lehrnbecher et al., 2016) wurde diese Methode jedoch ebenfalls zur Diagnosestellung verwendet, was wiederum die Vergleichbarkeit erhöht. Zum jetzigen Zeitpunkt arbeitet die Arbeitsgruppe an einer überarbeiteten Version, bei der ebenfalls Pädiatrie-spezifische Diagnostiküberlegungen beachtet werden sollen. Wie von Subirà et al., 2003 beschrieben war die eigentliche Intention hinter den Wahrscheinlichkeitskategorien der EORTC/MSG-Kriterien der Einsatz in einem Forschungs-, aber nicht in einem Kliniksetting. Die Klassifikation „possible“ wird in einem klinischen Setting häufig erreicht und kann zu einer Überexposition von antifungaler Therapie führen.

²⁶ Europäische Aspergillus PCR Initiative

1.3. Aspergillus-PCR

Die Ursache der fehlenden Inkorporation in die EORTC/MSG-Kriterien war ursprünglich das Fehlen eines methodologischen Standards, welcher aber mittlerweile durch die Aspergillus-PCR-Initiative (EAPCRI) entwickelt wurde (White et al., 2011). Jedoch gibt es weiterhin keinen vergleichbaren methodologischen Standard für pädiatrische Kohorten, was die Vergleichbarkeit der spärlichen pädiatrischen Daten weiter einschränkt.

1.4. Patientenklassifikation

Die QUADAS-Kriterien zur korrekten Darstellung diagnostischer Studienergebnisse (Whiting et al., 2011) weisen auf eine Unsauberkeit unserer Studie hin. Basierend auf den vorgegebenen Richtlinien wurde bei Patient 4 das Zeitintervall von maximal 15 Tagen zwischen Indextest und Diagnose laut der Referenzmethode nicht eingehalten. Der Patient wurde als probable klassifiziert, obwohl zwischen positivem CT (Tag x) und positivem GM (Tag y) 45 Tage lagen. Unklar ist daher, ob die GM-Negativität an Tag x und die CT-Negativität an Tag y eine Falsch-Negativität darstellen oder ob die kombinierte Biomarkerpositivität an Tag z eine Falsch-Positivität signalisiert.

1.5. Probenmaterial

Im Studiendesign war die Verwendung von Serumproben zur Durchführung der Indextests vorgesehen. White et al., 2015 konnten jedoch zeigen, dass bei Verwendung von Plasma statt Serum die Sensitivität der PCR höher ist, genauer gesagt 94,7% (Plasma) zu 68,4% (Serum). Zudem konnte im Plasma eine frühere Positivität der PCR festgestellt werden als im Serum (16,8 Tage zu 10,8 Tage). Bezogen auf die Spezifität ergaben sich nur geringfügige Unterschiede. Eine weitere Studie (Springer et al., 2013) konnte für die PCR jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der Richtig-Positiv-Rate und der Sensitivität von Serum- und Plasmaproben nachweisen ($p=0,6242$). Beide Studien beziehen sich jedoch auf Probenmaterial erwachsener Patienten. In unserer Studie wurden EDTA-Plasma-Proben nur als Ersatz zur Testung genutzt, wenn keine Serumprobe zur Verfügung stand. Für eine weiterführende Studie wäre eine Testung beider Probenmaterialien hinsichtlich oben genannter Qualitätsmerkmale in einer pädiatrischen Kohorte zu überlegen. In unserer Studie zeigte sich bei einem Patienten ein positives Galactomannan- und PCR-Ergebnis in einer BAL vor einer Serumpositivität.

Steinbach et al., 2012 wiesen in einer großen Studie ebenfalls auf den höheren Wert der BAL im Vergleich zu Blutproben aufgrund der anatomischen Nähe zur Lunge, der häufigsten Manifestation der IA, hin.

Eine höhere Sensitivität der BAL wurde auch bei pädiatrischen Patienten für die PCR (Hummel et al., 2009) wie auch den GM (Guo et al., 2010) beschrieben. Eine Erwachsenenstudie aus unserer Arbeitsgruppe (Springer et al., 2020) zeigt ebenfalls eine höhere Sensitivität der BAL im Vergleich zu Serumproben bei jedoch frühzeitigerer Detektion einer IA im Serum als in der BAL. Der oben dargelegte Fall unseres einzigen Patienten mit parallelen Testungen von PCR und GM in BAL und Serumproben lässt sich durch Ergebnisse von Hummel et al., 2010 und Lass-Flörl et al., 2004 weiter hinterfragen, die eine niedrigere Sensitivität von blut-basierten Diagnostikassays im Vergleich zu BAL bei Patienten unter antifungaler Medikation beschreiben. In unserer Studie wurde die BAL nur bei einem Patienten durchgeführt, sodass hier lediglich eine Beobachtung ohne klare Schlussfolgerung für die Klinik dargelegt werden kann. Vor diesem Hintergrund sind weiterführende pädiatrischen Studien essentiell um den Einsatz der BAL insbesondere in einem Setting wie unserem, mit hohem Anteil an Patienten mit antifungaler Medikation, weiter zu untersuchen.

1.6. Screening

In unserer Auswertung wurde das Screening zweimal wöchentlich durchgeführt, was sich mit den Intervallen anderer Studien deckt. Der gewählte Screeningabstand beruht auf biologischer Plausibilität, da sich der Antigenanteil im Serum bei einer IA normalerweise alle 2-3 Tage um 0,5-1 erhöht (Mennink-Kersten et al., 2004). Aus diesem Grunde scheint dieser Rhythmus für eine frühzeitige Diagnosestellung ausreichend und zudem kosteneffizient und praktikabel zu sein.

2. Ergebnisdiskussion

2.1. Diagnostische Genauigkeit des kombinierten Biomarkerscreenings

Kombiniertes Biomarkerscreening

Die IA ist eine der häufigsten Ursachen von Morbidität und Mortalität bei pädiatrischen immunsupprimierten Patienten mit hämato-onkologischer Grunderkrankung und/oder alloSZT. Ein zentrales Problem stellt die frühzeitige und verlässliche Diagnose dar.

Ein erfolgreicher Ansatz aus dem Feld der modernen Datenanalyse zur Verbesserung von Vorhersagen ist die Kombination von mehreren Methoden, welche einzeln nur eine schwache Aussagekraft haben (Dietterich, 2000). Kombiniertes Biomarkerscreening mittels GM-ELISA und Aspergillus-PCR hat sich in Erwachsenenstudien als vorteilhaft im Vergleich zur Einzeltestung in der Diagnose der IA bei Hochrisikopatienten erwiesen. Für pädiatrische Populationen gibt es dazu kaum Daten, weshalb die Hauptzielsetzung dieser Studie die Beurteilung des kombinierten Biomarkerscreenings bei pädiatrischen Hochrisikopatienten war. Lehrnbecher et al., 2016, Huppler et al., 2017 und Buchheidt et al., 2016, die in ihren pädiatrischen Reviews die beiden Biomarker in der Einzeltestung näher beleuchteten, plädierten ebenfalls für einen kombinierten Einsatz der Biomarker um die jeweiligen Schwächen in der Sensitivität und Spezifität des einzelnen Biomarkers in pädiatrischen Kohorten zu überwinden.

In unserer Auswertung konnten wir zeigen, dass das intensivierete (zweimal in der Woche) und standardisierte Biomarkerscreening mittels GM und PCR eine höhere diagnostische Genauigkeit erbrachte als die Einzeltestung. Alle vier Patienten mit probable IA wurden durch das kombinierte Screening erkannt, was mit einer Sensitivität/Spezifität/PPV und NPV von 100% und perfekten Likelihood Ratios einherging. Im Vergleich zu einer vergleichbaren Kontrollgruppe von erwachsenen Hochrisikopatienten nach alloSZT (Springer et al., 2016) lagen bei den pädiatrischen PROB-Patienten zudem höhere GM-Indices (OD-Index 3,1 zu 1,5) sowie längere Phasen dualer Positivität (9,5/6,8 zu 2,1/1,9 Proben von GM bzw. PCR) vor. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Kombination beider fungaler Testsysteme auch in einer pädiatrischen Hochrisikokohorte von hohem diagnostischem Wert ist.

Die drei Erwachsenenstudien (Rogers et al., 2013, Aguado et al., 2015, Morrissey et al., 2013) auf denen unsere Fragestellung hauptsächlich beruhte, verwiesen einstimmig auf die erhöhte klinische Gewissheit hinsichtlich des Vorliegens einer floriden IA durch die kombinierte Biomarker-basierte Strategie. Die nach unserem Wissen einzige pädiatrische Studie, die nicht nur die diagnostische Güte der Einzeltests, sondern auch die Biomarkerkombination von GM und PCR untersuchte, zeigte ebenfalls, dass die Kombination aus GM und PCR die größte diagnostische Genauigkeit mit einer erhöhten Sensitivität von 98,2%, Spezifität von 89,3%, PPV von 97,1% und NPV von 90% erbrachte (Gupta et al., 2017). Rogers et al., 2013 wiesen in einer multizentrischen Erwachsenenkohorte eine Verbesserung in der Leistung der Biomarker nach, wenn ein positiver Einzeltest (z.B. ITS-PCR) innerhalb von 12 Tagen durch einen positiven GM bestätigt wurde. Durch die Positivität beider Biomarker verfestigte sich der klinische Verdacht eines Progresses zur invasiven fungalen Infektion.

Vor diesem Hintergrund weisen unsere Daten darauf hin, dass die PCR aufgrund ihrer höheren Sensitivität als Suchtest und der GM aufgrund der höheren Spezifität als Bestätigungstest in pädiatrischen Hochrisikopopulationen eingesetzt werden könnten. Diese klinische Empfehlung fußt auf biologischer Plausibilität im Hinblick auf die nachgewiesene zeitliche Latenz zwischen der Aspergillus-DNAämie und der Freisetzung von fungalem Galactomannan-Antigen ins Blut (Cuenca-Estrella et al., 2009). Im Einklang mit diesem Grundprinzip könnte die duale Positivität somit als Entscheidungskriterium für den Beginn eines diagnostischen Workups, eine therapeutische Dosierung von Aspergillus-wirksamen Antimykotika sowie eine längere Therapiedauer gelten. Diese klinische Bedeutung wird durch die Ergebnisse von Aguado et al., 2015 unterstützt, die eine im Durchschnitt 7 Tage frühere Diagnose und dadurch relative Risikoreduktion von 68,1% aufgrund eines früheren Beginns eines diagnostischen Workups bei doppelter Positivität aufzeigen konnten.

Die vielversprechenden prädiktiven Werte der Biomarkerkombination in unserer Studie weisen auf ihren potentiellen klinischen Wert in pädiatrischen Hochrisikokohorten hin. Ein exzellenter positiver (PPV) und negativer prädiktiver Wert (NPV) von 1,0 der Biomarkerkombination bei hoher Vortestwahrscheinlichkeit (IA-Inzidenz: 10%) in unserer homogenen Hochrisikokohorte spricht für eine gute Eignung als Screeninginstrument während einer definierten Risikoperiode. Da die

Vortestwahrscheinlichkeit und das Level der Immunsuppression große Auswirkungen auf die prädiktiven Werte haben (Mennink-Kersten et al., 2004, Pfeiffer et al., 2006, Reinwald et al., 2014), gelten die Empfehlungen unserer Studie nur für ein prospektives serielles Monitoring in Hochrisikokohorten mit einer IA-Inzidenz von >5% während Phasen der Neutropenie und/oder GvHD oder bei prolongierter Hochdosiscorticosteroidtherapie.

Die hervorragende Eignung der schnell-verfügbaren, kultur-unabhängigen Biomarkerkombination als Screeningtest in pädiatrischen Hochrisikopopulationen könnte im klinischen Alltag den Verzicht auf eine antimykotische Prophylaxe bzw. eine empirische Therapie zu Gunsten einer präemptiven Therapie ermöglichen. Diese Empfehlung wird durch Ergebnisse einer Erwachsenenstudie (Morrissey et al., 2013) gestützt, die eine 52%-ige Reduktion im Einsatz von empirischer Therapie durch kombiniertes Biomarkerscreening im Vergleich zur Standardstrategie (Kultur und Histologie) nachweisen konnten. Daten einer weiteren Erwachsenenstudie (Aguado et al., 2015) bestätigten diese Erkenntnisse, indem sie nachwies, dass 13% der Patienten, welche nur einem seriellen GM-Monitoring unterzogen wurden, durch ein kombiniertes Biomarkerscreening keine empirische Therapie benötigt hätten. Ein Biomarker-basierter Ansatz zur Steuerung des Einsatzes von antifungaler Therapie in der klinischen Routine könnte, wie von Maertens et al., 2012 dargelegt, den unnötigen Einsatz von Antimykotika verhindern und Nebenwirkungsraten, Resistenzentwicklungen sowie hohe Medikamentenkosten verringern. Zudem könnte es die Kultur und Histologie als klinischen Trigger ablösen und somit insbesondere bei Kindern die Abhängigkeit von invasiven diagnostischen Verfahren reduzieren (Reinwald et al., 2012b, Heng et al., 2014, Morrissey et al., 2013).

Ausblick

Die entscheidende weiterführende Frage neben der guten diagnostischen Genauigkeit des kombinierten Biomarkerscreenings ist, ob Besagtes ein Frühwarnsystem darstellt und einen Hinweis auf eine floride IA bei asymptomatischen Patienten vor anderen diagnostischen Methoden (vor den EORTC/MSG-Kriterien) ermöglichen kann.

Maertens et al., 2002 legten dar, dass bei 2/3 der Patienten einer adulten Hochrisikokohorte zirkulierendes Antigen im Durchschnitt 8 Tage früher als bei einer

anderen Diagnosemöglichkeit detektiert werden konnte. Sulahian et al., 2001 bestätigten diese Erkenntnis auch in einer pädiatrischen GM-Screeningstudie, in der 64,6% der Patienten im Durchschnitt eine 8 Tage frühere Positivität des GM im Vergleich zu Kultur/CT zeigten. Einsele et al., 1997 wiesen eine frühere Detektion der IA von 1-8 Tagen durch die PCR im Vergleich zur Kulturpositivität nach. El-Mahallawy et al., 2006 und Einsele et al., 1997 bestätigten dies in einer pädiatrischen Studie mit einer früheren Positivität der PCR von durchschnittlich 5,8 Tagen im Vergleich zu klinischen Symptomen. Auch das kombinierte Biomarkerscreening signalisierte in einer Erwachsenenstudie (Aguado et al., 2015) das Potential für eine Detektion früher subklinischer Infektionsstadien.

Aufgrund der niedrigen Anzahl an Patienten mit probable IA war in unserer Studie keine signifikante Aussage zur Eignung des kombinierten Biomarkerscreenings als Frühwarnsystem möglich. Dennoch zeigte sich in 2/4 Patienten eine kombinierte Positivität im Durchschnitt 8 Tage vor Beginn der pilztypischen Symptomatik und in 1/4 Patienten vor Diagnosestellung durch die Referenzmethode. In der Beurteilung der Biomarker als Frühwarnsystem muss jedoch berücksichtigt werden, dass der exakte Beginn einer IA nicht klar definiert ist und ein positives Biomarkerergebnis vor Positivität der EORTC/MSG-Kriterien auch ein falsch-positives darstellen kann (Huppler et al., 2017). Weiterführende Studien sind daher nötig, um die Rolle des kombinierten Biomarkerscreenings in der Früherkennung subklinischer Infektionen bei Kindern zu evaluieren.

In diesem Zusammenhang ist die Korrelation zwischen frühzeitiger Diagnose (und damit frühzeitiger Therapie) und positivem Outcome zu betonen (Cordonnier et al., 2014), welche auch von Pfeiffer et al., 2006 als wichtigste Aussage einer Diagnosestudie deklariert wird. Macesic et al., 2017 beschrieben zudem, dass das Biomarkerscreening im Vergleich zur Standarddiagnostik nur dann (kosten-)effektiv ist, wenn es einen Überlebensvorteil bietet. Daten zu dieser Korrelation wurden in den vorliegenden adulten und pädiatrischen Biomarkerstudien jedoch nicht zur Verfügung gestellt und bedürfen daher weiterer Forschung.

Der aktuelle Goldstandard zur Diagnose der IA bei Erwachsenen, die EORTC/MSG-Kriterien, ist für den klinischen Einsatz in der Pädiatrie nur bedingt geeignet. Die Computertomographie wird nur unter strenger Indikationsstellung durchgeführt und die radiologische Darstellung der IA bei Kindern ist häufig sehr unspezifisch. Zudem sind invasive diagnostische Prozedere zur Gewinnung von sterilem Material bei Kindern äußerst schwierig und die Sensitivitäten von Kulturen niedrig. Zudem wurden die Definitionen für die akkurate Diagnose in klinischen Studien konzipiert und verfügen im Gegensatz zu Biomarkern nicht über die Möglichkeit einer frühzeitigen Diagnose vor Beginn von Symptomen (Springer et al., 2013). Die duale Testung von GM und PCR könnte aufgrund der hohen diagnostischen Genauigkeit und zeitlicher Vergleichbarkeit in der Positivität als Screeningtest in der Neutropenie sowie nach alloSZT die EORTC/MSG-Kriterien ersetzen.

In unserer Studie wurde die Biomarkerkombination als Screeninginstrument und nicht als Diagnostikum bei z.B. antibiotikaresistentem Fieber in der Neutropenie evaluiert. Sowohl für den GM als auch für die PCR gibt es keine Empfehlungen bezüglich des Einsatzes als Diagnostikum bei Kindern (Groll et al., 2014, Warris et al., 2019). In der Biomarkerkombination zeigten sich in unserer Studie jedoch PPVs von 1,0, sowohl wenn PROB als auch wenn PROB+POS als IA gewertet wurden, was ihre potentielle Eignung als diagnostischer Test widerspiegelt. Dies deckt sich mit den Daten einer pädiatrischen Studie (Gupta et al., 2017), die die Biomarkerkombination GM und PCR als die geeignetste im Vergleich zu anderen Kombinationsmöglichkeiten für die Diagnose der IA bei Patienten mit Fieber in der Neutropenie oder antibiotikaresistentem Fieber werteten. Weitere Studien sind nötig, um diese Erkenntnisse und den potentiellen Nutzen der kombinierten Testung als Diagnostikum unter Nicht-Überwachungsbedingungen zu bestätigen.

