

STELLENWERT DER  
(1-3)- $\beta$ -D GLUKANTESTUNG ZUR DIAGNOSE VON  
INVASIVEN PILZINFEKTIONEN IM KLINISCHEN ALLTAG

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Marta Jozefina Zubkowicz  
geboren am 18.10.1995 in Berlin**

## **Gutachter**

1. Prof. Dr. Marie von Lilienfeld -Toal
2. Prof. Dr. Oliver Kurzai
3. Prof. Dr. Mathias Pletz

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.02.2022

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Invasive Pilzinfektionen (IPI) gehen mit einer hohen Sterblichkeit einher. In den letzten Jahren konnte ein Anstieg der IPI verzeichnet werden. Die Prognose und der Verlauf der Erkrankung werden durch eine frühzeitige Diagnose und Beginn der Therapie positiv beeinflusst. Blutkulturen gelten als der diagnostische Goldstandard, sind aber zeitaufwändig und erreichen nur eine moderate Sensitivität. Serologische Methoden stellen eine schnelle und vielversprechende Alternative dar.

**Fragestellung:** Das Ziel dieser Studie war es, die diagnostische Fähigkeit des fungalen Markers (1-3)- $\beta$ -D Glukan (BDG) anhand des Fungitell Assays, Associates of Cape Cod, East Falmouth, Massachusetts ® (FA) und des Wako Tests, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan (GT) im klinischen Alltag zu vergleichen.

**Methodik:** Bei dieser Studie handelt es sich um eine retrospektive Kohortenstudie. Die Studie wurde zwischen November 2018 und März 2019 am Universitätsklinikum Jena (UKJ) durchgeführt. Die Indikation zur BDG-Testung stellten die Ärzte des Institutes für Infektionsmedizin und Krankenhaushygiene. Alle Patienten wurden nach den Kriterien der European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) zur Diagnose einer IPI eingeteilt. Die BDG-Konzentrationen jedes Patienten wurden durch den FA und GT analysiert.

**Ergebnisse:** Es wurden 109 interdisziplinäre Patienten mit dem klinischen Verdacht einer IPI in die Studie einbezogen. 56 Patienten (51.4%) hatten mindestens einen Risikofaktor für eine IPI. Bei Patienten mit einer bewiesenen IPI (n = 11) oder einer wahrscheinlichen IPI (n = 20), lagen die medianen BDG-Konzentrationen bei 145 pg/ml für den FA und 5.1 pg/ml für den GT. Ein positives Testergebnis, laut Schwellenwerten der Hersteller, sagte 89.5% - 98.3% der bewiesenen oder wahrscheinlichen IPI für beide Tests voraus. Die Sensitivität der beiden Tests war jedoch limitiert: der FA identifizierte 60.7% der IPI (Schwellenwert: 80 pg/ml). Mit der Anpassung des Schwellenwertes von 11 auf 4.1 pg/ml für den GT konnte die Sensitivität des Tests von 35.5% auf 54.8% gesteigert werden.

**Schlussfolgerung:** Ein positives Testergebnis beider Hersteller, hatte einen hohen positiven prädiktiven Wert. Dennoch sind die Sensitivitäten nicht ausreichend. Lediglich die Sensitivitäten im Falle einer Pneumocystis Pneumonie (PCP) waren hoch genug, um eine Diagnose zu unterstützen. Eine Anpassung des Schwellenwertes des GT ist nötig, um eine vergleichbare Leistung zum FA sicher zu stellen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>III</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
<b>I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
2.1    EPIDEMIOLOGIE UND KLINIK DER INVASIVEN PILZINFEKTIONEN.....	1
2.2    DIAGNOSE DER INVASIVEN PILZINFEKTIONEN.....	2
2.3    SEROLOGISCHE METHODEN UND BDG-TEST.....	3
<b>3 ZIELE DER ARBEIT</b> .....	<b>5</b>
<b>4 PUBLIZIERTE ORIGINALARBEIT</b> .....	<b>6</b>
<b>5 DISKUSSION</b> .....	<b>14</b>
5.1    DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	14
5.2    LIMITATIONEN DER STUDIE.....	16
5.3    AUSBLICK.....	17
<b>6 SCHLUSSFOLGERUNG</b> .....	<b>19</b>
<b>II LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>VI</b>
<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG</b> .....	<b>XIII</b>

## I Abkürzungsverzeichnis

<b>IPI</b>	Invasive Pilzinfektionen
<b>BDG</b>	(1,3) - $\beta$ -D Glukan
<b>FA</b>	Fungitell Assays, Associates of Cape Cod, East Falmouth, Massachusetts ®
<b>GT</b>	Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan
<b>UKJ</b>	Universitätsklinikum Jena
<b>EORTC</b>	European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)
<b>PCP</b>	Pneumocystis jirovecii Pneumonie
<b>spp.</b>	Species
<b>GM</b>	Galaktomannan
<b>FDA</b>	Federal Drug Administration
<b>CE</b>	Conformitee Europeenne

# 1 Einleitung

## 2.1 Epidemiologie und Klinik der Invasiven Pilzinfektionen

IPI stellen ein hohes Mortalitätsrisiko für Patienten mit bestimmten Vorerkrankungen dar (Hadley, Lee et al. 2002, Kett, Azoulay et al. 2011). In immunsupprimierten oder schwerkranken Patienten mit septischem Schock variieren die Mortalitätsraten zwischen 50%-80% (Hadley, Lee et al. 2002, Forstner, Lassnigg et al. 2013, Schauwvlieghe, Rijnders et al. 2018). Diese Risikogruppe ist in den letzten Jahren stetig gewachsen (Bitar, Lortholary et al. 2014, Delaloye and Calandra 2014). Fortschritte wie Organtransplantationen oder andere intensivmedizinische Verfahren verlängern die Lebenserwartung vieler immunsupprimierter und multimorbider Patienten. Mit der wachsenden Anzahl immunsupprimierter Patienten, wächst auch die Inzidenz der IPI (Arendrup 2010, Bitar, Lortholary et al. 2014, Lortholary, Renaudat et al. 2014). Ungefähr 15% der krankenhausessoziierten Infektionen werden durch Pilze verursacht (Delaloye and Calandra 2014).

Unter IPI versteht man schwere, generalisierte Infektionen der Blutbahn oder Infektionen der inneren Organe durch Pilze (De Pauw, Walsh et al. 2008). Zu den häufigsten Erregern einer IPI zählen *Candida species (spp.)*, *Aspergillus spp.*, sowie *Pneumocystis jirovecii* (Bitar, Lortholary et al. 2014). *Candida spp.*, verursacht 80% der IPI Infektionen, dabei manifestiert diese sich am häufigsten als eine Candidämie (Delaloye and Calandra 2014). 10-20% aller IPI werden durch invasive Aspergillieninfektionen verursacht (Delaloye and Calandra 2014). Um eine Infektion verursachen zu können, benötigen Pilze Eintrittspforten durch Schäden an der natürlichen Barriere des Wirtes oder eine gestörte zelluläre Immunantwort des Wirtes (Delaloye and Calandra 2014). Besonders gefährdet sind dabei hämatookologische Patienten, da sie eine eingeschränkte Immunreaktion aufweisen (Lamoth and Calandra 2017). Unter den Risikofaktoren für eine Candidämie finden sich aber auch weitere unspezifische und iatrogene Risikofaktoren. Sie beinhalten prolongierte Krankenhausaufenthalte, Breitbandantibiotika, intravenöse Zugänge, zentralvaskuläre Katheter, totale parenterale Ernährung, mechanische Ventilation, Niereninsuffizienz, Nierenersatzverfahren, Diabetes mellitus, Corticosteroide, Immunsupprimierung und Kolonisierung durch *Candida* (Delaloye and Calandra 2014, Lortholary, Renaudat et al. 2014). Je länger und aufwändiger der Krankenhausaufenthalt ist, desto höher das Risiko an einer IPI zu erkranken.

Die klinischen und radiologischen Zeichen einer invasiven Pilzinfektion sind ebenfalls unspezifisch und bleiben somit lange unerkannt (Ostrosky-Zeichner 2012, Lamoth and Calandra 2017). Eine erhöhte Körpertemperatur oder steigende Infektionswerte bei schwerkranken Patienten können Ärzte differentialdiagnostisch an eine IPI denken lassen. Oft äußert sich eine IPI erst durch eine Sepsis oder einen septischen Schock (Delaloye and Calandra 2014), da eine fungale Sepsis klinisch nicht von einer bakteriellen Sepsis unterschieden werden kann (Hadley, Lee et al. 2002, Delaloye and Calandra 2014).

## 2.2 Diagnose der invasiven Pilzinfektionen

Die Diagnose einer IPI basiert vor allem auf drei Pfeilern: klinische Symptome, bildgebende Verfahren und mikrobiologische Untersuchungen (Ullmann, Aguado et al. 2018). Die EORTC Richtlinien beschreiben Kriterien, mit denen sich die Wahrscheinlichkeit einer IPI Diagnose bestimmen lässt. Primär sind diese Richtlinien zur Verwendung in Studien gedacht und beschränken sich auf immunsupprimierte Patienten. Dabei wird in a) bewiesen, b) wahrscheinlich und c) möglich unterschieden. Bewiesene IPI müssen durch eine histopathologische Untersuchung oder eine Kultur aus sterilem Gewebe, Blut oder Liquor cerebrospinalis nachgewiesen werden. Wahrscheinliche IPI hängen von drei Faktoren ab: dem individuellen Risikoprofil des Patienten, klinischen Zeichen einer IPI, und mikrobiologischen Untersuchungen, die nicht zu einer bewiesenen IPI beitragen. Mögliche IPI zeichnen sich durch vorhandene Risikofaktoren des Patienten und klinische Symptome aus, während mikrobiologische Hinweise für eine IPI fehlen (De Pauw, Walsh et al. 2008). Die EORTC Richtlinien illustrieren die Komplexität einer IPI Diagnose. Lediglich histopathologische Untersuchungen und sterile Kulturen liefern einen sicheren Nachweis für eine IPI und dienen somit als Goldstandard. Die restlichen Faktoren können nur als Hinweise gedeutet werden, und sind für eine Diagnose allein nicht ausreichend.

Der Verlauf und die Prognose einer IPI wird vor allem durch eine frühe Diagnose und den daraus resultierenden frühzeitigen Beginn einer antimykotischen Therapie bestimmt (Morrell, Fraser et al. 2005, Garey, Rege et al. 2006, Andes, Safdar et al. 2016). Mangels schneller diagnostischer Möglichkeiten wird im klinischen Alltag dann auf eine empirische Pilztherapie in den betroffenen Patientengruppen gesetzt (Azoulay, Dupont et al. 2012). Im Hinblick auf Kosten, Nebenwirkungen und entstehende Resistenzen ist eine empirische Therapie jedoch keine optimale Lösung (Arendrup 2010, Clancy and Nguyen 2013).

Für die Diagnose einer Candidämie wird ein Nachweis in einer Blutkultur benötigt. In diesem Fall würde das Warten auf das Ergebnis der Blutkultur den Beginn der Therapie, um 2-4 Tage verspäten (Clancy and Nguyen 2018). Hinzu kommt, dass Blutkulturen zwar als Goldstandard gewertet werden, aber nur 50% der IPI erkennen oder erst im späteren Verlauf der IPI positiv werden (Arendrup 2010, Clancy and Nguyen 2013). Vorteile der Blutkulturen sind neben der genauen Identifikation des Erregers, die Möglichkeit einer Empfindlichkeitstestung.

