



La Société Tunisienne
de Pathologie Infectieuse



La Société de Pathologie
Infectieuse de Langue Française

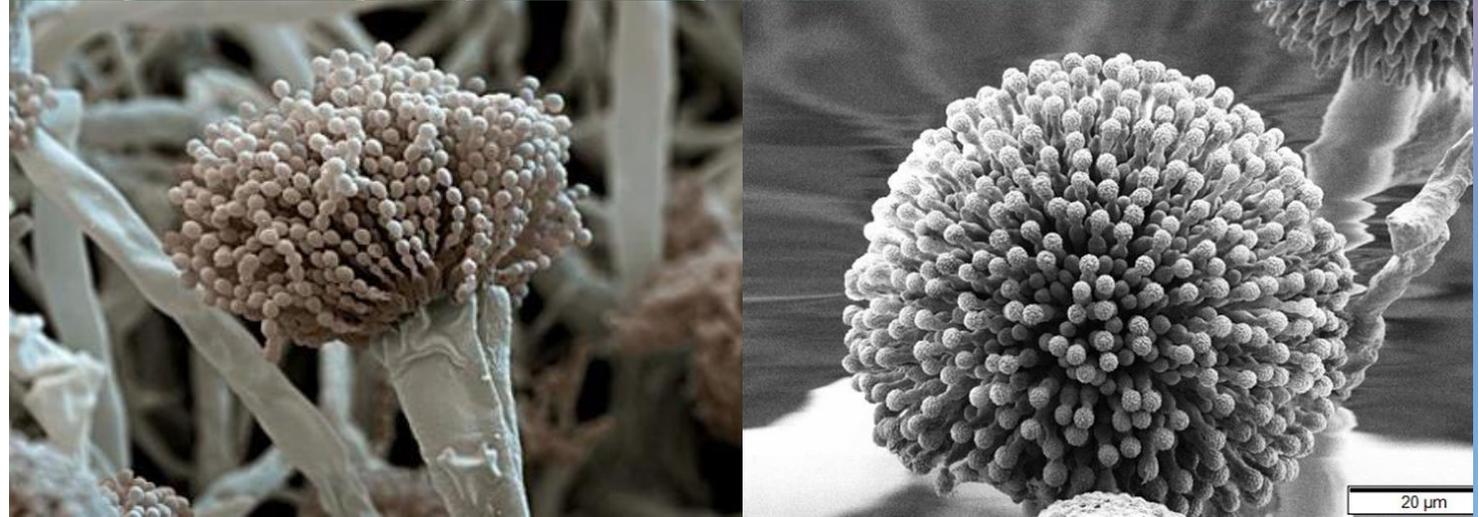
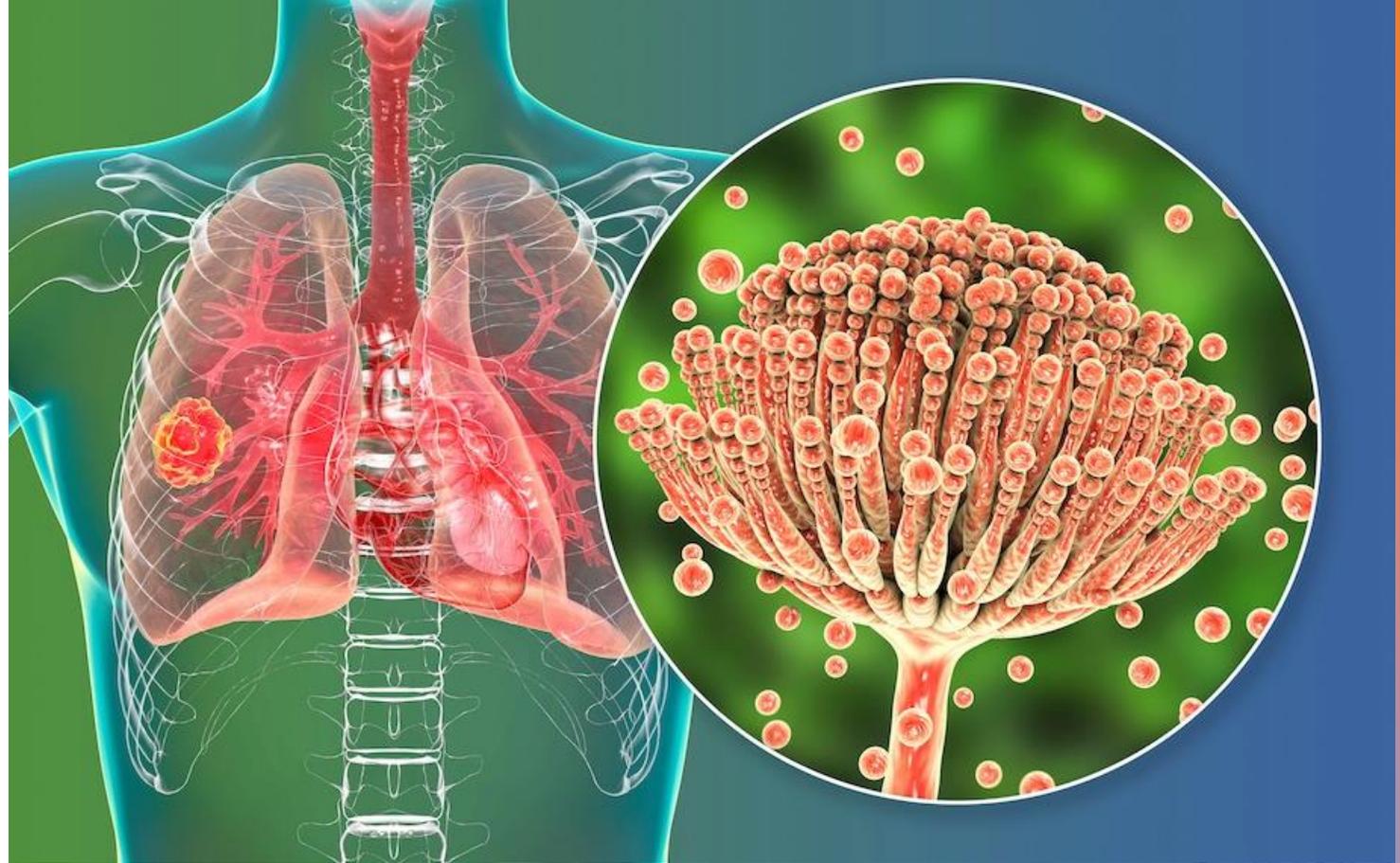
33^{ème} Congrès National de la Société
Tunisienne de Pathologie Infectieuse