2.2. Diagnostische Genauigkeit der Indextests in der Einzelbeurteilung

Galactomannan-ELISA

In unserer Studie zeigte der GM eine hervorragende Sensitivität (1,0) und Spezifität (0,9). Eine vergleichbare Metaanalyse bei Erwachsenen erbrachte eine vergleichbare Spezifität von 81% mit einer niedrigeren Sensitivität von 82% (Maertens et al., 2005). Dies unterstreicht die ähnliche Performanceleistung bei Kindern und Erwachsenen wie von

Buchheidt et al., 2016 und Lehrnbecher et al., 2016 beschrieben. Pädiatrische Studien zur Evaluation des Biomarkers GM sind im Vergleich zu Erwachsenenstudien nur spärlich vorhanden. Insgesamt gibt es 18 pädiatrische Studien, die über GM-Testungen berichten (Lehrnbecher et al., 2016, Huppler et al., 2017). Dabei muss zwischen zwei klinischen Szenarien unterschieden werden: a) Einsatz des GM als Screeningmethode oder b) Einsatz als diagnostisches Instrument bei Fieber in der Neutropenie. In unserer Studie haben wir uns auf den Einsatz von GM als Screeningmethode fokussiert, sodass hier unser Schwerpunkt liegen soll.

10 pädiatrische Studien untersuchten den GM als Screeningmethode mit einer durchschnittlichen Sensitivität von 67% (0-100%) und Spezifität von 84% (50- 100%). Die niedrigere Gesamtsensitivität der Vergleichsstudien beruht hauptsächlich auf der sehr variablen Prävalenz der proven/probable IA von 0,5-30%. Verantwortlich sind dafür hauptsächlich drei Studien (Hovi et al., 2007, Steinbach et al., 2007, Fisher et al., 2012), die aufgrund einer sehr niedrigen Prävalenz von 0,5/1,6/2,0 mit Sensitivitäten von 0,0/0,0/0,5 einhergingen. Die gute Sensitivität und Spezifität in Studien mit hoher Prävalenz (Rohrlich et al., 1996, Sulahian et al., 2001, Badiie et al., 2012, Choi et al., 2013, Gefen et al., 2015) erklärt die Empfehlung aktueller pädiatrischer Leitlinien zum ausschließlichen Einsatz des GM bei neutropenen Patienten mit einer hohen Hintergrundprävalenz (Warris et al., 2019, Groll et al., 2014). Biologische Grundlage dafür ist die Korrelation zwischen Immunsuppression und Serum-GM-Level im Blut (Petraitiene et al., 2015). Der durchgehend hohe NPV (0,9-1,0) der oben genannten Studien mit vergleichbarer Prävalenz deckt sich mit dem hohen NPV (1,0) unserer Studie, was für eine gute Eignung des GM als Screeningtest spricht (Lehrnbecher et al., 2016).

Mehrere Studien (Herbrecht et al., 2002b, Verweij et al., 1998, Marr et al., 2004) bestätigen, dass eine Verringerung des ursprünglichen GM-Cut-Offs von 1,0-1,5 zur Definition einer Testpositivität keine Zugeständnisse in der Spezifität erfordert. Aus diesem Grunde wurde der Cut-Off des FDA²⁷-genehmigten ELISA letztendlich auf 0,5 herabgesetzt. Unsere ROC-Kurvenanalyse wies sogar auf einen Cut-Off-Wert von $\geq 0,4$ für den GM Index hin, mit einer zugehörigen Sensitivität von 0,6 und Spezifität von 95%, welche für die Eigenschaft als Bestätigungstest besonders wichtig ist. Marr et al., 2005

²⁷ US Food and Drug Administration

empfehlen basierend auf ihren Ergebnissen besonders in Kohorten mit antifungaler Prophylaxe einen niedrigen Cut-Off-Wert.

Aspergillus-PCR

In aktuellen Leitlinien wird der Routineeinsatz der PCR zur Detektion der IA bei Kindern aufgrund fehlender Standardisierung sowie nicht-akzeptabler Betriebseigenschaften für eine standardisierte Herangehensweise nicht empfohlen (Groll et al., 2014, Lehrnbecher et al., 2017, Warris et al., 2019). Dies deckt sich mit der Quintessenz von drei Reviews (Buchheidt et al., 2016, Lehrnbecher et al., 2016, Huppler et al., 2017), die die vorhandenen 11 pädiatrischen PCR-Studien hinsichtlich ihrer diagnostischen Güte bei Kindern evaluierten. Die vier pädiatrischen PCR-Screeningstudien weisen hierbei sehr variable diagnostische Gütewerte mit einer durchschnittlichen Sensitivität von 0,5 (0,1-0,8) und Spezifität 0,7 (0,4-0,9) auf. Unsere Daten eines longitudinalen Follow-Ups kombiniert mit einer detaillierten Krankengeschichte legen jedoch den diagnostischen Wert der PCR auch bei Kindern dar. Die hohe Sensitivität der PCR in unserer Studie deckt sich mit den Ergebnissen von Badiee et al., 2012, die in einem Screeningsetting von pädiatrischen Hochrisikopatienten und hoher IA-Inzidenz ebenfalls eine große diagnostische Genauigkeit und die Empfehlung zum Einsatz der PCR in der Detektion der IA bei Kindern beschreiben. Die Divergenz zwischen unseren vielversprechenden Daten und den Negativempfehlungen von pädiatrischen Reviews und Leitlinien (s.o.) lässt sich durch mehrere Faktoren erklären. Die große Variabilität der Daten beruht zum einen auf der starken Heterogenität mancher Studien (Armenian et al., 2009, Reinwald et al., 2014), deren inhomogene Kohorten aus pädiatrischen Krebs- und Nicht-Krebs-Patienten und somit unterschiedlichen Vortestwahrscheinlichkeiten und Risikoprofilen bestanden. In diesen zwei pädiatrischen PCR-Screeningstudien zeigten sich bei niedrigen IA-Inzidenzen (4% bzw. 0%) unzureichende diagnostische Gütekriterien (Sensitivität 0,1 bzw. 0,3) und eine daraus resultierende Negativempfehlung bezüglich des Einsatzes der PCR als Screeninginstrument in Niedrig-Risiko-Settings. In unserer Studie einer homogenen Hochrisikokohorte sowie zwei anderen vergleichbaren pädiatrischen Screeningstudien (Bialek et al., 2002, Badiee et al., 2012) ergaben sich jedoch hohe NPVs (1,0 bzw. 0,9 bzw. 0,8), sodass entgegen oben genannter Ergebnisse und aktueller Empfehlungen sich auch die PCR als Screeningmethode bei Patienten mit Hochrisikoprofil zu eignen scheint. Eine weitere Schwierigkeit in der Beurteilung der

diagnostischen Güte der PCR bei Kindern und daraus resultierender Negativempfehlung ist die absolut geringe Anzahl an pädiatrischen Studiendaten, welche durch die oft unterschiedlichen Studienobjekte (Screening von asymptomatischen Risikopatienten vs. diagnostisches Workup von klinisch IA-verdächtiger Symptomatik) der vorhandenen Studien weiter minimiert wird (Buchheidt et al., 2016). Eines der entscheidendsten Kriterien für die zurückhaltende Bewertung der PCR bei Kindern ist die fehlende Standardisierung der PCR-Methode in aktuellen Studien und die daraus resultierende schwierige Vergleichbarkeit von Studienergebnissen. So evaluierten Bialek et al., 2002, Badiie et al., 2012 und Reinwald et al., 2014 eine nested-PCR mit unterschiedlichen Protokollen und Armenian et al., 2009 eine Aspergillus 28s rRNA-Assay. Im Unterschied zu den Vergleichsstudien wurde in unserer Studie ein etabliertes PCR-Assay (Aspergillus ITS1-5.8SrRNA) verwendet, was bereits in einer Erwachsenenkohorte validiert wurde (Springer et al., 2016) und auch in Buchheidt et al., 2016 als potentieller „molekularer Goldstandard-Assay“ postuliert wird. Aus diesem Grunde gilt es in größeren multizentrischen Studien mit Hochrisikopatienten und übereinstimmendem PCR-Assay die positiven Ergebnisse unserer Studie zu konsolidieren.

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse unserer Studie könnte das relativ große Blutvolumen, welches für eine PCR-Testung notwendig ist (3ml) eine nicht zu unterschätzende Limitation dieser diagnostischen Methode bei Kindern darstellen (White et al., 2011).

Ausblick

Für den GM wie auch für die PCR gibt es keine Empfehlungen bezüglich des Einsatzes als Diagnostikum bei Kindern mit Fieber in der Neutropenie oder anderweitigem klinischem Verdacht auf eine IFD (Groll et al., 2014, Warris et al., 2019). Beide Tests zeigten in unserer Studie in der Einzelbeurteilung schwache positive prädiktive Werte (PPV) von 0,5 (GM) bzw. 0,2 (PCR), was ihnen eine individuelle Eignung als diagnostischer Test abspricht. In anderen pädiatrischen Studien, in denen der GM als ad-hoc Methode (Diagnoseinstrument) evaluiert wurde (El-Mahallawy et al., 2006, Herbrecht et al., 2002b, Challier et al., 2004, Jha et al., 2013, Dinand et al., 2016), zeigte sich der Wert des PPV sehr variabel (0-100%), jedoch im Durchschnitt (0,5) ähnlich unserer Studie und damit ebenfalls zu niedrig für eine klinische Relevanz. Die Prävalenz dieser Vergleichsstudien zeigte sich ähnlich bei durchschnittlich 11,1%. Der NPV des

GM war durchgehend hoch, jedoch auch von limitiertem klinischen Nutzen aufgrund der alleinigen Detektion von *Aspergillus* spp. und fehlendem Nachweis anderer Schimmelpilze (Lehrnbecher et al., 2016). 8 pädiatrische Studien (Lehrnbecher et al., 2016), die die PCR als diagnostische Methode betrachteten, zeigten im Durchschnitt einen zu unserer Studie vergleichbaren PPV von 0,3 (0,0-0,7) bei im Durchschnitt höherer Prävalenz von 15,3%.

2.3. Bedeutung des Inkorporationsbias

In der Methodendiskussion wurde die Problematik des Inkorporationsbias durch die Integration des GM in die Referenzmethode bereits ausführlich dargelegt. Zur Minimierung des Effektes wurde eine zweite Berechnung der diagnostischen Genauigkeit vorgenommen, in der auch die Patienten der POS-Gruppe als richtig-positiv gewertet wurden. Diese erfüllten ebenfalls alle Kriterien der Referenzmethode außer den mykologischen Kriterien, wodurch der Bias der GM-Positivität ausgeglichen werden konnte. Diese Darstellung hatte einen gering positiven Effekt für den PPV der PCR (Anstieg von 0,3 auf 0,4). Für den GM hingegen senkte es die Sensitivität und den NPV, da alle possible IA GM-negativ waren. Dies hatte ebenfalls eine Auswirkung auf die Sensitivität (1,0 zu 0,7) und des NPV (1,0 zu 0,9) der kombinierten Betrachtung (GM+PCR). Spezifität und PPV der kombinierten Betrachtung blieben jedoch bei 1,0. Die potentielle Unterschätzung der Sensitivität durch Klassifikation der POS-Gruppe als richtig-positiv stellte auch Maertens et al., 2002 dar. In dieser Studie zeigte sich, dass nur 14% der POS-Gruppe eine autopsiebestätigte IA hatte im Gegensatz zu 75% in der PROB-Gruppe. Aus diesem Grunde empfehlen Mennink-Kersten et al., 2004 und Leeftang et al., 2015, Patienten mit possible IA, aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer floriden IA, nicht in die Berechnungen der diagnostischen Genauigkeit zu integrieren, um eine Unterschätzung der Sensitivität des GM (und damit der kombinierten Biomarkertestung) zu vermeiden. Die Handhabung dieses intrinsischen Bias wird in vergleichbaren Studien zur Prüfung der diagnostischen Güte des GM erstaunlicherweise kaum erwähnt (Huppler et al., 2017). Die oben dargelegten Ergebnisse decken sich mit einer anderen Berechnung unserer Studie, in der die Einzeltests mit der Computertomographie als Referenzmethode evaluiert wurden. [Zur Erinnerung: Ein positives CT ist neben den Wirtsfaktoren das entscheidende gemeinsame Merkmal einer possible und probable IA.] Auf der Einzeltestebene zeigte

sich auch hier eine höhere Sensitivität der PCR im Vergleich zum GM, bei jedoch höherer Spezifität des Letzteren. Aus theoretischer Sicht wird die Überlegenheit der PCR in der Sensitivität im Vergleich zu kultur-, oder antigenbasierten Methoden erwartet (Huppler et al., 2017) und bestärkt die guten Ergebnisse einer vorangegangenen Erwachsenenstudie (Suarez et al., 2008).

2.4. Einflüsse auf die diagnostische Genauigkeit der Indextests

12% bzw. 42% der Patienten der Kontrollgruppe (UNCLASS) zeigten einen falsch-positiven Test des GM bzw. der PCR. In der kombinierten Testung (GM+PCR) gab es keine Falsch-Positivität. Falsch-negative Tests traten weder in der Einzel- noch in der Kombinationstestung auf.

Sulahian et al., 2001 und Herbrecht et al., 2002b postulierten in ihren Studien eine signifikant höhere Falsch-Positiv-Rate des GM bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen (10%/2,5 bzw. 44%/0,9%). Im Vergleich unserer Daten mit denen von vorangegangenen Erwachsenenstudien aus unserer Arbeitsgruppe (Springer et al., 2013, Springer et al., 2016) lässt sich diese Beobachtung teilen. Dort zeigte sich jeweils eine 0,3% bzw. 5% Falsch-Positiv-Rate im Vergleich zu 12% unserer pädiatrischen Kohorte.

Subklinische Infektion

Die falsch-positiven Testergebnisse unserer Studie lassen sich neben anderen Einflussfaktoren (s.u.) unter anderem mit subklinischen Infektionen (positiver Biomarkertest ohne spezifische klinische Zeichen einer IA) erklären, auch wenn diese bei Kindern seltener auftreten als bei Erwachsenen. Die Vermutung, dass die falsch-positiven Testergebnisse in Wahrheit richtig-positive subklinische Infektionen sind, wird vielfach postuliert (McLintock and Jones, 2004, Lass-Flörl et al., 2001, Pinel et al., 2003, Sulahian et al., 2001).

Antifungale Prophylaxe

85% der Patienten der Kontrollgruppe erhielten zu einem Zeitpunkt ihres stationären Aufenthaltes Aspergillus-wirksame Prophylaxe/Therapie, was die aktuelle Strategie in Deutschland widerspiegelt (Lehrnbecher et al., 2009).

Erwachsenenstudien verdeutlichen den negativen Einfluss von antifungal aktiven Wirkstoffen auf die diagnostische Genauigkeit von Biomarkern (Duarte et al., 2014, Leeftang et al., 2015, Reinwald et al., 2012a). Daten zur Auswirkung der antifungalen

Prophylaxe auf die diagnostische Genauigkeit der Biomarkertestung in pädiatrischen Kohorten sind rar, da diese Informationen in vielen Studien nicht angegeben oder diskutiert wurden (Armenian et al., 2009), Patienten keine antifungale Prophylaxe erhielten (Badiee et al., 2012) oder Patienten deshalb bereits vorher exkludiert wurden (Gupta et al., 2017). Der Mangel eines standardisierten Konzeptes für Prophylaxe und empirische Therapie sowie die schwierige Trennung der beiden Indikationen bei Kindern mindert, wie auch in einer aktuellen Meta-Analyse pädiatrischer Biomarkerstudien (Lehrnbecher et al., 2018) beschrieben, die Vergleichbarkeit von Studien und erschwert dadurch die genaue Beurteilung. Diese Tatsache stellt auch eine Schwäche unserer Studie dar.

Springer et al., 2016 konnten in einer multizentrischen Erwachsenenstudie darlegen, dass die PCR durch gleichzeitige Gabe von Aspergillus-wirksamen Medikamenten (Prophylaxe oder empirische Therapie) häufiger falsch-positive Ergebnisse zeigt und somit in diesen Settings an diagnostischer Genauigkeit einbüßt. Die Falsch-Positiv-Rate lag in der Kohorte ohne primäre antifungale Prophylaxe bei 29% (PPV 39%, Spezifität 73%) und mit bei 73% (PPV 7%, Spezifität 27%). Die hohe Falsch-Positiv-Rate der PCR von 42% (PPV 29%, Spezifität 58%) in der Kontrollgruppe unserer Studie lässt sich jedoch nur bedingt durch die dargelegten Erkenntnisse von Springer et al., 2016 erklären. In der Kohorte von Patienten (28/33), die zu einem Zeitpunkt eine Aspergillus-wirksame Prophylaxe/Therapie erhielten, zeigten nur 11% der Patienten ihr falsch-positives PCR-Ergebnis während der Einnahme. Die Mehrheit der Falsch-Positivität trat außerhalb des Einsatzes (29%) von bzw. in der Kohorte ohne (60%) Aspergillus-wirksame Agenzien auf. Der GM zeigte in der Kohorte der Patienten mit Aspergillus-wirksamer Prophylaxe oder empirischer Therapie eine Falsch-Positiv-Rate von 12%. Davon traten jedoch ebenfalls nur 3% während und 9% außerhalb der Einnahme von Aspergillus-wirksamen Antimykotika auf. Dies steht im Gegensatz zu Erkenntnissen von Duarte et al., 2014, die dem GM aufgrund einer Falsch-Positiv-Rate von 14% während antifungaler Prophylaxe die zuverlässige Eignung als Screeningtest absprechen. In der Zusammenfassung unserer Ergebnisse ergibt sich kein negativer Einfluss der Prophylaxe auf die Leistungseigenschaft der beiden Biomarker. Die geringere Inzidenz falsch-positiver GM bzw. PCR-Ergebnisse unter antifungaler Prophylaxe/empirischer Therapie könnte auf den positiven klinischen Effekt von Antimykotika bei subklinischen Infektionen

hindeuten, die ein reduziertes Hyphenwachstum/Angioinvasion und damit verminderte Freisetzung von Schimmelpilzantigenen in den Blutkreislauf ermöglichen (Becker et al., 2003, Robenshtok et al., 2007).

Verschiedene (auch pädiatrische) Studien (El-Mahallawy et al., 2006, Marr et al., 2005, Reinwald et al., 2012a, Marr et al., 2004, Duarte et al., 2014) beschreiben eine Auswirkung der antifungalen Prophylaxe oder empirischen Therapie auf die Sensitivität der PCR und des GM. Aufgrund der partiellen Annullierung von zirkulierendem Antigen oder fungaler DNA durch antimykotische Substanzen im Blut (Petraitiene et al., 2001) wird insbesondere der Einsatz von GM zum Screening in Erwachsenenkohorten mit Prophylaxe nicht mehr empfohlen (Patterson et al., 2016). Diese Beobachtung ließ sich in unserer Studie nicht reproduzieren.