50% der primären Candidämien resultieren in einer sekundären tiefsitzenden Candidose (Clancy and Nguyen 2018). Tiefsitzende Infektionen stellen ein besonderes diagnostisches Problem dar, da die Materialgewinnung besonders aufwändig ist und mit einem erhöhten Risiko für den Patienten verbunden ist. Bei den invasiven Pneumonien stellen bronchoalveoläre Proben das Material mit der höchsten Sensitivität da. Oftmals ist eine solche Probengewinnung aber aufgrund der Grunderkrankung des Patienten zu riskant.

### **2.3 Serologische Methoden und BDG-Test**

Um die Diagnose einer IPI und somit auch die Überlebenschancen der Patienten zu optimieren ist ein Test mit einer hohen Sensitivität, schnellen Ergebnissen und minimal invasiver Probengewinnung erforderlich. Besonders vielversprechend sind serologische Tests, die es ermöglichen Zellteile wie Galaktomannan (GM) und BDG, antigene Komponenten, Antikörper oder fungale DNA identifizieren zu können. Trotz einer Vielfalt an erhältlichen Testen schafften es bisher nur einige BDG-, GM-, und PCR-Tests validiert und in den klinischen Alltag etabliert zu werden (De Pauw, Walsh et al. 2008, Cuenca-Estrella, Verweij et al. 2012, Donnelly, Chen et al. 2019). Im Folgendem werden die BDG-Tests näher auf ihren klinischen Nutzen hin evaluiert.

BDG ist ein Polysaccharid vieler Pilzwände. Während des Wachstums der Pilze im Menschen als Wirt, wird BDG in die umliegenden Gewebe und ins Blut freigesetzt, wo er als Biomarker für eine Erkrankung dienen kann (Tissot, Lamoth et al. 2013). Da die meisten herkömmlichen Pilze BDG als Bestandteil ihrer Zellwände haben, deckt es die Pilzarten mit der größten klinischen Relevanz ab. Gleichzeitig bedeutet es jedoch auch, dass BDG ein panfungaler Marker ist und eine eindeutige Zuordnung der Infektion durch den Test nicht möglich ist (Cuenca-Estrella, Kett et al. 2019).

BDG Tests basieren auf der Aktivierung der Koagulationskaskade durch den Koagulationsfaktor G in dem Amöbozyten-Lysat der Northshoe Krabbe.



Anschließend werden die Konzentrationen mithilfe kolorimetrischer (FA) oder turbidimetrischer (GT) Methoden bemessen.

Auf dem Markt sind bereits mehrere BDG-Tests vertreten (Yoshida, Shoji et al. 2011). Bis vor kurzem war der FA der einzige BDG-Test mit einer Zulassung durch die Federal Drug Administration (FDA) in den USA und einer Conformance Européenne (CE) Kennzeichnung (Clancy and Nguyen 2018). Daher ist der FA bis dato am häufigsten in klinischen Studien untersucht worden und am weitesten verbreitet (White, Schmidt et al. 2020). Doch der FA bringt ökonomische und methodologische Nachteile mit sich. In jedem Testdurchlauf des FA müssen 21 Proben simultan getestet werden mit zusätzlichen Kontrollproben. Das führt dazu, dass bestimmte Krankenhäuser mehrere Tage warten müssen, um diese Anzahl von Testungen zu erreichen (Clancy and Nguyen 2018, Dichtl, Seybold et al. 2018). Neuere BDG-Tests, wie der GT, sollen eine einfachere Handhabung ermöglichen, jedoch wurden sie bisher nicht ausreichend getestet und verglichen. Ein direkter Vergleich ist schwierig, da die Methoden der Messung und damit auch die Schwellenwerte grundlegend anders sind. Laut Richtlinien ist somit nur der FA für die Diagnose einer IPI empfohlen (Donnelly, Chen et al. 2019). Weitere mögliche Nachteile der BDG-Tests sind die aus der Literatur bekannten falsch-positiven Einflussfaktoren (Ostrosky-Zeichner 2012).







Die bisher durchgeführten Studien zeigen große Diskrepanzen zwischen den Sensitivitäten und Spezifitäten der Tests. Dadurch ist es kaum möglich, Rückschlüsse auf den klinischen Nutzen der Tests zu ziehen (White, Schmidt et al. 2020). Eine Metanalyse fand Sensitivitäten zwischen 57%-97% und Spezifitäten zwischen 56%-93% (Karageorgopoulos, Vouloumanou et al. 2011). Trotz der uneindeutigen Studienergebnisse wurden die BDG-Tests bereits unter bestimmten Bedingungen in Richtlinien aufgenommen (Cuenca-Estrella, Verweij et al. 2012, Alanio, Hauser et al. 2016, Donnelly, Chen et al. 2019).

### 3 Ziele der Arbeit

Serologische Tests wie der BDG stellen eine vielversprechende diagnostische Ergänzung zu Blutkulturen dar, die sich vor allem durch die Schnelligkeit der Ergebnisse auszeichnen. Hauptziel der Studie war es den Nutzen der BDG-Tests im klinischen Alltag am UKJ zu evaluieren. Bisherige Studien nutzten vor allem den FA, während andere Tests wie der GT noch nicht ausreichend evaluiert wurden. Ziel der Studie war es

- 1) die diagnostische Leistung von zwei verschiedenen BDG-Tests, dem FA und dem GT zu prüfen
- 2) den optimalen Schwellenwert für den GT zu bestimmen
- 3) Faktoren zu identifizieren, welche die BDG-Konzentration beeinflussen können

## 4 Publierte Originalarbeit

Received: 10 September 2020	Revised: 3 November 2020	Accepted: 4 November 2020
DOI: 10.1111/myc.13207		
ORIGINAL ARTICLE		mycoses Mycoses, Infection and Tropical Medicine WILEY
<h2>Clinical evaluation of two different (1,3)-<math>\beta</math>-D-glucan assays for diagnosis of invasive fungal diseases: A retrospective cohort study</h2>		
<p>Marta Zubkowicz<sup>1</sup>   Jürgen Held<sup>2</sup>    Michael Baier<sup>3</sup>    Mathias W. Pletz<sup>1</sup>             Miriam Kesselmeier<sup>4,5</sup>    Stefan Hagel<sup>1</sup>    Christina Bahrs<sup>1,6</sup> </p>		
<p><sup>1</sup>Institute for Infectious Diseases and Infection Control, Jena University Hospital/Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany  <sup>2</sup>Mikrobiologisches Institut - Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Universitätsklinikum Erlangen und Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany  <sup>3</sup>Institute of Medical Microbiology, Jena University Hospital/Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany  <sup>4</sup>Research Group Clinical Epidemiology, Centre for Sepsis Control and Care (CSCC), Jena University Hospital/Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany  <sup>5</sup>Institute of Medical Statistics, Computer and Data Sciences, Jena University Hospital/Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany  <sup>6</sup>Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Department of Medicine I, Medical University of Vienna, Vienna, Austria</p>		
<p><b>Correspondence</b>          Christina Bahrs, Institute of Infectious Diseases and Infection Control, Jena University Hospital/Friedrich-Schiller-University, Am Klinikum 1, 07747 Jena, Germany.          Email: christina.forstner@med.uni-jena.de</p> <p><b>Funding information</b>          This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit science. MK was supported by the Integrated Research and Treatment Center—Center for Sepsis Control and Care (CSCC) at the Jena University Hospital/Friedrich-Schiller-University, funded by the German Ministry of Education and Research (BMBF No. 01EO1502). JH was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Grant HE 8209/1-1.</p>	<p><b>Abstract</b>  <b>Background:</b> Early diagnosis of invasive fungal diseases (IFDs) remains a major challenge in routine clinical practice.  <b>Objectives:</b> The aim of this retrospective cohort study was to evaluate the diagnostic performance of the fungal biomarker (1,3)-<math>\beta</math>-D-glucan (BDG) using the <math>\beta</math>-Glucan test (GT) and the well-established Fungitell assay® (FA) in real-life clinical practice.  <b>Patients/Methods:</b> We included 109 patients with clinical suspicion of IFD who were treated at Jena University Hospital, Germany, between November 2018 and March 2019. The patients were classified according to the latest update of the EORTC/MSG consensus definitions of IFD. The first serum sample of every patient was analysed for BDG using the FA and the GT, respectively.  <b>Results:</b> Fifty-six patients (51.4%) had at least one host factor for IFD. In patients with proven (<math>n = 11</math>) or probable IFDs (<math>n = 20</math>), median BDG concentrations were 145.0 pg/ml for the FA and 5.1 pg/ml for the GT, respectively. A positive test result of both BDG assays at manufacturer's cut-offs predicted 89.5%–98.3% of proven or probable IFD, but the sensitivity of both assays was limited: The FA identified 60.7% of IFDs (cut-off: 80 pg/ml). Reducing the GT cut-off value from 11.0 to 4.1 pg/ml increased the detection rate of IFDs from 35.5% to 54.8%.  <b>Conclusions:</b> A positive test result of both BDG assays at manufacturer's cut-off was highly predictive for IFD, but except for <i>Pneumocystis jirovecii</i> pneumonia sensitivities were limited. Adjustment of the GT cut-off value equalised sensitivities of GT and FA.</p>	
Marta Zubkowicz and Jürgen Held contributed equally to this work.		
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. © 2020 The Authors. Mycoses published by Wiley-VCH GmbH		
212	wileyonlinelibrary.com/journal/myc	Mycoses. 2021;64:212–219.

## KEYWORDS

(1,3)- $\beta$ -D-Glucan, *Aspergillus*, *Candida*, invasive fungal disease, *Pneumocystis*

## 1 | INTRODUCTION

Invasive fungal diseases (IFDs) are life-threatening infections with overall 30-day mortality rates of approximately 40%,<sup>1,2</sup> rising to 50%-80% in severely immunocompromised or critically ill patients with septic shock.<sup>3-5</sup> The most common pathogens causing IFDs in Germany are *Candida spp.*, followed by *Aspergillus spp.* and *Mucorales spp.*<sup>6</sup> Reliable and early diagnosis of IFD are the central challenge in routine clinical practice.<sup>7</sup> However, due to unspecific clinical symptoms and limited diagnostic approaches, the diagnosis of IFDs is often delayed or even missed.<sup>8</sup> In fact, at least 50% of invasive candidiasis cases remain blood culture negative,<sup>9,10</sup> and prospective autopsy studies showed that the diagnosis of invasive aspergillosis is frequently missed in critically ill patients.<sup>11,12</sup> Microbiological culture of sterile sites or histopathological examination are necessary for a confirmatory diagnosis of IFD.<sup>13</sup> Although invasive diagnostic methods remain the gold standard,<sup>14</sup> non-invasive diagnostics are of particular interest for daily routine.<sup>9,12,15</sup> Currently, there are a number of serological biomarkers (eg *Aspergillus* galactomannan, *Candida* mannan/anti-mannan antibodies and (1,3)- $\beta$ -D-glucan [BDG]) utilised in the diagnosis of IFDs.<sup>16,17</sup>

BDG assays can detect most fungal pathogens, including *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* and *Pneumocystis jirovecii*. However, BDG is no panfungal marker. For instance, Cryptococci and *Mucorales* produce only small amounts of BDG or no BDG at all and consequently, they cannot be detected by BDG assays.<sup>18</sup> Currently, BDG assays from multiple manufacturers are available. Among them, the Fungitell assay® (FA; Associates of Cape Cod, Inc, USA) is the most commonly used, as it was the first to be acknowledged by the FDA (US Food & Drug Administration) and it is currently the only one recommended by the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium (EORTC/MSG) for diagnosing probable invasive candidiasis and *P jirovecii* pneumonia (PCP) in the appropriate clinical setting.<sup>13</sup> However, performing the FA is challenging due to methodological reasons, as 21 specimens have to be assessed in one test run to guarantee cost-efficiency.<sup>19</sup> Other assays, such as the  $\beta$ -Glucan test (GT; FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Germany), are more convenient because they can be performed with a single specimen but they are less well evaluated.<sup>13</sup> The GT allows random access processing of samples independent from batch size also in settings with limited sample throughput. Immediate testing avoids substrate decay and contamination on sample transport to remote test sites.