Diagnostic biologique des aspergilloses

Sarra Cheikhrouhou

MCA Laboratoire de Parasitologie-Mycologie

Hôpital La Rabta



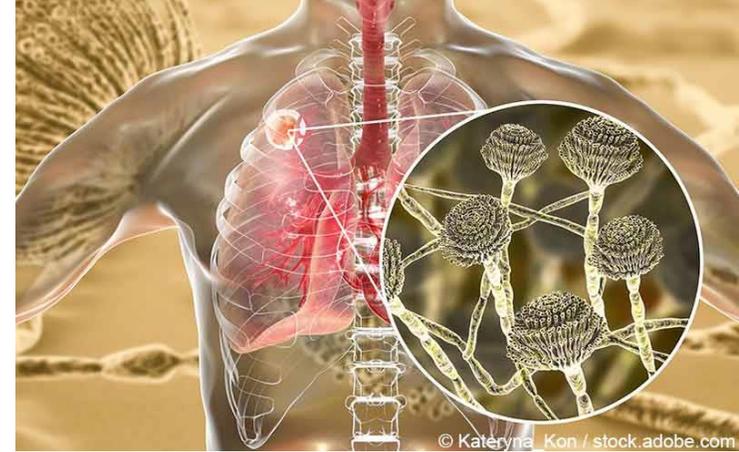
Introduction



- Les moisissures du genre *Aspergillus* sont responsables d'une grande variété de maladies dont la physiopathologie et l'expression clinique sont principalement conditionnées par la réponse du système immunitaire de l'hôte au champignon.
- On distingue schématiquement:
 - **Les formes allergiques** (asthme aspergillaire, aspergillose bronchopulmonaire allergique [ABPA], rhinosinusite fongique allergique)
 - **La colonisation des bronches ou de cavités** (balle fongique sinusienne ou pulmonaire [aspergillome])
 - **Les formes invasives chroniques** (sinusite aspergillaire chronique, aspergillose chronique cavitaire)
 - **Les formes invasives subaiguës ou aiguës.**
 - Elles surviennent chacune dans un contexte particulier ; les formes invasives intéressent principalement les patients immunodéprimés.