Weiterführende Studien sind daher nötig, um basierend auf unseren Erkenntnissen den Einfluss von antifungaler Prophylaxe auf die diagnostische Genauigkeit des Biomarkerscreenings bei Kindern genauer zu evaluieren.

GM-ELISA- Mukositis

Eine weitere Erklärung für falsch-positive GM-Ergebnisse könnte die Tatsache liefern, dass in unserer Studie alle 4 Patienten mit falsch-positiven GM Ergebnissen zeitgleich eine schwere Mukositis aufgrund der zytotoxischen Chemotherapie aufwiesen. Letscher-Bru et al., 1998 konnten fungales Galactomannan in verschiedenen getreidehaltigen Produkten nachweisen und somit die Theorie von Ansorg et al., 1997 unterstützen, die eine vermehrte Aufnahme von alimentärem Galactomannan bei Dysfunktion der intestinalen Schleimhautbarriere (bei Mukositis als Nebenwirkung einer zytotoxischen Chemotherapie) oder vor Vollendung des Reifeprozesses des Darmes bei Neugeborenen postulierten (Mennink-Kersten et al., 2004). Aus diesem Grunde könnte eine Aspergillus spp.-unabhängige Herkunft des Galactomannan eine falsch-positive Antigenämie erklären. 2/4 unserer falsch-positiven Patienten litten zudem ebenfalls unter einer GVHD des Darmes, die dieses Phänomen verstärken könnte. Der Theorie widerspricht jedoch, dass 25/33 Patienten der UNCLASS-Gruppe eine Mukositis aufwiesen. Auch (Sulahian et al., 2001) detektierten ebenfalls nur in 8/25 pädiatrischen Patienten mit falsch-positivem GM eine Mukositis, sodass diese Hypothese nur eine partielle Erklärung darstellen kann.

GM-ELISA- Bifidobakterien

Eine weitere Ursache für falsch-positive GM-Resultate stellen Bifidobakterien dar, welche sich in Joghurts und Probiotika befinden sowie 75-91% der fäkalen Mikroflora von Neugeborenen und Säuglingen ausmachen. Der Hintergrund ist, dass die membran-assoziierte Lipoteichonsäure von Bifidobakterien ebenfalls durch den GM detektiert wird (Mennink-Kersten et al., 2004). Für unsere Studien spielen die hohen falsch-positiven Resultate in Neugeborenen/Säuglingen keine entscheidende Rolle, da die relevanten Patienten bereits älter waren. Eine Falsch-Positivität aufgrund der oralen Aufnahme von Probiotika kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Gangneux et al., 2002 konnten zudem hohe Konzentrationen von Galactomannan in Kuhmilch nachweisen.

GM-ELISA- Antibiotika

Drei der vier Patienten unserer Studie, die ein falsch-positives GM-Testergebnis im Verlauf ihres stationären Aufenthaltes aufwiesen, wurden zum Zeitpunkt der Probenentnahme mit einem Beta-Laktam-Antibiotikum behandelt. Aubry et al., 2006 konnten eine signifikante Assoziation ($P < 0,0001$) zwischen GM-Positivität und der Anwendung von Beta-Laktam-Antibiotika zeigen. Ursächlich ist das in Beta-Laktam-Antibiotika enthaltende Galactomannan, welches noch bis zu 5 Tagen nach Absetzen nachzuweisen war. Sulahian et al., 2003 und Walsh et al., 2004 konnten diese Korrelation speziell für Piperacillin-Tazobactam bestätigen. Neuere Erwachsenenstudien (Vergidis et al., 2014, Mikulska et al., 2012) lassen jedoch darauf schließen, dass Galactomannan in Piperacillin-Tazobactam nicht mehr nachweisbar ist und daher auch keine zur Falsch-Positivität führende Kreuzreaktivität auslöst.

GM-ELISA- Kreuzreaktivität

Eine Kreuzreaktivität des GM mit *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Histoplasma capsulatum* und *Cryptococcus neoformans* ist beschrieben, welche ebenfalls eine Falsch-Positivität des Assays bedingen könnte (Lehrnbecher et al., 2018).

Aspergillus-PCR

Zum anderen kann es durch den ubiquitär in der Luft befindlichen, klinisch irrelevanten *Aspergillus fumigatus* zu einer Probenverunreinigung und damit falsch-positivem PCR-Ergebnis kommen. Harrison et al., 2010 konnten in ihrer Studie darlegen, dass 18% aller Sammelröhrchen mit *Aspergillus* DNA verunreinigt waren.

Korrelation Werte Richtig-Positiv und Falsch-Positiv

Eine Korrelation zwischen der Höhe der Schwellenüberschreitung des GM und der PCR und der Richtig- oder Falsch-Positivität ließ sich in unserer Studie erkennen. Der GMI lag bei richtig-positiven Ergebnissen im Durchschnitt bei $3,1 \pm 2,7$, bei falsch-positiven jedoch nur bei $1,5 \pm 1,0$. Vergleichend zeigte sich ein durchschnittlicher Cq-Wert von $41,9 \pm 4,4$ und $44,6 \pm 6,1$ bei falsch-positiven Proben. Somit zeigten die falsch-positiven Proben im Vergleich deutlich niedrigere Werte als die Richtig-Positiven.

Kombiniertes Biomarkerscreening und Falsch-Positivität

Zusammenfassend zeigten sich in unserer Studie immer wieder einzelne falsch-positive Testergebnisse ohne eine entsprechende klinische Korrelation. In der kombinierten Betrachtung der Biomarker traten jedoch keine falsch-positiven Ergebnisse auf, weshalb dieses als Entscheidungskriterium bei der Identifikation von Patienten mit IA und für den Beginn eines diagnostischen Workups oder die Klassifikation von Werten als tatsächlich falsch-positiv im klinischen Alltag dienen könnte.

2.5. Durchbruchsinfektionen

In unserer Studie entwickelten alle vier PROB-Patienten ihre IA unter einer Aspergillus-wirksamen Prophylaxe. Eine Speziesbestimmung des ursächlichen Schimmelpilzes in der PCR mit anschließender Resistenztestung gelang nicht. Es gab jedoch keinen Hinweis darauf, dass es sich um resistente Stämme gehandelt haben könnte.

Trotz erheblicher Verbesserungen in der Prophylaxe und Therapie der IA stellen Durchbruchsinfektionen während des Einsatzes von Antimykotika ein zunehmendes und bedeutendes Problem dar (Lionakis et al., 2018). Die Herausforderungen im klinischen Management von Durchbruchsinfektionen werden durch falsch-negative GM-Ergebnisse weiter verstärkt. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die antifungale Prophylaxe (vornehmlich Amphotericin B) die Expression von Galactomannan bei IA reduziert und somit die Antigendetektion im Blut verspätet (Petraitiene et al., 2001, Francis et al., 1994). Zur Definition und verbesserten Detektion einer möglichen Durchbruchsinfektion in klinischen Studien wurde durch die Gremien MSG-ERC²⁸ und ECMM²⁹ eine aktuelle Leitlinie herausgegeben (Cornely et al., 2019). Weiterführende Studien sind nötig, um

²⁸ Mycoses Study Group Education and Research Consortium

²⁹ European Confederation of Medical Mycology

ähnliche Leitlinien für das Management von Durchbruchsinfektionen im klinischen Kontext zu etablieren.

Die Ursachen für Durchbruchsinfektionen sind aufgrund der fehlenden Datenlage, insbesondere im pädiatrischen Setting, nicht sicher zu eruieren. Lestner et al., 2015 konnten in der ARPEC³⁰-Studie eine hohe Inzidenz von subtherapeutischen und nicht-indikationsspezifischen Dosierungen von Antimykotika in pädiatrischen Hochrisikoseettings aufgrund limitierter evidenzbasierter Dosierungsempfehlungen für Kinder beobachten. Diese Erkenntnis könnte eine mögliche Ursache für die steigende Anzahl an resistenten pathogenen Schimmelpilzen darstellen. Stockmann et al., 2014 konnten große inter-individuelle Unterschiede in der pharmakokinetischen Variabilität insbesondere bei der therapeutischen Anwendung von Triazolen und Echinocandinen bei Kindern darlegen, weshalb ein Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) für einige Antimykotika auch bei Kindern empfohlen wird. Die antifungale Pharmakokinetik von Kindern spiegelt nicht die von Erwachsenen wider, weshalb die aktuellen Werte von Zielspiegeln für Antimykotika, die auf Erwachsenenaten beruhen, für Kinder validiert werden müssen (Warris et al., 2019, Stockmann et al., 2014). Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass die Wirkkonzentrationen von Antimykotika an den Risikoorganen z.B. den Alveolen oftmals zu niedrig sind, um eine effektive Prophylaxe zu gewährleisten. Vor diesem Hintergrund ist ein globaler Konsensus über die prophylaktische und therapeutische Dosierung von Antimykotika bei pädiatrischen Patienten und koordinierte Stewardship-Programme für einen einheitlichen und angemessenen Einsatz von Antimykotika auf der Basis neuer klinischer und pharmakokinetischer Daten anzustreben (Lestner et al., 2015). Insbesondere sollten dabei die Unterschiede in der Pharmakokinetik von Kindern verschiedener Alters- und Entwicklungsstufen berücksichtigt werden, um die antifungale Aktivität zu verbessern und Toxizität und das Aufkommen von Resistenzen zu minimieren (Steinbach, 2005).

Zwei unserer PROB-Patienten zeigten ihre Durchbruchsinfektionen unter Caspofungin, was sich mit Studiendaten deckt, die ebenfalls höhere Raten von Durchbruchsinfektionen unter diesem Echinocandin beschrieben (Pang et al., 2012, Madureira et al., 2007). Als Ursache wird neben niedrigen Wirkspiegeln (s.o.) auch die unzureichende in-vivo-

³⁰ Antibiotic Resistance and Prescribing in European Children

Wirksamkeit bei neutropenen Patienten aufgrund der rein fungistatischen Wirkung diskutiert (Lafaurie et al., 2010).

2.6. Multivarianalyse

Kortikosteroide (definiert nach den EORTC-Kriterien) erhöhten in unserer Studie signifikant das Risiko für eine IA (GM-Ereignis). Diese Ergebnisse sind deckungsgleich mit denen anderer Studien (Cordonnier et al., 2006, Upton et al., 2007, Dvorak et al., 2005), die in ähnlichen Kohorten ebenfalls eine Assoziation zwischen der Einnahme von hochdosierten Kortikosteroiden und erhöhter Morbidität/Mortalität durch eine IA aufgrund der induzierten Immunsuppression herstellen konnten.

Herpesviren (außer CMV) zeigten sich als signifikanter Risikofaktor für eine IA. Ebenso wie bei Caspofungin muss jedoch davon ausgegangen werden, dass ebenfalls keine kausale Assoziation vorliegt, sondern das Auftreten von Herpesviren als Zeichen einer schlechten Immunlage gewertet werden muss, welche wiederum einen großen Risikofaktor für die IA darstellt.

In der Multivarianalyse zeigte sich zudem eine signifikante Assoziation zwischen Caspofungin und einem erhöhten Risiko für eine IA (GM-Ereignis). Diese Beobachtung wurde bisher in keiner anderen pädiatrischen Studie beschrieben. Caspofungin gehört nicht zu den empfohlenen Erstlinien-Prophylaktika, sondern kommt hauptsächlich als empirische Therapie oder bei Durchbruchinfektionen zum Einsatz. In beiden Fällen liegen per definitionem bereits Hinweise auf eine Infektion (hohe Prä-Test-Wahrscheinlichkeit) vor, sodass nicht von einer kausalen Assoziation (Caspofungin → Infektion), sondern vielmehr von einem umgekehrten Effekt (Infektion → Caspofungin) auszugehen ist. Der Einsatz von Caspofungin ist Ausdruck eines Infektionsverdachtes, wie auch in der Verteilung unserer Studie zu sehen ist (4/4 der PROB-Patienten, 1/2 der POS-Patienten und 4/33 der UNCLASS-Patienten erhielten Caspofungin).

Ambisome und Tachykardie reduzierten in der Multivarianalyse das Risiko für ein PCR-Ereignis. Ambisome gehören in Hochrisikokohorten zu den Standard-Antimykotika zur Prophylaxe und Therapie einer IA, weshalb die signifikante Risikoreduktion nicht überrascht. Der Einsatz von Ambisomen an sich ist ein Ausdruck für ein kränkeres Patientenkollektiv, da diese in unserer Studie insbesondere bei Patienten mit höherem Risiko und längerem Krankheitsgeschehen eingesetzt wurden. Die Risikoreduktion durch

die Variable Tachykardie ist höchstwahrscheinlich fehlerhaft und auf die geringe Patientenanzahl zurückzuführen (Loeffler et al., 2017).

2.7. GM-Index (GMI) als Surrogatmarker für das Outcome und Therapieansprechen

Unsere Resultate weisen auf eine starke Übereinstimmung zwischen dem Patientenüberleben und der Kinetik des Serum-GMIs hin, wenn die von Woods et al., 2007 definierten GMI-basierten Outcomekriterien angewendet wurden. Dies deckt sich mit den Daten von Maertens et al., 2009, Woods et al., 2007 und Miceli et al., 2008, die bei hämato-onkologisch erkrankten Erwachsenen eine exzellente Korrelation ($\kappa^{31}0,89$ bzw. $\kappa 0,86$ bzw. $\kappa 0,87$) zwischen dem klinischen Outcome der Aspergillose und den GMI-basierten Kriterien als Surrogatmarker für das Outcome bei neutropenen Patienten und seropositiver IA zeigen konnten. Miceli et al., 2008 wiesen zudem eine noch stärkere Korrelation ($\kappa 0,9$) nach, wenn das Outcome durch eine Autopsie bestätigt wurde.

Unsere Ergebnisse ergaben zudem, dass eine persistierende GMI-Positivität mit einer hohen Mortalität und eine GMI-Normalisierung mit einem erfolgreichen Outcome assoziiert ist. Eine Erkenntnis, deren Signifikanz ($P < ,0001$) Maertens et al., 2009 und Woods et al., 2007 darlegen konnten.

Bei der Beurteilung des Therapieansprechens wurden nach den EORTC/MSG-Kriterien (Segal et al., 2008) beide Patienten als Versagen und nach den GMI-basierten Kriterien Patient 1 als Erfolg und Patient 2 als Versagen klassifiziert. Die Übereinstimmung beider Kriterien in der Bewertung des Therapieansprechens bei Patient 2 deckt sich mit den Ergebnissen von Nouer et al., 2011 und Maertens et al., 2009, die eine exzellente Korrelation ($\kappa > 0,82$ bzw. $\kappa > 0,76$) zwischen den GMI-basierten Responsekriterien und den EORTC/MSG Definitionen in Erwachsenenkohorten in Woche 6 nachweisen konnten.

Die Unstimmigkeit der beiden Kriterien bei Patient 1 widerspricht dieser Korrelation jedoch nicht, sondern beruht, wie auch in Maertens et al., 2009 und Nouer et al., 2011 beschrieben, am ehesten auf einer Schwäche der EORTC/MSG-Kriterien. Im Rahmen eines Immunrekonstitutionssyndroms (IRIS) treten oftmals Größenzunahmen der

³¹ Kappa Korrelationskoeffizient

pulmonalen IA-Läsionen sowie Verschlechterungen der klinischen Symptome auf (Miceli et al., 2007). Trotz eines guten Therapieansprechens werden die Patienten daraufhin als Therapieversager gewertet, was häufig in einer Missklassifikation resultiert. Die von den EORTC/MSG-Kriterien geforderte radiologische Bildgebung in Woche 6 ist zudem im pädiatrischen Setting aufgrund der strengen Indikationsstellung oftmals nicht umsetzbar und schränkt die Einsetzbarkeit weiter ein, wie auch bei Studienpatient 1. Daher gehen wir davon aus, dass Patient 1 nach den EORTC/MSG-Kriterien missklassifiziert wurde und tatsächlich ein erfolgreiches Therapieansprechen zeigte, wie auch durch die Kinetik des GMI suggeriert.

Unsere Daten weisen zudem auf eine Früherkennung des Therapieansprechens durch die GMI-basierten Responsekriterien im Gegensatz zum 6-Wochen-Endpunkt der EORTC/MSG-Kriterien hin. Diese Beobachtung wird in den Ergebnissen einer ähnlichen Erwachsenenkohorte widergespiegelt (Nouer et al., 2011), in der 87% aller Patienten mit Therapieansprechen eine im Mittel 21 Tage kürzere Zeit bis zum Ansprechen vorwiesen, wenn sie nach den GMI-basierten Kriterien definiert wurden. Aufgrund der potentiellen Verschlechterung von radiologischen und klinischen Befunden durch ein IRIS ist eine Früherkennung mittels EORTC/MSG-Kriterien wahrscheinlich kaum möglich (Miceli et al., 2007, Nouer et al., 2011).

Unsere Ergebnisse, denen zufolge rückläufige GMIs mit Therapieansprechen und persistierende oder steigende GMIs mit Therapieversagen assoziiert sind, unterstützen auch bei pädiatrischen Patienten zum Therapiemonitoring eine Fortführung des Biomarkerscreenings mittels serieller GMI-Bestimmungen, auch nach der Diagnosestellung. Abgesehen von der starken Korrelation zwischen GMI-basierten Responsekriterien und dem Therapieansprechen in Woche 6 ermöglichen diese zudem eine Früherkennung des Ansprechens. Wo die EORTC/MSG-Kriterien durch das Immunkonstitutionssyndrom noch in die Missklassifikation getrieben werden, kann eine GMI-Normalisierung bei gleichzeitiger Neutrophilenregeneration bereits ein Therapieansprechen signalisieren (Miceli et al., 2007). Dies kann die Dauer der antifungalen Therapie beeinflussen und somit zu den Zielen des ‚Antifungal Stewardship‘ beitragen (Kovanda et al., 2017). Zudem ermöglicht eine frühzeitige Klassifikation rechtzeitige Änderungen in der Therapiestrategie bei therapieversagenden Patienten.

