

Invasiva svampinfektioner – diagnostiska metoder och klinisk tillämpning

Ett dokument från Referensgruppen för
AntiMykotika (RAM)

Fjärde upplagan, uppdaterad 2026

Förord

Ambitionen med detta dokument är att redovisa de mikrobiologiska metoder för att diagnostisera invasiv svampsjukdom som finns tillgängliga i Sverige samt redogöra för indikationer och tolkning av koncentrationsbestämning av antimykotiska läkemedel. Första utgåvan publicerades 2021 med målet att den skulle utgöra ett levande dokument med regelbundna uppdateringar. Denna utgåva är den fjärde versionen där vi flyttat delen om indikationer för koncentrationsbestämning av antimykotiska läkemedel till ett eget dokument. Den aktuella utgåvan innehåller nu två delar: 1) Översikt över de tillgängliga diagnostiska metodernas bakgrund, styrkor, svagheter samt tolkning av resultatet och 2) Indikation för provtagning inom intensivvård och vid uttalad immunsuppression samt tolkning av resultaten.

Dokumentet är skrivet gemensamt av medlemmarna i Referensgruppen för AntiMykotika (RAM) som är en oberoende expertgrupp vars ledamöter utses av Svenska Läkaresällskapets nämnd efter nominering av sektioner för klinisk mikrobiologi (2), infektionssjukdomar (2), pediatrik (1), hematologi (1) och läkemedelslära (1). RAM:s huvuduppgifter är att verka för en rationell användning av antimykotiska läkemedel vid invasiv svampsjukdom genom att sprida information om antimykotiska läkemedel och kontinuerligt utveckla och uppdatera rekommendationer för användandet av antimykotiska läkemedel vid invasiv svampsjukdom. En viktig del i detta arbete är att verka för att antimykotiska läkemedel ges på rätt indikation. Invasiva svampinfektioner är generellt svåra att diagnostisera vilket riskerar att leda till överanvändning i form av så kallad empirisk svampbehandling. Spridandet av information om de i Sverige tillgängliga mikrobiologiska metoderna och i vilka sammanhang de kan användas är därför viktigt.

Innehållet baseras huvudsakligen på den vetenskapliga litteraturen men avsikten med dokumentet har inte varit att ge en heltäckande litteraturgenomgång utan snarare en syntes av litteraturen och RAM:s egna erfarenheter. På så sätt hoppas vi att dokumentet blir användbart i den kliniska vardagen och kan vara till hjälp vid ställningstagande till insättning eller förändringar av antimykotisk behandling.

För RAM 260625

Ola Blennow, ordförande (Sektionen för Infektionssjukdomar), Karin Amilon (Sektionen för Klinisk Mikrobiologi), Silvia Botero Kleiven (Sektionen för Klinisk Mikrobiologi), Erik Eliasson (Sektionen för Läkemedelslära), Helena Hammarström (Sektionen för Infektionssjukdomar), Cecilia Langenskiöld (Sektionen för pediatrik) och Jan Sjölin (adjungerad)

Innehåll

1	Mikrobiologisk indelning av svampriket.....	7
2	Mikrobiologiska metoder tillgängliga i Sverige	9
2.1	Direktmikroskopi.....	9
2.1.1	Metod.....	9
2.1.2	Provmaterial.....	9
2.1.3	Prestanda.....	9
2.1.4	Indikation för provtagning.....	9
2.1.5	Svarsrutiner och tolkning.....	9
2.2	Odling.....	10
2.2.1	Metod.....	10
2.2.2	Provmaterial.....	11
2.2.3	Prestanda.....	11
2.2.4	Indikation för provtagning.....	11
2.2.5	Svarsrutiner och tolkning.....	11
2.3	Resistensbestämning av svamp.....	11
2.3.1	Metod.....	11
2.3.2	Provmaterial.....	11
2.3.3	Prestanda.....	12
2.3.4	Indikation för resistensbestämning	12
2.3.5	Svarsrutiner och tolkning.....	12
2.3.6	Referenser.....	13
2.4	Galaktomannan (Aspergillus-antigen).....	13
2.4.1	Metod.....	13
2.4.2	Provmaterial.....	13
2.4.3	Prestanda.....	13
2.4.4	Indikation för provtagning.....	14
2.4.5	Svarsrutiner och tolkning.....	14
2.4.6	Referenser.....	15
2.5	Aspergillus-IgG antikroppar.....	15
2.5.1	Metod.....	15
2.5.2	Provmaterial.....	15
2.5.3	Indikation för provtagning.....	16

2.5.4	Svarsrutiner och tolkning.....	16
2.6	1,3-β-D-glukan (BDG).....	16
2.6.1	Metod.....	16
2.6.2	Provmaterial.....	17
2.6.3	Prestanda.....	17
2.6.3.1	Sensitivitet	17
2.6.3.2	Specificitet	17
2.6.4	Indikation för provtagning.....	18
2.6.5	Svarsrutiner.....	18
2.6.5.1	Fungitell®	18
2.6.5.2	Fungitell® STAT.....	18
2.6.5.3	Wako	19
2.6.6	Tolkning av resultat.....	19
2.6.7	Referenser.....	20
2.7	Cryptococcus-antigen.....	21
2.7.1	Metod.....	21
2.7.2	Provmaterial.....	21
2.7.3	Prestanda.....	21
2.7.4	Indikation för provtagning.....	21
2.7.5	Svarsrutiner och tolkning.....	21
2.7.6	Referenser.....	21
2.8	PCR.....	22
2.8.1	Aspergillus-DNA.....	22
2.8.1.1	Metod.....	22
2.8.1.2	Provmaterial.....	22
2.8.1.3	Prestanda.....	22
2.8.1.4	Indikation för provtagning.....	23
2.8.1.5	Svarsrutiner och tolkning.....	23
2.8.1.6	Referenser.....	23
2.8.2	Candida DNA	23
2.8.2.1	Metod.....	23
2.8.2.2	Provmaterial och svarsrutin.....	23
2.8.2.3	Prestanda.....	24
2.8.2.4	Indikation för provtagning.....	24
2.8.2.5	Svarsrutiner och tolkning.....	24

2.8.2.6	Referenser.....	24
2.8.3	DNA-sekvensering svamp (ITS).....	24
2.8.4	Metod.....	24
2.8.4.1	Provmaterial.....	25
2.8.4.2	Prestanda.....	25
2.8.4.3	Indikation för provtagning.....	25
2.8.4.4	Svarsrutiner och tolkning.....	25
2.9	Pneumocystisdiagnostik	25
2.9.1	Immunoflourescens (IF).....	25
2.9.1.1	Metod.....	25
2.9.1.2	Provmaterial.....	25
2.9.1.3	Prestanda.....	26
2.9.1.4	Indikation för provtagning.....	26
2.9.1.5	Svarsrutin och tolkning.....	26
2.9.2	Realtids-PCR (qPCR).....	26
2.9.2.1	Metod.....	26
2.9.2.2	Provmaterial.....	27
2.9.2.3	Prestanda.....	27
2.9.2.4	Indikation för provtagning.....	27
2.9.2.5	Svarsrutiner och tolkning.....	27
2.9.3	Referenser.....	28
3	Provtagning/diagnostik på IVA och efter kirurgi.....	30
3.1	Screening/övervakning	30
3.2	Diagnostik av invasiva candidainfektioner.....	30
3.2.1	Odling och mikroskopi.....	30
3.2.2	Beta-D-glukan.....	31
3.2.3	Övriga metoder.....	32
3.2.3.1	PCR.....	32
3.2.3.2	Antigen-antikroppsanalys.....	32
3.3	Diagnostik av aspergillusinfektioner	32
3.3.1	Odling och mikroskopi.....	32
3.3.2	Galaktomannan/aspergillusantigen.....	33
3.3.3	Beta-D-glukan.....	33
3.3.4	Övriga metoder.....	33
3.3.4.1	PCR.....	33

3.3.4.2	Antikroppsanalys	33
3.4	Uppföljning av behandling	33
3.5	Referenser	34
4	Provtagning på hematologen	37
4.1	Screening/övervakning	37
4.1.1	Galaktomannan (GM)	37
4.1.2	Beta-D-glukan	38
4.1.3	Aspergillus-PCR	38
4.1.4	Diagnostik av Candidainfektioner	38
4.1.5	Odling	39
4.1.6	Betaglukan	39
4.1.7	PCR	39
4.2	Diagnostik av aspergillusinfektion	39
4.2.1	Mikroskopi/odling	39
4.2.2	Galaktomannan	40
4.2.2.1	Galaktomannan i serum	40
4.2.2.2	Galaktomannan i bronkoalveolärt lavage (BAL)	40
4.2.2.3	Galaktomannan i cerebrospinalvätska (CSV)	41
4.2.3	Betaglukan	41
4.2.4	PCR	42
4.3	Mögelsvampsinfektioner andra än aspergillus	42
4.3.1	Mikroskopi/odling	42
4.3.2	Sekvensering svamp (ITS)	42
4.3.3	Pneumocystis	42
4.3.3.1	PCR och immunoflouescens	43
4.3.3.2	Betaglukan	43
4.4	Uppföljning av behandling	43
4.4.1	Galaktomannan	43
4.4.2	Beta-D-glukan	44
4.5	Referenser	44

1 Mikrobiologisk indelning av svampriket

Inom klinisk mykologi indelas svamparna morfologiskt i jästsvampar, trådsvampar (mögelsvamp) och termiskt dimorfa svampar (sk "dimorfa" svampar). Jästsvampar är encelliga organismer som delar sig främst med knoppning. Trådsvampar växer ut som hyfer och bildar ett hyfnätverk kallad mycel. I gruppen trådsvampar ingår dermatofyterna (svampar som orsakar infektioner i hud, hår och nagel). Många jästarter kan bilda pseudohyfer och även äkta hyfer, likt trådsvamparna. Dimorfa svampar har en jästform vid kroppstemperatur men växer som trådsvampar i naturen. De kliniskt viktiga dimorfa svampar förekommer oftast endemiskt på vissa geografiska platser.

Tabell 1.1 Exempel på indelning av svampar

Jästsvampar	Trådsvampar (mögelsvamp)	Dimorfa svampar
<i>Candida</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Histoplasma capsulatum</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Coccidioides immitis</i> , <i>C. posadasii</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Scedosporium</i> spp.	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
<i>Trichosporon</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Mucorales: <i>Rhizopus</i> spp, <i>Rhizomucor</i> spp. <i>Mucor</i> spp. <i>Lichtheimia</i> spp.	<i>Talaromyces marneffe</i>
<i>Malassezia</i> spp.	Dermatofyter: <i>Trichophyton</i> spp. <i>Microsporum</i> spp.	<i>Sporothrix</i> spp.

Utvecklingen av molekylära sekvenseringstekniker har lett till ny förståelse av svampars släktskap vilket under de senaste åren medfört en del förändringar i nomenklaturen av svamparter. För kliniskt relevanta arter rekommenderas att laboratoriet använder både det gamla och nya namnet vid svarsrapportering för att undvika förvirring och säkerställa att klinikern förstår fyndet, samtidigt som det är utbildande att få kännedom om förändringar i nomenklaturen. Taxonomin är under konstant utveckling och förändring och området bevakas löpande.

Tabell 1.2 Några exempel på kliniskt relevanta svampar där nomenklatur har förändrats.

Tidigare namn	Nytt namn	Rekommenderat svar från laboratoriet
Jästsvampar		
<i>Candida glabrata</i>	<i>Nakaseomyces glabratus</i>	Båda namnen bör ingå i svaren
<i>Candida krusei</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>	
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	
<i>Candida lusitanae</i>	<i>Clavispora lusitanae</i>	

<i>Candida lambica</i>	<i>Pichia fermentans</i>	
<i>Candida kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	
Mögelsvampar		
<i>Absidia corymbifera</i>	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
<i>Penicillium marneffe</i>	<i>Talaromyces marneffe</i>	<i>Talaromyces marneffe</i>
<i>Scedosporium prolificans</i>	<i>Lomentospora prolificans</i>	<i>Lomentospora prolificans</i>

2 Mikrobiologiska metoder tillgängliga i Sverige

Information om vilka mikrobiologiska analyser för svamp som utförs vid olika kliniska mikrobiologiska laboratorier i Sverige kan hittas i [Nationell analyslista — Folkhälsomyndigheten](#). För mer detaljer om de olika analyserna hänvisas till lokala provtagningsanvisningar på respektive laboratorium.

2.1 Direktmikroskopi

2.1.1 Metod

Mikroskopi från kliniska prov kan ge värdefull information om vilken typ av svampinfektion patienten har. Mikroskopifynd kan bestå av jästceller och/eller jästhyfer vid *Candida*- och andra jästsvampinfektioner, septerade hyfer vid trådsvampinfektioner, exempelvis *Aspergillus* spp., eller breda hyfer med färre septa vid infektioner orsakade av gruppen Mucorales (benämndes förr zygomyceter). I patientprov uppvisar dimorfa svampar jäststrukturer som kan vara diagnostiska vid mikroskopifynd, exempelvis små intracellulära *Histoplasma* jästceller, *Coccidioides* sferulae, stora *Blastomyces* jästceller med bredknoppning eller ”pilot wheel” jästceller för *Paracoccidioides*. För att öka detektionskänsligheten brukar cellvägsbindande fluorescerande färgningsreagens som Blankophor eller Calcofluor white användas. Preparatet undersöks i fluorescensmikroskop med 200 - 400 × förstoring.

2.1.2 Provmaterial

Nedre luftvägsprov (bronkoalveolärt lavage, BAL; bronksekret, sputum, trakealsekret), sinusaspirat, normalt sterila vätskor (till exempel cerebrospinalvätska, perikardvätska, pleuravätska), vävnadsprov. Provtagning med pinnprov (swab) rekommenderas inte då sämre diagnostiskt utbyte för mikroskopi erhålls pga mindre mängd provmaterial insamlat genom swabning.

2.1.3 Prestanda

Mikroskopi är en snabb och viktig diagnostisk metod och positiva fynd kan vara till hjälp i det initiala valet av antimykotika vid svampinfektioner som kräver olika medel för behandling, exempelvis aspergillos kontra mucormykos. Den kan vara positiv även vid negativ odling, till exempel för påvisning av hyfer med fåtals septa vid mukormykos då *Mucorales* inte alltid växer fram vid odling eftersom hyferna kan lätt skadas vid provhantering. Begränsningar med mikroskopi är att den inte kan särskilja *Aspergillus* spp. från andra trådsvampar (exempelvis *Fusarium* spp) samt att metoden kräver flertalet synliga svampstrukturer i provet för att kunna bedömas som positivt.

2.1.4 Indikation för provtagning

Misstänkt svampinfektion.

2.1.5 Svarsrutiner och tolkning

1. Fynd av jästceller och/eller jästhyfer:

Jästsvampar kan förekomma ensamt eller tillsammans med hyfer och/eller pseudohyfer (som utgörs av jästceller som efter knoppning växer på längden och antar ett utseende som liknar äkta hyfer) Gäller *Candida* spp samt många andra jästsvampar.