Épidémiologie

- **Les aspergilloses chroniques cavitaires:**
- Patients immunocompétents
- Terrains: ATCD de TBC, une bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), une sarcoïdose pulmonaire
- Les aspergilloses chroniques sont des entités complexes regroupant plusieurs entités nosologiques.
- **Les aspergilloses invasives:**
- Patients ayant une immunodépression profonde (acquise ou innée):
- **Patients d'hématologie++** (neutropéniques, allogreffés de cellules souches hématopoïétiques, notamment au cours de la maladie du greffon contre l'hôte, patients atteints de syndromes myélodysplasiques) qui représentent 75 % des cas
- Les transplantés d'organes solides, les patients recevant des corticoïdes à dose élevée et prolongée, les patients atteints de granulomatose septique chronique
- La létalité de l'aspergillose invasive aiguë est d'environ **40 %** (dépend du terrain)



Les aspergilloses



- **Les formes chroniques:** associées à une altération de l'état général, avec perte de poids, toux productives, sueurs nocturnes, dyspnée et hémoptysies.
- **Les formes invasives** peuvent être paucisymptomatiques du fait de la forte immunodépression ; une douleur thoracique ou une fièvre isolée peuvent en révéler l'existence
- Les différentes méthodes de diagnostic biologique de l'aspergillose se caractérisent par une sensibilité et/ou spécificité imparfaite(s), rendant **le diagnostic de certitude souvent difficile.**
- Cela justifie d'associer différentes techniques sur des **prélèvements répétés** dans le but d'améliorer la performance du diagnostic.

Diagnostic biologique

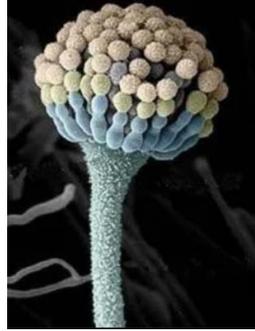
- Le mode de contamination étant l'inhalation de spores d'*Aspergillus*, les aspergilloses ont avant tout une expression clinique respiratoire
- Il n'y a pas de signe pathognomonique.

➤ Méthodes de diagnostic directe:

- Examen mycologique (prélèvement, examen direct, culture, identification, ATFgramme)
- Biologie moléculaire
- Examen anatomopathologique
- Spectrométrie de masse

➤ Méthodes de diagnostic indirecte:

- Sérologie
- Recherche des antigènes circulants



Diagnostic mycologique

- Le prélèvement doit se faire dans des **conditions d'asepsie**, dans un **réceptacle stérile**.
 - Crachats induits, aspiration bronchique, LBA, **PTP, biopsies (stériles)**
 - Les plus profonds possibles, sites stériles (sans ouverture avec l'environnement)
 - Biopsie **non fixée au formol !!** (si besoin de différer: eau physiologique stérile et conservé à +4°C en attendant son acheminement rapide au laboratoire)
- Le diagnostic mycologique doit être effectué par un laboratoire expérimenté



Précautions à prendre en manipulant les prélèvements respiratoires:

- Il est essentiel de respecter les règles de sécurité microbiologiques et d'ensemencer les prélèvements sous poste de sécurité microbiologique (PSM) II.
- (Sous hotte à flux laminaire car risque de contagion par la tuberculose, le COVID etc.)