Unsere Erkenntnisse zeigen die starke Korrelation zwischen den GMI-basierten Outcomekriterien und dem klinischen Outcome und unterstützen dadurch zusätzlich das bereits von Anaissie, 2007 dargelegte Potential des GMI als Surrogatendpunkt für das klinische Outcome auch in pädiatrischen Patienten. Aufgrund seiner biologischen Plausibilität – Freigabe von GM während Wachstum und Korrelation mit fungaler Last (Wheat, 2006) –, Aspergillus-Spezifität und schneller Verfügbarkeit von quantitativen, reproduzierbaren Resultaten erfüllt der GMI zudem alle geforderten Kriterien (Health et al., 2004) für einen Einsatz als Surrogatendpunkt für klinische Studien. Der Einsatz der GMI-basierten Outcomekriterien als Surrogatendpunkt könnte wichtige Implikationen für die Effizienz klinischer Studien durch geringere benötigte Fallzahlen (Ellenberg, 1989), kürzere Dauer und geringere Kosten haben und somit einen potentiell schnelleren Zugang zu lebensrettenden Medikamenten ermöglichen (Nouer et al., 2011, Woods et al., 2007, Miceli et al., 2008, Maertens et al., 2009, Mercier et al., 2018).

Aufgrund der niedrigen Fallzahl und den damit einhergehenden geringen Datenpunkten war es in unserer Studie nicht möglich eine signifikante Korrelation zu berechnen, was eine bedeutende Limitation darstellt. Die Bestätigung unserer Hypothese beruht daher auf nicht-signifikanten Trends, die aber in dieselbe Richtung weisen wie die Daten vieler (vorwiegend Erwachsenen-) Studien.

Aufgrund der spärlichen Datenlage bei Kindern empfehlen wir - basierend auf unseren Beobachtungen - die Durchführung weiterführender Studien in größeren pädiatrischen Kohorten zur Evaluation des GMI als Surrogatmarker für Outcome und Therapieansprechen bei Kindern. Wichtige offene Fragen beinhalten zudem die Ermittlung bestimmter Grenzwerte, das prädiktive Potential des frühen GMI-Verlaufs (Han et al., 2015, Chai et al., 2012, Kovanda et al., 2017) sowie den Einfluss von hepatischer/renalener Elimination (Bennett et al., 1987, El Saleeby et al., 2005) und die antifungale Therapie auf die Kinetik des GMI (Petraitiene et al., 2001, Leeflang et al., 2015).

3. Ausblick

Die Diagnostik der IA stellt weiterhin, insbesondere aufgrund der spärlichen Datenlage im pädiatrischen Kontext, eine Herausforderung dar. Die vorliegende Arbeit bietet einen Einblick in die diagnostischen Möglichkeiten, die das kombinierte Biomarkerscreening bietet. Aufgrund der geringen Anzahl an Studienpatienten sind weiterführende Studien nötig um aufbauend auf den Ergebnissen und Daten unserer Studie den Einsatz des kombinierten Biomarkerscreenings in größeren pädiatrischen Hochrisikopopulationen zu validieren und den potentiellen Nutzen als „Frühwarnsystem“ weiter zu evaluieren. Ebenso sollte der Effekt von Aspergillus-wirksamer antifungaler Prophylaxe bzw. empirischer Therapie auf die diagnostische Genauigkeit der Biomarker bei Kindern sowie der Einsatz des GMI als Surrogatmarker für Therapieansprechen und Outcome in größeren multizentrischen Studien weiter untersucht werden. Dieses Wissen könnte weitreichende klinische Implikationen für den Therapiebeginn, die Therapiesteuerung, den Einsatz von Prophylaktika und die Mortaliätsrate haben.

Obwohl die Kombination von bereits vorhandenen diagnostischen Methoden die diagnostische Genauigkeit erhöht, sind neue diagnostische Hilfsmittel notwendig. Die Klinik für Innere Medizin plant mit der Kinderklinik der Universität Würzburg eine Studie für immunologische Tests. Diese Biomarker sollen ähnlich dem Quantiferontest (Tuberkulose) die Aspergillus-spezifische T-Zell-Wirtsantwort detektieren (Loeffler, Bacher et al., 2015).

Hoenigl et al., 2018 sowie Heldt and Hoenigl, 2017 konnten zudem in ihren Erwachsenenstudien gute Daten für einen Aspergillus-spezifischen Lateralfluss-Immunoassay aufzeigen. Dieser detektiert ein extrazelluläres Glykoproteinantigen, welches in der aktiven Wachstumsphase von Aspergillus spp. sezerniert wird, und könnte als Schnelltest und Bedside-Test angewandt werden. Eine Validierung in pädiatrischen Populationen steht noch aus.

E Zusammenfassung

Die Invasive Aspergillose (IA) stellt eine Hauptursache der infektassoziierten Morbidität und Mortalität bei pädiatrischen Patienten mit hämato-onkologischer Grunderkrankung und/oder allogener Stammzelltransplantation dar. Die sichere und frühzeitige Diagnose ist bei Kindern aufgrund spärlicher pädiatrischer Daten weiterhin eine klinische Herausforderung. Die Kombination der Biomarker Galactomannanantigen und Aspergillus DNA hat sich in Erwachsenenstudien als vorteilhaft in der Diagnose der IA erwiesen. Ziel der durchgeführten Studie war daher, die diagnostische Güte des kombinierten Biomarkerscreenings in einer pädiatrischen Hochrisikokohorte zu ermitteln.

Hierfür wurden 39 pädiatrische Patienten, die während eines Zeitraumes von drei Jahren aufgrund einer hämato-onkologischen Grunderkrankung und Notwendigkeit einer Stammzelltransplantation in der Würzburger Kinderklinik behandelt wurden, einem hochstandardisierten, zweimal wöchentlichen Screening auf Galactomannanantigen und fungaler DNA zugeführt. Zusätzlich wurde für jeden Patienten ein breites Spektrum an klinischen Daten sowie mikrobiologischen und radiologischen Ergebnissen erfasst und die IA-Klassifikation nach den EORTC/MSG-Kriterien durchgeführt.

Unsere Daten zeigten eine IA-Inzidenz (probable IA) von 10%, was per definitionem einer Hochrisikokohorte entspricht. Das kombinierte Monitoring der Biomarker Galactomannanantigen und Aspergillus-DNA wies eine hohe diagnostische Genauigkeit mit einer Sensitivität/Spezifität/PPV/NPV von 1.00 und gute Eignung als Screeningtest auf. Die antifungale Prophylaxe zeigte keinen negativen Einfluss auf die diagnostischen Gütekriterien der beiden Biomarker, wie in anderen Studien postuliert. Der Galactomannanindex erwies sich als vielversprechender Surrogatmarker für das Outcome und das Therapieansprechen.

Weiterführende Studien sind notwendig, um festzulegen, ob die Biomarkerkombination eine Detektion asymptomatischer subklinischer Infektionen als eine Art „Frühwarnsystem“ ermöglicht und somit eine Reduktion der Mortalität bedingen kann.

F Literaturverzeichnis

- ABBASI, S., SHENEP, J. L., HUGHES, W. T. & FLYNN, P. M. 1999. Aspergillosis in children with cancer: A 34-year experience. *Clin Infect Dis*, 29, 1210-9.
- AGUADO, J. M., VAZQUEZ, L., FERNANDEZ-RUIZ, M., VILLAESCUSA, T., RUIZ-CAMPS, I., BARBA, P., SILVA, J. T., BATLLE, M., SOLANO, C., GALLARDO, D., HERAS, I., POLO, M., VARELA, R., VALLEJO, C., OLAVE, T., LOPEZ-JIMENEZ, J., ROVIRA, M., PARODY, R. & CUENCA-ESTRELLA, M. 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.
- AMBASTA, A., CARSON, J. & CHURCH, D. L. 2015. The use of biomarkers and molecular methods for the earlier diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Med Mycol*, 53, 531-57.
- ANAISSIE, E. J. 2007. Trial design for mold-active agents: time to break the mold-aspergillosis in neutropenic adults. *Clin Infect Dis*, 44, 1298-306.
- ANANTASIT, N., NUNTACHARRUKSA, N., INCHAROEN, P. & PREUTTHIPAN, A. 2018. Clinical and Pathological Correlation in Pediatric Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Front Pediatr*, 6, 31.
- ANSORG, R., VAN DEN BOOM, R. & RATH, P. M. 1997. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses*, 40, 353-7.
- ARMENIAN, S. H., NASH, K. A., KAPOOR, N., FRANKLIN, J. L., GAYNON, P. S., ROSS, L. A. & HOFFMAN, J. A. 2009. Prospective monitoring for invasive aspergillosis using galactomannan and polymerase chain reaction in high risk pediatric patients. *J Pediatr Hematol Oncol*, 31, 920-6.
- ARVANITIS, M., ZIAKAS, P. D., ZACHARIOUDAKIS, I. M., ZERVOU, F. N., CALIENDO, A. M. & MYLONAKIS, E. 2014. PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance. *J Clin Microbiol*, 52, 3731-42.
- AUBRY, A., PORCHER, R., BOTTERO, J., TOURATIER, S., LEBLANC, T., BRETHON, B., ROUSSELOT, P., RAFFOUX, E., MENOTTI, J., DEROUIN, F., RIBAUD, P. & SULAHIAN, A. 2006. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol*, 44, 389-94.
- BACHER, P., STEINBACH, A., KNIEMEYER, O., HAMPRECHT, A., ASSENMACHER, M., VEHRESCHILD, M. J., VEHRESCHILD, J. J., BRAKHAGE, A. A., CORNELLY, O. A. & SCHEFFOLD, A. 2015. Fungus-specific CD4(+) T cells for rapid identification of invasive pulmonary mold infection. *Am J Respir Crit Care Med*, 191, 348-52.
- BADIEE, P., ALBORZI, A., KARIMI, M., POURABBAS, B., HADDADI, P., MARDANEH, J. & MOIENI, M. 2012. Diagnostic potential of nested PCR, galactomannan EIA, and beta-D-glucan for invasive aspergillosis in pediatric patients. *J Infect Dev Ctries*, 6, 352-7.
- BALLOY, V., HUERRE, M., LATGE, J. P. & CHIGNARD, M. 2005. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and

- chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun*, 73, 494-503.
- BECKER, M. J., DE MARIE, S., FENS, M. H., VERBRUGH, H. A. & BAKKER-WOUDENBERG, I. A. 2003. Effect of amphotericin B treatment on kinetics of cytokines and parameters of fungal load in neutropenic rats with invasive pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother*, 52, 428-34.
- BEN-AMI, R., LEWIS, R. E. & KONTOYIANNIS, D. P. 2010. Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *Br J Haematol*, 150, 406-17.
- BENNETT, J. E., FRIEDMAN, M. M. & DUPONT, B. 1987. Receptor-mediated clearance of *Aspergillus galactomannan*. *J Infect Dis*, 155, 1005-10.
- BENNETT, J. W. 2009. *Aspergillus*: a primer for the novice. *Med Mycol*, 47 Suppl 1, S5-12.
- BIALEK, R., MOSHOUS, D., CASANOVA, J. L., BLANCHE, S. & HENNEQUIN, C. 2002. *Aspergillus* antigen and PCR assays in bone marrow transplanted children. *Eur J Med Res*, 7, 177-80.
- BOSSUYT, P. M., REITSMA, J. B., BRUNS, D. E., GATSONIS, C. A., GLASZIOU, P. P., IRWIG, L., LIJMER, J. G., MOHER, D., RENNIE, D., DE VET, H. C., KRESSEL, H. Y., RIFAI, N., GOLUB, R. M., ALTMAN, D. G., HOOFT, L., KOREVAAR, D. A. & COHEN, J. F. 2015. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *Bmj*, 351, h5527.
- BUCHHEIDT, D., REINWALD, M., SPIESS, B., BOCH, T., HOFMANN, W. K., GROLL, A. H. & LEHRNBECHER, T. 2016. Biomarker-based diagnostic work-up of invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised paediatric patients--is *Aspergillus* PCR appropriate? *Mycoses*, 59, 67-74.
- BURGOS, A., ZAOUTIS, T. E., DVORAK, C. C., HOFFMAN, J. A., KNAPP, K. M., NANIA, J. J., PRASAD, P. & STEINBACH, W. J. 2008. Pediatric invasive aspergillosis: a multicenter retrospective analysis of 139 contemporary cases. *Pediatrics*, 121, e1286-94.
- CAILLOT, D., CASASNOVAS, O., BERNARD, A., COUAILLIER, J. F., DURAND, C., CUISENIER, B., SOLARY, E., PIARD, F., PETRELLA, T., BONNIN, A., COUILLAULT, G., DUMAS, M. & GUY, H. 1997. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol*, 15, 139-47.
- CAILLOT, D., COUAILLIER, J. F., BERNARD, A., CASASNOVAS, O., DENNING, D. W., MANNONE, L., LOPEZ, J., COUILLAULT, G., PIARD, F., VAGNER, O. & GUY, H. 2001. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J Clin Oncol*, 19, 253-9.
- CASADEVALL, A. & PIROFSKI, L. A. 2003. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 1, 17-24.
- CASELLI, D., CESARO, S., ZIINO, O., RAGUSA, P., PONTILLO, A., PEGORARO, A., SANTORO, N., ZANAZZO, G., POGGI, V., GIACCHINO, M., LIVADIOTTI, S., MELCHIONDA, F., CHIODI, M. & ARICÒ, M. 2012. A prospective, randomized study of empirical antifungal therapy for the treatment of chemotherapy-induced febrile neutropenia in children. *Br J Haematol*, 158, 249-255.

- CDC, C. F. D. C. A. P. 2019. *Aspergillus fumigatus*. In: STATES, A. R. T. I. T. U. (ed.). Center for Disease Control and Prevention (CDC).
- CHAI, L. Y., KULLBERG, B. J., JOHNSON, E. M., TEERENSTRA, S., KHIN, L. W., VONK, A. G., MAERTENS, J., LORTHOLARY, O., DONNELLY, P. J., SCHLAMM, H. T., TROKE, P. F., NETEA, M. G. & HERBRECHT, R. 2012. Early serum galactomannan trend as a predictor of outcome of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*, 50, 2330-6.
- CHALLIER, S., BOYER, S., ABACHIN, E. & BERCHE, P. 2004. Development of a serum-based Taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*, 42, 844-6.
- CHOI, S. H., KANG, E. S., EO, H., YOO, S. Y., KIM, J. H., YOO, K. H., SUNG, K. W., KOO, H. H. & KIM, Y. J. 2013. *Aspergillus* galactomannan antigen assay and invasive aspergillosis in pediatric cancer patients and hematopoietic stem cell transplant recipients. *Pediatr Blood Cancer*, 60, 316-22.
- CORDONNIER, C., RIBAUD, P., HERBRECHT, R., MILPIED, N., VALTEAU-COUANET, D., MORGAN, C. & WADE, A. 2006. Prognostic factors for death due to invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year retrospective study of consecutive patients at French transplantation centers. *Clin Infect Dis*, 42, 955-63.
- CORDONNIER, C., ROBIN, C., ALANIO, A. & BRETAGNE, S. 2014. Antifungal preemptive strategy for high-risk neutropenic patients: why the story is still ongoing. *Clin Microbiol Infect*, 20 Suppl 6, 27-35.
- CORNELY, O. A., HOENIGL, M., LASS-FLÖRL, C., CHEN, S. C., KONTOYIANNIS, D. P., MORRISSEY, C. O. & THOMPSON, G. R., 3RD 2019. Defining breakthrough invasive fungal infection-Position paper of the mycoses study group education and research consortium and the European Confederation of Medical Mycology. *Mycoses*, 62, 716-729.
- CUENCA-ESTRELLA, M., MEIJE, Y., DIAZ-PEDROCHE, C., GOMEZ-LOPEZ, A., BUITRAGO, M. J., BERNAL-MARTINEZ, L., GRANDE, C., JUAN, R. S., LIZASOAIN, M., RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. & AGUADO, J. M. 2009. Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive Aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *J Clin Microbiol*, 47, 379-84.
- DE PAUW, B., WALSH, T. J., DONNELLY, J. P., STEVENS, D. A., EDWARDS, J. E., CALANDRA, T., PAPPAS, P. G., MAERTENS, J., LORTHOLARY, O., KAUFFMAN, C. A., DENNING, D. W., PATTERSON, T. F., MASCHMEYER, G., BILLE, J., DISMUKES, W. E., HERBRECHT, R., HOPE, W. W., KIBBLER, C. C., KULLBERG, B. J., MARR, K. A., MUNOZ, P., ODDS, F. C., PERFECT, J. R., RESTREPO, A., RUHNKE, M., SEGAL, B. H., SOBEL, J. D., SORRELL, T. C., VISCOLI, C., WINGARD, J. R., ZAOUTIS, T. & BENNETT, J. E. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*, 46, 1813-21.
- DIETTERICH, T. G. Ensemble methods in machine learning. International workshop on multiple classifier systems, 2000. Springer, 1-15.
- DIGNANI, M. C. 2014. Epidemiology of invasive fungal diseases on the basis of autopsy reports. *F1000Prime Rep*, 6, 81.