The primary aim of this study was to evaluate and compare the FA and the GT for diagnosing IFDs in real-life practice. The secondary objective was to adjust diagnostic accuracy of GT testing by adapting the cut-off level.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 | Study design

This retrospective cohort study was performed at Jena University Hospital (JUH), Germany, between November 2018 and March 2019. Patients with clinical suspicion of any IFD, in whom at least one GT was performed, were included. Clinical indication to perform a BDG sample was recommended by a specialist of the Institute of Infectious Diseases of the JUH during daily clinic-wide consultations and during weekly antibiotic stewardship visits at the intensive care units. If patients received more than one GT per hospital stay, only the first one was considered. The ethical approval was provided by the Ethics Committee of JUH (Reg. No.: 2019-1354). Due to the retrospective nature of the study, the need of an informed consent was waived by the Ethics Committee.

### 2.2 | Microbiological measurements

The GT was performed at the Institute of Medical Microbiology at the JUH. For the FA, sera of each patient were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  and then collectively tested for the presence of BDG at the Microbiology Institute of the University Hospital Erlangen, Germany. Both assays were conducted according to the manufacturers' instructions. For GT, samples without a detectable concentration of BDG were reported for technical reasons as  $<2.35$  pg/ml. In the past, samples with a concentration of 11 pg/ml or larger were regarded as positive. Recently, a lower cut-off value of 7 pg/ml was recommended to improve the test's accuracy and will probably be soon adapted by the manufacturer.<sup>20</sup> The manufacturer of the FA recommends a positivity threshold of 80 pg/ml.

### 2.3 | Data collection and definition

We collected demographic and clinical characteristics from the patients' electronic files, including age, gender, admission to an intensive care unit (ICU), presence of septic shock, outcome at discharge, treating clinical department, comorbidities (as considered by the Charlson Comorbidity Index), presence of any host factor for IFD according to the EORTC/MSG classification,<sup>13</sup> ongoing antifungal treatment or prophylaxis, antimicrobial therapy administered up to 7 days before or on the date of the BDG test, and known possible risk factors for false-positive BDG results. These possible risk factors included recent abdominal surgery, pretreatment with beta-lactam antibiotics, renal replacement therapy, administration of blood products (eg erythrocytes, thrombocytes, albumin,

intravenous immunoglobulins) and total parenteral nutrition.<sup>9,21-23</sup> Furthermore, we recorded sites of microbiological specimens and pathogens taken up to 7 days before or after the BDG test.

The GT results were compared to those of the FA because it is the most extensively studied BDG assay and the only one recommended by the EORTC/MSG. The patients were classified into 'proven', 'probable' or 'possible' IFD according to the criteria established by the EORTC/MSG in 2019.<sup>13</sup> However, in the present study, the FA did not serve as inclusion criterion and was not used for EORTC/MSG classification to avoid incorporation bias. Patients that did not fulfil the criteria for any of the IFD groups were denoted as having 'unlikely' IFD. IFDs included infections caused by yeasts (mainly *Candida spp.*), moulds (mainly *Aspergillus spp.*) or *Pjirovecii*.

## 2.4 | Statistical analysis

To summarise patients' characteristics and to compare GT and FA results among patients stratified by clinical diagnosis of IFD, we provide absolute and relative frequencies, or the median complemented by the first and third quartile (Q1, Q3). As the FA was tested in duplicates, the categorical agreement between both results was verified, and the value from the first FA was used for further analysis.

To compare the GT for different cut-off values with the FA (cut-off: 80 pg/ml; defined as the reference standard in our analysis), we first provide the receiver operating characteristics (ROC) curve and the area under the ROC curve (AUC) with 95% confidence intervals (CIs). Based on the ROC curve, we identified an optimal cut-off value. Further investigated cut-off values were the detection threshold of the GT lot used in the present study (2.35 pg/ml) as well as the current and the former manufacturer thresholds (7.0 pg/ml, 11.0 pg/ml). For the selected cut-off values, we provide the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) together with 95% Clopper-Pearson CIs. Sensitivity is defined as the proportion of patients with a positive test among patients with proven or probable IFDs. Similarly, specificity is defined as the proportion of patients with a negative test among patients with unlikely IFDs. PPV and NPV are defined in the subgroup of patients with proven, probable or unlikely IFDs. In this subgroup, the PPV is defined as the proportion of patients with proven or probable IFDs among patients with a positive test result, and similarly, the NPV as the proportion of patients with unlikely IFDs among patients with a negative test result.

The Clopper-Pearson CIs were calculated with Microsoft Excel (Version 2001). The ROC curve analysis was done with R (version 3.6.0) and the R package pROC<sup>24</sup> (version 1.16.2). All other statistical analyses were performed using SPSS Statistics version 25.0 for Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

## 3 | RESULTS

Overall, 109 patients were included in the present study. Among them, all patients had a test result from the GT and 101 from the FA. The study population included 10 paediatric patients and 99 adult

patients. A host factor for IFD according to EORTC/MSG was present in 56 patients (51.4%) and 84 patients (77.1%) were admitted to an ICU. An overview about the demographic and clinical characteristics of the corresponding patients is provided in Table 1.

Classification of the type of IFDs and the corresponding BDG concentrations as measured by the GT and the FA are shown in Table 2. Among the 109 patients, 31 patients (28.4%) were classified as proven or probable IFD, 18 patients (16.5%) as possible IFD and 60 patients (55.0%) had an unlikely IFD. Foci of invasive candidiasis are provided in Table S1. Four of 10 patients with proven invasive candidiasis had ongoing antifungal treatment at the time of serum sampling for BDG testing. One proven pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus flavus* was diagnosed in a 16-year-old male stem cell transplant recipient with acute graft-versus-host disease by lung biopsy. This patient was under antifungal combination treatment with posaconazole and liposomal amphotericin B at time of serum sampling. No proven PCP was diagnosed because respiratory samples were tested for *Pjirovecii* solely by quantitative polymerase chain reaction (PCR) without performing microscopy. Probable invasive candidiasis, probable invasive aspergillosis and probable PCP were diagnosed in 8, 9 and 3 patients, respectively.

In patients with proven or probable IFD, median BDG concentrations were 145.0 (Q1, Q3: 41.5, 543.8) pg/ml for the FA and 5.1 (Q1, Q3: 2.5, 23.7) pg/ml for the GT, respectively. The highest BDG values were detected in the 3 patients with probable PCP (GT range: 11.5-81.4 pg/ml, FA range: 318.0-1560.0 pg/ml), followed by patients with probable invasive candidiasis (GT median (Q1, Q3): 11.4 (3.0, 94.2) pg/ml and FA median (Q1, Q3): 187.5 (64.8, 2079.8) pg/ml). The single patient with proven invasive aspergillosis was negative in both assays.

An overview about the diagnostic performance of FA and GT is provided in Table 3. The FA reached a sensitivity of 60.7% (95% CI 40.6%-78.5%), a specificity of 96.4% (95% CI 87.7%-99.6%), a PPV of 89.5% (95% CI 66.9%-98.7%) and a NPV of 83.1% (95% CI 71.7%-91.2%). The GT with the manufacturer's cut-off value of 11 pg/ml had a sensitivity of 35.5% (95% CI 19.2%-54.6%), a specificity of 98.3% (95% CI 91.1%-100.0%), a PPV of 91.7% (95% CI 61.5%-99.8%) and a NPV of 74.7% (95% CI 63.6%-83.8%).

A comparison of the GT for several cut-off values with the FA is provided in Figure 1. The AUC is 0.96 (95% CI 0.92-1.00). Based on these results, an optimal cut-off value for the GT in our cohort is 4.1 pg/ml. Subsequently, we denote this value 'optimized cut-off value'. The GT with the optimised cut-off value reached a sensitivity of 54.8% (95% CI 36.0%-72.7%), a specificity of 93.3% (95% CI 83.8%-98.2%), a PPV of 81.0% (95% CI 58.1%-94.9%) and a NPV of 80.0% (95% CI 68.7%-88.6%). Of note, none of the two BDG tests identified all patients with proven or probable IFD. Both tests, the FA and the GT with the optimised cut-off value, were positive for the same 17 proven or probable cases.

## 4 | DISCUSSION

A key advantage of evaluation of BDG for diagnosis of IFD is the easily accessible specimen source, serum.<sup>25</sup> In the present study, we evaluated the diagnostic performance of two different BDG tests,



TABLE 1 Patients' characteristics

Characteristic	Value (N = 109)
<i>Demographics</i>	
Age, in years; median (Q1, Q3)	62 (52, 70)
Male sex; n (%)	62 (56.9%)
Charlson comorbidity index <sup>a</sup> ; median (Q1, Q3)	4 (2, 6)
<i>Clinical course</i>	
ICU admission; n (%)	84 (77.1%)
Septic shock <sup>a</sup> ; n (%)	21 (19.3%)
Hospital mortality; n (%)	35 (32.1%)
<i>Host factors and other underlying diseases</i>	
Presence of any host factor for invasive fungal disease according to EORTC/MSG; n (%)	56 (51.4%)
Presence of a specific host factor	
Immunosuppressive therapy; n (%)	50 (45.9%)
Recent history of severe neutropenia <math>0.5 \times 10^9</math> neutrophils/l; n (%)	10 (9.2%)
Haematological malignancy; n (%)	16 (14.7%)
Receipt of an allogeneic stem cell transplant; n (%)	4 (3.7%)
Organ recipient; n (%)	13 (11.9%)
Solid cancer; n (%)	24 (22.0%)
Autoimmune disease; n (%)	9 (8.3%)
Chronic lung disease; n (%)	32 (29.4%)
End-stage kidney disease; n (%)	14 (12.8%)
Liver Cirrhosis Child C; n (%)	12 (11.0%)
Acquired immunodeficiency syndrome; n (%)	3 (2.8%)
Necrotising pancreatitis; n (%)	5 (4.6%)
Recurrent anastomotic leaks/perforation of upper GIT; n (%)	3 (2.8%)
<i>Other risk factors of invasive fungal disease</i>	
Recent gastrointestinal surgery; n (%)	16 (14.7%)
Broad-spectrum antibiotic pretreatment; n (%)	99 (90.8%)
Enteral nutrition; n (%)	64 (59.8%)
Use of fresh frozen plasma; n (%)	9 (8.4%)
Use of thrombocytes; n (%)	20 (18.7%)
Use of albumin; n (%)	53 (49.5%)
Use of erythrocytes; n (%)	60 (56.1%)
Use of immunoglobulins; n (%)	10 (9.3%)
Renal replacement treatment; n (%)	32 (29.9%)
<i>Ongoing prophylaxis or treatment of invasive fungal disease</i>	
Ongoing antifungal treatment; n (%)	37 (33.9%)
Ongoing cotrimoxazole prophylaxis or treatment; n (%)	15 (13.8%)

Note: Median together with first and third quartile (Q1, Q3) or absolute and relative frequencies (n, %) are provided. The total number of samples (N) is given.