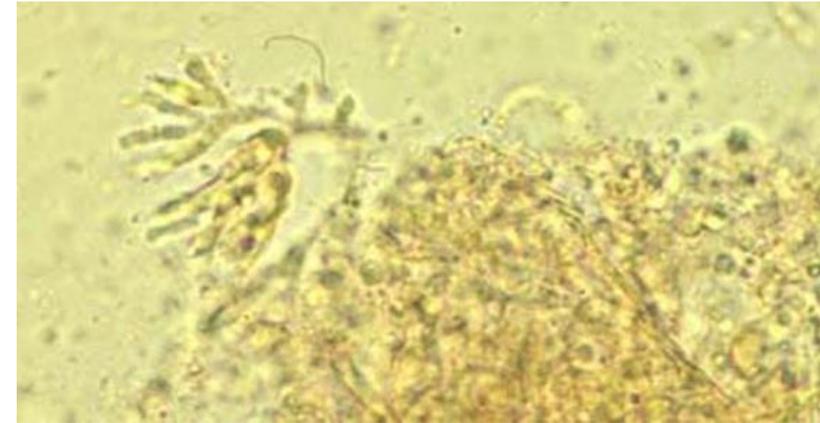


تحذير
خطر حيوي

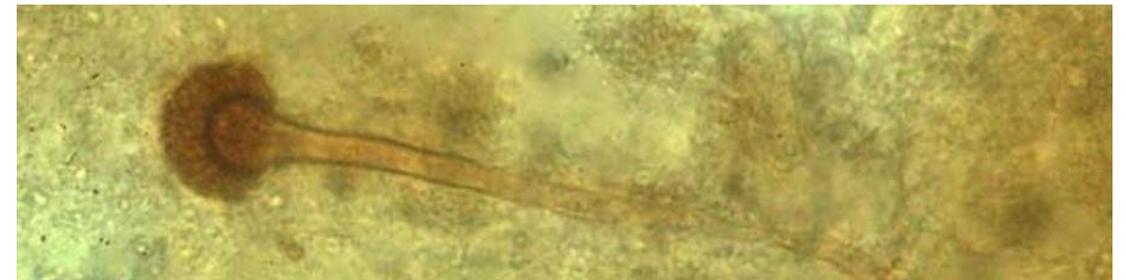
**WARNING
BIOLOGICAL HAZARD**

Examen direct

- Rechercher à l'état frais ou après coloration de **filaments mycéliens de "type aspergillaire"** fins régulièrement septés à **bords parallèles et à ramification à angles aigus**, en faveur d'une infection plutôt qu'une colonisation. Entre lame et lamelle, ils mesurent de 2 à 4 μm de diamètre, apparaissent hyalins, cloisonnés, et parfois ramifiés (dichotomie avec angles aigus à 45°)
- Rarement, des têtes aspergillaires peuvent être observées (prélèvements au cours d'aspergillome).



Filaments mycéliens de "type aspergillaire"

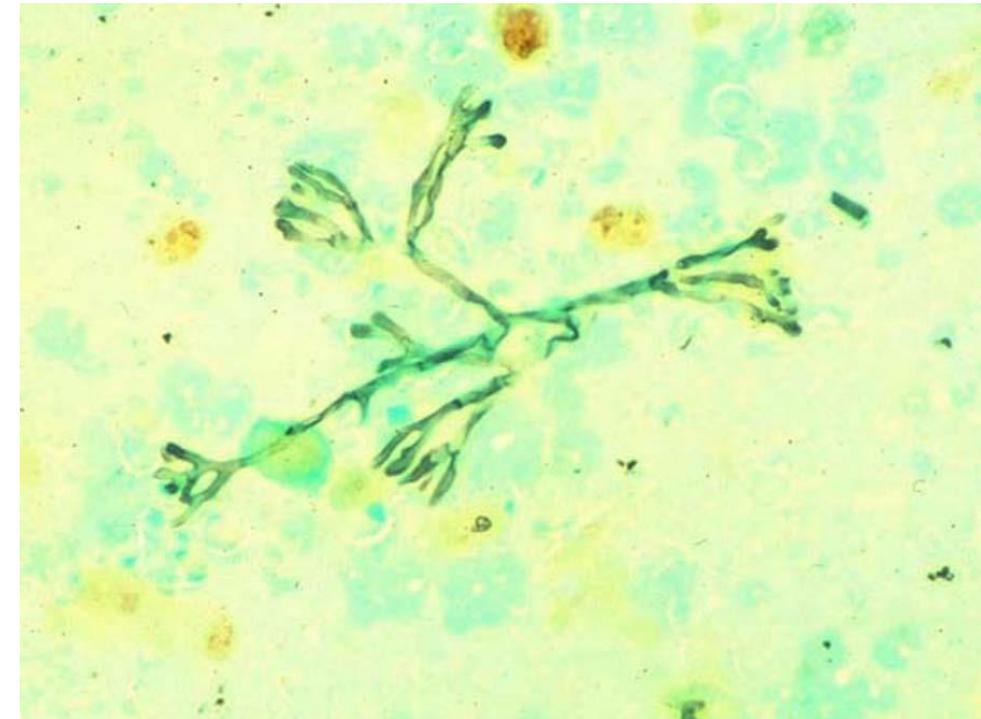
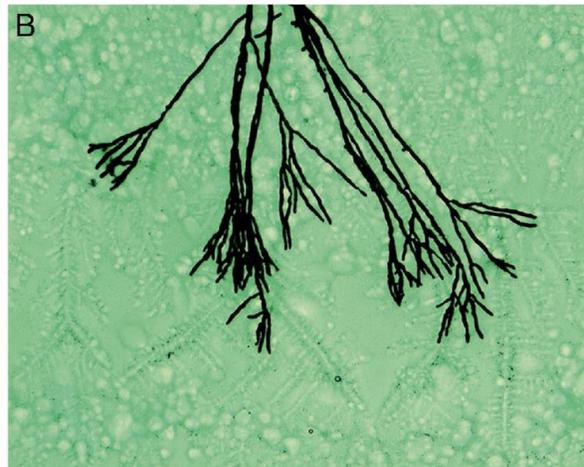