2. Fynd av svamphyfer liknande trådsvamp (mögel):

Trådsvamphyfer är relativt smala (2–3 µm), ofärgade och har regelbundet septerade hyfer, ofta med dikotoma och laterala (i 45° graders vinkel) förgreningar. Gäller *Aspergillus*/*Fusarium*/*Scedosporium* m.fl.:

3. Fynd av svamphyfer liknande mucorales:

Hyfer med fåtals septa, relativt breda (6- >16 µm) och med oregelbundna bandliknande hyfer, förgreningar ofta i 90° graders vinkel men även i 45° grader. Gäller svampar från Mucorales gruppen (f.d. zygomyceter).

4. Fynd av kapselbärande jästceller:

Gäller fynd av *Cryptococcus spp.*: Runda kapselförsedda jästceller i varierande storlek. Kan visualiseras med Blankophor och fluorescensmikroskopi men även tusch (India ink) preparat kan användas för påvisning av kapsel.

Tolkning: Mikroskopifynd från normalt sterila provmaterial är diagnostiskt och bekräftar svampinfektion. Fynd från icke-sterila provmaterial kan användas som stöd för klinisk diagnos. Utifrån direktmikroskopi är det svårt att med säkerhet skilja på olika svampsorter, men viss vägledning kan ges.

2.2 Odling

2.2.1 Metod

Odling från kliniskt prov taget från normalt sterila lokaler är "gold standard" för diagnostik av svampinfektion. För definitiv diagnos av svampsjukdom krävs isolering av den specifika svampen från det infekterade området. Odling av svampar från icke sterila lokaler (t.ex. luftvägar) är svårare att bedöma avseende klinisk relevans då många svampar ingår i normalfloran eller inhaleras som sporer från omgivningen.

För att garantera bästa möjliga odlingsbetingelser för olika grupper av svampar ska provmaterial odlas på olika svampselektiva substrat, inkuberingen utföras i olika temperaturer och odlingar pågår under 1-3 veckor, beroende på typ av svamp och provmaterial.

Odlingstiden av blododlingsflaskor förlängs till 10 dagar vid svamp (särskilt viktigt vid mögelfrågeställning).

Odlingar för dimorfa endemiska svampar (P3 organismer) inkuberas upp till 6 veckor i säkerhetslaboratorium.

Olika tekniker kan användas för artidentifiering av det framodlade svampisolatet. Artidentifiering av de vanligaste patogena jästsvamparna kan utföras genom odling i kommersiella kromogena agarsubstrat. Konventionell artidentifiering av trådsvampar baseras på mikro- och makromorfologi (koloniutseende). De för arten karakteristiska strukturerna studeras i mikroskopipreparat och utgör grunden för artidentifieringen, antingen till släkte eller art.

Nästa steg för artidentifiering är analys med Maldi-Tof MS, metoden som används för artbestämning genom analys av svampens proteinspektra. Om morfologiska metoder och/eller Maldi-Tof inte räcker för artbestämning av svampen kan sekvensering genomföras. NGS (Next Generation Sequencing) av ITS (internal transcribed spacer), TEF-1a (translation elongation factor) eller andra specifika gensekvenser är gold standard för artidentifiering av svampar. Klassificeringen och namngivning av

svampar (taxonomin) baseras på fylogenetiska träd framtagna med hjälp av gensekvenser från besläktade arter. På grund av hög variabilitet är ITS-sekvensen väl lämpad för att differentiera olika arter inom samma släkte i de flesta fall.

2.2.2 Provmaterial

Sterila vätskor, vävnad, biopsi, sekret, urin, blod, luftvägsprov.

Vävnad och biopsi: Vid nålbiopsi eftersträvas minst 2 mm. Materialet läggs i sterilt provrör med 0,5 mL-1,0 mL fysiologisk koksaltlösning. Förvara provet kylt. Omgående transport till laboratoriet.

Blododling: Aerob 8–10 mL blod per flaska (BacT/ALERT FA Plus och/eller Mycosis IC/F blodflaska).

Övre och nedre luftvägsprov: Sinussekret, nasofarynxaspirat, trakealsekret, sputum, bronkoalveolärt lavage (BAL, 2-3 mL), pleuravätska (efter aspirat/punktion, 2 mL)

2.2.3 Prestanda

Fördelen är att den specifika sjukdomsalstrande svampen kan identifieras från positiv odling samt att isolering av stammen är en förutsättning för resistensbestämning. Begränsningar med odlingsmetoder är att de är långsamma och har relativt låg känslighet.

2.2.4 Indikation för provtagning

Misstänkt svampinfektion.

2.2.5 Svarsrutiner och tolkning

Odlingsfynd svaras ut på art- eller artkomplexnivå om möjligt. Svampfynd från normalt sterila provmaterial är diagnostiska och bekräftar svampinfektion. Svampfynd från icke-sterila provmaterial kan användas som stöd för klinisk diagnos.

2.3 Resistensbestämning av svamp

2.3.1 Metod

Referensmetoden för resistensbestämning av svampisolat i Sverige är EUCAST buljongspädningsmetod. På EUCAST hemsida: <http://www.eucast.org> finns utförliga beskrivningar om metoderna för resistensbestämning av jästsvamp, trådsvamp/mögel och dermatofyter, epidemiologiska och kliniska brytpunkter samt godkända MIC-värden för kvalitetskontroller. Dessa metoder är uppsatta på de nationella referenslaboratorierna för mykologi (Karolinska universitetslaboratoriet i Solna och Sahlgrenska Universitetssjukhuset i Göteborg).

Då referensmetoden för resistensbestämning är arbetskrävande och ej lämplig som screeningmetod finns förenklade kommersiella resistensbestämningsmetoder som används på flera laboratorier i Sverige. Dessa används framför allt för de vanligaste jästsvamparna. Metoderna har vissa tillkortakommanden och verifiering av resistensbestämning kan ibland behöva göras med referensmetod på något av referenslaboratorierna. Resistensbestämning av ovanliga svampar utförs i regel med referensmetod på referenslaboratorier.

2.3.2 Provmaterial

Framodlad svampisolat (jästsvamp, trådsvamp/mögel inklusive dermatofyt)

2.3.3 Prestanda

EUCAST referensmetoder är reproducerbara och tillförlitliga för resistensbestämning av jäst, sporulerande trådsvampar/mögel inklusive dermatofyter (1,2). Dagens tillgängliga kommersiella metoder har vissa brister gällande reproducerbarhet.

2.3.4 Indikation för resistensbestämning

Resistensbestämning rekommenderas 1) på svampisolat från sterila lokaler som blod, csv, vävnader och andra normalt sterila lokaler, 2) på svampisolat framodlade under pågående antimykotisk behandling och 3) på svampisolat med misstänkt förvärvad resistens mot antimykotika.

Resistensbestämning kan även vara befogad på isolat från icke-sterila lokaler om antimykotisk behandling planeras eller om svamp odlas fram under pågående svampbehandling.

I första hand rekommenderas att resistensbestämning utförs på isolat av jästsvampar och *Aspergillus*-arter. MIC-bestämning av ovanliga mögelarter har tveksamt värde då in-vitro känslighet har visat dålig korrelation med behandlingseffekt (3).

2.3.5 Svarsrutiner och tolkning

Specifika kliniska brytpunkter, som skiljer sig mellan olika svamparter, finns tillgängliga från EUCAST för vissa svamparter. De gör det möjligt att klassificera isolatet som känsligt (S) vid standarddosering, känslig vid ökad exponering (I) eller resistent (R) då det finns en hög sannolikhet för behandlingssvikt även vid högre dos. Kategorin "S" innebär en hög sannolikhet för att behandlingen ska lyckas. Kategorin "I" indikerar att isolatets känslighet beror på doseringsregimen och att doser för att uppnå högre läkemedelsexponering är nödvändiga (4).

Kliniska brytpunkter sätts med hjälp av farmakokinetiska och -dynamiska data för antimykotikum, MIC-fördelningar av vildtypisolat och med data från kliniska prövningar. På grund av otillräckliga data saknas kliniska brytpunkter för många kombinationer av svampart och antimykotikum. Eventuellt kan epidemiologiska brytpunkter (ECOFF eller ECV enligt EUCAST) som endast baseras på MIC-fördelningarna och definieras som den övre gränsen av vildtypens MIC-värde användas för vägledning vid tolkning. Dessa epidemiologiska brytpunkter gör det möjligt att skilja mellan vildtypisolat ($MIC \leq ECOFF/ECV$) och troliga icke-vildtypisolat ($MIC > ECOFF/ECV$) som kan ha förvärvade resistensmekanismer. Eftersom data som används för att fastställa brytpunkter kan vara olika, tillhandahåller EUCAST sina egna kliniska och ECOFF/ECV-brytpunkter (5). När det är möjligt, bör både MIC-värdet och dess tolkning rapporteras för att vägleda läkare i valet av svampbehandling (6).

Svarsalternativ: MIC-värde (mg/L) och/eller SIR tolkning enligt EUCASTs brytpunktstabell (se <http://www.eucast.org>), baserad på MIC-värden erhållna med EUCAST referensmetod.

EUCAST har nyligen publicerat ett vägledningsdokument som kan användas för tolkning av MIC-värden av ovanliga jästsvampar där brytpunkter saknas (When there are no antifungal breakpoints, EUCAST guidance on Interpretation of MICs for rare yeast without breakpoints in breakpoint tables <http://www.eucast.org>).

2.3.6 Referenser

1. Cuenca-Estrella, M. et al. (2007). Multicentre determination of quality control strains and quality control ranges for antifungal susceptibility testing of yeasts and filamentous fungi using the methods of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). Clin Microbiol Infect. 13, (10):1018-22.
2. Arendrup, MC. et al. (2020). Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Multicentre validation of a EUCAST method for the antifungal susceptibility testing of microconidia-forming dermatophytes. J Antimicrob Chemother. 75, (7):1807-1819.
3. Lamoth F, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Role and Interpretation of Antifungal Susceptibility Testing for the Management of Invasive Fungal Infections. Journal of fungi (Basel, Switzerland). 2020;7(1).
4. Arendrup et al. (2020). Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). How to interpret MICs of antifungal compounds according to the revised clinical breakpoints v. 10.0 European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). Clin Microbiol Infect. 26(11):1464-1472.
5. Espinel-Ingroff A. et al. (2005). International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. J Clin Microbiol. 43(8):3884-9.

2.4 Galaktomannan (*Aspergillus*-antigen)

2.4.1 Metod

Galaktomannan (GM) tillhör en grupp polysackarider som utgör en stor del av cellväggen hos *Aspergillus*-arter och som delvis utsöndras under invasiv växt. Påvisning av GM har utvecklats för diagnostik av invasiv aspergillos men testet har också visat sig användbart för diagnostik av fusarios (1) och kan även vara positiv vid histoplasmos (2). Det finns ett flertal olika metoder för påvisande av GM.

Den vanligaste metoden för detektion av GM är en double-sandwich enzyme immunoassay (EIA)-test som nyttjar den monoklonala antikroppen EBA-2 som är riktad mot GM (Platelia™ *Aspergillus* antigen, Bio-Rad, Frankrike). Metoden är godkänd och validerad för serum och BAL-vätska men har i studier även visats vara användbar för cerebrospinalvätska (CSV) (3). Resultat anges som index på optisk densitet som erhålls genom att räkna fram kvoten mellan absorbansvärdet på kliniska prov och absorbansvärdet på ett referensserum.

2.4.2 Provmaterial

Provmaterial: Serum, BAL, CSV.

2.4.3 Prestanda

En Cochraneanalys från 2015 som inkluderade data från 47 artiklar fann att analys av GM i serum hos immunsupprimerade patienter (definierade som neutropeni, organtransplantation, cytostatikabehandling eller sjukdomar som påverkar T-cellsfunktion) hade en sensitivitet på 78% och specificitet på 85% vid ett cut-off värde på 0,5 (4). Vid ett cut-off värde på 1,0 var motsvarande siffror 71% och 90%. Andra meta-analyser har funnit liknande resultat (5). Galaktomannan i serum har

högst känslighet hos neutropena patienter med disseminerad aspergillusinfektion och lägre känslighet hos icke neutropena patienter med Aspergillusinfektion lokaliserad till lungan.

GM i BAL har högre känslighet och specificitet än GM i serum. I BAL är känsligheten ca 85–90% och specificiteten ca 90–95% hos immunsupprimerade patienter (6,7). Kliniska studier har visat att ett GM index $<0,5$ i BAL har ett högt negativt prediktivt värde och att index ≥ 3 har ett högt positivt prediktivt värde (8).

Viktigt att tänka när man använder GM är att prestandan, mätt som positivt prediktivt värde, är avhängigt incidensen. Eftersom invasiva aspergillusinfektioner är relativt ovanliga betyder det att GM i första hand skall användas för mer uttalat immunsupprimerade patientgrupper.

Även om invasiv aspergillusinfektion i CNS är ovanligt är påvisning av GM i CSV värdefullt, och mindre studier med cut-off värden mellan 0,5 och 2 har visat relativt hög sensitivitet på 88% och specificitet på 96% (9).

Vissa trådsvampar som är närbesläktade med *Aspergillus*, till exempel *Penicillium* spp. och *Fusarium* spp., kan korsreagera i antigen-testet i BAL och ge positiva resultat. Falskt positiva resultat i serum kan bland annat orsakas av blodprodukter och translokation av GM i mat och enterala näringsprodukter från tarmen ut i blodet. Däremot finns det inte längre någon risk för falskt positiva resultat på grund av samtidig behandling med piperacillin-tazobactam (10). Man har inte påvisat GM i näringslösningar för parenteral nutrition (11).

2.4.4 Indikation för provtagning

Serum: 1) Diagnostiskt prov vid klinisk misstanke på invasiv aspergillusinfektion; 2) screeningtest för invasiv aspergillusinfektion i en högriskpopulation om svampprofylax inte används.

BAL: Misstanke på aspergillusinfektion i lunga.

CSV: Misstanke på aspergillusinfektion i hjärnan.

Exakt indikation och tidpunkter för provtagning beror på den individuella riskbedömningen av patienten baserat på bakomliggande sjukdom, medicinering, grad av immunbrist, pågående profylaxmedicinering mot svampinfektioner samt klinisk bild. Detta avhandlas i avsnittet "Provtagning på IVA och efter kirurgi" samt "Provtagning på hematologen och vid tillstånd med uttalad T-cellssuppression".

2.4.5 Svarsrutiner och tolkning

Resultatet anges som index av optisk densitet som erhålls genom att räkna fram kvoten mellan absorbansvärdet på det kliniska provet och absorbansvärdet på ett referensserum.

Tillverkarna av testerna rekommenderar ett cut-off värde för positivt resultat på 0,5 för serum och CSV-prov) och 1,0 för BAL-prov. Positiva resultat strax över cut-off är osäkra och upprepade provtagningar rekommenderas.