Abbreviations: EORTC/MSG, European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium; GIT, gastrointestinal tract; ICU, intensive care unit.

<sup>a</sup>One patient with missing information.

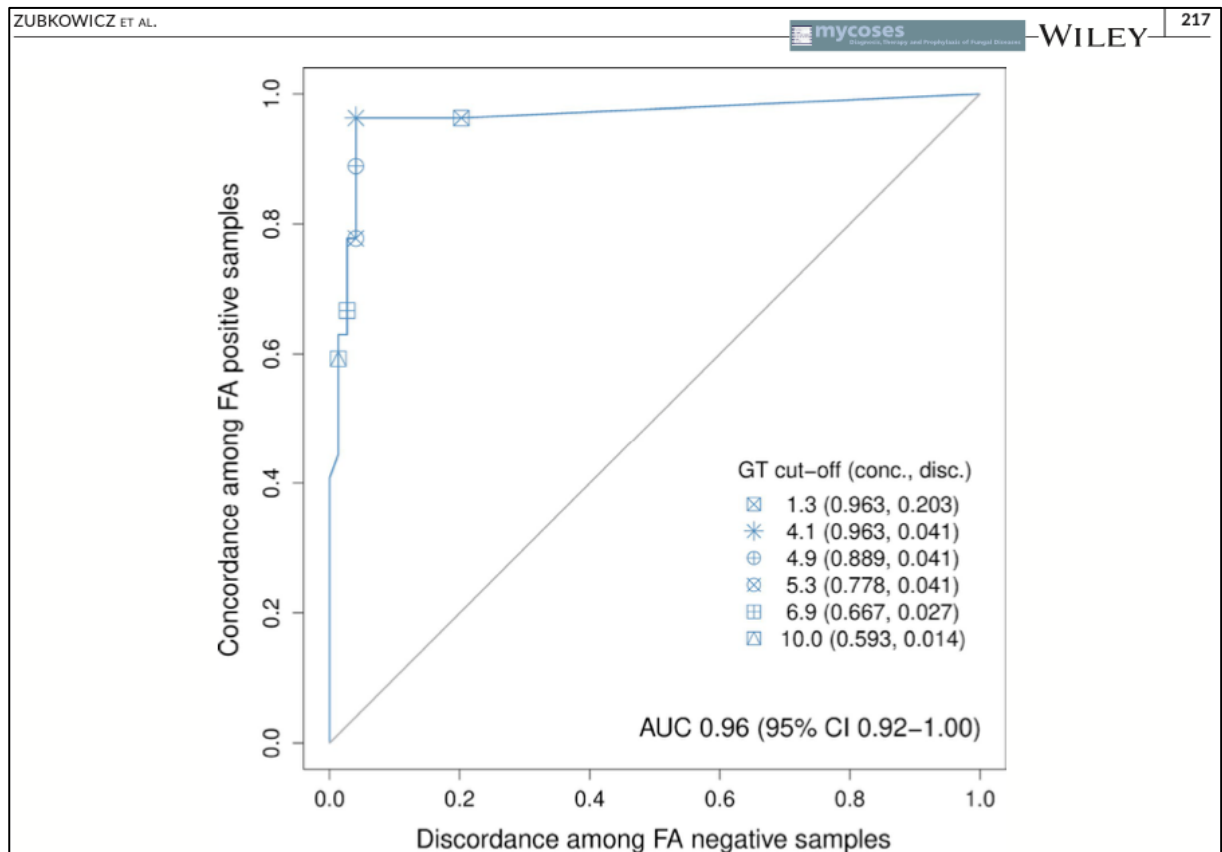
namely the Fungitell assay (FA) and the  $\beta$ -Glucan test (GT), in paediatric and adult patients with variable risk of IFDs.

There are three main results of the present study. First, in a mixed population, in which 51% of the patients had at least one host factor for an IFD according to the EORTC/MSG criteria,<sup>13</sup> a positive test result of both BDG assays at manufacturer's cut-offs predicted presence of proven or probable IFD in 89.5%-98.3% but the sensitivity of both assays (sensitivity: 60.7% by FA versus 35.5% by GT) except for PCP was limited. Second, it was necessary to adapt the cut-off value of the GT to equalise the GT sensitivity with the FA. An optimised GT cut-off value of 4.1 pg/ml yielded similar results as the FA. Still, a significant proportion of proven IFD cases were missed by both assays. In fact, FA and GT applying the optimised cut-off missed the same cases of proven IFDs, including one case of pulmonary aspergillosis, two cases of candidemia and one case of blood-culture-negative invasive candidiasis. The two additional cases of invasive candidiasis that were missed by the GT had no FA measurements. Third, high BDG concentrations were especially found in patients with probable PCP (BDG range 11.5-81.4 pg/ml for the GT and 318-1560 pg/ml for the FA, respectively) which support the value and the actual manufacturer's cut-off of both BDG assays for diagnosis of PCP.

Most included patients received antibiotic pretreatment (>90%), and one third of the patients was already under ongoing antifungal therapy at time of blood sampling for BDG measurement. While antibiotic pretreatment is clearly a risk factor for IFD, it has been shown that antifungal therapy has a negative effect on the sensitivity of fungal biomarkers.<sup>26</sup> Therefore, the low sensitivity of BDG in our study could at least partially be caused by the existing antifungal treatment. In the present study, 3 of 5 patients with proven IFD and antifungal treatment had GT values below 4.1 pg/ml. According to a recently published Cochrane systematic review that included 49 studies with a total of 6244 participants, it is not possible to estimate the diagnostic accuracy of the BDG for detecting IFD in immunocompromised or critically ill patients due to wide variation in the results for both, sensitivity and specificity.<sup>27</sup> An exception, however, are patients with PCP. We observed high BDG concentrations in the three patients with probable PCP. Similarly, Friedrich et al<sup>28</sup> found much higher BDG levels in patients with PCP than in patients with candidemia. In general, BDG measurements in the course of PCP were associated with a high sensitivity in recent studies.<sup>29-32</sup>

Similar to other studies, we observed differences between the GT and the FA in terms of diagnostic performance.<sup>28,29</sup> These differences were larger when applying the cut-off value originally proposed by the manufacturer (11 pg/ml) compared to the latest recommended manufacturer's adjusted cut-off value (7 pg/ml).<sup>20</sup> Using the manufacturer's adjusted cut-off value for the GT, the FA was still superior in detecting proven or probable IFDs. According to our observations, a further adjustment of the GT cut-off value is necessary, as the median BDG concentration of the GT for proven invasive candidiasis was only 4.4 pg/ml. According to our ROC curve analysis using the FA as the extensively studied and the only

216		WILEY mycoses		ZUBKOWICZ ET AL.		
<p><b>TABLE 2</b> Classification of invasive fungal diseases (IFDs) according to the updated definitions of EORTC/MSG and corresponding (1,3)-<math>\beta</math>-D-glucan (BDG) concentrations of the <math>\beta</math>-Glucan test (GT) and the Fungitell Assay (FA)</p>						
Classification of IFDs	Patients (n = 109)	BDG concentration, in pg/ml		No. true-negative tests/No. negative tests	Negative predictive value (95% CI), in %	
		GT (n = 109)	FA (n = 101) <sup>a</sup>			
<i>IFD diagnosis</i>						
Proven/probable	31 (28.4%)	5.1 (2.5; 23.7)	145.0 (41.5; 543.8)	54/65	83.1 (71.7-91.2)	
Possible	18 (16.5%)	4.5 (<2.35; 12.6)	73.0 (2.0; 189.5)			
Unlikely	60 (55.0%)	<2.35 (<2.35; <2.35)	11.5 (1.3; 32.0)			
<i>Invasive candidiasis</i>						
Proven/probable	18 (16.5%)	5.0 (<2.35; 48.4)	159.5 (44.3; 877.3)	17/19	89.5 (66.9-98.7)	
Possible	10 (9.2%)	9.9 (3.7; 20.1)	138.0 (38.0; 330.0)			
<i>Invasive aspergillosis</i>						
Proven/probable	10 (9.2%)	4.4 (<2.35; 7.7)	87.0 (28.5; 278.0)	24/35	68.6 (50.7-83.2)	
Possible	10 (9.2%)	<2.35 (<2.35; 1.5)	18.0 (0.0; 69.0)			
<i>Pneumocystis pneumonia</i>						
Proven/probable	3 (2.8%)	23.7 (11.5; 81.4)	402.0 (318.0; 1560.0)	17/21	81.7 (69.6-90.5)	
Possible	3 (2.8%)	4.1 (<2.35; 6.4)	133.0 (8.0; 292.0)			
<p>Note: The total number of patients (n) is given. Absolute and relative frequency of patients with respective classifications as well as the median together with the first and third quartile for the BDG concentrations are provided. '&lt;2.35' indicates below detection threshold and '-1' not applicable.</p> <p><sup>a</sup>There are 8 patients with missing FA measurement. The missing measurements are differently distributed in relation to (i) IFD diagnosis (proven/probable: 3, possible: 1, unlikely: 4), (ii) invasive candidiasis (proven/probable: 2, possible: 1), and (iii) invasive aspergillosis (proven/probable: 1, possible: 0).</p>						
<p>recommended BDG assay as reference,<sup>13</sup> we were able to show an optimised GT cut-off value of 4.1 pg/ml, which is in agreement with other studies.<sup>28</sup> Mercier et al and Friedrich et al proposed an even lower cut-off at 3.7 pg/ml.<sup>28,29</sup> The establishment of a lower cut-off level, however, is a double-edged sword. Lower cut-off levels will result in an increase of false-positive test results and therefore require an even more cautious interpretation. In fact, a reduction of the GT cut-off decreased the PPV of the GT for diagnosis of IFD from 91.7% (cut-off 11.0 pg/ml) to 81.0% (cut-off 4.1 pg/ml) in the present study. Nevertheless, a lower cut-off value may improve the sensitivity of the GT, and hence, the GT would become a valuable competitor to the FA. However, the limit of quantification of the GT is dependent on the lot of the assay and usually ranges between 2 and 6 pg/ml. As a consequence, the official measurement range of the GT is from 6 to 600 pg/</p>						
<b>TABLE 3</b> Diagnostic performance of the $\beta$ -Glucan test (GT) and the Fungitell Assay (FA) for diagnosis of invasive fungal disease (IFD)						
Cut-off, in pg/ml	No. true-positive tests/No. patients with proven or probable IFD	Sensitivity (95% CI), in %	No. true-negative tests/No. patients with unlikely IFD	Specificity (95% CI), in %	No. true-positive tests/No. positive tests	Positive predictive value (95% CI), in %
Fungitell						
80	17/28	60.7 (40.6-78.5)	54/56	96.4 (87.7-99.6)	17/19	89.5 (66.9-98.7)
$\beta$ -Glucan test						
2.35	24/31	77.4 (58.9-90.4)	49/60	81.7 (69.6-90.5)	24/35	68.6 (50.7-83.2)
4.1	17/31	54.8 (36.0-72.7)	56/60	93.3 (83.8-98.2)	17/21	81.0 (58.1-94.6)
7.0	11/31	35.5 (19.2-54.6)	57/60	95.0 (86.1-99.0)	11/14	78.6 (49.2-95.3)
11.0	11/31	35.5 (19.2-54.6)	59/60	98.3 (91.1-100.0)	11/12	91.7 (61.5-99.8)
<p>Note: Patients with proven, probable or unlikely IFDs are considered (for patients with possible IFDs, see Table S2). Absolute numbers (no.) and relative frequencies together with 95% confidence intervals (CI) are provided for selected cut-off values.</p> <p>For FA, the manufacturer's cut-off value of 80 pg/ml is given. For GT, several cut-off values (comprising the limit of quantification of the GT lot used in our study of 2.35 pg/ml, manufacturer's initial cut-off value of 11 pg/ml, manufacturer's adjusted cut-off value of 7 pg/ml and optimised cut-off value of 4.1 pg/ml) are provided.</p> <p>Definitions: True-positive tests are defined as positive tests in patients with proven or probable IFD. True-negative tests are defined as negative tests in patients with unlikely diagnosis of IFD. False-positive tests are defined as positive tests in patients with unlikely diagnosis of IFD. False-negative tests are defined as negative tests in patients with proven or probable IFD.</p>						



**FIGURE 1** Receiver operating characteristics (ROC) curve (blue) for assessing the concordance between the Glucan test (GT) and the Fungitell Assay (FA; cut-off: 80 pg/ml) as reference. The observed proportion of concordant test results among FA-positive samples (conc.) and of discordant test results among FA-negative samples (disc.) are provided for selected GT cut-off values. The identity (no discrimination) line is given in grey. The area under the ROC curve (AUC) and the corresponding 95% confidence interval (CI) are provided. The analysis is based on those samples which were measured with GT and FA, that is on 101 samples

ml. In the GT lot used in our study, the limit of quantification was 2.35 pg/ml and consequently a cut-off of 4.1 pg/ml was within the reliable quantification range. But, sometimes there will be a GT lot with a limit of quantification above the reliable quantification range. To avoid such a situation, the manufacturer will lower the cut-off in the near future to 7 pg/ml, but not lower (personal communication).