- DINAND, V., ANJAN, M., OBEROI, J. K., KHANNA, S., YADAV, S. P., WATTAL, C. & SACHDEVA, A. 2016. Threshold of galactomannan antigenemia positivity for early diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic children. *J Microbiol Immunol Infect*, 49, 66-73.
- DOTIS, J., IOSIFIDIS, E. & ROILIDES, E. 2007. Central nervous system aspergillosis in children: a systematic review of reported cases. *Int J Infect Dis*, 11, 381-93.
- DUARTE, R. F., SÁNCHEZ-ORTEGA, I., CUESTA, I., ARNAN, M., PATIÑO, B., FERNÁNDEZ DE SEVILLA, A., GUDIOL, C., AYATS, J. & CUENCA-ESTRELLA, M. 2014. Serum galactomannan-based early detection of invasive aspergillosis in hematology patients receiving effective antimold prophylaxis. *Clin Infect Dis*, 59, 1696-702.
- DVORAK, C. C., STEINBACH, W. J., BROWN, J. M. & AGARWAL, R. 2005. Risks and outcomes of invasive fungal infections in pediatric patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 36, 621-9.
- EINSELE, H., HEBART, H., ROLLER, G., LÖFFLER, J., ROTHENHOFER, I., MÜLLER, C. A., BOWDEN, R. A., VAN BURIK, J., ENGELHARD, D., KANZ, L. & SCHUMACHER, U. 1997. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol*, 35, 1353-60.
- EINSELE, H. & LOEFFLER, J. 2008. Contribution of new diagnostic approaches to antifungal treatment plans in high-risk haematology patients. *Clin Microbiol Infect*, 14 Suppl 4, 37-45.
- EL SALEEBY, C. M., ALLISON, K. J., KNAPP, K. M., WALSH, T. J. & HAYDEN, R. T. 2005. Discordant rise in galactomannan antigenemia in a patient with resolving Aspergillosis, renal failure, and ongoing hemodialysis. *J Clin Microbiol*, 43, 3560-3.
- EL-MAHALLAWY, H. A., SHAKER, H. H., ALI HELMY, H., MOSTAFA, T. & RAZAK ABO-SEDAH, A. 2006. Evaluation of pan-fungal PCR assay and Aspergillus antigen detection in the diagnosis of invasive fungal infections in high risk paediatric cancer patients. *Med Mycol*, 44, 733-9.
- ELLENBERG, S. S. 1989. Biostatistics in clinical trials: Part 2. Determining sample sizes for clinical trials. *Oncology (Williston Park)*, 3, 39-46; discussion 48, 51.
- FISHER, B. T., ROBINSON, P. D., LEHRNBECHER, T., STEINBACH, W. J., ZAOUTIS, T. E., PHILLIPS, B. & SUNG, L. 2018. Risk Factors for Invasive Fungal Disease in Pediatric Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Systematic Review. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 7, 191-198.
- FISHER, B. T., ZAOUTIS, T. E., PARK, J. R., BLEAKLEY, M., ENGLUND, J. A., KANE, C., ARCECI, R. J., GUINAN, E., SMITH, F. O., LUAN, X. & MARR, K. A. 2012. Galactomannan Antigen Testing for Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Pediatric Hematology Patients. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 1, 103-11.
- FRANCIS, P., LEE, J. W., HOFFMAN, A., PETER, J., FRANCESCONI, A., BACHER, J., SHELFHAMER, J., PIZZO, P. A. & WALSH, T. J. 1994. Efficacy of unilamellar liposomal amphotericin B in treatment of pulmonary aspergillosis in persistently granulocytopenic rabbits: the potential role of bronchoalveolar D-mannitol and serum galactomannan as markers of infection. *J Infect Dis*, 169, 356-68.

- GANGNEUX, J. P., LAVARDE, D., BRETAGNE, S., GUIGUEN, C. & GANDEMER, V. 2002. Transient aspergillus antigenaemia: think of milk. *Lancet*, 359, 1251.
- GAVALDA, J., LEN, O., SAN JUAN, R., AGUADO, J. M., FORTUN, J., LUMBRERAS, C., MORENO, A., MUNOZ, P., BLANES, M., RAMOS, A., RUFÍ, G., GURGUI, M., TORRE-CISNEROS, J., MONTEJO, M., CUENCA-ESTRELLA, M., RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. & PAHISSA, A. 2005. Risk factors for invasive aspergillosis in solid-organ transplant recipients: a case-control study. *Clin Infect Dis*, 41, 52-9.
- GEFEN, A., ZAIDMAN, I., SHACHOR-MEYOUHAS, Y., AVIDOR, I., HAKIM, F., WEYL BEN-ARUSH, M. & KASSIS, I. 2015. Serum galactomannan screening for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in children after stem cell transplantation or with high-risk leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*, 32, 146-52.
- GEFTER, W. B., ALBELDA, S. M., TALBOT, G. H., GERSON, S. L., CASSILETH, P. A. & MILLER, W. T. 1985. Invasive pulmonary aspergillosis and acute leukemia. Limitations in the diagnostic utility of the air crescent sign. *Radiology*, 157, 605-10.
- GEORGIADOU, S. P., PONGAS, G., FITZGERALD, N. E., LEWIS, R. E., RYTTING, M., MAROM, E. M. & KONTOYIANNIS, D. P. 2012. Invasive Mold Infections in Pediatric Cancer Patients Reflect Heterogeneity in Etiology, Presentation, and Outcome: A 10-Year, Single-Institution, Retrospective Study. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 1, 125-35.
- GERSON, S. L., TALBOT, G. H., HURWITZ, S., STROM, B. L., LUSK, E. J. & CASSILETH, P. A. 1984. Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med*, 100, 345-51.
- GERSUK, G. M., UNDERHILL, D. M., ZHU, L. & MARR, K. A. 2006. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol*, 176, 3717-24.
- GOLDBERG, E., GAFTER-GVILI, A., ROBENSHTOK, E., LEIBOVICI, L. & PAUL, M. 2008. Empirical antifungal therapy for patients with neutropenia and persistent fever: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*, 44, 2192-203.
- GONZALEZ, A. V., ULLMANN, A. J., ALMYROUDIS, N. G. & SEGAL, B. H. 2008. Broad-spectrum antifungal prophylaxis in patients with cancer at high risk for invasive mold infections: point. *J Natl Compr Canc Netw*, 6, 175-82.
- GROLL, A. H., CASTAGNOLA, E., CESARO, S., DALLE, J. H., ENGELHARD, D., HOPE, W., ROILIDES, E., STYCZYNSKI, J., WARRIS, A. & LEHRNBECHER, T. 2014. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis, prevention, and treatment of invasive fungal diseases in paediatric patients with cancer or allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation. *Lancet Oncol*, 15, e327-40.
- GROLL, A. H., KURZ, M., SCHNEIDER, W., WITT, V., SCHMIDT, H., SCHNEIDER, M. & SCHWABE, D. 1999. Five-year-survey of invasive aspergillosis in a paediatric cancer centre. Epidemiology, management and long-term survival. *Mycoses*, 42, 431-42.
- GROUP, B. D. W. 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*, 69, 89-95.

- GUO, Y. L., CHEN, Y. Q., WANG, K., QIN, S. M., WU, C. & KONG, J. L. 2010. Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. *Chest*, 138, 817-24.
- GUPTA, P., AHMAD, A., KHARE, V., KUMAR, A., BANERJEE, G., VERMA, N. & SINGH, M. 2017. Comparative evaluation of pan-fungal real-time PCR, galactomannan and (1-3)- β -D-glucan assay for invasive fungal infection in paediatric cancer patients. *Mycoses*, 60, 234-240.
- HADJILIADIS, D., SPORN, T. A., PERFECT, J. R., TAPSON, V. F., DAVIS, R. D. & PALMER, S. M. 2002. Outcome of lung transplantation in patients with mycetomas. *Chest*, 121, 128-34.
- HAHN, F., KAUFFMANN, ULLMANN 2005. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Heidelberg, Springer Medizin Verlag.
- HALE, K. A., SHAW, P. J., DALLA-POZZA, L., MACINTYRE, C. R., ISAACS, D. & SORRELL, T. C. 2010. Epidemiology of paediatric invasive fungal infections and a case-control study of risk factors in acute leukaemia or post stem cell transplant. *Br J Haematol*, 149, 263-72.
- HAN, S. B., KIM, S. K., LEE, J. W., YOON, J. S., CHUNG, N. G., CHO, B., JEONG, D. C., KANG, J. H., KIM, H. K., LEE, D. G., LEE, H. S. & IM, S. A. 2015. Serum galactomannan index for early prediction of mortality in immunocompromised children with invasive pulmonary aspergillosis. *BMC Infect Dis*, 15, 271.
- HARRISON, E., STALHBERGER, T., WHELAN, R., SUGRUE, M., WINGARD, J. R., ALEXANDER, B. D., FOLLETT, S. A., BOWYER, P. & DENNING, D. W. 2010. Aspergillus DNA contamination in blood collection tubes. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 67, 392-4.
- HAYDEN, R. T., ISOTALO, P. A., PARRETT, T., WOLK, D. M., QIAN, X., ROBERTS, G. D. & LLOYD, R. V. 2003. In situ hybridization for the differentiation of Aspergillus, Fusarium, and Pseudallescheria species in tissue section. *Diagn Mol Pathol*, 12, 21-6.
- HEALTH, U. S. D. O., HUMAN SERVICES, F. & DRUG, A. 2004. Innovation or stagnation? Challenge and opportunity on the critical path to new medical products.
<http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/CriticalPathInitiative/CriticalPathOpportunitiesReports/ucm077262.htm> Accessed July 19, 2010.
- HELDT, S. & HOENIGL, M. 2017. Lateral Flow Assays for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis: Current Status. *Curr Fungal Infect Rep*, 11, 45-51.
- HENG, S. C., CHEN, S. C., MORRISSEY, C. O., THURSKY, K., MANSER, R. L., DE SILVA, H. D., HALLIDAY, C. L., SEYMOUR, J. F., NATION, R. L., KONG, D. C. & SLAVIN, M. A. 2014. Clinical utility of Aspergillus galactomannan and PCR in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with haematological malignancies. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 79, 322-7.
- HERBRECHT, R., DENNING, D. W., PATTERSON, T. F., BENNETT, J. E., GREENE, R. E., OESTMANN, J. W., KERN, W. V., MARR, K. A., RIBAUD, P., LORTHOLARY, O., SYLVESTER, R., RUBIN, R. H., WINGARD, J. R., STARK, P., DURAND, C., CAILLOT, D., THIEL, E., CHANDRASEKAR, P. H., HODGES, M. R., SCHLAMM, H. T., TROKE, P. F. & DE PAUW, B. 2002a. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med*, 347, 408-15.

- HERBRECHT, R., LETSCHER-BRU, V., OPREA, C., LIOURE, B., WALLER, J., CAMPOS, F., VILLARD, O., LIU, K. L., NATARAJAN-AMÉ, S., LUTZ, P., DUFOUR, P., BERGERAT, J. P. & CANDOLFI, E. 2002b. Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol*, 20, 1898-906.
- HERKNER, H. & MÜLLNER, M. 2011. *Wissenschaftlich arbeiten in der Klinik*, Germany, Springer-Verlag/Wien.
- HEROLD, G. (ed.) 2014. *Innere Medizin : eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*, Köln: Herold.
- HOENIGL, M., EIGL, S., HELDT, S., DUETTMANN, W., THORNTON, C. & PRATTES, J. 2018. Clinical evaluation of the newly formatted lateral-flow device for invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses*, 61, 40-43.
- HOHL, T. M., VAN EPPS, H. L., RIVERA, A., MORGAN, L. A., CHEN, P. L., FELDMESSER, M. & PAMER, E. G. 2005. Aspergillus fumigatus triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathog*, 1, e30.
- HOL, J. A., WOLFS, T. F., BIERINGS, M. B., LINDEMANS, C. A., VERSLUYS, A. B., WILDT DE, A., GERHARDT, C. E. & BOELEN, J. J. 2014. Predictors of invasive fungal infection in pediatric allogeneic hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant*, 49, 95-101.
- HOVI, L., SAARINEN-PIHKALA, U. M., VETTENRANTA, K. & SAXEN, H. 2000. Invasive fungal infections in pediatric bone marrow transplant recipients: single center experience of 10 years. *Bone Marrow Transplant*, 26, 999-1004.
- HOVI, L., SAXEN, H., SAARINEN-PIHKALA, U. M., VETTENRANTA, K., MERI, T. & RICHARDSON, M. 2007. Prevention and monitoring of invasive fungal infections in pediatric patients with cancer and hematologic disorders. *Pediatr Blood Cancer*, 48, 28-34.
- HUMMEL, M., SPIESS, B., CORNELLY, O. A., DITTMER, M., MÖRZ, H. & BUCHHEIDT, D. 2010. Aspergillus PCR testing: results from a prospective PCR study within the AmBiLoad trial. *Eur J Haematol*, 85, 164-9.
- HUMMEL, M., SPIESS, B., RODER, J., VON KOMOROWSKI, G., DÜRKEN, M., KENTOUCHE, K., LAWS, H. J., MÖRZ, H., HEHLMANN, R. & BUCHHEIDT, D. 2009. Detection of Aspergillus DNA by a nested PCR assay is able to improve the diagnosis of invasive aspergillosis in paediatric patients. *J Med Microbiol*, 58, 1291-1297.
- HUPPLER, A. R., FISHER, B. T., LEHRNBECHER, T., WALSH, T. J. & STEINBACH, W. J. 2017. Role of Molecular Biomarkers in the Diagnosis of Invasive Fungal Diseases in Children. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 6, S32-s44.
- JHA, A. K., BANSAL, D., CHAKRABARTI, A., SHIVAPRAKASH, M. R., TREHAN, A. & MARWAHA, R. K. 2013. Serum galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis in children with haematological malignancies. *Mycoses*, 56, 442-8.
- JOHNSTON, D. L., LEWIS, V., YANOFSKY, R., GILLMEISTER, B., ETHIER, M. C., MITCHELL, D., CELLOT, S., DIX, D., PORTWINE, C., PRICE, V., SILVA, M., ZELCER, S., MICHON, B., BOWES, L., STOBART, K., BROSSARD, J., BEYENE, J. & SUNG, L. 2013. Invasive fungal infections in paediatric acute myeloid leukaemia. *Mycoses*, 56, 482-7.

- KARTHAUS, M. & BUCHHEIDT, D. 2013. Invasive aspergillosis: new insights into disease, diagnostic and treatment. *Curr Pharm Des*, 19, 3569-94.
- KOLTZE, A., RATH, P., SCHONING, S., STEINMANN, J., WICHELHAUS, T. A., BADER, P., BOCHENNEK, K. & LEHRNBECHER, T. 2015. beta-D-Glucan Screening for Detection of Invasive Fungal Disease in Children Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Clin Microbiol*, 53, 2605-10.
- KONTOYIANNIS, D. P., SUMOZA, D., TARRAND, J., BODEY, G. P., STOREY, R. & RAAD, II 2000. Significance of aspergillemia in patients with cancer: a 10-year study. *Clin Infect Dis*, 31, 188-9.
- KOVANDA, L. L., KOLAMUNNAGE-DONA, R., NEELY, M., MAERTENS, J., LEE, M. & HOPE, W. W. 2017. Pharmacodynamics of Isavuconazole for Invasive Mold Disease: Role of Galactomannan for Real-Time Monitoring of Therapeutic Response. *Clin Infect Dis*, 64, 1557-1563.
- LAFaurIE, M., LAPALU, J., RAFFOUX, E., BRETON, B., LACROIX, C., SOCIÉ, G., PORCHER, R., RIBAUD, P., TOURATIER, S. & MOLINA, J. M. 2010. High rate of breakthrough invasive aspergillosis among patients receiving caspofungin for persistent fever and neutropenia. *Clin Microbiol Infect*, 16, 1191-6.
- LAI, H. P., CHEN, Y. C., CHANG, L. Y., LU, C. Y., LEE, C. Y., LIN, K. H. & HUANG, L. M. 2005. Invasive fungal infection in children with persistent febrile neutropenia. *J Formos Med Assoc*, 104, 174-9.
- LAMOTH, F., CRUCIANI, M., MENGOLI, C., CASTAGNOLA, E., LORTHOLARY, O., RICHARDSON, M. & MARCHETTI, O. 2012. beta-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis*, 54, 633-43.
- LASS-FLÖRL, C., AIGNER, J., GUNSILIUS, E., PETZER, A., NACHBAUR, D., GASTL, G., EINSELE, H., LÖFFLER, J., DIERICH, M. P. & WÜRZNER, R. 2001. Screening for *Aspergillus* spp. using polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with haematological malignancies. *Br J Haematol*, 113, 180-4.
- LASS-FLÖRL, C., GUNSILIUS, E., GASTL, G., BONATTI, H., FREUND, M. C., GSCHWENDTNER, A., KROPSHOFER, G., DIERICH, M. P. & PETZER, A. 2004. Diagnosing invasive aspergillosis during antifungal therapy by PCR analysis of blood samples. *J Clin Microbiol*, 42, 4154-7.
- LATGE, J. P., KOBAYASHI, H., DEBEAUPUIS, J. P., DIAQUIN, M., SARFATI, J., WIERUSZESKI, J. M., PARRA, E., BOUCHARA, J. P. & FOURNET, B. 1994. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*, 62, 5424-33.
- LEEFLANG, M. M., DEBETS-OSENKOPP, Y. J., WANG, J., VISSER, C. E., SCHOLTEN, R. J., HOOFT, L., BIJLMER, H. A., REITSMA, J. B., ZHANG, M., BOSSUYT, P. M. & VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. 2015. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst Rev*, Cd007394.
- LEHRNBECHER, T. 2015. Antifungal prophylaxis in pediatric patients undergoing therapy for cancer: drugs and dosing. *Curr Opin Infect Dis*, 28, 523-31.

- LEHRNBECHER, T., ETHIER, M. C., ZAOUTIS, T., CREUTZIG, U., GAMIS, A., REINHARDT, D., APLENC, R. & SUNG, L. 2009. International variations in infection supportive care practices for paediatric patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 147, 125-8.
- LEHRNBECHER, T., HASSLER, A., GROLL, A. H. & BOCHENNEK, K. 2018. Diagnostic Approaches for Invasive Aspergillosis-Specific Considerations in the Pediatric Population. *Front Microbiol*, 9, 518.
- LEHRNBECHER, T., ROBINSON, P., FISHER, B., ALEXANDER, S., AMMANN, R. A., BEAUCHEMIN, M., CARLESSE, F., GROLL, A. H., HAEUSLER, G. M., SANTOLAYA, M., STEINBACH, W. J., CASTAGNOLA, E., DAVIS, B. L., DUPUIS, L. L., GAUR, A. H., TISSING, W. J. E., ZAOUTIS, T., PHILLIPS, R. & SUNG, L. 2017. Guideline for the Management of Fever and Neutropenia in Children With Cancer and Hematopoietic Stem-Cell Transplantation Recipients: 2017 Update. *J Clin Oncol*, 35, 2082-2094.
- LEHRNBECHER, T., ROBINSON, P. D., FISHER, B. T., CASTAGNOLA, E., GROLL, A. H., STEINBACH, W. J., ZAOUTIS, T. E., NEGERI, Z. F., BEYENE, J., PHILLIPS, B. & SUNG, L. 2016. Galactomannan, beta-D-Glucan, and Polymerase Chain Reaction-Based Assays for the Diagnosis of Invasive Fungal Disease in Pediatric Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Infect Dis*, 63, 1340-1348.
- LEROUX, S. & ULLMANN, A. J. 2013. Management and diagnostic guidelines for fungal diseases in infectious diseases and clinical microbiology: critical appraisal. *Clin Microbiol Infect*, 19, 1115-21.
- LESTNER, J. M., VERSPORTEN, A., DOERHOLT, K., WARRIS, A., ROILIDES, E., SHARLAND, M., BIELICKI, J. & GOOSSENS, H. 2015. Systemic antifungal prescribing in neonates and children: outcomes from the Antibiotic Resistance and Prescribing in European Children (ARPEC) Study. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 782-9.
- LIONAKIS, M. S., LEWIS, R. E. & KONTOYIANNIS, D. P. 2018. Breakthrough Invasive Mold Infections in the Hematology Patient: Current Concepts and Future Directions. *Clin Infect Dis*, 67, 1621-1630.
- LOEFFLER, J. *MANASP - Development of novel management strategies for invasive aspergillosis* [Online]. Available: <http://www.manasp.org> [Accessed].
- LOEFFLER, J., HAFNER, J., MENGOLI, C., WIRTH, C., HEUSSEL, C. P., LOFFLER, C., WHITE, P. L., ULLMANN, A. J., MICHEL, D., WIEGERING, V., WOLFL, M., SCHLEGEL, P. G., EINSELE, H., SPRINGER, J. & EYRICH, M. 2017. Prospective Biomarker Screening for Diagnosis of Invasive Aspergillosis in High-Risk Pediatric Patients. *J Clin Microbiol*, 55, 101-109.
- MACESIC, N., MORRISSEY, C. O., LIEW, D., BOHENSKY, M. A., CHEN, S. C., GILROY, N. M., MILLIKEN, S. T., SZER, J. & SLAVIN, M. A. 2017. Is a biomarker-based diagnostic strategy for invasive aspergillosis cost effective in high-risk haematology patients? *Med Mycol*, 55, 705-712.
- MADUREIRA, A., BERGERON, A., LACROIX, C., ROBIN, M., ROCHA, V., DE LATOUR, R. P., FERRY, C., DEVERGIE, A., LAPALU, J., GLUCKMANA, E., SOCIÉ, G., GHANNOUM, M. & RIBAUD, P. 2007. Breakthrough invasive aspergillosis in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients treated with caspofungin. *Int J Antimicrob Agents*, 30, 551-4.