I den senaste versionen av de internationella definitionerna av invasiva svampinfektioner hos immunsupprimerade patienter anges följande som ett mikrobiologiskt kriterium för invasiv Aspergillusinfektion: GM $\geq 1,0$ i serum (och plasma), BAL och CSV, eller en kombination av $\geq 0,7$ i serum/plasma och $\geq 0,8$ i BAL (12).

2.4.6 Referenser

1. Nucci et al. Earlier Diagnosis of Invasive Fusariosis with *Aspergillus* Serum Galactomannan Testing. Plos One 2014; 9: e87784
2. Gajurel et al. Histoplasmosis in transplant recipients. Clinical Transplantation 2017; 10: e13087.
3. Chong GM et al. Diagnostic Performance of Galactomannan Antigen Testing in Cerebrospinal Fluid. J Clin Microbiol. 2016; 54, 428-31.
4. Leeflang et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2015.
5. Pfeiffer et al. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis Clin Infect Dis. 2006 May 15;42(10):1417-27.
6. Guo et al. Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. Chest. 2010; 138: 817-24.
7. Zou et al. Systematic review and meta-analysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis. Plos One 2012; 7: e43347.
8. D'Haese et al. Detection of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid samples of patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis: analytical and clinical validity. J Clin Microbiol. 2012; 50: 1258-63.
9. Chong GM et al. Diagnostic Performance of Galactomannan Antigen Testing in Cerebrospinal Fluid. J Clin Microbiol. 2016; 54, 428-31.
10. Mikulska et al. Piperacillin/tazobactam (Tazocin™) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. J Antimicrob Chemother. 2012 Jul;67(7):1746-8.
11. Knoth et al. In-vitro detection of mannan and galactomannan in components of total parenteral nutrition (TPN). Pharmazie 2016 May;71(5):238-42.
12. Donnelly 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 Sep 12;71(6):1367-1376.

2.5 Aspergillus-IgG antikroppar

2.5.1 Metod

Aspergillus IgG (Platelia™, Bio-Rad) test är en indirekt immunoenzymatisk analys för påvisning av anti-aspergillus IgG-antikroppar i humant serum eller plasma. Ett komplex bildas om anti-Aspergillus IgG antikroppar finns i provet. Komplexet består av Aspergillus ag, human anti-Aspergillus IgG och mus anti-human IgG-märkt med peroxid. Komplexet påvisas med hjälp av kromogen-peroxidassubstrat och detekteras i en spektrofotometer. Analysen mäter Aspergillus IgG-Ak i AU/mL från en standardkurva med fem kalibratorer i kända IgG-koncentrationer. Analysen är uppsatt på Klinisk Mikrobiologi, vid Karolinska universitetslaboratoriet. Det finns liknande metoder uppsatta på Klinisk Immunologi på andra sjukhus i landet.

2.5.2 Provmaterial

Serum.

2.5.3 Indikation för provtagning

Aspergillus IgG-Ak analys används för att diagnostisera kroniska former av *Aspergillus*-infektion (t. ex aspergillom och kronisk nekrotiserande, fibrotiserande och/eller kaviterande pulmonell aspergillos) hos vuxna immunkompetenta patienter. I särskilda fall kan man överväga att jämföra IgG-nivåer över tid genom att parallellköra tidigare sparad och aktuellt serum. Detta görs efter särskild begäran.

2.5.4 Svarsrutiner och tolkning

Svarsalternativ:

Aspergillus IgG-Ak: Negativ;

Aspergillus IgG-Ak: Påvisade

Koncentration <5 AU/mL anses vara negativ och koncentration ≥ 10 AU/mL anses vara positiv med avseende på förekomst av IgG anti-aspergillus-antikroppar. Koncentration mellan 5 och 10 AU/mL tolkas som gränsvärde. Negativt test är särskilt användbart som tillägg för annan diagnostik för att utesluta kronisk pulmonell aspergillos hos immunkompetenta patienter.

2.6 1,3- β -D-glukan (BDG)

2.6.1 Metod

Polysackariden 1,3- β -D-glukan (BDG) är en viktig beståndsdel av cellväggen hos majoriteten av humanpatogena svampar och kan detekteras i blod hos patienter med invasiv infektion orsakade av *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Pneumocystis jirovecii*, *Fusarium* spp., *Histoplasma* m fl. *Cryptococcus* spp. och svampar från släktet *Mucorales* har låg mängd 1,3- β -D-glukan i sina cellväggar varför patienter med infektioner orsakade av dessa svampar sällan har detekterbart BDG i blod.

Analysmetoden för BDG baseras på en enzymatisk reaktion mellan den aktiva substansen Faktor G (en koagulationsfaktor från blodceller av hästskokrabban *Limulus*) och BDG i patientprovet där resultatet av det sista reaktionssteget är ett färgomslag (kolorimetrisk analysmetod) eller en gelbildning av provet (turbidimetrisk analysmetod) beroende på vilket test som används.

2.6.1.2 Fungitell®

Fungitell® är det test som har använts under längst tid i Europa och USA. Detta är ett kolorimetriskt och kvantitativt test där absorbansen i serumprovet avläses och tolkas mot en standardkurva för att uppskatta BDG koncentrationen i provet.

2.6.1.3 Fungitell® STAT

Fungitell STAT® är en vidareutveckling av Fungitell® testet som anpassats för att möjliggöra singelprov analys. Fungitell STAT® är ett kvalitativt test. Metoden baseras på samma princip som Fungitell®, men resultatet erhålls som ett index utifrån en jämförelse av frekvensen av optisk densitetsökning i patientprovet och frekvensen av optisk densitetsökning i standardlösningen.

2.6.1.4 Wako

Det turbidimetriska testet Wako (FUJIFILM Wako Chemicals Europe, Germany), som använts under lång tid i Japan, har under de senaste åren börjat användas mer i Europa. Detta är ett turbidimetrisk och kvantitativt test där grumligheten i serumprovet avläses och tolkas mot en standardkurva för att uppskatta BDG koncentrationen i provet. Wako testet har ett annorlunda mätområde jämfört med Fungitell®.

2.6.2 Provmaterial

BDG är än så länge endast godkänt för serumprover, men studier har visat att BDG kan detekteras i cerebrospinalvätska hos patienter med invasiv svampinfektion i CNS (1, 2). Detektion av BDG i BAL-vätska har visat begränsad diagnostisk prestanda (3).

2.6.3 Prestanda

BDG koncentrationer i blod uppvisar stor variabilitet mellan patienter och påverkas av vilken typ av invasiv svampinfektion som föreligger, vilket/vilka organsystem som är engagerade, svampbördan i kroppen, tidpunkten för provtagning i förhållande till symptomdebut samt individrelaterade faktorer för elimination av BDG från cirkulationen. Pga av denna stora individuella variabilitet visar olika studier mycket varierande resultat avseende BDG testets diagnostiska prestanda och exakta siffror avseende sensitivitet och specificitet är svårtolkade. I en nyligen genomförd systematisk Cochrane genomgång som inkluderade 49 diagnostiska studier noterades en alltför stor heterogenitet mellan studier för att möjliggöra en formell meta-analys och siffror avseende sensitivitet, specificitet och prediktiva värden kunde inte presenteras (4).

Sensitivitet: BDG kan vara lågt om provet tas tidigt i förloppet vid en invasiv svampinfektion (4, 5). En studie visade att endast 52% av patienter med invasiv aspergilloz och 62% av patienter med candidemi hade positivt BDG vid tidpunkten för diagnos (4). Vid upprepade provtagning under de första två veckorna efter infektionsdebut är sannolikheten för att patienten har ett positivt BDG resultat betydligt högre och sensitiviteten ökar vid provtagning senare i infektionsförloppet, även om patienten blivit insatt på antifungal behandling (5). BDG vid invasiv svampinfektion når ofta höga serumnivåer (inte sällan > 400–500 pg/ml mätt med Fungitell®) under de närmsta dagarna-veckorna efter infektionsdebut. En studie som jämfört de tre kommersiella metoderna för BDG analys visade en något lägre sensitivitet för Fungitell® STAT och Wako test jämfört med Fungitell® (6).

Specificitet: BDG kan detekteras i blod även hos patienter utan invasiv svampinfektion. Flera faktorer har beskrivits som möjliga källor till BDG påvisning i blod. Administration av olika läkemedelsprodukter kontaminerade med betaglukan är sannolikt en av de viktigaste källorna till "falskt positivt" BDG i blod. I tidiga studier sågs en korrelation mellan olika typer av intravenösa antibiotika och "falskt positivt" BDG i blod, men med förbättrade tillverkningsprocesser anses inte längre antibiotika vara en källa för BDG-reaktivitet i blod (7). Blodprodukter såsom albumin, koagulationsfaktorer och immunoglobulinlösningar har visats kunna innehålla betaglukan och studier har visat förhöjda BDG nivåer i blod hos patienter utan invasiv svampinfektion som fått denna typ av läkemedelsprodukter (8-10). I en av dessa studier sågs förhöjda BDG-nivåer upp till 3 veckor efter givet immunoglobulin. Tidiga studier har visat att cellulosa-innehållande dialysfilter kan ge förhöjda BDG nivåer hos patienter som genomgår hemodialys, men med dagens dialysfilter verkar detta inte längre vara relevant (11). Det finns också data från olika källor som tyder på en korrelation mellan positivt BDG och höggradig Candida-kolonisation hos intensivvårdspatienter, även i frånvaro av invasiv Candidainfektion. En annan källa till falskt positiva BDG testresultat kan vara optisk

interferens vid analys av lipemiska, hemolyserade eller bilirubinemiska serumprov och en svensk studie har visat en korrelation mellan triglyceridnivåer och BDG nivåer i blod hos patienter utan invasiv svampinfektion (5). Detta gäller kolorimetriska BDG-test som exempelvis Fungitell. Betaglukan kan även finnas i miljön på laboratorier varför stringent metodik vid genomförandet av BDG test är av yttersta vikt för att minska risken för kontamination från omgivningen.

Studier har visat att specificiteten för BDG-testet förbättras om två konsekutivt positiva testresultat används för att definiera ett positivt resultat (5, 12).

I en prospektiv studie på patienter med hematologisk malignitet sågs att patienter med "falskt" förhöjda BDG-test oftast hade BDG-nivåer <400 pg/ml och vid en cut-off nivå på 800 pg/ml var specificiteten 100% (kolorimetrisk metod). Vidare fann man att patienter med invasiv svampinfektion tenderade att ha successivt stigande BDG nivåer i blod under perioden 2 veckor före till 2 veckor efter att diagnosen fastställdes (oavsett tidpunkt för insatt antifungal behandling) medan patienter med positiva BDG utan invasiv svampinfektion uppvisade ett mönster av enstaka positiva värden eller varierande BDG nivåer (5).

En studie som jämfört de tre komersiella metoderna för BDG analys visade en något högre specificitet för Wako test jämfört med Fungitell® och Fungitell® STAT (6).

2.6.4 Indikation för provtagning

Diagnostiskt prov vid klinisk misstanke på invasiv svampinfektion exv. invasiv aspergillos, invasiv *Candida*-infektion eller *Pneumocystis* pneumoni (se ovan bakgrund).

Kan övervägas som screeningtest för invasiv svampinfektion i en väldefinierad högriskpopulation om svampprofylax inte används.

2.6.5 Svarsrutiner

2.6.5.1 Fungitell®

Resultatet anges kvantitativt i pg/ml.

Tillverkaren för Fungitell® testet rekommenderar följande cut-off gränser:

<60 pg/ml = negativ

60–79 pg/ml = obestämd

≥80 pg/ml = positiv

2.6.5.2 Fungitell® STAT

Resultatet anges kvalitativt. Några laboratorier har valt att lägga till indexvärde.

Tillverkaren för Fungitell® STAT testet rekommenderar följande cut-off gränser:

Index ≤ 0,74 = negativ

Index 0,75-1,14 = obestämd

Index ≥ 1,15 = positiv

2.6.5.3 Wako

Resultatet anges kvantitativt i pg/mL.

Tillverkaren för Wako testet rekommenderar följande cut-off gränser:

≥ 7 pg/mL = positivt

Även koncentrationer som < 7 pg/mL som ligger över detektionsgränsen innebär ökad sannolikhet för svampinfektion.

2.6.6 Tolkning av resultat

Pga av den stora individuella variabiliteten i BDG nivåer enligt ovan (avsnitt Prestanda) är det svårt att bestämma exakta cut-off gränser och BDG-resultat bör tolkas utifrån den aktuella kliniska situationen.

Faktorer att beakta vid tolkning av testresultat:

- Infektioner orsakade av *Cryptococcus* eller svampar från släktet *Mucorales* ger sällan förhöjda BDG nivåer i blod.
- BDG kan vara negativt tidigt i förloppet vid en invasiv svampinfektion men uppvisar ofta en kinetik med successivt stigande BDG nivåer i blod under de första veckorna av infektionen
- Enstaka förhöjda BDG nivåer i blod med efterföljande negativa värden talar emot invasiv svampinfektion
- Minst två konsekutivt positiva BDG resultat bör användas för att definiera ett positivt testresultat
➔ *Analys av upprepade BDG test med 2–3 dagars mellanrum rekommenderas*
- Ju högre BDG-nivåer, desto större sannolikhet att invasiv svampinfektion föreligger.
- I en studie sågs att BDG-nivåer > 800 pg/mL (med kolorimetrisk metod) talade mycket starkt för invasiv svampinfektion (13)
➔ Vid höga BDG nivåer (högre än den övre detektionsgränsen) kan exakt kvantifiering av BDG-nivå göras för att underlätta tolkning av resultat.
- Faktorer såsom administration av vissa typer av blodprodukter, immunglobulinlösningar och lipemiska serumprover kan ge positiva BDG-nivåer. Troligen kan även höggradig Candidakolonisation hos intensivvårdspatienter resultera i positivt BDG.
➔ Beakta möjliga faktorer som kan ge upphov till förhöjda BDG nivåer i blod hos patienter utan invasiv svampinfektion.
- Det finns en relativt hög variabilitet vid analys betaglukan och kinetik av betaglukanresultat bör tolkas med försiktighet. En trend av tydligt stigande värden över tid kan dock tala för terapisivikt (14). Betaglukan kan kvarstå positivt i blod under flera veckor (-månader) efter utläkt svampinfektion (14) och kan inte användas som en indikator för att avsluta behandling.