False-positive results are a known limitation of BDG testing.<sup>21,33–35</sup> Risk factors for false-positive test results mentioned in previous studies include blood products such as albumin, immunoglobulins, beta-lactam antibiotics and previous abdominal surgery.<sup>21–23,36</sup> The therapy of critically ill patients often includes many of the risk factors mentioned above.<sup>37</sup> Although the presence of known risk factors associated with false-positive BDG results was high in our study (95.5% of the patients had at least a single risk factor), the rate of positive test results in patients with an unlikely IFD diagnosis remained below 7%. This implicates that the above-mentioned risk factors do not uniformly cause elevated BDG levels. A possible explanation is that only certain brands or even lots of a product have this effect.<sup>38</sup> Therefore, a positive BDG test result should always be followed by an intensified

diagnostic work-up. For instance, a high BDG-value (41.5 pg/ml for GT, 692 pg/ml for FA) in a non-hemato-oncological patient with fever of unknown origin and repeated negative blood cultures was the first evidence of a fungal infection in the present study. Hepatosplenic candidiasis could be later confirmed by liver biopsy.

Our study has several limitations. First, the study was retrospective. Hence, we might have missed some IFD diagnoses due to lacking invasive diagnostics. Second, as most patients had only received one serum sample for BDG testing, we only considered the first serum sample in all patients. Repeated testing could have a positive effect on BDG sensitivity. Third, as FA analysis was performed retrospectively contamination of the serum sample cannot be excluded in all cases. At least in one patient with an unlikely diagnosis of IFD and a GT value below the detection limit (<2.35 pg/ml), we had a high FA value (510 pg/ml). To address this issue, we repeated GT analysis in all 10 available serum samples that were initially GT negative (below the manufacturer cut-off value of 11 pg/ml) and FA positive (>80 pg/ml). The GT values remained below 11 pg/ml in the retest (data not shown). Fourth, the low incidence of proven IFDs (10%) in



218 | WILEY **mycoses** Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases | ZUBKOWICZ ET AL.

our study impacts the accuracy of the statistical results. Fifth, our patient population comprised a wide variety of underlying diseases spanning from ICU patients after abdominal surgery to patients after hematopoietic stem cell transplantation. Although our patients are reflecting a real-life scenario for the microbiology laboratory the IFD classification of these patients is problematic. Due to the lack of a universal IFD classification, we used the EORTC/MSG criteria which are proposed for immunocompromised patients only.

In conclusion, in patients with a mixed risk of IFD, a positive test result of both BDG assays at manufacturer's cut-offs was highly predictive for IFD, but except for PCP the sensitivity of both assays was limited. To equalise the sensitivity of the FA and the GT, it was necessary to adjust the cut-off value of the GT. At a cut-off value of 4.1 pg/ml, the GT yielded similar results as the FA, and the easier handling may favour the use of the GT. BDG test results should be interpreted together with a broad-spectrum of clinical, laboratory and microbiological findings. Keeping the potential pitfalls as risk factors for false-positive results in mind and being used by experienced clinicians, it may be a useful tool in high-risk patients.

**ACKNOWLEDGEMENTS**  
Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

**CONFLICT OF INTEREST**  
JH received beta-D-glucan kits free of charge for other studies from Associates of Cape Cod, Inc and from FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH. All other authors declare that they have no potential financial or ethical conflicts of interest regarding the contents of the publication.


**AUTHOR CONTRIBUTIONS**  
**Marta Zubkovicz:** Conceptualization (equal); data curation (equal); formal analysis (equal); investigation (equal); writing-original draft (equal). **Jürgen held:** investigation (equal); methodology (equal); writing-review & editing (equal). **Michael Baier:** Investigation (equal); methodology (equal); writing-review & editing (equal). **Mathias W. Pletz:** Conceptualization (supporting); funding acquisition (equal); writing-review & editing (equal). **Miriam Kesselmeier:** Formal analysis (equal); software (equal); validation (supporting); visualization (equal); writing-original draft (supporting); writing-review & editing (supporting). **Stefan Hagel:** Conceptualization (lead); data curation (supporting); project administration (equal); supervision (equal); writing-review & editing (equal). **Christina Bahrs:** Conceptualization (supporting); data curation (equal); formal analysis (lead); investigation (equal); software (equal); supervision (equal); validation (lead); writing-original draft (equal); writing-review & editing (lead).

**DATA AVAILABILITY STATEMENT**  
The data sets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**ORCID**  
Jürgen Held  <https://orcid.org/0000-0003-1130-9727>  
Michael Baier  <https://orcid.org/0000-0002-3625-1544>  
Mathias W. Pletz  <https://orcid.org/0000-0001-8157-2753>  
Miriam Kesselmeier  <https://orcid.org/0000-0001-6462-2579>  
Stefan Hagel  <https://orcid.org/0000-0003-2999-6131>  
Christina Bahrs  <https://orcid.org/0000-0002-4427-2839>

**REFERENCES**

1. Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL, Extended Prevalence in Infection in ICU Study (EPIC II) Group of Investigators. Candida bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med*. 2011;39:665-670.
2. Lausch KR, Søgaard M, Rosenvinge FS, et al. High incidence of candidaemia in a nationwide cohort: underlying diseases, risk factors and mortality. *Int J Infect Dis*. 2018;76:58-63.
3. Harrison N, Mitterbauer M, Tobudic S, et al. Incidence and characteristics of invasive fungal diseases in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis*. 2015;15:584.
4. Forstner C, Lassnigg A, Tobudic S, et al. A prospective analysis of invasive candidiasis following cardiac surgery: severity markers are predictive. *J Infect*. 2013;66:528-535.
5. Schauvflieghe AFAD, Rijnders BJA, Philips N, et al. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2018;6:782-792.
6. Ruhnke M, Groll AH, Mayser P, et al. Estimated burden of fungal infections in Germany. *Mycoses*. 2015;58(Suppl 5):22-28.
7. von Lilienfeld-Toal M, Wagener J, Einsele H, Cornely OA, Kurzai O. Invasive fungal infection—new treatments to meet new challenges. *Dtsch Arztebl Int*. 2019;116:271-278.
8. Rives MM, Wingard JR. Diagnostic methods for invasive fungal diseases in patients with hematologic malignancies. *Expert Rev Hematol*. 2012;5:661-669.
9. Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis*. 2013;56:1284-1292.
10. Bassetti M, Righi E, Ansaldi F, et al. A multicenter multinational study of abdominal candidiasis: epidemiology, outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Med*. 2015;41:1601-1610.
11. Tejerina EE, Padilla R, Abril E, et al. Autopsy-detected diagnostic errors over time in the intensive care unit. *Hum Pathol*. 2018;76:85-90.
12. Blot S, Rello J, Kouletis D. Diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in ICU patients: putting the puzzle together. *Curr Opin Crit Care*. 2019;25:430-437.
13. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis*. 2020;71(6):1367-1376.
14. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(Suppl 7):9-18.
15. Ruhnke M, Behre G, Buchheidt D, et al. Diagnosis of invasive fungal diseases in haematology and oncology: 2018 update of the recommendations of the infectious diseases working party of the German Society for Hematology and Medical Oncology (AGIHO). *Mycoses*. 2018;61:796-813.

ZUBKOWICZ ET AL.  WILEY 219

16. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(Suppl 1):e1-e38.
17. Dichtl K, Seybold U, Wagener J. Serological biomarkers of candidemia: a retrospective evaluation of three assays. *Infection.* 2019;47:217-224.
18. Odabasi Z, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, McGinnis MR, Ostrosky-Zeichner L. Differences in beta-glucan levels in culture supernatants of a variety of fungi. *Med Mycol.* 2006;44:267-272.
19. Tran T, Beal SG. Application of the 1,3- $\beta$ -D-glucan (Fungitell) assay in the diagnosis of invasive fungal infections. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140:181-185.
20. De Carolis E, Marchionni F, Torelli R, et al. Comparative performance evaluation of Wako  $\beta$ -D-Glucan test and Fungitell assay for the diagnosis of invasive fungal diseases. *PLoS One.* 2020;15:e0236095.
21. Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, et al. Difficulties in using 1,3-(beta)-D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies—high frequency of false-positive results and their analysis. *J Med Microbiol.* 2010;59(Pt 9):1016-1022.
22. Martín-Rabadán P, Gijón P, Alonso Fernández R, Ballesteros M, Anguita J, Bouza E. False-positive *Aspergillus antigenemia* due to blood product conditioning fluids. *Clin Infect Dis.* 2012;55:e22-e77.
23. Marty FM, Koo S. Role of (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol.* 2009;47(Suppl 1):S233-S240.
24. Robin X, Turck N, Hainard A, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:77.
25. Theel ES, Doern CD.  $\beta$ -D-glucan testing is important for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3478-3483.
26. Eigl S, Prattes J, Reinwald M, et al. Influence of mould-active antifungal treatment on the performance of the *Aspergillus*-specific bronchoalveolar lavage fluid lateral-flow device test. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46:401-405.
27. White SK, Schmidt RL, Walker BS, Hanson KE. (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan testing for the detection of invasive fungal infections in immunocompromised or critically ill people. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;(7). Art. No.: CD009833.
28. Friedrich R, Rappold E, Bogdan C, Held J. Comparative analysis of the Wako  $\beta$ -glucan test and the Fungitell assay for diagnosis of Candidemia and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2018;56:e00464-18.
29. Mercier T, Guldentops E, Patteet S, Beuselink K, Lagrou K, Maertens J. Beta-D-glucan for diagnosing pneumocystis pneumonia: a direct comparison between the Wako  $\beta$ -glucan assay and the Fungitell assay. *J Clin Microbiol.* 2019;57:e00322-19.
30. Dichtl K, Seybold U, Wagener J. Evaluation of a turbidimetric  $\beta$ -D-glucan test for detection of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2018;56:e00286-18.
31. Held J, Koch MS, Reischl U, Danner T, Serr A. Serum (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan measurement as an early indicator of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and evaluation of its prognostic value. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:595-602.
32. Held J, Wagner D.  $\beta$ -D-Glucan kinetics for the assessment of treatment response in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1118-1122.
33. Sulahian A, Porcher R, Bergeron A, et al. Use and limits of (1-3)- $\beta$ -D-glucan assay (Fungitell), compared to galactomannan determination (Platelia *Aspergillus*), for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2014;52:2328-2333.
34. Urabe N, Sakamoto S, Sano G, et al. Usefulness of two *Aspergillus* PCR assays and *Aspergillus* galactomannan and  $\beta$ -D-glucan testing of bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2017;55:1738-1746.
35. Hartl B, Zeller I, Manhart A, Selitsch B, Lass-Flörl C, Willinger B. A retrospective assessment of four antigen assays for the detection of invasive candidiasis among high-risk hospitalized patients. *Mycopathologia.* 2018;183:513-519.
36. Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing invasive candidiasis. *J Clin Microbiol.* 2018;56:e01909-17.
37. Makroo RN, Mani RK, Vimarsh R, Kansal S, Pushkar K, Tyagi S. Use of blood components in critically ill patients in the medical intensive care unit of a tertiary care hospital. *Asian J Transfus Sci.* 2009;3:82-85.
38. Demiraslan H, Atalay MA, Eren E, et al. Assessing the risk of false positive serum galactomannan among patients receiving piperacillin/tazobactam for febrile neutropenia. *Med Mycol.* 2017;55:535-540.