- MAERTENS, J., BUVE, K. & ANAISSIE, E. 2008. Broad-spectrum antifungal prophylaxis in patients with cancer at high risk for invasive mold infections: counterpoint. *J Natl Compr Canc Netw*, 6, 183-9.
- MAERTENS, J., BUVE, K., THEUNISSEN, K., MEERSSEMAN, W., VERBEKEN, E., VERHOEF, G., VAN ELDERE, J. & LAGROU, K. 2009. Galactomannan serves as a surrogate endpoint for outcome of pulmonary invasive aspergillosis in neutropenic hematology patients. *Cancer*, 115, 355-62.
- MAERTENS, J., MARCHETTI, O., HERBRECHT, R., CORNELLY, O. A., FLUCKIGER, U., FRERE, P., GACHOT, B., HEINZ, W. J., LASS-FLORL, C., RIBAUD, P., THIEBAUT, A. & CORDONNIER, C. 2011. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3--2009 update. *Bone Marrow Transplant*, 46, 709-18.
- MAERTENS, J., RAAD, I., PETRIKKOS, G., BOOGAERTS, M., SELLESLAG, D., PETERSEN, F. B., SABLE, C. A., KARTSONIS, N. A., NGAI, A., TAYLOR, A., PATTERSON, T. F., DENNING, D. W. & WALSH, T. J. 2004. Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis in patients refractory to or intolerant of conventional antifungal therapy. *Clin Infect Dis*, 39, 1563-71.
- MAERTENS, J., THEUNISSEN, K., VERHOEF, G., VERSCHAKELEN, J., LAGROU, K., VERBEKEN, E., WILMER, A., VERHAEGEN, J., BOOGAERTS, M. & VAN ELDERE, J. 2005. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis*, 41, 1242-50.
- MAERTENS, J., VAN ELDERE, J., VERHAEGEN, J., VERBEKEN, E., VERSCHAKELEN, J. & BOOGAERTS, M. 2002. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis*, 186, 1297-306.
- MAERTENS, J. A., KLONT, R., MASSON, C., THEUNISSEN, K., MEERSSEMAN, W., LAGROU, K., HEINEN, C., CREPIN, B., VAN ELDERE, J., TABOURET, M., DONNELLY, J. P. & VERWEIJ, P. E. 2007. Optimization of the cutoff value for the Aspergillus double-sandwich enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis*, 44, 1329-36.
- MAERTENS, J. A., MADERO, L., REILLY, A. F., LEHRNBECHER, T., GROLL, A. H., JAFRI, H. S., GREEN, M., NANIA, J. J., BOURQUE, M. R., WISE, B. A., STROHMAIER, K. M., TAYLOR, A. F., KARTSONIS, N. A., CHOW, J. W., ARNDT, C. A., DEPAUW, B. E. & WALSH, T. J. 2010. A randomized, double-blind, multicenter study of caspofungin versus liposomal amphotericin B for empiric antifungal therapy in pediatric patients with persistent fever and neutropenia. *Pediatr Infect Dis J*, 29, 415-20.
- MAERTENS, J. A., NUCCI, M. & DONNELLY, J. P. 2012. The role of antifungal treatment in hematology. *Haematologica*, 97, 325-7.
- MARCHETTI, O., LAMOTH, F., MIKULSKA, M., VISCOLI, C., VERWEIJ, P. & BRETAGNE, S. 2012. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant*, 47, 846-54.
- MARR, K. A., BALAJEE, S. A., MCLAUGHLIN, L., TABOURET, M., BENTSEN, C. & WALSH, T. J. 2004. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme

- immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis*, 190, 641-9.
- MARR, K. A., LAVERDIERE, M., GUGEL, A. & LEISENRING, W. 2005. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis*, 40, 1762-9.
- MARTY, F. M. & RUBIN, R. H. 2006. The prevention of infection post-transplant: the role of prophylaxis, preemptive and empiric therapy. *Transpl Int*, 19, 2-11.
- MCCULLERS, J. A., VARGAS, S. L., FLYNN, P. M., RAZZOUK, B. I. & SHENEP, J. L. 2000. Candidal meningitis in children with cancer. *Clin Infect Dis*, 31, 451-7.
- MCLINTOCK, L. A. & JONES, B. L. 2004. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Br J Haematol*, 126, 289-97.
- MELVILLE, J. M. & MOSS, T. J. 2013. The immune consequences of preterm birth. *Front Neurosci*, 7, 79.
- MENNINK-KERSTEN, M. A., DONNELLY, J. P. & VERWEIJ, P. E. 2004. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis*, 4, 349-57.
- MERCIER, T., GULDENTOPS, E., LAGROU, K. & MAERTENS, J. 2018. Galactomannan, a Surrogate Marker for Outcome in Invasive Aspergillosis: Finally Coming of Age. *Front Microbiol*, 9, 661.
- MICELI, M. H., GRAZZIUTTI, M. L., WOODS, G., ZHAO, W., KOCOGLU, M. H., BARLOGIE, B. & ANAISSIE, E. 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.
- MICELI, M. H., MAERTENS, J., BUVE, K., GRAZZIUTTI, M., WOODS, G., RAHMAN, M., BARLOGIE, B. & ANAISSIE, E. J. 2007. Immune reconstitution inflammatory syndrome in cancer patients with pulmonary aspergillosis recovering from neutropenia: Proof of principle, description, and clinical and research implications. *Cancer*, 110, 112-20.
- MIKULSKA, M., FURFARO, E., DEL BONO, V., RAIOLA, A. M., RATTO, S., BACIGALUPO, A. & VISCOLI, C. 2012. Piperacillin/tazobactam (Tazocin™) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. *J Antimicrob Chemother*, 67, 1746-8.
- MOR, M., GILAD, G., KORNRICH, L., FISHER, S., YANIV, I. & LEVY, I. 2011. Invasive fungal infections in pediatric oncology. *Pediatr Blood Cancer*, 56, 1092-7.
- MORGAN, J., WANNEMUEHLER, K. A., MARR, K. A., HADLEY, S., KONTOYIANNIS, D. P., WALSH, T. J., FRIDKIN, S. K., PAPPAS, P. G. & WARNOCK, D. W. 2005. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Med Mycol*, 43 Suppl 1, S49-58.
- MULLINS, J. 1994. *Aspergillus and Aerobiology*, Boston, MA, Springer.
- NOUER, S. A., NUCCI, M., KUMAR, N. S., GRAZZIUTTI, M., BARLOGIE, B. & ANAISSIE, E. 2011. Earlier response assessment in invasive aspergillosis based on the kinetics of serum *Aspergillus* galactomannan: proposal for a new definition. *Clin Infect Dis*, 53, 671-6.

- OSHEROV, N. & MAY, G. S. 2001. The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol Lett*, 199, 153-60.
- PANG, K. A., GODET, C., FEKKAR, A., SCHOLLER, J., NIVOIX, Y., LETSCHERBRU, V., MASSIAS, L., KAUFFMANN-LACROIX, C., ELSEENDOORN, A., UZUNOV, M., DATRY, A. & HERBRECHT, R. 2012. Breakthrough invasive mould infections in patients treated with caspofungin. *J Infect*, 64, 424-9.
- PATTERSON, T. F., THOMPSON, G. R., 3RD, DENNING, D. W., FISHMAN, J. A., HADLEY, S., HERBRECHT, R., KONTOYIANNIS, D. P., MARR, K. A., MORRISON, V. A., NGUYEN, M. H., SEGAL, B. H., STEINBACH, W. J., STEVENS, D. A., WALSH, T. J., WINGARD, J. R., YOUNG, J. A. & BENNETT, J. E. 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.
- PETRAITIENE, R., PETRAITIS, V., BACHER, J. D., FINKELMAN, M. A. & WALSH, T. J. 2015. Effects of host response and antifungal therapy on serum and BAL levels of galactomannan and (1 → 3)- β -D-glucan in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*, 53, 558-68.
- PETRAITIENE, R., PETRAITIS, V., GROLL, A. H., SEIN, T., PISCITELLI, S., CANDELARIO, M., FIELD-RIDLEY, A., AVILA, N., BACHER, J. & WALSH, T. J. 2001. Antifungal activity and pharmacokinetics of posaconazole (SCH 56592) in treatment and prevention of experimental invasive pulmonary aspergillosis: correlation with galactomannan antigenemia. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 857-69.
- PFEIFFER, C. D., FINE, J. P. & SAFDAR, N. 2006. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*, 42, 1417-27.
- PINEL, C., FRICKER-HIDALGO, H., LEBEAU, B., GARBAN, F., HAMIDFAR, R., AMBROISE-THOMAS, P. & GRILLOT, R. 2003. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*, 41, 2184-6.
- PORTUGAL, R. D., GARNICA, M. & NUCCI, M. 2010. D-index and Prediction of Infection. *Biol Blood Marrow Transplant*, 16, 1608.
- PRASAD, P. A., COFFIN, S. E., LECKERMAN, K. H., WALSH, T. J. & ZAOUTIS, T. E. 2008. Pediatric antifungal utilization: new drugs, new trends. *Pediatr Infect Dis J*, 27, 1083-8.
- REID, M. C., LACHS, M. S. & FEINSTEIN, A. R. 1995. Use of methodological standards in diagnostic test research. Getting better but still not good. *Jama*, 274, 645-51.
- REINWALD, M., HUMMEL, M., KOVALEVSKAYA, E., SPIESS, B., HEINZ, W. J., VEHRESCHILD, J. J., SCHULTHEIS, B., KRAUSE, S. W., CLAUS, B., SUEDHOFF, T., SCHWERDTFEGGER, R., REUTER, S., KIEHL, M. G., HOFMANN, W. K. & BUCHHEIDT, D. 2012a. Therapy with antifungals decreases the diagnostic performance of PCR for diagnosing invasive aspergillosis in bronchoalveolar lavage samples of patients with haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother*, 67, 2260-7.
- REINWALD, M., KONIETZKA, C. A., KOLVE, H., UHLENBROCK, S., AHLKE, E., HUMMEL, M., SPIESS, B., HOFMANN, W. K., BUCHHEIDT, D. & GROLL, A. H. 2014. Assessment of *Aspergillus*-specific PCR as a screening method for

- invasive aspergillosis in paediatric cancer patients and allogeneic haematopoietic stem cell recipients with suspected infections. *Mycoses*, 57, 537-43.
- REINWALD, M., SPIESS, B., HEINZ, W. J., VEHRSCCHILD, J. J., LASS-FLÖRL, C., KIEHL, M., SCHULTHEIS, B., KRAUSE, S. W., WOLF, H. H., BERTZ, H., MASCHMEYER, G., HOFMANN, W. K. & BUCHHEIDT, D. 2012b. Diagnosing pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies: a multicenter prospective evaluation of an *Aspergillus* PCR assay and a galactomannan ELISA in bronchoalveolar lavage samples. *Eur J Haematol*, 89, 120-7.
- ROBENSHTOK, E., GAFTER-GVILI, A., GOLDBERG, E., WEINBERGER, M., YESHURUN, M., LEIBOVICI, L. & PAUL, M. 2007. Antifungal prophylaxis in cancer patients after chemotherapy or hematopoietic stem-cell transplantation: systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol*, 25, 5471-89.
- ROGERS, T. R., MORTON, C. O., SPRINGER, J., CONNEALLY, E., HEINZ, W., KENNY, C., FROST, S., EINSELE, H. & LOEFFLER, J. 2013. Combined real-time PCR and galactomannan surveillance improves diagnosis of invasive aspergillosis in high risk patients with haematological malignancies. *British Journal of Haematology*, 161, 517-524.
- ROHRLICH, P., SARFATI, J., MARIANI, P., DUVAL, M., CAROL, A., SAINT-MARTIN, C., BINGEN, E., LATGE, J. P. & VILMER, E. 1996. Prospective sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for serum galactomannan: early predictive value and clinical use in invasive aspergillosis. *Pediatr Infect Dis J*, 15, 232-7.
- RUHNKE, M., BEHRE, G., BUCHHEIDT, D., CHRISTOPEIT, M., HAMPRECHT, A., HEINZ, W., HEUSSEL, C. P., HORGER, M., KURZAI, O., KARTHAUS, M., LOFFLER, J., MASCHMEYER, G., PENACK, O., RIEGER, C., RICKERTS, V., RITTER, J., SCHMIDT-HIEBER, M., SCHUELPER, N., SCHWARTZ, S., ULLMANN, A., VEHRSCCHILD, J. J., VON LILIENFELD-TOAL, M., WEBER, T. & WOLF, H. H. 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.
- RUHNKE, M., GROLL, A. H., MAYSER, P., ULLMANN, A. J., MENDLING, W., HOF, H. & DENNING, D. W. 2015. Estimated burden of fungal infections in Germany. *Mycoses*, 58 Suppl 5, 22-8.
- SANTOLAYA, M. E., ALVAREZ, A. M., ACUNA, M., AVILES, C. L., SALGADO, C., TORDECILLA, J., VARAS, M., VENEGAS, M., VILLARROEL, M., ZUBIETA, M., FARFAN, M., DE LA MAZA, V., VERGARA, A., VALENZUELA, R. & TORRES, J. P. 2018. Efficacy of pre-emptive versus empirical antifungal therapy in children with cancer and high-risk febrile neutropenia: a randomized clinical trial. *J Antimicrob Chemother*, 73, 2860-2866.
- SCHAFFNER, A., DOUGLAS, H. & BRAUDE, A. 1982. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J Clin Invest*, 69, 617-31.
- SEGAL, B. H. 2009. Aspergillosis. *N Engl J Med*, 360, 1870-84.

- SEGAL, B. H., DECARLO, E. S., KWON-CHUNG, K. J., MALECH, H. L., GALLIN, J. I. & HOLLAND, S. M. 1998. *Aspergillus nidulans* infection in chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*, 77, 345-54.
- SEGAL, B. H., HERBRECHT, R., STEVENS, D. A., OSTROSKY-ZEICHNER, L., SOBEL, J., VISCOLI, C., WALSH, T. J., MAERTENS, J., PATTERSON, T. F., PERFECT, J. R., DUPONT, B., WINGARD, J. R., CALANDRA, T., KAUFFMAN, C. A., GRAYBILL, J. R., BADEN, L. R., PAPPAS, P. G., BENNETT, J. E., KONTOYIANNIS, D. P., CORDONNIER, C., VIVIANI, M. A., BILLE, J., ALMYROUDIS, N. G., WHEAT, L. J., GRANINGER, W., BOW, E. J., HOLLAND, S. M., KULLBERG, B. J., DISMUKES, W. E. & DE PAUW, B. E. 2008. Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer consensus criteria. *Clin Infect Dis*, 47, 674-83.
- SHIBUYA, K., ANDO, T., HASEGAWA, C., WAKAYAMA, M., HAMATANI, S., HATORI, T., NAGAYAMA, T. & NONAKA, H. 2004. Pathophysiology of pulmonary aspergillosis. *J Infect Chemother*, 10, 138-45.
- SPRINGER, J., LACKNER, M., NACHBAUR, D., GIRSCHIKOFSKY, M., RISSLEGGER, B., MUTSCHLECHNER, W., FRITZ, J., HEINZ, W. J., EINSELE, H., ULLMANN, A. J., LOFFLER, J. & LASS-FLORL, C. 2016. Prospective multicentre PCR-based *Aspergillus* DNA screening in high-risk patients with and without primary antifungal mould prophylaxis. *Clin Microbiol Infect*, 22, 80-86.
- SPRINGER, J., LÖFFLER, J., EINSELE, H. & WHITE, P. L. 2020. The screening of blood by *Aspergillus* PCR and galactomannan ELISA precedes BAL detection in patients with proven and probable IA. *Med Mycol*.
- SPRINGER, J., MORTON, C. O., PERRY, M., HEINZ, W. J., PAHOLCSEK, M., ALZHEIMER, M., ROGERS, T. R., BARNES, R. A., EINSELE, H., LOEFFLER, J. & WHITE, P. L. 2013. Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA in high-risk hematological patients. *J Clin Microbiol*, 51, 1445-50.
- STEINBACH, W. J. 2005. Antifungal agents in children. *Pediatr Clin North Am*, 52, 895-915, viii.
- STEINBACH, W. J., ADDISON, R. M., MCLAUGHLIN, L., GERRALD, Q., MARTIN, P. L., DRISCOLL, T., BENTSEN, C., PERFECT, J. R. & ALEXANDER, B. D. 2007. Prospective *Aspergillus* galactomannan antigen testing in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *Pediatr Infect Dis J*, 26, 558-64.
- STEINBACH, W. J., MARR, K. A., ANAISSIE, E. J., AZIE, N., QUAN, S. P., MEIER-KRIESCHE, H. U., APEWOKIN, S. & HORN, D. L. 2012. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. *J Infect*, 65, 453-64.
- STEINMANN, J., HAMPRECHT, A., VEHRESCHILD, M. J., CORNELY, O. A., BUCHHEIDT, D., SPIESS, B., KOLDEHOFF, M., BUER, J., MEIS, J. F. & RATH, P. M. 2015. Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany. *J Antimicrob Chemother*, 70, 1522-6.
- STOCKMANN, C., CONSTANCE, J. E., ROBERTS, J. K., OLSON, J., DOBY, E. H., AMPOFO, K., STIERS, J., SPIGARELLI, M. G. & SHERWIN, C. M. 2014. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals in children and their clinical implications. *Clin Pharmacokinet*, 53, 429-54.