2.6.7 Referenser

1. Litvintseva AP, Lindsley MD, Gade L, Smith R, Chiller T, Lyons JL, et al. Utility of (1-3)-beta-D-glucan testing for diagnostics and monitoring response to treatment during the multistate outbreak of fungal meningitis and other infections. *Clin Infect Dis*. 2014;58(5):622-30.
2. Lyons JL, Thakur KT, Lee R, Watkins T, Pardo CA, Carson KA, et al. Utility of measuring (1,3)-beta-d-glucan in cerebrospinal fluid for diagnosis of fungal central nervous system infection. *J Clin Microbiol*. 2015;53(1):319-22.
3. Shi XY, Liu Y, Gu XM, Hao SY, Wang YH, Yan D, et al. Diagnostic value of (1--> 3)-beta-D-glucan in bronchoalveolar lavage fluid for invasive fungal disease: A meta-analysis. *Respiratory medicine*. 2016;117:48-53.
4. Angebault C, Lanternier F, Dalle F, Schrimpf C, Roupie AL, Dupuis A, et al. Prospective Evaluation of Serum beta-Glucan Testing in Patients With Probable or Proven Fungal Diseases. *Open forum infectious diseases*. 2016;3(3):ofw128.
5. Hammarstrom H, Stjarne Aspelund A, Christensson B, Heussel CP, Isaksson J, Kondori N, et al. Prospective evaluation of a combination of fungal biomarkers for the diagnosis of invasive fungal disease in high-risk haematology patients. *Mycoses*. 2018.
6. Kritikos A, Caruana G, Poissy J, Mamin A, Bachmann D, Pagani JL, et al. Comparison of Three β -Glucan Tests for the Diagnosis of Invasive Candidiasis in Intensive Care Units. *J Clin Microbiol*. 2023;61(2):e0169122.
7. Liss B, Cornely OA, Hoffmann D, Dimitriou V, Wisplinghoff H. 1,3-beta-d-Glucan contamination of common antimicrobials-authors' response. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(10):2997-9.
8. Liss B, Cornely OA, Hoffmann D, Dimitriou V, Wisplinghoff H. 1,3-ss-D-glucan concentrations in blood products predict false positive post-transfusion results. *Mycoses*. 2016;59(1):39-42.
9. Hammarstrom H, Kondori N, Friman V, Wenneras C. How to interpret serum levels of beta-glucan for the diagnosis of invasive fungal infections in adult high-risk hematology patients: optimal cut-off levels and confounding factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015.
10. Egger M, Pruller F, Raggam R, Divjak MK, Kurath-Koller S, Lackner H, et al. False positive serum levels of (1-3)-ss-D-Glucan after infusion of intravenous immunoglobulins and time to normalisation. *J Infect*. 2017.
11. Prattes J, Schneditz D, Pruller F, Jandl E, Sauseng N, Hoenigl M, et al. 1,3-ss-d-Glucan testing is highly specific in patients undergoing dialysis treatment. *J Infect*. 2017;74(1):72-80.
12. Ellis M, Al-Ramadi B, Finkelman M, Hedstrom U, Kristensen J, Ali-Zadeh H, et al. Assessment of the clinical utility of serial beta-D-glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. *J Med Microbiol*. 2008;57(Pt 3):287-95.
13. Hammarstrom H, Stjarne Aspelund A, Christensson B, Heussel CP, Isaksson J, Kondori N, et al. Prospective evaluation of a combination of fungal biomarkers for the diagnosis of invasive fungal disease in high-risk hematology patients. *Mycoses*. 2018.
14. Jaijakul S, Vazquez JA, Swanson RN, Ostrosky-Zeichner L. (1,3)-beta-D-glucan as a prognostic marker of treatment response in invasive candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2012;55(4):521-6.

2.7 Cryptococcus-antigen

2.7.1 Metod

Infektion orsakad av *Cryptococcus* species komplex (*C. neoformans* och *C. gattii*) kan diagnostiseras genom antigenpåvisning, direktmikroskopi, odling och PCR. Den metod som har högst känslighet för att diagnostisera kryptokockmeningit är antigenpåvisning (1).

Det finns flera olika metoder för påvisning av *Cryptococcus*-antigen (kapselpolysackarid glucuronoxylomannan) varav olika lateral flow -, latexagglutinations- och EIA-tester är de vanligaste. Den dominerande metoden i Sverige är lateral flow test. *Cryptococcus*-Ag lateral flow test är ett kvalitativt och semikvantitativt immunokromatografiskt test för påvisning av kapselpolysackaridantigen tillhörande *C. neoformans* och *C. gattii*.

2.7.2 Provmaterial

Serum, cerebrospinalvätska, (urin).

2.7.3 Prestanda

En systematisk översikt från 2023 granskade prestandan på IMMY *Cryptococcus*-Ag lateral flow test för diagnostik av *Cryptococcus* infektion i studier utförda på prov från HIV-negativa patienter. Åtta studier som utvärderade den diagnostiska prestandan av *Cryptococcus*-Ag lateral flow test i serum visade att såväl sensitivitet som specificitet låg på 96%. Sex studier utvärderade prestandan i cerebrospinalvätska och visade på en sensitivitet och specificitet på 99% (2). Korsreaktioner med serum från patienter med *Trichosporon asahii* fungemi har rapporterats.

2.7.4 Indikation för provtagning

Vid disseminerad *Cryptococcus*-infektion kan antigen detekteras i cerebrospinalvätska, serum och urin. Antigen kan även påvisas i serum från patienter med *Cryptococcus*-pneumoni samt i cerebrospinalvätska vid meningit och i andra lokaler såsom urin från patienter med HIV/AIDS.

2.7.5 Svarsrutiner och tolkning

Besvaras som negativt eller positivt, med titer (1-2560).

Ett positivt resultat talar starkt för förekomst av kryptokockinfektion. En hög antigen titer talar för disseminerad infektion.

Studier har visat att antigen titrar sjunker sakta i både serum och likvor hos patienter med kryptokockmeningit, även vid regress av infektion (3) och internationella guidelines avråder från att använda detta test för att följa behandlingseffekt (1).

2.7.6 Referenser

1. Chang CC, Harrison TS, Bicanic TA, et al. Global guideline for the diagnosis and management of cryptococcosis: an initiative of the ECMM and ISHAM in cooperation with the ASM. *Lancet Infect Dis.* 2024;24(8):e495-e512.
2. Macrae C. et al. Diagnostic performance of the IMMY cryptococcal antigen lateral flow assay on serum and cerebrospinal fluid for diagnosis of cryptococcosis in HIV-negative patients: a systematic review. *BMC Infect Dis.* 2023, 23(1):209.
3. Bennett JE, Williamson PR. Antigen Titers in Cryptococcal Meningitis: What Determines How Fast They Fall? *J Infect Dis.* 2024;230(5):1291-1296.

2.8 PCR

2.8.1 Aspergillus-DNA

2.8.1.1 Metod

Påvisande av *Aspergillus*-DNA kan användas som komplement till galaktomannan (GM) och beta-D-glukan för att stärka misstanken om en invasiv aspergillos. Påvisande av *Aspergillus*-DNA görs med en PCR-reaktion som riktas mot konserverade DNA-sekvenser för *Aspergillus* spp. En av de vanligaste målsekvenserna är oftast belägen inom rDNA, dvs gener som kodar för ribosomalt RNA (vanligen 18S eller ITS). Fördelen med att välja ribosomala gener är att de oftast är multipla vilket ökar metodens känslighet. Några kommersiella metoder har tillkommit under sista åren i marknaden; i Sverige är det dock fortfarande få laboratorier som utför in-house eller kommersiella PCR-metoder. *Aspergillus* förekommer dock i den omgivande miljön varför risk för kontamination finns både vid provtagning och analys.

2.8.1.2 Provmaterial

EDTA-blod (helblod, plasma), serum, BAL, cerebrospinalvätska, biopsi.

2.8.1.3 Prestanda

European Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI) som är en internationell arbetsgrupp under ISHAM och EORTC publicerade en utvärdering av det diagnostiska värdet av *Aspergillus*-DNA i blodprov i en Cochrane-analys publicerad 2019 (1). Man inkluderade 29 studier med en genomsnittlig incidens av invasiv aspergillos hos immunsupprimerade på 16,3% och fann en sensitivitet på 79% och specificitet på 80% för ett enskilt positivt PCR-resultat och 60% respektive 95% för två konsekutivt positiva resultat. I en översikt av flera metaanalytiska studier av Aspergillus-PCR i BAL- och blod/serumprov var den beräknade sensitiviteten 0,57-0,91 och specificiteten 0,92-0,97 för BAL respektive 0,57-0,84 och 0,58-0,95 för blod (2). Man fann dock att valet av en standardiserad procedur för DNA extraktionen var avgörande för ett gott resultat.

I de senaste versionerna av de internationella definitionerna av invasiva svampinfektioner hos immunsupprimerade patienter har man inkluderat *Aspergillus* PCR som ett godkänt mykologiskt test i form av två konsekutivt positiva test i blod/serum/plasma eller två positiva PCR test i BAL (helst duplikattest) eller en kombination av ett positivt test i blod/serum/plasma och ett positivt test i BAL (3).

Analys av *Aspergillus* PCR i blod har, när den använts tillsammans med GM och beta-D-glukan, även visat sig vara användbart för att styra empirisk antimykotikabehandling (4). I Sverige har *Aspergillus* PCR i blod inte använts systematiskt och erfarenheterna är därför begränsade varför några tydliga tolkningsrekommendationer inte kan ges. Det har på några ställen i landet ingått i BAL-analyser hos immunsupprimerade patienter med nytillkomna lunginfiltrat, där nyttan upplevts vara varierande. Internationellt bedöms prestandan dock vara så bra att testet numera ingår i de reviderade definitionerna för invasiv svampinfektioner hos immunsupprimerade patienter (3).

Enligt internationella publicerade data (se ovan) har två konsekutivt positiva analyser i blod visats ha ett högt positivt prediktivt värde. Prestandan för PCR i BAL har angetts vara lik den för GM (4,5).

2.8.1.4 Indikation för provtagning

Internationellt är indikation för provtagning antingen screening av patienter med hög risk för invasiv aspergillos, då i kombination med GM och/eller BDG (se avsnitt Provtagning på hematologen), eller vid misstanke på etablerad invasiv infektion.

2.8.1.5 Svarsrutiner och tolkning

Svarsrutin: Positivt, Negativt.

2.8.1.6 Referenser

1. Cruciani et al. Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people. Cochrane Database of Systematic Reviews 2019.
2. Cruciani M et al. An Overview of Systematic Reviews of Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Immunocompromised People: A Report of the Fungal PCR Initiative (FPCRI)-An ISHAM Working Group. J Fungi (Basel). 2023 Sep 26;9(10):967.
3. Donnelly 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 Sep 12;71(6):1367-1376.
4. Morrissey et al. Galactomannan and PCR versus culture and histology for directing use of antifungal treatment for invasive aspergillosis in high-risk haematology patients: a randomised controlled trial. Lancet Infect Dis. 2013; 13: 519-28.
5. White, PL et al. Aspergillus Polymerase Chain Reaction—An Update on Technical Recommendations, Clinical Applications, and Justification for Inclusion in the Second Revision of the EORTC/MSGERC Definitions of Invasive Fungal Disease. Clin Infect Dis. 2021; 72(S2):S95-101

2.8.2 Candida DNA

2.8.2.1 Metod

Påvisande av *Candida* -DNA kan användas som ett komplement till blododling och beta-D-glukan för att stärka misstanken om en invasiv *Candida* infektion. Påvisande av *Candida* DNA görs med en PCR-reaktion som riktar mot DNA-sekvenser unika för *Candida* spp. Målsekvensen är oftast belägen inom rDNA, dvs gener som kodar för ribosomalt RNA (vanligen 18S, 28S eller ITS) men även andra gener kan förekomma. Fördelen med att välja ribosomala gener är att de oftast är multipla vilket ökar metodens känslighet. Ett antal kommersiella metoder finns tillgängliga på marknaden men också in-house metoder förekommer. Vissa av testerna är arts specifika, dvs de känner igen de vanligaste *Candida* arterna (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* och *C. krusei*). Andra tester detekterar endast *Candida* som genus utan att särskilja arter. I nuläget erbjuds in-house *Candida* -DNA analys i Sverige endast vid Karolinska laboratoriet där målsekvensen är 18S rDNA. Metoderna saknar fortfarande standardisering.

2.8.2.2 Provmaterial och svarsrutin

EDTA-blod, (helblod, plasma), cerebrospinalvätska, biopsi.

2.8.2.3 Prestanda

Prestanda varierar med metod, typ av infektion och vilken patientpopulation som studerats. I en metaanalys av det diagnostiska utbytet av *Candida* PCR, innefattande totalt 54 olika publikationer, fann man en god sensitivitet och specificitet för patienter med bekräftad eller sannolik invasiv candidiasis(1). Hos totalt 85 % av dessa patienter kunde *Candida*-DNA detekteras medan motsvarande siffra för blododling var 38 %. Prestandan förefaller bättre vid candidemi än vid djupa infektioner. I en studie på intensivvårdspatienter som genomgått olika typer av bukkirurgi och som följdes prospektivt med avseende på abdominal candidainfektion fann man en sensitivitet på 0,85 och en specificitet som var <0,5 och lägre ju mer koloniserad patienten var (2). En senare studie har visat klart lägre sensitivitet än i metaanalysen (3) och många anser att dokumentationen ännu inte är tillräcklig för att använda metoden i rutinbruk (4).

Sammanfattningsvis kan in-house *Candida* PCR eventuellt ge ett bättre utbyte än blododling och skulle kunna vara ett värdefullt tillskott i diagnostiken vid candidemi, särskilt med tanke på den snabbare "turn around" tiden. Flera studier visar att PCR från helblod uppvisar en bättre sensitivitet än från serumprov (3, 4). Ytterligare karaktärisering av prestanda skulle dock öka metodens värde.

2.8.2.4 Indikation för provtagning

I Sverige har *Candida* PCR inte använts systematiskt och erfarenheterna är begränsade varför några tydliga rekommendationer inte kan ges. En brist är att det inte är standardiserad metod. För vävnadsdiagnostik och csv har analysen fortfarande en plats i dagsläget men det är möjligt att metoden här kan komma att ersättas av svampsekvensering (ITS) (se längre ned) i framtiden.

2.8.2.5 Svarsrutiner och tolkning

Positivt, negativt.

2.8.2.6 Referenser

1. Avni et al. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol. 2011 Feb;49(2):665-70.
2. Léon et al. Contribution of *Candida* biomarkers and DNA detection for the diagnosis of invasive candidiasis in ICU patients with severe abdominal conditions. Critical Care. 2016; 20: 149.
3. Nieto et al. Polymerase Chain Reaction Versus Blood Culture to Detect Candida Species in High-Risk Patients with Suspected Invasive Candidiasis: The MICAFEM Study. Infect Dis Ther. 2019; 8: 429–4.
4. Clancy CJ, Nguyen MH. Rapid diagnosis of invasive candidiasis: ready for prime-time? Curr Opin Infect Dis. 2019;32:546-52.