**SUPPORTING INFORMATION**  
Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Zubkowicz M, Held J, Baier M, et al. Clinical evaluation of two different (1,3)- $\beta$ -D-glucan assays for diagnosis of invasive fungal diseases: A retrospective cohort study. *Mycoses.* 2021;64:212-219. <https://doi.org/10.1111/myc.13207>

## 5 Diskussion

In dieser retrospektiven Studie wurde der Stellenwert der BDG-Testung im klinischen Alltag untersucht und zwei unterschiedliche Testverfahren verglichen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Studie diskutiert und in den Kontext der bestehenden Literatur gesetzt. Im Anschluss wird auf mögliche Limitationen der Aussagekraft der durchgeführten Studie eingegangen. Das letzte Unterkapitel dieses Abschnitts soll sich mit der Leitfrage dieser Studie beschäftigen und einen Ausblick auf den möglichen klinischen Nutzen der Tests geben.

### 5.1 Diskussion der Ergebnisse

Insgesamt konnten 31 der 109 (28.4%) Fälle als eine bewiesene oder wahrscheinliche IPI nach EORTC Richtlinien klassifiziert werden. Dabei handelte es sich am häufigsten um eine durch *Candida* spp. verursachte Infektion. Die medianen Konzentrationen für eine bewiesene oder wahrscheinliche IPI lagen bei 145.0 pg/ml für den FA und 5.1 pg/ml für den GT.

In unserer Studie erreichte der FA unter Berücksichtigung der Schwellenwerte laut Hersteller eine Sensitivität von 60.7% und der GT von 35.5%. Somit scheinen die BDG-Tests als alleiniges diagnostisches Mittel unzureichend. In mehreren Studien erzielten die BDG-Tests ebenfalls keine ausreichend hohen Sensitivitäten, um sich für die Diagnosestellung zu eignen (Angebault, Lanternier et al. 2016, Dichtl, Seybold et al. 2019). In unserer Studie erzielten beide Tests hohe positive prädiktive Werte, 89.5% für den FA und 91.7% für den GT. Andere Autoren schlussfolgerten hingegen in ihren Studien, dass der positive prädiktive Wert der BDG-Tests nicht ausreichend ist, um eine Initiation der Therapie auf dieser Grundlage allein zu rechtfertigen (Racil, Kocmanova et al. 2010, De Vlieger, Lagrou et al. 2011). Clancy et al. verglichen die Ergebnisse der BDG-Tests direkt mit Blutkulturen und sprechen von einem Candidämie-Paradox, in dem bei Blutkultur-positiven Patienten serologische Untersuchungen negativ waren (Clancy and Nguyen 2018). Auch in unserer Studie wurden zwei blutkulturpositive Candidämien durch beide Tests nicht erkannt.

Während die Sensitivitäten in unserer Studie unzureichend blieben, konnten hohe Spezifitäten erzielt werden. Der FA erreichte eine Spezifität von 96.4% und der GT eine Spezifität von 95,0%. Damit wären beide Tests zum Ausschluss einer IPI geeignet. In einer anderen Studie konnte der GT ähnliche Ergebnisse erzielen mit einer Sensitivität und Spezifität von 42.5% und 98.8% (Friedrich, Rappold et al. 2018).

Azoulay et al. empfehlen die BDG Tests zum Ausschluss einer IPI und Deeskalieren der empirischen Therapie (Azoulay, Guigue et al. 2016). Hohe Spezifitäten und hohe negative prädiktive Werte konnten auch in weiteren Studien reproduziert werden (Racil, Kocmanova et al. 2010, Giacobbe, Mikulska et al. 2017, Dichtl, Seybold et al. 2019). So berichteten Murri et al. in ihrer Studie mit 1296 Patienten in nicht-intensivmedizinischer Behandlung eine Spezifität von >99% für den FA (Murri, Camici et al. 2019). In einer Metaanalyse mit 1771 hematoonkologischen Patienten, von denen 215 Patienten mit einer bewiesenen oder wahrscheinlichen IPI diagnostiziert wurden, fanden die Autoren ebenfalls hohe Spezifitäten mit hohen positiven prädiktiven Werten, ähnlich zu unserer Studie. Darauf basierend empfahlen sie den Test zur Initiation einer empirischen Therapie. (Lamoth, Cruciani et al. 2012)

Pneumocystis Pneumonien (PCP) stellen eine Ausnahme für die BDG Tests da und sollten gesondert betrachtet werden. Die Literatur ist sich hier über die hohe Sensitivität und den Nutzen einig (Son, Sung et al. 2017, Dichtl, Seybold et al. 2018, Friedrich, Rappold et al. 2018). BDG Tests können laut Richtlinien zur Unterstützung der Diagnose einer PCP und zum Ausschluss einer PCP benutzt werden (Alanio, Hauser et al. 2016). Auch unsere Studie kam zu ähnlichen Ergebnissen. Zwar beinhaltete die Studie keine bewiesene PCP, jedoch konnten alle wahrscheinlichen PCP korrekt identifiziert werden. Beide Tests erzielten bei Patienten mit einer PCP überdurchschnittlich hohe BDG Konzentrationen, der FA lag im Durchschnitt bei 402 pg/ml und der GT 23.7 pg/ml.

Wie bereits ausgeführt, ist der GT dem FA in der Handhabung überlegen. Ohne die Anpassung der Schwellenwerte des GT, ist der Test aber nicht gleichwertig. Andere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen, die daher die Anpassung des Schwellenwertes empfehlen (Lamoth, Cruciani et al. 2012, Friedrich, Rappold et al. 2018, Mercier, Guldentops et al. 2019). Der GT erzielte in unserer Studie mediane BDG-Konzentrationen von 5.1 pg/ml für Patienten mit einer bewiesenen oder wahrscheinlichen IPI, was unter dem aktuellen Schwellenwert des Herstellers von 11pg/ml liegt. Aktuell wurde auch die Senkung des Schwellenwertes auf 7pg/ml in einer größeren Studie mit 322 Patienten diskutiert (De Carolis, Marchionni et al. 2020). Für unsere Studie wäre auch dieser Schwellenwert nicht ausreichend und könnte keine Verbesserung der Sensitivitäten mit sich bringen. Nach Auswertung der ROC-Kurven mit dem FA als Goldstandard, haben wir den optimalen Schwellenwert für den GT bei 4.1 pg/ml festgesetzt. Damit ließ sich die Sensitivität von 35.5% auf 54.8% erhöhen, wobei die Spezifität mit 93.3% relativ gleichblieb. Niedrigere Schwellenwerte könnten das Risiko für falsch-positive Ergebnisse erhöhen. Bei dieser Anpassung sank der positive prädiktive Wert von 91.7% auf 81.0%.

Friedrich et. al empfehlen, passend zu unserem Ergebnis, einen Schwellenwert von 3.8% (Friedrich, Rappold et al. 2018). Damit konnte die Sensitivität auf 70.8% erhöht werden, ohne die Spezifität schwerwiegend zu verändern. Mercier et al. passten den GT-Schwellenwert an, indem sie qPCR-Teste als Goldstandard benutzten und empfahlen einen höheren Schwellenwert von 6.222 pg/ml, der eine höhere Spezifität ermöglichen würde als der FA. (Mercier, Guldentops et al. 2019)

Viele der Faktoren, die ein falsch-positives Ergebnis der BDG-Tests begünstigen können, finden sich im klinischen Alltag von Risikopatienten, insbesondere bei Patienten, die intensivmedizinisch behandelt werden. Ungefähr 50% der schwerkranken Patienten einer Intensivstation sind auf die Gabe von Blutprodukten angewiesen (Makroo, Mani et al. 2009). Zu den falsch-positiven Faktoren zählen Blutprodukte, Nierenersatzverfahren,  $\beta$ -Lactam Antibiotika und bakterielle Superinfektionen (Mohr, Sims et al. 2011, Ostrosky-Zeichner 2012). In unserer Studie konnten wir einen Zusammenhang zwischen falsch-positiven Ergebnissen und Nierenersatzverfahren sowie Albumingabe für den FA beobachten. Bei dem GT beeinflusste die Gabe von Thrombozyten, Nierenersatzverfahren und ein vorrausgegangener chirurgischer abdomineller Eingriff das Ergebnis falsch-positiv. Obwohl 95.5% der Patienten mindestens einen falsch-positiven Einflussfaktor hatten, waren die falsch-positiven Ergebnisse trotzdem recht gering mit 3.6% für den FA und 5.0% für den GT beim Schwellenwert des Herstellers. Andere Studien berichteten allerdings über falsch-positive Raten von 75% (Racil, Kocmanova et al. 2010).

## 5.2 Limitationen der Studie

Unsere Studie beinhaltete eine heterogene Patientengruppe. 51.4 % der Patienten zeigten einen Risikofaktor laut EORTC Richtlinien und 77.1% der Patienten wurden intensivmedizinisch behandelt. Die Patientengruppe repräsentiert zwar einen realen Querschnitt aus dem klinischen Alltag, könnte aber die Ergebnisse beeinflusst haben. Die Auswahl einer Gruppe mit einer hohen Prävalenz und Vortestwahrscheinlichkeit könnte den positiven prädiktiven Wert der Tests weiter erhöhen (Lamoth 2016, Clancy and Nguyen 2018). Um die Aussagekraft der BDG Tests zu optimieren, grenzten einige Studien die Auswahl der Patienten näher ein. In einer hämatoonkologischen Patientengruppe erzielte der BDG hohe Spezifitäten (>99%) mit moderaten Sensitivitäten (62%) (Lamoth, Cruciani et al. 2012).

Da unsere Studie retrospektiv durchgeführt wurde, konnte keine nachträgliche invasive Diagnostik in schwerkranken Patienten mit einer negativen Blutkultur und einem positiven BDG-Test veranlasst werden.

Die strenge Klassifikation laut EORTC Richtlinien der bewiesenen IPI in Studien vergrößert die Gefahr mögliche IPI zu übersehen (Karageorgopoulos, Vouloumanou et al. 2011). Blutkulturen, die für die Diagnose einer bewiesenen IPI benötigt werden, erreichen nur Sensitivitäten von 50% und sind somit als Referenz kritisch anzusehen (Clancy and Nguyen 2013). Die Methoden, die für eine bewiesene IPI laut EORTC Richtlinien notwendig sind, ordnen vor allem fortgeschrittene IPI richtig ein, während IPI in einem frühzeitigen Stadium ausgelassen werden könnten.