- SUAREZ, F., LORTHOLARY, O., BULAND, S., RUBIO, M. T., GHEZ, D., MAHÉ, V., QUESNE, G., POIRÉE, S., BUZYN, A., VARET, B., BERCHE, P. & BOUGNOUX, M. E. 2008. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. *J Clin Microbiol*, 46, 3772-7.
- SULAHIAN, A., BOUTBOUL, F., RIBAUD, P., LEBLANC, T., LACROIX, C. & DEROUIN, F. 2001. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer*, 91, 311-8.
- SULAHIAN, A., TOURATIER, S. & RIBAUD, P. 2003. False positive test for aspergillus antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam. *N Engl J Med*, 349, 2366-7.
- SULLIVAN, K. M., DYKEWICZ, C. A., LONGWORTH, D. L., BOECKH, M., BADEN, L. R., RUBIN, R. H. & SEPKOWITZ, K. A. 2001. Preventing opportunistic infections after hematopoietic stem cell transplantation: the Centers for Disease Control and Prevention, Infectious Diseases Society of America, and American Society for Blood and Marrow Transplantation Practice Guidelines and beyond. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 392-421.
- SUNG, L., GAMIS, A., ALONZO, T. A., BUXTON, A., BRITTON, K., DESWARTE-WALLACE, J. & WOODS, W. G. 2009. Infections and association with different intensity of chemotherapy in children with acute myeloid leukemia. *Cancer*, 115, 1100-8.
- SUNG, L., PHILLIPS, R. & LEHRNBECHER, T. 2011. Time for paediatric febrile neutropenia guidelines - children are not little adults. *Eur J Cancer*, 47, 811-3.
- THOMAS, K. E., OWENS, C. M., VEYS, P. A., NOVELLI, V. & COSTOLI, V. 2003. The radiological spectrum of invasive aspergillosis in children: a 10-year review. *Pediatr Radiol*, 33, 453-60.
- UPTON, A., KIRBY, K. A., CARPENTER, P., BOECKH, M. & MARR, K. A. 2007. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis*, 44, 531-40.
- VAN BURIK, J. A., CARTER, S. L., FREIFELD, A. G., HIGH, K. P., GODDER, K. T., PAPANICOLAOU, G. A., MENDIZABAL, A. M., WAGNER, J. E., YANOVICH, S. & KERNAN, N. A. 2007. Higher risk of cytomegalovirus and aspergillus infections in recipients of T cell-depleted unrelated bone marrow: analysis of infectious complications in patients treated with T cell depletion versus immunosuppressive therapy to prevent graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 13, 1487-98.
- VERGIDIS, P., RAZONABLE, R. R., WHEAT, L. J., ESTES, L., CALIENDO, A. M., BADEN, L. R., WINGARD, J. R., BADDLEY, J., ASSI, M., NORRIS, S., CHANDRASEKAR, P., SHIELDS, R., NGUYEN, H., FREIFELD, A., KOHLER, R., KLEIMAN, M., WALSH, T. J. & HAGE, C. A. 2014. Reduction in false-positive *Aspergillus* serum galactomannan enzyme immunoassay results associated with use of piperacillin-tazobactam in the United States. *J Clin Microbiol*, 52, 2199-201.
- VERWEIJ, P. E., ERJAVEC, Z., SLUITERS, W., GOESSENS, W., ROZENBERG-ARSKA, M., DEBETS-OSENKOPP, Y. J., GUIOT, H. F. & MEIS, J. F. 1998. Detection of antigen in sera of patients with invasive aspergillosis: intra- and

- interlaboratory reproducibility. The Dutch Interuniversity Working Party for Invasive Mycoses. *J Clin Microbiol*, 36, 1612-6.
- VON LILIENFELD-TOAL, M., WAGENER, J., EINSELE, H., CORNELLY, O. A. & KURZAI, O. 2019. Invasive Pilzinfektionen. *Dtsch Arztebl International*, 116, 271-8.
- WALSH, T. J., ANAISSIE, E. J., DENNING, D. W., HERBRECHT, R., KONTOYIANNIS, D. P., MARR, K. A., MORRISON, V. A., SEGAL, B. H., STEINBACH, W. J., STEVENS, D. A., VAN BURIK, J. A., WINGARD, J. R. & PATTERSON, T. F. 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 46, 327-60.
- WALSH, T. J., SHOHAM, S., PETRAITIENE, R., SEIN, T., SCHAUFELE, R., KELAHER, A., MURRAY, H., MYA-SAN, C., BACHER, J. & PETRAITIS, V. 2004. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen interaction. *J Clin Microbiol*, 42, 4744-8.
- WARRIS, A. 2015. Azole-resistant aspergillosis. *J Infect*, 71 Suppl 1, S121-5.
- WARRIS, A., LEHRNBECHER, T., ROILIDES, E., CASTAGNOLA, E., BRUGGEMANN, R. J. M. & GROLL, A. H. 2019. ESCMID-ECMM guideline: diagnosis and management of invasive aspergillosis in neonates and children. *Clin Microbiol Infect*, 25, 1096-1113.
- WATTIER, R. L., DVORAK, C. C., HOFFMAN, J. A., BROZOVICH, A. A., BIN-HUSSAIN, I., GROLL, A. H., CASTAGNOLA, E., KNAPP, K. M., ZAOUTIS, T. E., GUSTAFSSON, B., SUNG, L., BERMAN, D., HALASA, N. B., ABZUG, M. J., VELEGRAKI, A., SHARMA, T. S., FISHER, B. T. & STEINBACH, W. J. 2015. A Prospective, International Cohort Study of Invasive Mold Infections in Children. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 4, 313-22.
- WHEAT, L. J. 2006. Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycoses in the immunocompromised host. *Transpl Infect Dis*, 8, 128-39.
- WHEAT, L. J. & WALSH, T. J. 2008. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 27, 245-51.
- WHITE, P. L., BARNES, R. A., SPRINGER, J., KLINGSPOR, L., CUENCA-ESTRELLA, M., MORTON, C. O., LAGROU, K., BRETAGNE, S., MELCHERS, W. J., MENGOLI, C., DONNELLY, J. P., HEINZ, W. J. & LOEFFLER, J. 2015. Clinical Performance of Aspergillus PCR for Testing Serum and Plasma: a Study by the European Aspergillus PCR Initiative. *J Clin Microbiol*, 53, 2832-7.
- WHITE, P. L., LINTON, C. J., PERRY, M. D., JOHNSON, E. M. & BARNES, R. A. 2006. The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. *Clin Infect Dis*, 42, 479-86.
- WHITE, P. L., MENGOLI, C., BRETAGNE, S., CUENCA-ESTRELLA, M., FINNSTROM, N., KLINGSPOR, L., MELCHERS, W. J., MCCULLOCH, E., BARNES, R. A., DONNELLY, J. P. & LOEFFLER, J. 2011. Evaluation of Aspergillus PCR protocols for testing serum specimens. *J Clin Microbiol*, 49, 3842-8.

- WHITING, P. F., RUTJES, A. W., WESTWOOD, M. E., MALLETT, S., DEEKS, J. J., REITSMA, J. B., LEEFLANG, M. M., STERNE, J. A. & BOSSUYT, P. M. 2011. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med*, 155, 529-36.
- WINTERS, B., CUSTER, J., GALVAGNO, S. M., JR., COLANTUONI, E., KAPOOR, S. G., LEE, H., GOODE, V., ROBINSON, K., NAKHASI, A., PRONOVOST, P. & NEWMAN-TOKER, D. 2012. Diagnostic errors in the intensive care unit: a systematic review of autopsy studies. *BMJ Qual Saf*, 21, 894-902.
- WOODS, G., MICELI, M. H., GRAZZIUTTI, M. L., ZHAO, W., BARLOGIE, B. & ANAISSIE, E. 2007. Serum Aspergillus galactomannan antigen values strongly correlate with outcome of invasive aspergillosis: a study of 56 patients with hematologic cancer. *Cancer*, 110, 830-4.
- ZAOUTIS, T. E., HEYDON, K., CHU, J. H., WALSH, T. J. & STEINBACH, W. J. 2006. Epidemiology, outcomes, and costs of invasive aspergillosis in immunocompromised children in the United States, 2000. *Pediatrics*, 117, e711-6.
- ZHAO, L., TANG, J. Y., WANG, Y., ZHOU, Y. F., CHEN, J., LI, B. R. & XUE, H. L. 2009. [Value of plasma beta-Glucan in early diagnosis of invasive fungal infection in children]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 11, 905-8.

G Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1. Abgebildet sind aspergillartige Pilzbestandteile, die sogenannten Konidienträger. Diese tragen die Sporen (Konidien), die für die Fortpflanzung und Vermehrung zuständig sind. Im Hintergrund sind Hyphen zu erkennen, die ein Geflecht, das Myzel, bilden und aus denen die Konidienträger hervorgehen. (CDC, 2019. Diese Abbildung ist der Öffentlichkeit frei zugänglich und daher frei von urheberrechtlichen Einschränkungen (lizenzfrei).) | 2 |
| Abbildung 2. Pathogenese der Invasiven Aspergillose A: Inhalation der Konidien bis in die Alveolen. Dort keimen diese aus und bilden die Hyphen. B: Immunkompetenter Patient: Mono- und polynukleäre Zellen bekämpfen die keimenden Konidien und Hyphen. C: Immunsupprimierter Patient: Gefäßinvasives Wachstum der Hyphen, diese verursachen Thrombose, Hypoxie, Nekrose und Dissemination. (Ben-Ami et al., 2010. Verlagslizenz vorliegend.)..... | 4 |
| Abbildung 3. Die Pfeilköpfe zeigen die intravaskuläre Invasion durch die Hyphen von <i>Aspergillus</i> spp und die Pfeile den Gefäßverlauf des Wirtes an. (Reproduziert mit Genehmigung von Segal, 2009, Copyright Massachusetts Medical Society.) | 4 |
| Abbildung 4. Übersicht über die einzelnen Risikofaktoren und deren Zusammenhänge. (Erstellt auf der Grundlage von Segal, 2009). | 5 |
| Abbildung 5. Typischer CT Thorax eines Kindes mit Invasiver pulmonaler Aspergillose. Zu sehen sind mehrere Raumforderungen - typische unspezifische Zeichen bei einer pädiatrischen IA. (Quelle: Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Würzburg.)..... | 16 |
| Abbildung 6. Klinisches Management von asymptomatischen Hochrisikopatienten und bei Verdacht auf eine IA. (Die Graphik wurde nach einer Abbildung von (Mennink-Kersten et al., 2004) erstellt.)..... | 17 |
| Abbildung 7. Vierfeldertafel zur Berechnung der diagnostischen Gütekriterien..... | 28 |
| Abbildung 8. Histogramm zur relativen Häufigkeitsverteilung des Alters der untersuchten Patienten. | 37 |
| Abbildung 9. Altersverteilung nach Studiengruppen. | 37 |
| Abbildung 10. Verteilung der Grunderkrankungen der Studienpatienten..... | 38 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 11. Vierfeldertafel für die Auswertung der Ergebnisse des GM-ELISA. GM-ELISA positiv = Test positiv (T+). | 41 |
| Abbildung 12. Vierfeldertafel für die Auswertung der Ergebnisse der Aspergillus-PCR. Aspergillus-PCR positiv = Test positiv (T+). | 42 |
| Abbildung 13. Vierfeldertafel für die kombinierte Auswertung der Ergebnisse des GM-ELISA und der Aspergillus-PCR. GM ELISA und Aspergillus PCR positiv = Test positiv (T+). | 43 |
| Abbildung 14. Fagan Nomogramm. In unserer Studienpopulation gehen wir von einer Vortestwahrscheinlichkeit von 10% aus. Die Likelihood Ratios für die Kombination von beiden klinischen Tests sind Inf und 0.00. Eine Fortsetzung der Linien ergibt die Nachtest-Wahrscheinlichkeit, also die Wahrscheinlichkeit, dass die Diagnose vorliegt, nachdem der Test durchgeführt wurde. | 44 |
| Abbildung 15. Dargestellt ist die Kinetik der GM-Indizes von zwei PROB-Patienten während der probable IA. Die positiven GM-Tests während der Erkrankung an IA sind durch ausgefüllte Rauten markiert. Der Höchstwert jedes Patienten wurde an entsprechender Stelle ergänzt. Tag 0 entspricht dem Tag des Beginns der antifungalen Therapie nach IA-Diagnose. | 48 |
| Abbildung 16. ROC-Kurve mit Sensitivität auf Y-Achse und 1-Spezifität (Falsch-Positiv-Rate) auf X-Achse, die gegeneinander aufgetragen wurden mit repräsentativen Werten des GM-Index. Die Diagonallinie entspricht einer AUC von 0,5 und gilt als Referenz. Die rote Linie (Youden-Index) ist die maximale vertikale Distanz zwischen der ROC-Kurve und der Diagonallinie. | 51 |
| Abbildung 17. Dargestellt ist der Zeitraum, an denen die Proben der vier PROB-Patienten eine kombinierte Positivität aufwiesen. Jeder Punkt entspricht einem Probenstag. Ein positives Ergebnis ist in rot, ein Negatives in blau gekennzeichnet. Bei Patient 1, 3 und 4 wurden alle Probenstage mit ausschließlich negativen Ergebnissen vor/nach dem oben dargestellten Zeitraum ausgeschlossen. | 52 |
| Abbildung 18. Aspergillus-PCR. Vierfeldertafel zur Bestimmung der diagnostischen Gütekriterien der PCR bei CT als Referenzmethode. | 53 |
| Abbildung 19. GM-ELISA. Vierfeldertafel zur Bestimmung der diagnostischen Gütekriterien der GM-ELISA bei CT als Referenzmethode. | 54 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 20. Venn-Diagramm stellt die Beziehung zwischen der CT-basierten Diagnostik der Aspergillose (CT), einem positiven Aspergillus-PCR-Resultat (asp) und einem positiven GM-ELISA (gm) her. Alle 6 positiven CTs wurden von der Aspergillus-PCR entdeckt (Sensitivität 100%), hingegen nur 4/6 vom GM-ELISA (Sensitivität 67%). Die Aspergillus-PCR hatte aber 10 falsch-positive Ergebnisse (PPV 37,5%) und die GM-ELISA nur 3/27 (PPV 57%). | 55 |
| Abbildung 21. Dargestellt ist die Aufrechterhaltung des GM-negativen Status bzw. das Zeitintervall bis zum relevanten Ereignis: die erste Konversion des GM-ELISA von negativ zu positiv eines Patienten (zu erkennen an Stufe nach unten). Y- Achse: S(t) Wahrscheinlichkeit testnegativ zu bleiben. X- Achse: Die Analysezeit ist dargestellt als Tage ab Krankenhauseinweisung. Jede Stufe symbolisiert einen Patienten mit Konversion zur Testpositivität..... | 56 |
| Abbildung 22. Dargestellt ist die Aufrechterhaltung des PCR-negativen Status bzw. das Zeitintervall bis zum relevanten Ereignis: die erste Konversion der Aspergillus-PCR von negativ zu positiv eines Patienten (zu erkennen an Stufe nach unten). Y- Achse: S(t) Wahrscheinlichkeit testnegativ zu bleiben. X-Achse: Die Analysezeit ist dargestellt als Tage ab Krankenhauseinweisung..... | 58 |
| Abbildung 23. Repräsentativer Krankheitsverlauf des Patienten 1 mit Invasiver Aspergillose bei AML. Der rote Graph zeigt den Verlauf des C- reaktiven Proteins (CRP) und der blaue den Neutrophilenverlauf über die Zeit. Ebenfalls abgebildet sind die Ergebnisse der beiden Indextests und der CTs (blau= negativ, rot=positiv), das Vorhandensein klinischer Symptome (Leisten über den Graphen) wie auch die antifungale Medikation (Leisten unter den Graphen)..... | 65 |
| Abbildung 24. Krankheitsverlauf von Patient 2 mit Invasiver Aspergillose bei AL. ... | 67 |
| Abbildung 25. Krankheitsverlauf von Patient 3 mit Invasiver Aspergillose bei AL. ... | 69 |
| Abbildung 26. Krankheitsverlauf von Patient 4 mit Invasiver Aspergillose bei ALL. . | 71 |
| Abbildung 27. Teil 1 der Datenbank. | 124 |
| Abbildung 28. Teil 2 der Datenbank. | 125 |
| Abbildung 29. Teil 3 der Datenbank. | 126 |
| Abbildung 30. Teil 4 der Datenbank. | 127 |
| Abbildung 31. Teil 5 der Datenbank. | 128 |

H Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1. Risiko für eine IA anhand der typischen Inzidenz für unterschiedliche hämato-onkologische Grunderkrankungen, basierend auf den Daten von (Groll et al., 2014, Lehrnbecher, 2015). | 21 |
| Tabelle 2. Dargestellt sind die fünf Teile der Datenbank mit ihren jeweiligen patientenspezifischen klinischen Variablen, die in die Auswertung miteingeschlossen wurden. | 32 |
| Tabelle 3. Übersicht über die Patientenzahl der drei Studiengruppen nach Zuordnung durch die EORTC/MSG-Kriterien. | 36 |
| Tabelle 4. Anzahl der Patienten mit positivem GM und/oder PCR- Resultat und jeweilige EORTC/MSG- Einstufung der Patienten. | 40 |
| Tabelle 5. GM-Ereignis Nicht-parametrische Log Rank Analyse. Abhängige Variable/Ereignis: GM Konversion von negativ zu positiv. Risikofaktoren wurden durch Ereigniszeitanalyse evaluiert. The Chi-Quadrat (1 Freiheitsgrad) ist angegeben als $\chi^2(1)$. P = Wahrscheinlichkeit, dass Nullhypothese – kein Effekt zutrifft. Risiko = Richtung des Effekts, Reduktion oder Erhöhung der Inzidenz des relevanten Ereignisses (GM Konversion von negativ zu positiv). | 57 |
| Tabelle 6. GM-Ereignis. Evaluation der Risikofaktoren durch Ereigniszeitanalyse. Details der beobachteten und erwarteten Ereignisse. | 58 |
| Tabelle 7. Semiparametrische Cox Regression. Abhängige Variable/Ereignis: Konversion der Aspergillus PCR von negativ zu positiv. | 59 |
| Tabelle 8. Non-parametrische Log Rank Analyse. Abhängige Variable/Ereignis: Konversion der Aspergillus PCR von negativ zu positiv. Risikofaktoren wurden durch Ereigniszeitanalyse evaluiert. The Chi-Quadrat (1 Freiheitsgrad) ist angegeben als $\chi^2(1)$. P = Wahrscheinlichkeit, dass Nullhypothese – kein Effekt zutrifft. Risiko = Richtung des Effekts, Reduktion oder Erhöhung der Inzidenz des relevanten Ereignisses (Aspergillus PCR Konversion von negativ zu positiv). | 59 |
| Tabelle 9. Aspergillus-PCR-Ereignis. Evaluation der Risikofaktoren durch Ereigniszeitanalyse. Details der beobachteten und erwarteten Ereignisse. | 60 |

| | |
|--|----|
| Tabelle 10. Übersicht über die Antimykotika und die Anzahl der Patienten, die dieses jeweilige Medikament erhalten haben. Eine Mehrfachwertung eines Patienten ist möglich. | 61 |
| Tabelle 11. Darstellung der Patienten mit falsch-positiven GM- und PCR Proben der UNCLASS-Gruppe in zeitlichem Zusammenhang zur Aspergillus-wirksamen Prophylaxe oder Therapie. | 63 |
| Tabelle 12. Daten einer Erwachsenenstudie (Springer et al., 2016), die durch die Ergebnisse unserer pädiatrischen Studie (in Klammern) ergänzt wurde. | 74 |

I Veröffentlichung der Ergebnisse der Arbeit

Die wesentlichsten Teile dieser Doktorarbeit entstammen meiner eigenen Publikation:

LOEFFLER, J.*, HAFNER, J.*, MENGOLI, C., WIRTH, C., HEUSSEL, C. P., LOFFLER, C., WHITE, P. L., ULLMANN, A. J., MICHEL, D., WIEGERING, V., WOLFL, M., SCHLEGEL, P. G., EINSELE, H., SPRINGER, J.* und EYRICH, M. * 2017. Prospective Biomarker Screening for Diagnosis of Invasive Aspergillosis in High-Risk Pediatric Patients. *J Clin Microbiol*, 55, 101-109.