2.8.3 DNA-sekvensering svamp (ITS)

2.8.3.1 Metod

Next Generation Sequencing (NGS) används för påvisande av svamp-DNA. Vid sekvensering utförs i ett första steg en PCR amplifiering av ITS-regionen inom den delen av svampgenomet som innehåller ribosomalt DNA. Eftersom denna region finns i genomet hos alla svamparter och dessutom har visat sig vara hypervariabel är den ett användbart verktyg för att detektera och särskilja olika svamparter. Vid PCR amplifieringen inkluderas adaptorsekvenser för efterkommande sekvensering. De erhållna sekvenserna mappas mot sekvenser i en referensdatabas för artidentifiering. NGS sekvensering har i jämförelse med klassisk Sangersekvenseringsteknik även fördelen att kunna hantera fynd av flera

olika svamparter i samma prov. Nackdelen är positiv amplifiering av de flesta svampsekvenser i provet, inklusive koloniserande svampflora och provkontaminanter, även i så kallade sterila prov.

2.8.3.2 Provmaterial

BAL (2-3 ml), cerebrospinalvätska (CSV) (2 ml), vävnad, biopsi, övrigt provmaterial (normalt sterila vätskor). Använd sterilt provrör/burk utan tillsats.

2.8.3.3 Prestanda

Sensitivitet och specificitet går inte att beräkna för sekvensering då resultatet skulle vara beroende av vilken svampart som förväntas påvisas i provet. Fördelen med sekvensering är att det möjliggör fynd av svårodlade arter. Metoden används också för framodlade isolat som inte kan artbestämmas med konventionella metoder.

2.8.3.4 Indikation för provtagning

Sekvensering bör övervägas vid misstanke om djup svampinfektion där annan svampdiagnostik är negativ alternativt direkt som ett komplement till annan svampdiagnostik vid invasiv provtagning hos patienter med hög risk för invasiv svampinfektion. Sådana situationer kan vara när BAL genomförs på grund av att annan svampdiagnostik varit negativ eller direkt, som ett komplement till annan svampdiagnostik, vid provtagning av sterila lokaler som biopsier och CSV.

2.8.3.5 Svarsrutiner och tolkning

Svarsrutin: Påvisad art alternativt Svamp-DNA har inte kunnat påvisas med sekvensering. Ofta medföljer det en svarskommentar om vad för sorts svamp det handlar om.

Den begränsade erfarenhet som finns i Sverige är att det är relativt vanligt med fynd av omgivningssvampar vid svampsekvensering av icke-sterila prover som BAL. Eventuella fynd måste därför värderas noggrant mot klinik och övrig diagnostik.

2.9 Pneumocystisdiagnostik

Luftvägsinfektioner med *Pneumocystis jirovecii* (Pj) börjar alltid med kolonisering av lungalveolerna och vid rätt förutsättningar, främst i form av att individens immunstatus är nedsatt, kan Pj växa till och orsaka pneumocystis-pneumoni, PCP (1). Diagnostiken i Sverige utförs huvudsakligen med realtids-PCR (qPCR).

2.9.1 Immunofluorescens (IF)

2.9.1.1 Metod

Immunfluorescensfärgning, IF, utförs genom mikroskopisk påvisning med fluorescenskonjugerade monoklonala antikroppar mot Pj ascus (cysta) och ascosporeer (trofiska former). Metodens prestanda är avhängig påvisning av svampstrukturer med karakteristisk morfologi och kräver erfaren mikroskopist och tillgång till positiva kontroller. IF är den diagnostiska "gold standard" för att verifiera PCP där positiv IF tolkas som en säkerställd PCP men metodens otillfredsställande kliniska känslighet samt svårighet att upprätthålla mikroskoperingskompetens hos laboratoriepersonalen har lett till att den endast finns att tillgå på Folkhälsomyndigheten i Stockholm.

2.9.1.2 Provmaterial

BAL, inducerat sputum, sputum, lungbiopsi, serum

Infektion med Pj uppvisar en naturlig gradient där den högsta svampbördan förekommer i lungalveolerna med minskande antal organismer högre upp i luftvägsträdet (2). Det mest representativa provmaterialet är således bronskölvätska (BAL) följt av inducerat sputumprov och i sista hand vanlig sputum. Luftvägsprov från övre luftvägar, munskölvätska och nasofarynxaspirat innehåller vanligtvis lägre mängder av morfologiskt igenkännliga pneumocystis-strukturer varför analys med IF inte rekommenderas.

2.9.1.3 Prestanda

IF-metoden uppvisar en hög klinisk specificitet för PCP men den rapporterade kliniska sensitiviteten kan variera mellan ca 50-70% beroende på metod och typ av studie (3, 4).

2.9.1.4 Indikation för provtagning

Lunginfiltrat hos immunsupprimerade patienter.

2.9.1.5 Svarsrutin och tolkning

Positiv IF eller negativ IF.

Positivt IF-svar verifierar PCP. Negativt IF-svar ska alltid kompletteras med ett qPCR resultat eftersom PCP ej kan uteslutas.

2.9.2 Realtids-PCR (qPCR).

2.9.2.1 Metod

Till skillnad från IF - som är en kvalitativ analys – är qPCR en semikvantitativ diagnostik vilket, åtminstone teoretiskt, skulle kunna ge en möjlighet att skilja mellan kolonisering och kliniskt signifikant infektion. I praktiken finns det dock olika många variabler som försvårar bedömningen såsom typ och mängd av provmaterial, om provet är representativt för de nedre luftvägarna, om behandling har hunnit sättas in samt patientens bakgrundssjukdom. Som för IF är det mest representativa provmaterialet BAL följt av inducerat sputum prov och sputum, men Pj kan även påvisas med qPCR i prov från övre luftvägar som till exempel nasofarynxaspirat och munskölvätska (5, 6).

Pj DNA påvisas genom amplifiering av *Pneumocystis*-specifika målsekvenser, antingen från "singel copy" gener (till exempel beta-tubulin eller di-hydropteroatsyntas genen (DHPS)) eller från "multiple copy" gener (till exempel den stora subenheten av mitokondriellt ribosomalt RNA (LSU mt rRNA) eller gensekvenser för det större ytglykoproteinet, (MSG)). I svenska laboratorier används oftast målsekvensen LSU mt rRNA. Metoder som baseras på detektion av "multiple copy" gener har en teoretiskt högre känslighet än de baserade på "singel copy" gener (7). Kvantifiering av målsekvensen, uttryckt i antal kopior per mL provmaterial alt. reaktionsvolym kan göras genom användning av en standardkurva i form av en spädningsserie av målsekvensen (8). Som ett grövre kvantifieringsmått kan cykeltröskelvärde (CT-värde) användas. För att kunna tolka semikvantitativa resultat måste laboratoriet utföra en validering av sin metod där qPCR-resultat (antal genkopior/ml eller CT-värde) jämförs med IF-resultat och korreleras med patienternas kliniska bild avseende Pj infektion i en

representativ samling kliniska prov. Anledningen till behovet av lokal validering är att kvantifieringen är avhängig av lokala variabler i utförandet såsom effektiviteten av extraktionen eller i PCR.

2.9.2.2 Provmaterial

BAL, inducerat sputum eller vanligt sputum (2). Gällande övriga provmaterial från de nedre luftvägarna (till exempel trakealsekret) finns inte lika många publicerade studier men man kan naturligtvis analysera även dessa med qPCR även om tolkningen av det negativa resultatet kommer att vara mer oviss. Lungbiopsimaterial är ett representativt prov men används oftast inte pre-mortem. Prov från skyddad borste har tidigare rapporterats som mindre representativt än andra provmaterial från nedre luftvägarna och brukar inte rekommenderas (9).

Övre luftvägsprover, som till exempel nasofarynxaspirat och munsköljvätska, rekommenderas enbart om djupare prover som BAL och/eller sputum inte kan erhållas (5, 6). Fynd av DNA i dessa provmaterial tyder på förekomst av högre svampmängder i de nedre luftvägarna men signifikansen är oftast svårvärderad.

I en svensk retrospektiv studie från Göteborg på patienter med HIV kunde Pj DNA påvisas i serumprov från 26/26 patienter med Pneumocystis pneumonia (10). Serum kan därmed vara ett accepterat provmaterial vid klinisk misstanke om PCP hos patienter med HIV. På grund av begränsad dokumentation får provresultat dock tolkas med försiktighet.

2.9.2.3 Prestanda

Väl validerade qPCR-metoder har en analytisk känslighet och specificitet nära 100%. Den kliniska känsligheten och negativa prediktiva värdet är höga i BAL och inducerat sputum men lägre för mindre invasiva provmaterial (11).

Det undersökta materialet utgörs av koncentrerat cellsediment. Förutom provtagningslokal kan även andra faktorer som till exempel spädning, homogenitet och provvolym påverka utbytespotentialen. Utöver inhibitionskontroll i qPCR används i vissa studier humana gensekvenser som kontroll för förekomst av humancellinnehållet i prov med misstänkt tveksam representativitet. Det är dock inte lätt att kunna skilja mellan nedre och övre luftvägscellsinnehåll med endast DNA-baserade humana cellmarkörer.

2.9.2.4 Indikation för provtagning

Lunginfiltrat hos immunsupprimerade patienter.

2.9.2.5 Svarsrutiner och tolkning

Positivt eller negativt fynd av Pj DNA.

En del laboratorier i Sverige har valt att ange qPCR-resultaten som kvalitativa svar medan andra har valt att ange ett semikvantitativt svar. Ett semikvantitativt svar anges vanligtvis i en tregradigskala (høgt/starkt, intermediärt, lågt/svagt). Tillgång till kommersiella metoder med kvantifieringspotential finns numera.

I publicerade studier finns det en - oavsett typ av provmaterial - bra korrelation mellan en stark klinisk misstanke och radiologisk bild förenlig med PCP, positiv IF och fynd av ett lågt CT-värde vid

qPCR (4, 11-13). Ett högt/starkt positivt resultat, det vill säga lågt CT-värde, bedöms därför vanligen som kliniskt relevant och därmed diagnostiskt för PCP.

I andra ändan av skalan gör qPCRs höga sensitivitet att ett negativt prov i BAL i princip utesluter PCP medan ett negativt prov i representativt sputum talar starkt emot.

Osäkerheten av huruvida det föreligger infektion eller bara kolonisering ligger främst vid intermediära och svagt positiva qPCR resultat. Här måste många faktorer vägas vid tolkningen såsom typ, mängd och kvalitet av det analyserade provmaterialet, patientens kliniska bild och riskfaktorer samt resultatet av andra laboratorie- och kliniska undersökningar. Det är således svårt att fastställa exakta brytpunkter för bedömning av klinisk relevans vid intermediära och svagt positiva resultat av qPCR-analyser.

2.9.3 Referenser

1. Alanio, A. et al. Pneumocystis jirovecii detection in asymptomatic patients: what does its natural history tells us? F1000Res. 2017; 6:739.
2. Alanio A. et al. ECIL guidelines for the diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. J Antimicrob Chemother 2016; 71: 2386-2396.
3. Moodley et al. Comparison of quantitative real-time PCR and direct immunofluorescence for the detection of Pneumocystis jirovecii. PLoS One. 2017;12: 603-607.
4. Unnewehr M. et al. High Diagnostic Value of a New Real-Time Pneumocystis PCR from Bronchoalveolar Lavage in a Real-Life Clinical Setting. Respiration 2016; 92:144-149
5. Guigue, N. et al. Utility of adding Pneumocystis jirovecii DNA detection in nasopharyngeal aspirates in immunocompromised adult patients with febrile pneumonia. Med Mycology 2015; 53:241-247.
6. Gotterris, L. et al. Molecular diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia using oral wash samples in immunocompromised patients: usefulness and importance of the DNA target. J Clin Microbiol 2019; doi:10.1128/JCM.01287-19.
7. Valero, C et al. Copy-Number Variation of Mitochondrial DNA-Genes in Pneumocystis jirovecii According to the Fungal Load in BAL Specimens. Frontiers in Microbiology 2016, 7, article 1413.
8. Linssen CFM. et al. Inter-laboratory comparison of three different real-time PCR assays for the detection of Pneumocystis jirovecii in bronchoalveolar lavage fluid samples. J Med Microbiol. 2006 Sep;55(Pt 9):1229-35.
9. Metersky ML. et al. Lack of Utility of Bronchial Brush Biopsy in Patients Infected with the Human Immunodeficiency Virus. Chest 1992; 101:680-683
10. Hammarström et al. Serum-based diagnosis of Pneumocystis pneumonia by detection of Pneumocystis jirovecii DNA and 1,3-β-D-glucan in HIV-infected patients: a retrospective case control study. BMC Infect Dis 2019;19:658
11. Alanio, A. et al. Real-time assay-based strategy for differentiation between active Pneumocystis jirovecii pneumonia and colonization in immunocompromised patients. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 1531-1537.
12. Fauchier, T. et al. Detection of Pneumocystis jirovecii by Quantitative PCR To Differentiate Colonization and Pneumonia in Immunocompromised HIV -Positive and HIV-Negative patients. J Clin Microbiol 2016; 54: 1487-1495.

13. Filaux, J. et al. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. J Microbiol Methods. 2008; 75: 258-261.

3 Provtagning/diagnostik på IVA och efter kirurgi

Candidainfektioner är den vanligaste invasiva svampinfektionen hos patienter inom intensivvården eller som nyligen opererats. Under senare år har en ökad förekomst av mögelsvampinfektioner, främst orsakade av *Aspergillus*, noterats hos patienter utanför de traditionella riskgrupperna, vanligen definierade som hematologpatienter med neutropeni eller nedsatt T-cellsfunktion och patienter som genomgått organtransplantation och som på grund av rejektionsproblematik står på kraftig immunsuppression.

Den viktigaste riskfaktorn för invasiv candidainfektion är genomgången kirurgi, särskilt bukkirurgi. Andra viktiga riskfaktorer är allvarlighetsgrad och omfattning av trauma- eller sepsisinducerad organdysfunktion samt kolonisationsgrad (1). Pankreatit, diabetes, dialys, centrala infarter samt steroid- och antibiotikabehandling har också visats vara associerade med ökad risk.

Främsta riskfaktorer för mögelsvampinfektioner är neutropeni och nedsatt T-cellsfunktion och inte sällan vårdas patienter med hematologisk sjukdom eller som genomgått organtransplantation på intensivvårdsavdelning. Utöver dessa högriskgrupper kan kliniskt relevanta aspergillusinfektioner ses hos intensivvårdspatienter med kronisk obstruktiv lungsjukdom, levercirrhos, steroidbehandling, diabetes, njursvikt, influensa, Covid-19 eller den immunsuppression som man ibland ser hos patienter med långvarig IVA-vård (2,3).

3.1 Screening/övervakning

Screening av patientgrupper utan misstänkta symtom för invasiv svampsjukdom, som inom hematologin, är inte aktuell inom intensivvården. Övervakning med beta-D-glukan av högriskgrupper som patienter med komplikationer efter bukkirurgi, återkommande tarmläckage eller nekrotiserande pankreatit har visserligen föreslagits (4) men underlaget är bräckligt och detta kan inte rekommenderas.