### 5.3 Ausblick

Der größte Vorteil der serologischen Tests ist die schnelle Auswertung. Antigentests könnten vor den Blutkulturen einen Hinweis auf eine mögliche IPI geben. In einer Studie konnten Antigentests wie FA in mehreren Fällen eine IPI früher identifizieren als die zugehörige Blutkultur (Hartl, Zeller et al. 2018).

Bezüglich der Interpretation und der Nutzung der Tests ist man sich in der Literatur noch uneinig (Karageorgopoulos, Vouloumanou et al. 2011, Lamoth, Cruciani et al. 2012). Dies ist vor allem der großen Heterogenität an Sensitivitäten und Spezifitäten in der Literatur zu verschulden (Karageorgopoulos, Vouloumanou et al. 2011, Xiaoling, Tingyu et al. 2018, White, Schmidt et al. 2020). Das kann unter anderem an verschiedenen Studienmodellen liegen, die verschiedene Definitionen einer IPI (nur bewiesene oder auch wahrscheinliche), Schwellenwerte und Patientengruppen auswählten (Karageorgopoulos, Vouloumanou et al. 2011). In zukünftigen Studien sollten strengere Studiendesigns gewählt werden, die einen größeren Wert auf den genauen Zeitpunkt und Anzahl der Testungen legen. Auch die untersuchten Patientengruppen sollten sorgfältiger ausgewählt und abgegrenzt werden.

Richtlinien der EORTC empfehlen den Einsatz von BDG in Risikogruppen wie Patienten mit hämatoonkologischen Erkrankungen, und bestimmten intensivmedizinischen Patienten. Jedoch wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Datenlage nur für den FA ausreichend ist. Interessanterweise wurden diese Richtlinien zuletzt angepasst, da der Gebrauch von BDG-Tests in älteren EORTC-Richtlinien ohne Einschränkungen empfohlen wurde (De Pauw, Walsh et al. 2008, Donnelly, Chen et al. 2019). Vor allem wiederholte positive Ergebnisse oder hoch positive Ergebnisse sollen die Aussagekraft der Teste erhöhen. Zwei positive Fungitell-Ergebnisse  $>80$  pg/ml sollen den Nachweis einer möglichen IPI erlauben (De Pauw, Walsh et al. 2008).

Wiederholte Testungen und eine Reproduktion der positiven Ergebnisse können die Spezifität der Testung steigern (Odabasi, Paetznick et al. 2006, Lamoth, Cruciani et al. 2012, Tissot, Lamoth et al. 2013). Mohr et al. konnten die Spezifität mit einer zweiten Testung von 59% auf 67% steigern (Mohr, Sims et al. 2011).

Andere Richtlinien empfehlen die Nutzung der BDG-Tests ebenfalls nur unter bestimmten klinischen Voraussetzungen (Cuenca-Estrella, Verweij et al. 2012, Marchetti, Lamoth et al. 2012). Die Richtlinien verfasst durch die ESCMID (The European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases) schließen den BDG als alleinigen Marker zur Diagnose einer invasiven Aspergillose eindeutig aus. Sie weisen aber auf einen möglichen Nutzen in Verbindung mit anderen Markern, wie Galaktomannan hin (Ullmann, Aguado et al. 2018). Sicher ist, dass eine Kombination aus mehreren Methoden, die Diagnosestellung unterstützen kann. Während Blutkulturen und BDG-Tests einzeln eine Sensitivität von jeweils 17% und 62% erreichten, erzielte die Kombination der beiden eine Sensitivität von 79% (Clancy and Nguyen 2013). Auch eine Kombination von BDG mit dem GM-Test kann die Spezifität auf fast 100% erhöhen (Sulahian, Porcher et al. 2014).

BDG-Tests können sinnvoll sein, um klinische Entscheidungen im Gesamtbild von anderen diagnostischen Modalitäten zu unterstützen. Anhand der unterschiedlichen Richtlinien kann man erkennen, dass BDG-Tests nur unter bestimmten Bedingungen durch erfahrenes Personal einen klinischen Nutzen erbringen können. Nichtsdestotrotz sollte man immer die variierenden Sensitivitäten und möglichen falsch-positiven Faktoren im Hinterkopf behalten.

## 6 Schlussfolgerung

Die BDG-Tests stellen, aufgrund der mangelhaften Sensitivitäten kein sicheres diagnostisches Mittel dar. Eine Ausnahme stellen die PCP dar, bei denen beide Tests hohe Sensitivitäten erreichten. In unserer heterogenen Patientengruppe erreichten beide Tests einen hohen positiven prädiktiven Wert. Eine Anpassung des Schwellenwertes des GT ist nötig, um eine vergleichbare Leistung zum FA zu erreichen. Mit einem Schwellenwert von 4.1 pg/ml erbringt der GT eine ähnliche Leistung wie der FA und überzeugt durch eine einfachere Handhabung. Die Ergebnisse der BDG-Tests sollten in einem größeren klinischen Kontext betrachtet werden und mithilfe von weiteren diagnostischen Modalitäten interpretiert werden. Unter Beachtung der möglichen falsch-positiven Einflussfaktoren kann der BDG-Test eine wertvolle Ergänzung zu Kulturen in Patientengruppen mit einem hohen Risiko einer IPI sein.



## II Literaturverzeichnis

- Alanio, A., P. M. Hauser, K. Lagrou, W. J. Melchers, J. Helweg-Larsen, O. Matos, S. Cesaro, G. Maschmeyer, H. Einsele, J. P. Donnelly, C. Cordonnier, J. Maertens, S. Bretagne and a. j. v. o. T. E. G. f. B. a. M. T. E. 5th European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-5), The European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), the Immunocompromised Host Society (ICHS) and The European LeukemiaNet (ELN) (2016). "ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients." J Antimicrob Chemother **71**(9): 2386-2396.
- Andes, D. R., N. Safdar, J. W. Baddley, B. Alexander, L. Brumble, A. Freifeld, S. Hadley, L. Herwaldt, C. Kauffman, G. M. Lyon, V. Morrison, T. Patterson, T. Perl, R. Walker, T. Hess, T. Chiller, P. G. Pappas and T. Investigators (2016). "The epidemiology and outcomes of invasive *Candida* infections among organ transplant recipients in the United States: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET)." Transpl Infect Dis **18**(6): 921-931.
- Angebault, C., F. Lanternier, F. Dalle, C. Schrimpf, A. L. Roupie, A. Dupuis, A. Agathine, A. Scemla, E. Paubelle, D. Caillot, B. Neven, P. Frange, F. Suarez, C. d'Enfert, O. Lortholary and M. E. Bougnoux (2016). "Prospective Evaluation of Serum  $\beta$ -Glucan Testing in Patients With Probable or Proven Fungal Diseases." Open Forum Infect Dis **3**(3): ofw128.
- Arendrup, M. C. (2010). "Epidemiology of invasive candidiasis." Curr Opin Crit Care **16**(5): 445-452.
- Azoulay, E., H. Dupont, A. Tabah, O. Lortholary, J. P. Stahl, A. Francois, C. Martin, B. Guidet and J. F. Timsit (2012). "Systemic antifungal therapy in critically ill patients without invasive fungal infection\*." Crit Care Med **40**(3): 813-822.
- Azoulay, E., N. Guigue, M. Darmon, D. Mokart, V. Lemiale, A. Kouatchet, J. Mayaux, F. Vincent, M. Nyunga, F. Bruneel, A. Rabbat, S. Bretagne, C. Lebert, A. P. Meert, D. Benoit and F. Pene (2016). "(1, 3)- $\beta$ -D-glucan assay for diagnosing invasive fungal infections in critically ill patients with hematological malignancies." Oncotarget **7**(16): 21484-21495.

- Bitar, D., O. Lortholary, Y. Le Strat, J. Nicolau, B. Coignard, P. Tattevin, D. Che and F. Dromer (2014). "Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010." Emerg Infect Dis **20**(7): 1149-1155.
- Clancy, C. J. and M. H. Nguyen (2013). "Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care." Clin Infect Dis **56**(9): 1284-1292.
- Clancy, C. J. and M. H. Nguyen (2018). "Diagnosing Invasive Candidiasis." J Clin Microbiol **56**(5).
- Clancy, C. J. and M. H. Nguyen (2018). "Non-Culture Diagnostics for Invasive Candidiasis: Promise and Unintended Consequences." J Fungi (Basel) **4**(1).
- Cuenca-Estrella, M., D. H. Kett and J. Wauters (2019). "Defining standards of CARE for invasive fungal diseases in the ICU." J Antimicrob Chemother **74**(Supplement\_2): ii9-ii15.
- Cuenca-Estrella, M., P. E. Verweij, M. C. Arendrup, S. Arikan-Akdagli, J. Bille, J. P. Donnelly, H. E. Jensen, C. Lass-Flörl, M. D. Richardson, M. Akova, M. Bassetti, T. Calandra, E. Castagnola, O. A. Cornely, J. Garbino, A. H. Groll, R. Herbrecht, W. W. Hope, B. J. Kullberg, O. Lortholary, W. Meersseman, G. Petrikos, E. Roilides, C. Viscoli, A. J. Ullmann and E. F. I. S. Group (2012). "ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: diagnostic procedures." Clin Microbiol Infect **18** Suppl 7: 9-18.
- De Carolis, E., F. Marchionni, R. Torelli, M. G. Angela, L. Pagano, R. Murri, G. De Pascale, G. De Angelis, M. Sanguinetti and B. Posteraro (2020). "Comparative performance evaluation of Wako  $\beta$ -glucan test and Fungitell assay for the diagnosis of invasive fungal diseases." PLoS One **15**(7): e0236095.
- De Pauw, B., T. J. Walsh, J. P. Donnelly, D. A. Stevens, J. E. Edwards, T. Calandra, P. G. Pappas, J. Maertens, O. Lortholary, C. A. Kauffman, D. W. Denning, T. F. Patterson, G. Maschmeyer, J. Bille, W. E. Dismukes, R. Herbrecht, W. W. Hope, C. C. Kibbler, B. J. Kullberg, K. A. Marr, P. Muñoz, F. C. Odds, J. R. Perfect, A. Restrepo, M. Ruhnke, B. H. Segal, J. D. Sobel, T. C. Sorrell, C. Viscoli, J. R. Wingard, T. Zaoutis, J. E. Bennett, E. O. f. R. a. T. o. C. I. F. I. C. Group and N. I. o. A. a. I. D. M. S. G. E. M. C. Group (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**(12): 1813-1821.
- De Vlieger, G., K. Lagrou, J. Maertens, E. Verbeken, W. Meersseman and E. Van Wijngaerden (2011). "Beta-D-glucan detection as a diagnostic test for invasive aspergillosis in immunocompromised critically ill patients with symptoms of respiratory infection: an autopsy-based study." *J Clin Microbiol* **49**(11): 3783-3787.
- Delaloye, J. and T. Calandra (2014). "Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient." *Virulence* **5**(1): 161-169.
- Dichtl, K., U. Seybold and J. Wagener (2018). "Evaluation of a Turbidimetric  $\beta$ -d-Glucan Test for Detection of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia." *J Clin Microbiol* **56**(7).
- Dichtl, K., U. Seybold and J. Wagener (2019). "Serological biomarkers of candidemia: a retrospective evaluation of three assays." *Infection* **47**(2): 217-224.
- Donnelly, J. P., S. C. Chen, C. A. Kauffman, W. J. Steinbach, J. W. Baddley, P. E. Verweij, C. J. Clancy, J. R. Wingard, S. R. Lockhart, A. H. Groll, T. C. Sorrell, M. Bassetti, H. Akan, B. D. Alexander, D. Andes, E. Azoulay, R. Bialek, R. W. Bradsher, S. Bretagne, T. Calandra, A. M. Caliendo, E. Castagnola, M. Cruciani, M. Cuenca-Estrella, C. F. Decker, S. R. Desai, B. Fisher, T. Harrison, C. P. Heussel, H. E. Jensen, C. C. Kibbler, D. P. Kontoyiannis, B. J. Kullberg, K. Lagrou, F. Lamoth, T. Lehrnbecher, J. Loeffler, O. Lortholary, J. Maertens, O. Marchetti, K. A. Marr, H. Masur, J. F. Meis, C. O. Morrissey, M. Nucci, L. Ostrosky-Zeichner, L. Pagano, T. F. Patterson, J. R. Perfect, Z. Racil, E. Roilides, M. Ruhnke, C. S. Prokop, S. Shoham, M. A. Slavin, D. A. Stevens, G. R. Thompson, J. A. Vazquez, C. Viscoli, T. J. Walsh, A. Warris, L. J. Wheat, P. L. White, T. E. Zaoutis and P. G. Pappas (2019). "Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium." *Clin Infect Dis*.
- Forstner, C., A. Lassnigg, S. Tobudic, A. Schiferer, H. Fischer, W. Graninger, B. Steinlechner, S. Frantal and E. Presterl (2013). "A prospective analysis of invasive candidiasis following cardiac surgery: severity markers are predictive." *J Infect* **66**(6): 528-535.
- Friedrich, R., E. Rappold, C. Bogdan and J. Held (2018). "Comparative Analysis of the Wako  $\beta$ -Glucan Test and the Fungitell Assay for Diagnosis of Candidemia and *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia." *J Clin Microbiol* **56**(9).