* = Equal contribution

Die Arbeit wurde zudem im Rahmen einer Posterpräsentation auf dem 42. Meeting der **European Society for Blood and Marrow Transplantation** in Valencia unter folgendem Namen "Screening of pediatric allogeneic stem cell recipients for invasive aspergillosis - increased diagnostic accuracy by using a dual parameter system combining galactomannan and fungal DNA detection assay" vorgestellt. Das Poster kann auf Seite 122 eingesehen werden.



Screening of paediatric allogeneic stem cell transplant recipients for invasive aspergillosis – increased diagnostic accuracy by using a dual parameter system combining galactomannan and fungal DNA detection assays.



Springer, J, Löffler J, Hafner J, Wirth C, Heussel CP, Ullmann A, Löffler C., Einsele H., Wiegering V, Wöfl M, Schlegel PG, Eyrich M
 University Medical Center Würzburg, Department of paediatrics¹, internal medicine II², radiology³,
 University Medical Center Heidelberg, Department of radiology⁴ Germany

Introduction

Invasive aspergillosis (IA) represents a frequent and significant complication of patients with prolonged neutropenia and after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT). Diagnosis of IA remains difficult, especially in paediatrics no validated methods for detection of IA have been established so far. Here we show that a combined testing for fungal galactomannan and DNA results in superior diagnostic accuracy than each test alone. We recommend to screen paediatric patients at high risk for IA biweekly for GM and fungal DNA.

Patients

543 consecutive blood samples from 39 paediatric patients around alloHSCT (mean 14 samples / patient [range 6-33]) were collected and analyzed.

25 male patients (mean age 10.5 [4-21] years)

14 female patients (mean age 8.1 [1-18] years)

Indications for allo HSCT:

ALL (n=22), MDS (n=5), AML (n=3), other (n=9)

Methods:

Twice weekly blood collections (2.7 ml EDTA blood)

with subsequent testing for presence of:

galactomannan antigen (fungal cell wall component) via Platelia® ELISA, Biorad, Munich, Germany)

fungal DNA detection via PCR as described

recently by our group and in compliance with EAPCRI recommendations (Springer J et al. Clin Microbiol Infect 2015).

Results:

4/33 (10%) patients showed probable , 2/33 (5%) possible, the remaining 33 patients no signs of IA. 51% and 35% of samples from patients with **probable IA** were positive for GM and PCR, resp. Re-

Results (continued)

markably, 33% of samples were positive for both tests and remained positive for several weeks

3 / 4 patients had GM-indices > 3.

In the 2 **possible IA** patients only 9% and 0% of samples were positive for GM and PCR, resp.

In the 33 **unclassified** patients, only 2% and 4% of samples were positive for GM and PCR, resp.

Figure 1:

Venn diagram illustrating the relationship between CT detection of IA, and positive PCR and GM events.

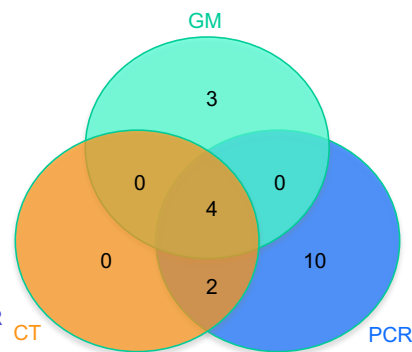


Table 1: Non-parametric logrank analysis defining covariates with a significant impact on GM conversion from negative to positive. The chi-square function with one degree of freedom is reported.

| Covariate | chi ² (1) | P | Risk |
|------------------------|----------------------|--------|----------|
| Corticosteroides EORTC | 3.89 | 0.0485 | increase |
| Other Herpesviruses | 7.40 | 0.0065 | increase |
| Caspofungine | 4.03 | 0.0447 | increase |
| CT positivity | 4.33 | 0.0375 | increase |

Conclusions

- ➔ In paediatric alloHSCT recipients combined testing for GM and PCR testing shows a very high sensitivity and specificity.
- ➔ Paediatric patients with probable IA exhibit prolonged phases of dual positivity (up to several weeks) and higher GM-indices compared to adult patients.

J Appendix



Datenbank pädiatrische Pilzinfektionen



| | | | |
|---------------------------------------|--|-------------------------|---|
| Name, Vorname | [REDACTED] | Patientennummer | K054 |
| Geb.datum | 29.06.2008 | Geschlecht | männlich |
| | | UPN | 219 |
| | | Altersgruppe | KIND |
| Diagnose | Blackfan- | GvHD akut >*1 | <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> unbekannt |
| Ethnizität | deutsch | Sorrer Score | [REDACTED] |
| Komorbidität | akzessorischer linkeventrikulärer | Besonderheiten Diagnose | steroidabhängige Blackfan-Diamond- Anämie |
| | | CMV Sp. / Empf. pn | |
| Outcome | CMV- Reaktivierung, GvHD Grad 1 | | |
| letzte Nachuntersuchung | [REDACTED] | Todesdatum | [REDACTED] |
| SZT Datum | 14.08.2012 | Konditionierung 1 | Cyclophosphamid 10.-11.08.12 |
| Stammzell Art | allogene PBSC | Konditionierung 2 | Busulfex 05.-08.08.12 |
| Stammzellherkunft | MSD | Konditionierung 3 | ATG (Fresenius) 09.-11.08.12 |
| Graftmanipulation | keine | Konditionierung 4 | [REDACTED] |
| HLA Mismatch | nein | Konditionierung 5 | [REDACTED] |
| Remissionsstatus | [REDACTED] | Konditionierung 6 | [REDACTED] |
| Bemerkungen bzw. noch zu klären | [REDACTED] | | |
| Datum Probe | 24.09.2012 | Tag nach SZT | 41 |
| | | Saison | Herbst |
| Galaktomannan oder β -Glucan | <input type="checkbox"/> positiv <input checked="" type="checkbox"/> negativ <input type="checkbox"/> nicht durchgeführt | | |
| Galaktomannan Wert | 0,09 | | |
| GM/ β -Gluc Bemerkungen | [REDACTED] | | |
| Aspergillus PCR | <input type="checkbox"/> positiv <input checked="" type="checkbox"/> negativ <input type="checkbox"/> nicht durchgeführt | | |
| Aspergillus PCR Details | [REDACTED] | | |
| Leukozyten aktuell | 5,05 n*1000/ μ l | Kreatinin normal | <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> unbekannt |
| Granulozyten aktuell | 2,20 n*1000/ μ l | Kreatinin Wert | [REDACTED] |
| Lymphozyten aktuell | 1,80 n*1000/ μ l | | |
| Monozyten aktuell | 0,60 n*1000/ μ l | | |
| EORTC Klassifikation | [REDACTED] | | |
| | | Indikator possible | 0 |
| | | Indikator probable | 0 |
| | | Indikator proven | 0 |
| | | Summe Indikator | 0 |

| | | | |
|---------------------|--------------------|----------------------|-------------------------|
| Risiko- faktoren | Mikro- biologie | Klinik Diagnostik | Medikation Ernährung |
|---------------------|--------------------|----------------------|-------------------------|

Abbildung 27. Teil 1 der Datenbank.

Risikofaktoren für IFI

Neutropenie Dauer Neutropenietage

Neutropenie >10d ja nein unbekannt

Neutropenie Details

alloSZT

Kortikosteroide

Kortikosteroide >21d >0,3mg/kg KG/d ja nein unbekannt

Steroide Dosis mg/kg KG

Steroide Dauer Tage

Steroidpräparat

Kortikosteroide Details

T Zell Immunsuppression

T Zell Immunsuppression in letzten 90d ja nein unbekannt

T-Zellimmunsuppression Details

letzte Gabe T Zell IS am

Latenz seit letzter T-Zell-IS Tage, Hinweis: T-Zell-IS gilt 90 Tage nach letzter Gabe

angeborene Immundefizienz

prädisponierende Erkrankungen

Details Prädisposition

zurück zu Stammdaten

Mikro-
biologie

Klinik
Diagnostik

Medikation
Ernährung

Abbildung 28. Teil 2 der Datenbank.

Mikrobiologie

Direktnachweis Kultur nichtsteriles Material: z.B. BAL, Sputum, Bronchial
abstrich, Sinusaspirat, andere Abstriche

Material Direktnachweis Kultur

Direktnachweis Mikroskopie

Material Direktnachweis Mikroskopie

Kultur aus sterilem Material

Mikroskopie aus sterilem Material

Blutkultur

KryptokokkenAg in Liquor

} proven-Kriterien

Material

Erreger andere als Asp

Freitext Erreger

zurück zu Stammdaten

Risiko-
faktoren Klinik
Diagnostik Medikation
Ernährung

Abbildung 29. Teil 3 der Datenbank.

Klinik / Diagnostik

| | | | |
|---|---|--------------------------------------|-----------------------------------|
| CT Thorax durchgeführt | <input type="text"/> | Datum am nächsten gelegene CT Thorax | <input type="text"/> |
| CT andere durchgeführt | <input type="text"/> | Datum am nächsten gelegenes C andere | <input type="text"/> |
| Hinweis: CT-Untersuchung bis zu zwei Wochen gültig | | | |
| Pilzhinweis basale Atemwege | <input type="text"/> | | |
| Pilzhinweis basale Atemwege Details | <input style="height: 40px;" type="text"/> | | |
| Tracheobronchitis | <input type="text"/> | | |
| Tracheobronchitis Details | <input style="height: 40px;" type="text"/> | | |
| Sinusbeteiligung | <input type="text"/> | | |
| Sinusbeteiligung Details | <input style="height: 40px;" type="text"/> | | |
| ZNS | <input type="text"/> | | |
| ZNS Details | <input style="height: 40px;" type="text"/> | | |
| disseminierte Candidiasis | <input type="text"/> | | |
| disseminierte Candidiasis Details | <input style="height: 40px;" type="text"/> | | |
| Klinische Symptome | | | |
| Fieber | <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> unbekannt | Grad Celsius | <input type="text"/> |
| Husten | <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> unbekannt | | |
| Tachykardie | <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> unbekannt | HF | <input type="text"/> |
| Sauerstoffbedarf | <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> unbekannt | | |
| Tachydyspnoe | <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> unbekannt | GvHD Grad | <input type="text" value="1"/> |
| Mucositis | <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> unbekannt | GvHD Details | <input type="text" value="Haut"/> |
| klinische Symptome andere | <input type="text" value="Stamm und OS Haut GvH Rötung, weißliche Beläge an Penisglans"/> | | |

Risiko-
faktoren

Mikro-
biologie

Medikation
Ernährung

Abbildung 30. Teil 4 der Datenbank.

Begleitmedikation / Ernährung

| | | |
|----------------------|---|----------------------|
| Antibiotika1 | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| Antibiotika2 | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| Antibiotika3 | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| Antibiotika4 | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| Antibiotika5 | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| Antibiotika6 | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| Antimykotika1 | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| Antimykotika2 | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| Antimykotika3 | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| Virostatika1 | <input type="text" value="Eoscavir"/> | <input type="text"/> |
| Virostatika2 | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| monoklonale AK | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| Ernährung Details | <input type="text" value="Kalinor Brausetbl."/> | |
| Prophylaxe1 | <input type="text" value="AmphoMoronal"/> | |
| Prophylaxe2 | <input type="text" value="Itraconazol"/> | |
| Prophylaxe3 | <input type="text" value="Hvdrocortison"/> | |
| Prophylaxe4 | <input type="text" value="Pantozol"/> | |
| Prophylaxe5 | <input type="text" value="Cvclosporin A"/> | |
| Prophylaxe6 | <input type="text"/> | |
| Prophylaxe7 | <input type="text"/> | |
| Prophylaxe8 | <input type="text"/> | |
| Prophylaxe9 | <input type="text"/> | |
| Prophylaxe10 | <input type="text"/> | |
| Prophylaxe11 | <input type="text"/> | |
| Prophylaxe12 | <input type="text"/> | |
| Zytostatika | <input type="text"/> | |
| Zytostatika 2 | <input type="text"/> | |
| Zytostatika 3 | <input type="text"/> | |
| Weitere Medikamente1 | <input type="text"/> | |
| Weitere Medikamente2 | <input type="text"/> | |
| Weitere Medikamente3 | <input type="text"/> | |

zurück zu Stammdaten

Risiko-
faktoren

Mikro-
biologie

Klinik
Diagnostik

Abbildung 31. Teil 5 der Datenbank

Danksagung

An erster Stelle gebührt mein ganz besonderer Dank meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Matthias Eyrich, für die Überlassung des hochinteressanten Themas dieser Doktorarbeit und die unvergleichliche Betreuung. Von Herzen möchte ich mich für die viele Zeit in den vergangenen Jahren, inmitten eines fordernden Klinikalltags, bedanken, in der ich alle Fragen stellen, alle Ideen besprechen und jegliche Unterstützung und Rat einholen durfte. Zudem bin ich sehr dankbar für die Mitbenutzung des Büros während der Zeit der Datenerhebung und das Wecken der Freude am wissenschaftlichen Arbeiten, insbesondere im infektiologischen Kontext.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Oliver Kurzai für die Übernahme des Koreferats und die sehr lehrreiche und angenehme mündliche Prüfung bedanken.

Ebenso zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn Professor Dr. Jürgen Löffler und Herrn Dr. Jan Springer für die großartige Kooperation, stete Unterstützung in der Studienorganisation sowie allen Phasen des gemeinsamen Projektes und die herausragende fachliche Expertise.

Ein großer Dank gilt dem gesamten Team der Station Schatzinsel für die sehr lehrreiche und prägende Famulatur, in der ich mich von der klinisch-praktischen Seite meinem Doktorarbeitsthema nähern durfte. Gedenken und danken möchte ich an dieser Stelle den vielen kleinen Patienten, deren Daten die Grundlage dieser Doktorarbeit darstellen und die ich in meiner Famulatur zum Teil persönlich kennenlernen durfte. Euren Lebensmut und Eure Stärke werde ich nie vergessen.

Ich möchte mich bei meinem zukünftigen Mann Joannis bedanken, der durch seine exzellente Forschungstätigkeit eine stete Quelle der Inspiration und Motivation darstellte und so maßgeblich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen hat.

Zudem gilt mein Dank meiner geliebten Großmutter Käthe, die mich durch ihren Lebenswillen und ihre Kraft tief geprägt und den Grundstein für diese Arbeit gelegt hat.

Zuletzt und ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern Barbara und Peter für ihre bedingungslose Unterstützung jeder meiner Schritte, für Wurzeln und Flügel und den Glauben an mich bedanken.

Curriculum Vitae Julia Hafner

Geburtstag: 7. Dezember 1990
Geburtsort: Mainz, Deutschland
Nationalität: Deutsch

Berufserfahrung

Seit 01/2021 Facharztausbildung Innere Medizin, Schwerpunkt Infektiologie, Medizinische Klinik II, Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt
06/2019 - 12/2020 Facharztausbildung Innere Medizin, Sektion Klinische Infektiologie, Medizinische Klinik IV, Klinikum der Universität München (LMU)
08 – 11/2018 Traineeship, Sektion Humanitäre Angelegenheiten, Delegation der Europäischen Union zu den Vereinten Nationen; New York, USA

Ausbildung

10 – 12/2017 Diploma of Tropical Medicine and International Health (DTMIH), Tropeninstitut München und Center for International Health; München
Seit 2016 Masterstudiengang „Global Health Policy“, London School of Hygiene and Tropical Medicine; London, England
2010 – 2017 Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität; Würzburg
03/2010 Abitur, Gutenberg Gymnasium; Mainz

Publikationen

06/2020 Hafner J, Bogner J. 30 Jahre ART: Vom Todesurteil zur chronischen Erkrankung: HIV-Therapie [30 years of antiretroviral therapy: from death sentence to chronic illness]. MMW Fortschr Med. 2020;162(Suppl 2):16-19.
10/2016 Loeffler J*, Hafner J* et al. Prospective Biomarker Screening for Diagnosis of Invasive Aspergillosis in High-Risk Pediatric Patients. J Clin Microbiol. 2016 ;55(1):101-109.

Stipendien

2018 Reisestipendium, Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD)
2011 – 2017 Stipendium der Studienförderung, Konrad- Adenauer- Stiftung