3.2 Diagnostik av invasiva candidainfektioner

Symtombilden vid candidemi är ofta ospecifik och består av feber med eller utan sepsisinducerad organpåverkan. Sekundärt till candidemin kan svampen slå sig ned i andra organ som öga, lunga, njurar, skelett, leder, hjärtklaffar och kärlproteser. *Candida* kan också orsaka en lokalt invasiv infektion i samtliga organ, vanligast i buk eller pleura, med utveckling av abscess/empyem, eventuellt med sekundär candidemi som följd. Den kliniska bilden vid dessa lokalt invasiva infektioner skiljer sig inte från den som orsakas av bakterier.

Misstanke om invasiv candidainfektion föreligger vid klinisk bild hos patient med riskfaktorer.

3.2.1 Odling och mikroskopi

Vid misstänkt invasiv candidainfektion intar blododlingar en central plats. Mängden candidaorganismer i blodet är låg och ligger ofta i närheten av detektionsgränsen (5). Detta gör blododlingar känsliga för antimykotika, varför det är av synnerlig vikt att blododlingar tas innan behandling med antimykotika startar. Minst två blododlingar bör tas, en via central och en via perifer infart. Tidigare växt i den centralt tagna odlingen kan indikera en kateterassocierad candidemi, även

om detta inte studerats på samma sätt som för koagulasnegativa stafylokocker (KNS) och ingen dokumenterad tidsgräns har kunnat fastställas. I fall där svampinfektionen misstänks utgå från en intravaskulär kateter kan det vara av värde att odla på kateterspetsen om denna dras.

Vid lokalt invasiv infektion tas om möjligt odling via punktion för att undvika kontamination. Odling från kvarliggande drän är att betrakta som kolonisationsodling men positiv odling tagen inom 24 timmar efter att dränet lagts in indikerar infektion (6). Odlingar på punktat från sterila organ och peroperativa biopsier är viktiga och här kan även mikroskopering vara av stort värde. I en nyligen publicerad genomgång av candidadiagnostik hos intensivvårdpatienter betonas att relevanta odlingar utgör den viktigaste komponenten i den mykologiska diagnostiken (6).

Växt av *Candida* i bronkoalveolärt lavage (BAL), annat luftvägssekret, sår och kateterurin är att betrakta som kolonisation men kolonisationsgraden utgör en riskfaktor för invasiv svampsjukdom. Kolonisationsodlingar för *Candida* kan hos högriskpatienter vara av visst värde då negativa odlingar innebär en lägre sannolikhet att en patient med oklara infektionssymptom har en invasiv svampinfektion (7).

3.2.2 Beta-D-glukan

Den relativt låga sensitiviteten hos odlingar vid candidemi gör att icke-odlingsbaserade tester är av stort värde, särskilt om de är kvantitativa. Beta-D-glukan (BDG) är ett sådant test och har utvärderats i ett stort antal studier med varierande resultat. Metaanalyser visar en sensitivitet på 65–85% och specificitet på 75–85% (8-10). Candidemier orsakade av *C. albicans* har högre BDG-värden, vilket leder till högre sensitivitet, medan candidemier orsakade av *C. parapsilosis* har lägre BDG-värden än de som orsakas av andra candidaarter (11). BDG-nivåer är även associerade till patientens svampbörda och i reglens högre nivåer hos patienter med candidemi och infektionsnedslag (12,13) än hos patienter med enstaka positiv blododling utan nedslag (14). Hos IVA-patienter med hög risk för invasiv candidainfektion är risken för falskt positiva resultat större, vilket leder till att specificiteten ligger i den lägre delen av metaanalysernas intervall (15,16). Falskt positiva reaktioner kan orsakas av bukdukar samt plasmaprodukter som albumin, koagulationsfaktorer och immunglobuliner (17,18). Hos IVA patienter tyder resultaten på att kolonisationsgraden också spelar en väsentlig roll (15). Viktigt att också tänka på att förhöjda halter av BDG kan orsakas av andra BDG-innehållande svampar som t ex *Aspergillus*.

Vid invasiv svampinfektion ses normalt konsekutivt förhöjda BDG-koncentrationer, initialt med successivt ökande nivåer. Kraftigt förhöjda BDG-koncentrationer talar starkt för invasiv svampinfektion. Det negativa prediktiva värdet av negativa BDG-resultat är högt, särskilt i situationer med låg eller måttlig risk (4). Observationsstudier på IVA pekar mot att en biomarkörbaserad algoritm där BDG ingår troligen kan användas som guidning till utsättning av empirisk behandling (19–22). I en prospektiv studie på IVA där ca 100 patienter med empirisk svampbehandling pga misstänkt invasiv candidainfektion randomiserades till antingen biomarkörbaserad övervakning, inkluderande BDG och mannan/anti-mannan, eller ordinarie klinisk rutin, fann man att svampbehandling kunde sättas ut tidigare i gruppen som övervakades med biomarkörer utan negativ påverkan på det kliniska utfallet (23). Studien var dock liten och internationella guidelines har inväntat större prospektiva och randomiserade studier innan en biomarkör-baserad strategi för empirisk svampbehandling kan överföras till klinisk praxis (7,24,25). I en studie som publicerades 2022 tog man två prov med 24 timmars mellanrum på patienter med nydebuterad sepsis och riskfaktorer för svampinfektion i form av antingen nyligen genomgången bukkirurgi, parenteral

nutrition, antibiotikabehandling eller dialys (26). BDG-analyserna besvarades inom 24 timmar och om endera var positiv insattes svampbehandling. BDG-gruppen jämfördes med en grupp där odlingssvar inväntades innan behandling. Totalt inkluderades 339 patienter och invasiv candidainfektion konstaterades i 14%. BDG-gruppen erhöll signifikant mer antimykotika utan positiv effekt på 28-dagarsmortaliteten.

3.2.3 Övriga metoder

3.2.3.1 PCR

PCR-metodik för påvisning av svamp kan vara av värde (som ett komplement till odling) vid provtagning av vävnad hos patienter med misstänkt lokalt invasiv infektion. Känsligheten för PCR verkar vara ungefär densamma som för odling men resultatet påverkas inte i samma grad av insatt antimykotikabehandling. PCR-analys i blod tillför troligen inte så mycket i denna patientgrupp då många av metoderna visar på sjunkande specificitet hos koloniserade patienter (15, 27, 28).

3.2.3.2 Antigen-antikroppsanalys

Olika analyser av candidaantigen och antikroppar var för sig eller i kombination har studerats i ett antal studier med varierande resultat. I Sverige finns i dagsläget metoden inte uppsatt för rutinbruk.

3.3 Diagnostik av aspergillusinfektioner

Infektioner med *Aspergillus* hos intensivvårdspatienter är nästan alltid lokaliserad till lungan men kan någon gång förekomma på andra lokalisationer som i buken, CNS, endovaskulärt, sinus och hud (30). Diagnostiken vid aspergillusinfektioner försvåras av problemen med att skilja kolonisation från infektion och att den kliniska bilden hos patienter utanför patientgrupperna med hematologisk sjukdom eller som genomgått organtransplantation oftast saknar de aspergillustypiska radiologiska förändringarna. Kavernbildning och "air crescent sign" kan ses i en mindre del av fallen medan halofenomenet inte är att räkna med hos icke-neutropena patienter. I de flesta fall är den kliniska bilden okaraktäristisk. Definitionen av aspergillusinfektion som gäller för kraftigt immunsupprimerade (31) är i de flesta fall inte tillämplig på intensivvårdspatienter då inte samma värdfaktorer kan användas. Inom intensivvården har särskilt kronisk obstruktiv lungsjukdom, levercirrhos, influensa, Covid-19 och HIV med CD4-celler <200/mm³ kommit att betraktas som viktiga värdfaktorer (6).

Misstanke om aspergillusinfektion föreligger hos intensivvårdspatienter med aspergillustypiska radiologiska förändringar eller nekrotiska infektioner men bör också misstänkas hos patienter med riskfaktorer och en infektion som inte synes orsakas av bakterier.

3.3.1 Odling och mikroskopi

Prov för odling och mikroskopi utgör grundpelare vid diagnostik av aspergillusinfektion och bör alltid tas vid misstanke om en sådan. Påvisande av *Aspergillus* i prov från sterila lokaler är diagnostiskt medan fynd från luftvägssekret och andra icke-sterila lokaler är mer svårtolkade. Växt av *Aspergillus* i BAL-vätska tillsammans med fynd av hyfer i mikroskopin talar för att det också föreligger

en djupare infektion jämfört med enbart positiv odling (32), vilket även validerats i en prospektiv multicenterstudie (33). Negativ odling och mikroskopi från luftvägssekret utesluter inte aspergillusinfektion.

3.3.2 Galaktomannan/aspergillusantigen

Sensitiviteten för galaktomannan (GM)-testen i serum är lägre hos intensivvårdspatienter och organtransplanterade än hos neutropena patienter (34–36). Hos patienter med influensa-associerad pulmonell aspergillos (IAPA) har dock sensitivitet på upp till 69% (GM index >0,5) rapporterats (37) medan sensitiviteten vid Covid-associerad pulmonell aspergillos (CAPA) har visats vara endast 5% med samma cut-off (38). Orsaken till denna skillnad har förklarats med att man vid IAPA får en djupare infektion med mer angioinvasivitet. GM-test i BAL har hos icke-neutropena patienter har en liknande sensitivitet och specificitet som hos neutropena, eventuellt på grund av att neutrofila granulocyter inte har samma möjlighet att eliminera frisatt galaktomannan (GM) i lungan som i blodet (36). Analys av GM i BAL-vätska har visats ha ett bra tilläggsvärde till odling och mikroskopi (39).

3.3.3 Beta-D-glukan

BDG stiger vid aspergillusinfektioner och kan vara ett komplement till diagnostiken (6, 32) men specifika studier som utvärderar BDG nivåer vid aspergillusinfektioner hos olika icke-neutropena intensivvårdspatienter saknas. Även om förhöjda värden i denna patientgrupp orsakas av många olika skäl (se ovan under candidainfektioner) kan analys av BDG i enskilda fall vara av värde även vid misstänkt aspergillos.

3.3.4 Övriga metoder

3.3.4.1 PCR

Studier som värderar aspergillus-PCR i blod hos intensivvårdspatienter är få men indikerar ett möjligt tilläggsvärde (40).

3.3.4.2 Antikroppsanalys

Bestämning av precipiterande antikroppar kan vara av värde vid aspergillom och vissa former av kronisk aspergillos men saknar värde vid de aspergillusinfektioner som förekommer hos intensivvårdspatienter.

3.4 Uppföljning av behandling

Vid candidemier bestäms behandlingstidens längd i första hand efter tidpunkten för första negativa odling, varför uppföljande blododlingar initialt minst varannan dag rekommenderas. I övriga fall följs kliniken och mykologisk uppföljning är sällan aktuell. I utvalda komplicerade fall kan uppföljning med

BDG vara tänkbart men nivåerna efter insatt behandling sjunker endast långsamt (41), varför BDG i detta sammanhang inte kan betraktas som någon snabb markör.

3.5 Referenser

1. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med*. 2015;373:1445-56.
2. Meersseman W, et al. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clin Infect Dis*. 2007;45:205-16.
3. Koehler P, et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. *Lancet Infect Dis*. 2021;21:e149-e162.
4. Lamoth F, et al. Assessment of the Role of 1,3- β -D-Glucan Testing for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections in Adults. *Clin Infect Dis*. 2021;72(Suppl 2):S102-8.
5. Pfeiffer CD, et al. Quantitation of *Candida* CFU in initial positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2879-83.
6. Bassetti M, et al. Invasive Fungal Diseases in Adult Patients in Intensive Care Unit (FUNDICU): 2024 consensus definitions from ESGCIP, EFISG, ESICM, ECMM, MSGERC, ISAC, and ISHAM. *Intensive Care Med*. 2024;50:502-15.
7. Martin-Loeches I, et al. ESICM/ESCMID task force on practical management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2019;45:789-805.
8. Karageorgopoulos DE, et al. Beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2011;52:750 –70.
9. Onishi A, et al. Diagnostic accuracy of serum 1,3-beta-D-glucan for pneumocystis jiroveci pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and metaanalysis. *J Clin Microbiol* 2012;50:7–15.
10. Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing Invasive Candidiasis. *J Clin Microbiol*. 2018;56:e01909-17.
11. Mikulska M, et al. Lower sensitivity of serum (1,3)- β -D-glucan for the diagnosis of candidaemia due to *Candida parapsilosis*. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:646.e5-8.
12. Oldberg K, Stenmark J, Hammarström H. β -D-Glucan Testing in Candidemia: Determinants of Positivity and Association With Mortality. *Mycoses*. 2025;68(5):e70067.
13. Träger J, Dräger S, Mihai S, et al. Detailed β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan and mannan antigen kinetics in patients with candidemia. *J Clin Microbiol*. 2023;61(11):e0059823.
14. Agnelli C, Bouza E, Del Carmen Martínez-Jiménez M, et al. Clinical Relevance and Prognostic Value of Persistently Negative (1,3)- β -D-Glucan in Adults With Candidemia: A 5-year Experience in a Tertiary Hospital. *Clin Infect Dis*. 2020;70(9):1925-1932.
15. León C, et al. Contribution of *Candida* biomarkers and DNA detection for the diagnosis of invasive candidiasis in ICU patients with severe abdominal conditions. *Crit Care*. 2016;20:149.
16. Persat F, et al. Contribution of the (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1009-13.
17. Cuenca-Estrella M, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18 (Suppl 7):9-18.
18. 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;56:1284-92.

19. Nucci M, et al. Discontinuation of empirical antifungal therapy in ICU patients using 1,3-beta-d-glucan. *Antimicrob Chemother*. 2016;71:2628-33.
20. Prattes J, et al. Serum 1,3-beta-d-glucan for antifungal treatment stratification at the intensive care unit and the influence of surgery. *Mycoses*. 2014;57:679-86.
21. Martínez-Jiménez MC, et al. Combination of Candida biomarkers in patients receiving empirical antifungal therapy in a Spanish tertiary hospital: a potential role in reducing the duration of treatment. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:3107-15.
22. Posteraro B, et al. (1,3)- β -D-Glucan-based antifungal treatment in critically ill adults at high risk of candidaemia: an observational study. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71:2262-9.
23. Rouzé A, et al. Biomarker-based strategy for early discontinuation of empirical antifungal treatment in critically ill patients: a randomized controlled trial. *Intensive Care Med*. 2017;43:1668-77.
24. Bassetti M, et al. Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2017;43:1225-38.
25. Pappas PG, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;62:e1-50.
26. Bloos F, et al. (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Glucan-guided antifungal therapy in adults with sepsis: the CandiSep randomized clinical trial. *Intensive Care Med*. 2022 Jun 16. Online ahead of print.
27. Nguyen MH, et al. Performance of Candida real-time polymerase chain reaction, β -D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2012;54:1240-8.
28. Clancy CJ, et al. Detecting Infections Rapidly and Easily for Candidemia Trial, Part 2 (DIRECT2): A Prospective, Multicenter Study of the T2Candida Panel. *Clin Infect Dis*. 2018;66:1678-86.
29. Steuber TD, et al. Comparison of blood cultures versus T2 Candida Panel in management of candidemia at a large community hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021;40:997-1001
30. Taccone FS, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Crit Care*. 2015;19:7.
31. Donnelly JP 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;71:1367-76.
32. Vandewoude KH, et al. Clinical relevance of Aspergillus isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. *Crit Care*. 2006;10:R31
33. Blot SI, et al. A clinical algorithm to diagnose Invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:56-64.
34. Kwak EJ, et al. Efficacy of galactomannan antigen in the Platelia Aspergillus enzyme immunoassay for diagnosis of invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2004;42:435-8.
35. Husain S, et al. Prospective assessment of Platelia Aspergillus galactomannan antigen for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Am J Transplant* 2004;4:796-802.
36. Meersseman W, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:27-34.
37. Schauwvlieghe AFAD, et al. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2018;6:782-92.