- Garey, K. W., M. Rege, M. P. Pai, D. E. Mingo, K. J. Suda, R. S. Turpin and D. T. Bearden (2006). "Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study." Clin Infect Dis **43**(1): 25-31.
- Giacobbe, D. R., M. Mikulska, M. Tumbarello, E. Furfaro, M. Spadaro, A. R. Losito, A. Mesini, G. De Pascale, A. Marchese, M. Bruzzone, P. Pelosi, M. Mussap, A. Molin, M. Antonelli, B. Posteraro, M. Sanguinetti, C. Viscoli, V. Del Bono and I.-S. I. S. G. o. R. I. o. t. S. I. T. Antinfettiva) (2017). "Combined use of serum (1,3)- $\beta$ -D-glucan and procalcitonin for the early differential diagnosis between candidaemia and bacteraemia in intensive care units." Crit Care **21**(1): 176.
- Hadley, S., W. W. Lee, R. Ruthazer and S. A. Nasraway (2002). "Candidemia as a cause of septic shock and multiple organ failure in nonimmunocompromised patients." Crit Care Med **30**(8): 1808-1814.
- Hartl, B., I. Zeller, A. Manhart, B. Selitsch, C. Lass-Flörl and B. Willinger (2018). "A Retrospective Assessment of Four Antigen Assays for the Detection of Invasive Candidiasis Among High-Risk Hospitalized Patients." Mycopathologia **183**(3): 513-519.
- Karageorgopoulos, D. E., E. K. Vouloumanou, F. Ntziora, A. Michalopoulos, P. I. Rafailidis and M. E. Falagas (2011). " $\beta$ -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis." Clin Infect Dis **52**(6): 750-770.
- Kett, D. H., E. Azoulay, P. M. Echeverria, J. L. Vincent and E. P. o. I. i. I. S. E. I. G. o. Investigators (2011). "Candida bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study." Crit Care Med **39**(4): 665-670.
- Lamoth, F. (2016). "Galactomannan and 1,3- $\beta$ -d-Glucan Testing for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis." J Fungi (Basel) **2**(3).
- Lamoth, F. and T. Calandra (2017). "Early diagnosis of invasive mould infections and disease." J Antimicrob Chemother **72**(suppl\_1): i19-i28.
- Lamoth, F., M. Cruciani, C. Mengoli, E. Castagnola, O. Lortholary, M. Richardson, O. Marchetti and T. E. C. o. I. i. L. (ECIL-3) (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**(5): 633-643.

- Lortholary, O., C. Renaudat, K. Sitbon, Y. Madec, L. Denoeud-Ndam, M. Wolff, A. Fontanet, S. Bretagne, F. Dromer and F. M. S. Group (2014). "Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010)." Intensive Care Med **40**(9): 1303-1312.
- Makroo, R. N., R. K. Mani, R. Vimarsh, S. Kansal, K. Pushkar and S. Tyagi (2009). "Use of blood components in critically ill patients in the medical intensive care unit of a tertiary care hospital." Asian J Transfus Sci **3**(2): 82-85.
- Marchetti, O., F. Lamoth, M. Mikulska, C. Viscoli, P. Verweij, S. Bretagne and E. C. o. I. i. L. E. L. W. Groups (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**(6): 846-854.
- Mercier, T., E. Guldentops, S. Patteet, K. Beuselinck, K. Lagrou and J. Maertens (2019). "Beta-d-Glucan for Diagnosing." J Clin Microbiol **57**(6).
- Mohr, J. F., C. Sims, V. Paetznick, J. Rodriguez, M. A. Finkelman, J. H. Rex and L. Ostrosky-Zeichner (2011). "Prospective survey of (1→3)-beta-D-glucan and its relationship to invasive candidiasis in the surgical intensive care unit setting." J Clin Microbiol **49**(1): 58-61.
- Morrell, M., V. J. Fraser and M. H. Kollef (2005). "Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality." Antimicrob Agents Chemother **49**(9): 3640-3645.
- Murri, R., M. Camici, B. Posteraro, F. Giovannenze, F. Taccari, G. Ventura, G. Scoppettuolo, M. Sanguinetti, R. Cauda and M. Fantoni (2019). "Performance evaluation of the (1,3)- $\beta$ -D-glucan detection assay in non-intensive care unit adult patients." Dove Press Journal.
- Odabasi, Z., V. L. Paetznick, J. R. Rodriguez, E. Chen, M. R. McGinnis and L. Ostrosky-Zeichner (2006). "Differences in beta-glucan levels in culture supernatants of a variety of fungi." Med Mycol **44**(3): 267-272.
- Ostrosky-Zeichner, L. (2012). "Invasive mycoses: diagnostic challenges." Am J Med **125**(1 Suppl): S14-24.

- Racil, Z., I. Kocmanova, M. Lengerova, B. Weinbergerova, L. Buresova, M. Toskova, J. Winterova, S. Timilsina, I. Rodriguez and J. Mayer (2010). "Difficulties in using 1,3- $\beta$ -D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies--high frequency of false-positive results and their analysis." *J Med Microbiol* **59**(Pt 9): 1016-1022.
- Schauwvlieghe, A. F. A. D., B. J. A. Rijnders, N. Philips, R. Verwijs, L. Vanderbeke, C. Van Tienen, K. Lagrou, P. E. Verweij, F. L. Van de Veerdonk, D. Gommers, P. Spronk, D. C. J. J. Bergmans, A. Hoedemaekers, E. R. Andrinopoulou, C. H. S. B. van den Berg, N. P. Juffermans, C. J. Hodiamont, A. G. Vonk, P. Depuydt, J. Boelens, J. Wauters and D.-B. M. s. group (2018). "Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study." *Lancet Respir Med* **6**(10): 782-792.
- Son, H. J., H. Sung, S. Y. Park, T. Kim, H. J. Lee, S. M. Kim, Y. P. Chong, S. O. Lee, S. H. Choi, Y. S. Kim, J. H. Woo and S. H. Kim (2017). "Diagnostic performance of the (1-3)- $\beta$ -D-glucan assay in patients with *Pneumocystis jirovecii* compared with those with candidiasis, aspergillosis, mucormycosis, and tuberculosis, and healthy volunteers." *PLoS One* **12**(11): e0188860.
- Sulahian, A., R. Porcher, A. Bergeron, S. Touratier, E. Raffoux, J. Menotti, F. Derouin and P. Ribaud (2014). "Use and limits of (1-3)- $\beta$ -d-glucan assay (Fungitell), compared to galactomannan determination (*Platelia Aspergillus*), for diagnosis of invasive aspergillosis." *J Clin Microbiol* **52**(7): 2328-2333.
- Tissot, F., F. Lamothe, P. M. Hauser, C. Orasch, U. Flückiger, M. Siegemund, S. Zimmerli, T. Calandra, J. Bille, P. Eggimann, O. Marchetti and F. I. N. o. S. (FUNGINOS) (2013). " $\beta$ -glucan antigenemia anticipates diagnosis of blood culture-negative intraabdominal candidiasis." *Am J Respir Crit Care Med* **188**(9): 1100-1109.
- Ullmann, A. J., J. M. Aguado, S. Arikan-Akdagli, D. W. Denning, A. H. Groll, K. Lagrou, C. Lass-Flörl, R. E. Lewis, P. Munoz, P. E. Verweij, A. Warris, F. Ader, M. Akova, M. C. Arendrup, R. A. Barnes, C. Beigelman-Aubry, S. Blot, E. Bouza, R. J. M. Brüggemann, D. Buchheidt, J. Cadranel, E. Castagnola, A. Chakrabarti, M. Cuenca-Estrella, G. Dimopoulos, J. Fortun, J. P. Gangneux, J. Garbino, W. J. Heinz, R. Herbrecht, C. P. Heussel, C. C. Kibbler, N. Klimko, B. J. Kullberg, C. Lange, T. Lehrnbecher, J. Löffler, O. Lortholary, J. Maertens, O. Marchetti, J. F. Meis, L. Pagano, P. Ribaud, M. Richardson, E. Roilides, M. Ruhnke, M. Sanguinetti, D. C. Sheppard, J. Sinkó, A. Skiada, M. J. G. T. Vehreschild, C. Viscoli and O. A. Cornely (2018). "Diagnosis and

management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline." Clin Microbiol Infect **24 Suppl 1**: e1-e38.

White, S. K., R. L. Schmidt, B. S. Walker and K. E. Hanson (2020). "(1→3)-β-D-glucan testing for the detection of invasive fungal infections in immunocompromised or critically ill people." Cochrane Database Syst Rev **7**: CD009833.

Xiaoling, L., T. Tingyu, H. Caibao, Z. Tian and C. Changqin (2018). "Diagnostic Efficacy of Serum 1,3-β-D-glucan for Invasive Fungal Infection: An Update Meta-Analysis Based on 37 Case Or Cohort Studies." Open Med (Wars) **13**: 329-337.

Yoshida, K., H. Shoji, T. Takuma and Y. Niki (2011). "Clinical viability of Fungitell, a new (1→3)-β-D: -glucan measurement kit, for diagnosis of invasive fungal infection, and comparison with other kits available in Japan." J Infect Chemother **17(4)**: 473-477.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr.med. Stefan Hagel M.Sc., PD Dr.med.univ. Christina Bahrs, Dr. Miriam Kesselmeier, Prof. Dr. med. Mathias Pletz, Dr.med. Michael Baier und Dr.med. Dipl. Biochem. Jürgen Held.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Berlin, den 17.02.22