38. Bartoletti M, et al. Epidemiology of Invasive Pulmonary Aspergillosis Among Intubated Patients With COVID-19: A Prospective Study. Clin Infect Dis. 2021;73:e3606-e3614
39. Schroeder M, et al. Does galactomannan testing increase diagnostic accuracy for IPA in the ICU? A prospective observational study. Crit Care. 2016;20:139.
40. Steinmann J, et al. Detection of *Aspergillus fumigatus* in blood samples from critically ill patients in intensive care units by use of the SeptiFast assay. J Clin Microbiol 2016;54:918-21.
41. Koo S, et al. Post-diagnostic kinetics of the (1 → 3)-β-D-glucan assay in invasive aspergillosis, invasive candidiasis and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Clin Microbiol Infect. 2012;18:E122-7.

4 Provtagning på hematologen

Patienter som behandlas för hematologiska maligniteter löper en ökad risk för att drabbas av invasiva svampinfektioner (IFD, Invasive Fungal Disease). Risken varierar markant beroende på grunddiagnos och typ av behandling. För hela hematologipopulationen är risken att drabbas av en IFD i olika studier cirka 1–2% att jämföra med patienter som får induktionsbehandling med intensivcytostatika för behandling av akut leukemi där risken är 7–10 %. Frekvensen är betydligt lägre när det gäller enbart invasiv Candida (0,1% respektive 1%) (1–2). IFD är fortfarande förknippade med hög morbiditet och mortalitet och leder inte sällan till fördröjd behandling av grundsjukdomen. Olika strategier med antimykotika används idag för att förebygga och/eller behandla IFD. Dessa kan variera mellan primär profylax, sekundär profylax, empirisk behandling, pre-emptiv behandling eller behandling enbart vid påvisad infektion. Val av strategi beror på patientpopulation, riskfaktorer och lokala epidemiologiska data. De vanligaste infektionerna är mögelsvampsorsakad pneumoni och/eller sinuit. Andra manifestationer såsom spridning av mögelsvampsinfektion till CNS är inte ovanligt. Candidemi och hepato-splenisk Candida förekommer men är betydligt mindre vanliga. För adekvat handläggning av IFD hos patienter med hematologiska maligniteter är tidig utredning och diagnostik av avgörande betydelse eftersom infektionen snabbt kan progrediera och resultera i permanenta och/eller livshotande komplikationer. Det är oftast svårt att ställa en definitiv diagnos av IFD och ofta får man göra en sammanvägning av ett flertal faktorer som den kliniska bilden, riskfaktorer för IFD, radiologisk diagnostik (framför allt datortomografi av bihålor, thorax och buk) och mikrobiologiska analyser (direktmikroskopi, odlingar, antigen test och DNA-analyser). De vanligaste kliniska tillstånden där utredning av IFD påbörjas är ihållande neutropen feber, progress eller utebliven förbättring av pneumoni eller sinuit under adekvat antibakteriell behandling, samt lunginfiltrat eller andra röntgenfynd med utseende som ger misstanke för svampinfektion. Utredning av IFD är också ofta aktuellt för patienter som planeras för allogen stamcellstransplantation och som bedöms vara högrisk för IFD eller tidigare haft IFD. Valet av mikrobiologiska analyser beror på målet med utredningen, dvs screening, utredning av misstänkt infektion eller uppföljning av konstaterad infektion.

4.1 Screening/övervakning

Till skillnad från många centra i Europa är screening av högriskpatienter med biomarkörer ovanligt i Sverige, sannolikt på grund av en kombination av relativt låg aspergillusincidens och användning av profylax till högrisk-patienter. Det saknas dock större prospektiva studier av incidensen av aspergillusinfektion hos hematologiska patienter i Sverige och retrospektiva sådana har gett blandade resultat. De biomarkörer som oftast har använts är galaktomannan (GM) och betaglukan (BDG). Aspergillus PCR har också använts i en del studier.

4.1.1 Galaktomannan (GM)

Screening med GM i serum kan användas som en strategi för tidig identifiering av aspergillusinfektion hos högriskpatienter. Tanken är att identifiera aspergillusinfektionen i ett tidigt skede, helst redan innan symtom har utvecklats, och därmed kunna sätta in behandling tidigt och så sätt minska mortalitet och morbiditet. I de större studier som har publicerats med detta förfarande har GM i serum tagits 2-3 gånger i veckan. Blir GM positivt, i form av ett värde $>0,7$ eller två $>0,5$, görs en

datortomografi (DT) av thorax. Visar denna infiltrat görs en diagnostisk bronkoalveolärt lavage (BAL) varefter behandling påbörjas. Är DT thorax negativ fortsätter screeningen med GM och om resultatet är/blir positiv igen så börjar processen om med en ny DT thorax. Detta koncept introducerades mer brett i en studie 2005 där man fann att GM screening 3 ggr/vecka minskade empirisk svampbehandling utan att några aspergillusinfektioner missades (3). I en randomiserad studie med högrisk pediatrika neutropena patienter såg man att sådan pre-emptiv behandling baserad på röntgen och antigendiagnostik var minst lika effektiv som empirisk behandling och ledde samtidigt till betydligt mindre användning av antimykotika. I en stor europeisk randomiserad studie av vuxna högriskpatienter publicerad i juli 2022, fann man att pre-emptiv behandling ledde till signifikant mindre användning av antimykotika än empirisk behandling utan påverkan på vare sig överlevnad eller incidens av invasiva svampinfektioner (4). GM-screening är främst testad under neutropeniperioderna för patienter som genomgår remissionssyftande behandling av akuta leukemier och som inte får mögelaktiv profylax. Om mögelaktiv profylax används så ger screening med GM mycket låg sensitivitet och positivt prediktivt värde (0-12%) på grund av låg pre-test sannolikhet, dvs en låg incidens av aspergillusinfektion. Detsamma gäller i andra situationer med liknande låg incidens vilket gör att screening med GM i praktiken endast är aktuellt vid förväntad neutropeni >7–10 dagar i frånvaro av mögelaktiv profylax.

4.1.2 Beta-D-glukan

Studier som utvärderat BDG som screening markör för IFD på hematologen är heterogena och pre-test probabiliteten för IFD i den specifika gruppen som provtagits har varit avgörande för utfallet av prediktiva värden. Generellt visar dessa studier att det negativa prediktiva värdet när BDG användes som screening markör 1–3 ggr per vecka var >85% (5–7). Det positiva prediktiva värdet var 44–89% vid screening av hematologpatienter med antibiotikarefraktär neutropen feber eller klinisk misstanke på IFD, men endast 12–27% när screening utförts på symptomfria högriskpatienter (6,7), varför ett positivt BDG resultat vid denna typ av provtagningsförfarande är svårbedömt. I internationella konsensusdokument ges endast en svag rekommendation för användandet av BDG som screeningmarkör pga lågt positivt prediktivt värde för IFD i denna patientgrupp (7).

4.1.3 Aspergillus-PCR

Screening med Aspergillus PCR har främst studerats i kombination med GM och/eller BDG i observationella studier med varierande resultat.

4.1.4 Diagnostik av Candidainfektioner

Risken för invasiv candidainfektion hos hematologpatienter beror till största delen på val av profylaxstrategi. De flesta patienter i Sverige med hög risk för invasiv candidainfektion, såsom långvarig neutropeni eller allogen stamcellstransplantation, får systemisk candida-aktiv profylax, vanligen med flukonazol eller posakonazol, och har därmed generellt låg risk att drabbas av en infektion. Om flukonazol används kan infektioner med flukonazolresistenta arter som *C. glabrata* och *C. krusei* uppstå men är relativt ovanligt.

4.1.5 Odling

Precis som på IVA har blododlingar en viktig plats vid misstänkt invasiv candidainfektion hos hematologpatienter. Ofta står patienterna dock redan på någon form av antimykotika varför sensitiviteten för blododlingar riskerar att bli låg. Om behandling inte har getts är det viktigt att blododlingar tas innan behandling med antimykotika startar. Minst två blododlingar bör tas, en via central och en via perifer infart. Tidigare växt i den centralt tagna odlingen kan indikera en kateterassocierad candidemi även om detta inte studerats på samma sätt som för KNS och ingen dokumenterad tidsgräns har kunnat fastställas. Vid candidemier som uppstår under neutropeni är det dock vanligast att candidemin uppkommer via genomvandring av Candida från tarmen och inte representerar en CVK-infektion. Någon gång kan hepato-lienal Candida ses sekundärt till hematogen utsädd av Candida under neutropen fas. Diagnostiskt bör man i dessa fall försöka få till odling och mikroskopi (samt PCR) på biopsier. Växt av Candida i BAL eller annat luftvägssekret, sår eller kateterurin är att betrakta som kolonisation och det finns ingen entydig korrelation mellan kolonisationsgrad och risk för invasiv candidainfektion hos hematologpatienter.

4.1.6 Betaglukan

Diagnostiska studier med BDG hos patienter med hematologiska maligniteter kännetecknas av stora variationer i patientmaterial, studieupplägg, screeningstrategier och kriterier för definitionen av ett positivt prov. På grund av den stora heterogeniteten kunde en Cochrananalys, inkluderandes 47 studier, varav hälften inkluderade patienter med cancer och hematologiska maligniteter, inte komma fram till några slutsatser eller rekommendationer avseende provtagning med BDG (8). I en annan publicerad genomgång av samtliga studier och metaanalyser kunde man dock redovisa data som stödjer BDG:s plats i diagnostiken (9). BDG kan användas för påvisande av Aspergillus, Candida och några icke-aspergillus mögelsvampar såsom Fusarium, dock inte vid mukormykos eller cryptokockos. I internationella konsensusdokument anser man att BDG kan användas vid diagnostik av misstänkt IFD hos hematologiska riskpatienter i kombination med andra mikrobiologiska diagnostiska metoder och DT-undersökning, samt ingå som en del i en screeningstrategi hos riskpatienter utan svampprofylax (9, 10).

4.1.7 PCR

Candida PCR är främst aktuellt på prov från sterila lokaler som biopsier, punktat och CSV. Erfarenheter av PCR i blod/serum/plasma på denna patientgrupp är begränsad.

4.2 Diagnostik av aspergillusinfektion

4.2.1 Mikroskopi/odling

Prov för odling och mikroskopi utgör grundpelare vid diagnostik av invasiv mögelinfektion inkluderande aspergillusinfektion. Påvisande av Aspergillus spp i prov från sterila lokaler är diagnostiskt medan fynd från luftvägssekret och andra icke-sterila lokaler är mer svårtolkade. Växt av Aspergillus i BAL-vätska tillsammans med fynd av hyfer i mikroskopin talar starkt emot kontamination

och för att det föreligger en djupare infektion jämfört med enbart positiv odling (10). Negativ odling och mikroskopi från luftvägssekret utesluter inte aspergillusinfektion. Majoriteten av patienter med hematologiska maligniteter kan optimeras med transfusioner och korrigeringar av koagulationsrubbningar inför en invasiv utredning med till exempel BAL, nålaspirat eller biopsi. Det är viktigt att utredningen utförs i god tid innan patientens tillstånd försämras med till exempel respiratorisk insufficiens. För biopsitagning från lunga hos denna patientgrupp behöver man dock noga överväga risker med allvarliga komplikationer mot nyttan av diagnostiken.

4.2.2 Galaktomannan

4.2.2.1 Galaktomannan i serum

Sensitivitet för GM i serum hos immunsupprimerade patienter har visats ligga kring 82% och specificiteten kring 81% (vid cut-off värdeindex 0,5) (12). Sensitiviteten verkar dock bero på graden av neutropeni, där man funnit högre GM värden i serum vid aspergillos (bevisad eller sannolik) om neutropeni förelegat (12). Möjliga förklaringar inkluderar frånvaro av vita blodkroppar som gör att aspergillusinfektionen är svårare att avgränsa och växer angioinvasivt med mer GM frisättning till blodbanan samt minskad fagocytos av det GM som når blodbanan. GM i serum tas alltid vid utredning av misstänkt svampinfektion, vanligen långdragen neutropen feber och/eller oklara lunginfiltrat hos immunsupprimerade patienter. GM i serum kan fungera diagnostiskt hos neutropena symtomatiska patienter men sensitiviteten minskar påtagligt om mögelaktiv profylax har getts (14). Vid tolkningen av GM är det viktigt att tänka på att frisättning av GM vid invasiv aspergillusinfektion är en dynamisk process. En tydlig ökning av GM kan därmed peka mot tidig aspergillusinfektion även om det faktiska värdet ligger under eller marginellt över cut-off nivån (0,5 för serum). Enstaka höga värden (>3) och flera positiva värden oavsett nivå talar starkt för invasiv aspergillusinfektion, särskilt om faktorer som är kända att ge förhöjd GM-nivå i serum inte föreligger. Omvänt har enstaka, inte reproducerbara, värden strax över 0,5 tveksam signifikans. En icke-infektiös orsak till förhöjd nivå av GM i serum, och därmed orsak till "falskt positivt" prov, är translokation av GM genom tarmen in i blodet via GM i föda och näringsprodukter. Infektioner med *Fusarium* spp är ofta GM-positiva eftersom de också har GM i cellväggen. I enstaka fall kan *Penicillium* spp och *Histoplasma* spp ge upphov till korsreaktion. Tidigare var betalaktamantibiotika, främst piperacillin/tazobaktam, en viktig felkälla men detta verkar nu inte längre vara ett problem.

4.2.2.2 Galaktomannan i bronkoalveolärt lavage (BAL)

GM skall alltid tas när en diagnostik BAL genomförs på immunsupprimerade patienter, inklusive de med hematologiska sjukdomar. Sensitiviteten och specificitet för GM vid diagnostisk BAL hos patienter med hematologisk malignitet har visats vara god. I en metaanalys av 16 studier inkluderande 783 patienter fann man en hög sensitivitet på 92% men med relativt stort konfidensintervall (95% CI 48%–99%), och en mycket hög specificitet, 98% med relativt litet konfidensintervall (95% CI 78%–100%) för bevisad eller sannolik invasiv lungaspergillos (15). Det har gjorts många studier för att finna en optimal cut-off nivå hos hematologiska patienter och man har funnit att värden över 1,0 talar för infektion, att värden över 3 har högt positivt prediktivt värde och att värden under 0,5 har ett högt negativt prediktivt värde. Detta avspeglas i de nyligen uppdaterade internationella definitionerna där ett värde >1,0 i BAL (eller >0,8 om även positiv i plasma med ett

värde $>0,7$) definieras som signifikant (16). Det finns en osäkerhet kring betydelsen av värden mellan 0,5 och 1,0 och resultatet måste vägas mot andra viktiga faktorer såsom graden av immunsuppression (långvarig neutropeni och/eller uttalad T-cellssuppression), andra mykologiska fynd och den kliniska bilden (typiska DT-fynd, pågående mögelaktiv behandling, förekomst av annan möjlig förklaring). En viktig orsak till falskt negativa resultat har visats vara mögelaktiv behandling vid tidpunkten för BAL. I den kliniska vardagen är insättning av empirisk behandling i väntan på BAL ett vanligt scenario varför det är viktigt att komma ihåg att GM nivåerna sjunker signifikant redan efter två dygns behandling. En annan möjlig felkälla är variationer i spädningen av BAL-vätskan. Många studier är gjorda på BAL-vätska från så kallade "mini-BAL" eller "infektions-BAL" där endast mindre mängd vätska använts för sköljning. Om en mer konventionell BAL görs, där flera hundra milliliter vätska kan användas, finns det risk för utspädning av GM och "falskt" lågt värde. Vid perifera infiltrat eller om BAL görs i annan lob än den där infiltratet sitter så kan det också finnas risk för lågt GM. Falskt positiva resultat kan orsakas av korsreaktion med andra mögelsvampar, främst *Fusarium* spp. Hos patienter med hematologiska maligniteter är det oklart om kolonisation med *Aspergillus* kan ge upphov till positivt GM.

4.2.2.3 *Galaktomannan i cerebrospinalvätska (CSV)*

Värdet av GM analys i CSV är inte kartlagt i några välkontrollerade stora studier men provet anses ha mycket stort värde vid diagnos av cerebral aspergillusinfektion där GM i princip alltid är positivt. Samtidigt har man rapporterat att patienter med invasiva svampinfektioner som inte engagerar hjärnan nästan alltid har ett negativt CSV prov. Publicerade studier tyder således på en hög specificitet och sensitivitet varför analys av GM i CSV rekommenderas starkt vid utredning av misstänkt cerebral aspergillusinfektion (17).

4.2.3 *Betaglukan*

Det saknas specifika data avseende användbarheten av BDG för att diagnostisera invasiva aspergillusinfektioner hos hematologpatienter. BDG ingår inte idag i definitionen av invasiv svampinfektion men provet kan vara av värde vid utredning av hematologpatienter för diagnos av invasiv aspergillos, *Candida* och några icke-aspergillus mögelsvampar såsom *Fusarium*, dock inte vid mukormykos eller cryptokockos. Cochranegruppen reviderade nyligen 47 studier varav hälften inkluderade patienter med cancer och hematologiska maligniteter men kunde inte komma fram till några slutsatser eller rekommendationer på grund av för stor heterogenitet (8). I en nyligen publicerad genomgång av samtliga studier och metaanalyser kunde man redovisa robusta data som stödjer provets plats vid diagnostiken (9). I internationella konsensusdokument anser man att BDG bör användas vid diagnostik av misstänkt IFD hos hematologiska riskpatienter i kombination med andra mikrobiologiska diagnostiska metoder och DT-undersökning (18). Ett positivt prov motiverar dels omtagning för att öka det positiva prediktiva värdet, dels initiering av annan svamputredning. Provet har begränsad värde hos patienter som får intravenös immunoglobulinbehandling vilket ger falskt positiva BDG resultat.

4.2.4 PCR

Vid den senaste och största studiegenomgången som utfördes av Cochrane för att belysa metodens roll vid Aspergillus screening/diagnostik inkluderades 29 studier från år 2000–2018 (19). Majoriteten av inkluderade patienter i dessa studier var patienter behandlade för hematologiska maligniteter där median prevalensen av IFD var 11%. Sensitiviteten och specificiteten var 79 % och 80 % för ett prov, och 60 % och 95 % för två konsekutiva prov med positivt resultat. Författarna konkluderade att om man utreder 100 högriskpatienter med PCR (definierat som en prevalens på drygt 16%), kommer man att missa tre av 16 fall fall med Aspergillus samtidigt som kommer att behandla eller vidare utreda 17 patienter i onödan. Liksom antigen test, har PCR fördelen med en pålitlig negativ prediktivt värde dock med större variation beroende på metodik. I Sverige analyseras PCR för Aspergillus enbart på Karolinska.

4.3 Mögelsvampsinfektioner andra än aspergillus

De invasiva mögelsvampsinfektioner som är aktuella förutom Aspergillus är främst infektioner med Mucorales spp. och Fusarium spp. Exempel på kliniska situationer när en icke-aspergillusinfektion kan misstänkas är genombrott på aspergillusaktiv profylax (posakonazol, vorikonazol, echinocandiner), DT-thorax fynd av reversed (inversed) halo-sign, negativt BDG och GM i blod/plasma samt när aspergillusdiagnostiken är negativ i BAL trots mögelmisstänkta pulmonella röntgenförändringar.

4.3.1 Mikroskopi/odling

Det är ofta svårt att nå etiologisk diagnos för icke-aspergillus mögelsvampsinfektioner. Den mikrobiologiska diagnostiken bygger i första hand på mikroskopi och odling av luftvägsprover och/eller biopsier. Undantaget är Fusarium som även kan växa i blododling. Generellt är sensitivitet för odling relativt låg och speciellt infektioner med Mucorales kan bli negativ i odling även vid positiv mikroskopi. Bäst diagnostiskt utbyte brukar det bli vid biopsier, främst av invasiva infektioner i sinus orsakade av Mucorales. Vid mögelmisstänkta röntgenförändringar av lungorna skall alltid BAL utföras för mikroskopi och odling.

4.3.2 Sekvensering svamp (ITS)

Eftersom odling har låg känslighet rekommenderas att alla invasiva prover som biopsier och punktat skickas för svampsekvensering, samt att BAL skickas för sekvensering om icke-aspergillus infektion misstänks.

4.3.3 Pneumocystis

Risken för pneumocystispneumoni beror till största delen på graden av T-cellspåverkan. Störst risk har patienter med T-cells lymfom och efter allogen stamcellstransplantation. I allmänhet ges profylax när incidensen närmar sig 5%, och majoriteten av alla hematologpatienter med risk för pneumocystispneumoni får adekvat profylax. Genombrottsinfektion vid trimsulfaproylax är mycket ovanligt men förekommer vid profylax med pentamidininhalationer. Viktigt att tänka på är att

pneumocystispneumoni hos hematologpatienter kan förlöpa snabbt och mer likna en vanlig bakteriell infektion är den typiska långdragna infektionsbild som ses vid pneumocystispneumoni som hos HIV-och reumatologpatienter.

4.3.3.1 PCR och immunofluorescens

PCR och immunofluorescens PCR-svaret måste vägas mot provtagningsmaterialet (BAL>trachealsekret>sputum>munsölvätska) och tid efter eventuell insättning av behandling. Pneumocystis finns i störst mängd i lungalveolerna varför BAL är det bästa provet och negativ PCR i BAL utesluter i princip pneumocystispneumoni. Provtagning med immunofluorescens (IF) var en gång golden standard, där ett positivt resultat var liktydigt med pneumocystispneumoni, men IF görs nu bara på tre ställen i Sverige, Folkhälsomyndigheten och Norrlands Universitetssjukhus. PCR-metoden skiljer sig mellan laboratorerna i Sverige och några svarar bara ut positivt/negativt medan några rapporterar någon form av uppskattning av DNA-mängden. Anges ingen uppskattning av DNA-mängden går det inte att bedöma om det handlar om kolonisering eller infektion, svaret får då bedömas i relation till klinik, röntgenbild och BDG-nivå (se nedan). Några laboratorier svarar ut en semi-kvantitativ uppskattning av mängden DNA i provet. Vid en genomgång av provtagning på hematologiska patienter på Karolinska Universitetssjukhuset 2012-2017 var 87% av proverna med "hög mängd DNA" även positiva i IF och uppfyllde därmed definition för pneumocystispneumoni (Blennow, personlig kommunikation). Omvänt uppvisade patienter med låg mängd DNA sällan kliniska tecken på pneumocystispneumoni (88%). Däremot var intermediär mängd svårbedömt och kunde stå både för kolonisation och klinisk infektion. Ett annat frågetecken vid tolkning av PCR-svaren är hur insatt behandling eller profylax påverkar svaren. Gamla studier har visat att IF kan vara positivt länge efter insatt behandling men det finns inga data för hur länge PCR positivitet kvarstår.

4.3.3.2 Betaglukan

Studier på BDG för diagnostik av pneumocystispneumoni hos hematologpatienter visar generellt hög diagnostisk prestanda med sensitivitet på 90–92% och specificitet på 84–89%. I internationella rekommendationer från European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-5) rekommenderas BDG som kompletterande diagnostisk markör för pneumocystispneumoni och som metod för att utesluta PCP vid negativt resultat (bevisgradering A-II) (20).

4.4 Uppföljning av behandling

4.4.1 Galaktomannan

Galaktomannan (GM) har i studier förslagits som uppföljningsprov för att monitorera svar på given antimykotika eftersom koncentrationen förväntas minska vid minskad infektionsbörda. Patienter där GM nivåerna inte sjunker eller stiger efter någon veckas behandling har mycket dålig prognos. Samtidigt är rapporterade studieresultat inte enhetliga och sjunkande värden kan även ses vid sviktande behandling. I en studiegenomgång kunde man identifiera nio kliniska studier och en metaanalys (totalt ca 900 patienter studerade där majoriteten hade hematologiska sjukdom) där nytta av provet vid monitoreringen av behandlingssvar studerats. Gemensamt pekade dessa studier mot att stigande värden talar för terapivikt och är relaterad till hög mortalitet. Likadana resultat sågs

vid en annan genomgång av 21 publicerade studier år 2018. Denna inkluderade dock en mer heterogen patientpopulation med olika brytpunktsvärden på GM. ECIL gruppen rekommenderar en noggrann klinisk utvärdering av pågående behandling om GM stiger efter en veckas behandling eller om GM värdet är ≥ 2 i serum efter två veckors behandling. Samtidigt saknas robusta prospektiva interventionsstudier och någon tydlig brytpunkt/värde för behandlingssvikt finns inte. Kinetiken på GM värdet behöver tolkas försiktigt tillsammans med andra patient-faktorer som njurfunktion (GM utsöndras delvis via njurarna), neutrofilvärden (GM fagocyteras och elimineras delvis av neutrofila) och pågående läkemedel (en del läkemedel kan påverka upptag av GM via Kupffer-cellerna i levern). Därför kan inte beslut gällande fortsatt behandling med antimykotika baseras enbart på GM-värden. Monitorering av GM i serum efter insatt behandling rekommenderas inte rutinmässigt men kan vara av värde i bedömning av situationer där terapissvikt misstänks som en del av en helhetsbedömning (21–24).

4.4.2 Beta-D-glukan

Många studier har undersökt om BDG kan användas för att följa behandlingseffekten vid IFD, men resultaten är heterogena. I några observationsstudier där man följt BDG nivåer under behandlingsförloppet vid invasiv candidainfektion och andra IFD har man sett att en nedåtgående trend av BDG korrelerade med positivt behandlingssvar medan stigande BDG nivåer korrelerade med behandlingssvikt. Andra studier har inte kunnat visa någon korrelation mellan BDG nivåer och behandlingseffekt vid IFD (25). Några studier har specifikt undersökt BDG nivåer vid behandling av *Pneumocystis pneumonia* och här har man inte kunnat se någon korrelation till behandlingssvar (26). Flera studier visar på att BDG, trots sjunkande nivåer, kan kvarstå positivt långt efter klinisk utläkning av svampinfektionen (ibland flera månader).

4.5 Referenser

1. Gamaletsou et al. A prospective, cohort, multicentre study of candidaemia in hospitalized adult patients with haematological malignancies. *Clin Microb Infect.* 2014.
2. Cornely et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Eng J Med.* 2007.
3. Maertens J et al. 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.* 2015.
4. Maertens et al. Empiric versus pre-emptive antifungal strategy in high-risk neutropenic patients on fluconazole prophylaxis: a randomized trial of the European organization for Research and Treatment of cancer. *Clin Infect Dis.* 2022.
5. Hammarstrom et al. Prospective evaluation of a combination of fungal biomarkers for the diagnosis of invasive fungal disease in high-risk haematology patients. *Mycoses.* 2018.
6. Furfaro et al. Performance of serum (1,3)- β -d-glucan screening for the diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients with haematological malignancies. *Mycoses.* 2018.
7. Ullmann et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microb Infect.* 2018.

8. Sandra et al. (1→3)-β-D-glucan testing for the detection of invasive fungal infections in immunocompromised or critically ill people. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020.
9. Lamoth et al. Assessment of the Role of 1,3-β-d-Glucan Testing for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections in Adults. *Clin Infect Dis*. 2021.
10. Marchetti et al. 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*. 2012.
11. Vandewoude et al. Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. *Crit Care*. 2006.
12. Leeflang et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane*. 2015.
13. Cordonnier et al. Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis. *Clin Microb Infect*. 2009.
14. Durate et al. Serum galactomannan-based early detection of invasive aspergillosis in hematology patients receiving effective antimold prophylaxis. *Clin Infect Dis*. 2014.
15. Heng et al. Utility of bronchoalveolar lavage fluid galactomannan alone or in combination with PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in adult hematology patients: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2015.
16. Donnelly 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. *CID*. 2020.
17. Chong et al. Diagnostic Performance of Galactomannan Antigen Testing in Cerebrospinal Fluid. *J Clin Micro*. 2016.
18. Ullmann et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis*. 2019.'
19. Cruciani et al. Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people. *Cochrane*. 2019.
20. Alanio et al. ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemo*. 2016.
21. Sehgal et al. Monitoring treatment response in chronic pulmonary aspergillosis: role of clinical, spirometric and immunological markers. *Clin Microbiol infect*. 2019.
22. Kovanda et al. Prognostic value of galactomannan: current evidence for monitoring response to antifungal therapy in patients with invasive aspergillosis. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2017.
23. Koo et al. Diagnostic performance of the (1→3)-beta-D-glucan assay for invasive fungal disease. *CID*. 2009.
24. Toine et al. Diagnostic performance of the (1→3)-beta-D-glucan assay for invasive fungal disease. *Frontiers in Microbiology*, 2018.
25. Held et al. β-d-Glucan kinetics for the assessment of treatment response in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect*. 2011.