Tête aspergillaire



Examen direct après colorations spécifiques

- Des méthodes de marquage (noir chlorazole, calcofluor) ou des colorations (coloration argentique de Gomori-Grocott, Giemsa) peuvent augmenter la sensibilité de l'examen
- La seule présence de filaments « de type aspergillaire » est présomptive d'aspergillose, mais peut aussi correspondre à d'autres hyphomycoses



Coloration argentique (MUSTO ou Grocott modifié)

Culture et identification

- Milieu de Sabouraud C+A à 27°C et à 37°C pendant 15j
- *Aspergillus sp.* se développe **en quelques jours (3 à 5 jours à 37°C)** sur milieu de Sabouraud ou au malt à une température de 30 ± 2 °C à 35 ± 2 °C et **jusqu'à plus de 50 °C pour *A. fumigatus* (espèce thermophile).**
- Le cycloheximide inhibe sa croissance dans la majorité des cas mais quand *Aspergillus sp.* pousse sur les milieux additionnés de cycloheximide cela est en faveur de sa pathogénicité
- La culture des balles fongiques (avec examen direct positif) se révèle négative (après 2 semaines d'incubation) dans la moitié des cas
- L'aspect macroscopique des cultures est essentiel en association à l'analyse morphologique microscopique (morphologie des têtes aspergillaires, des hyphes, présence d'organes de la reproduction sexuée, etc.)

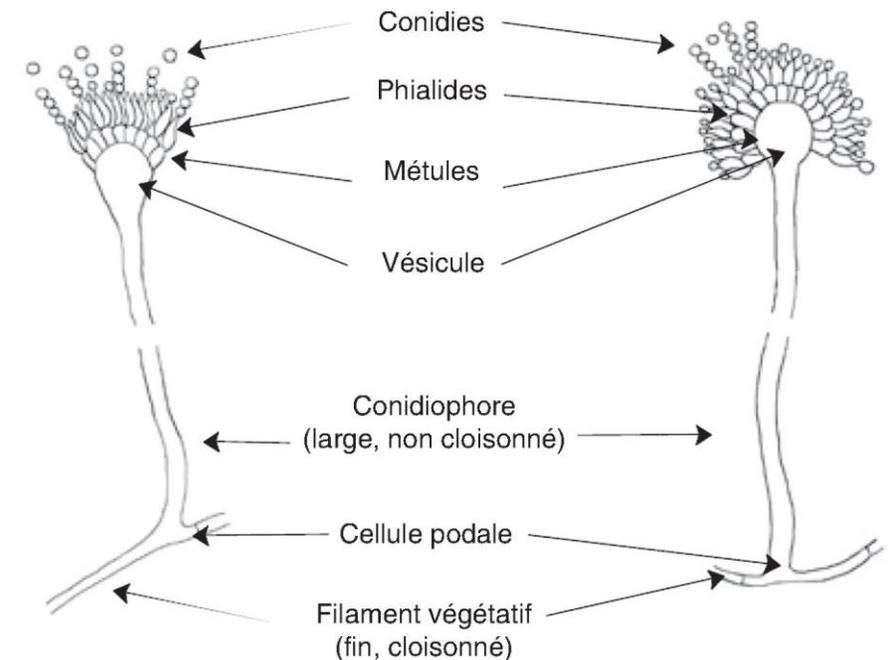
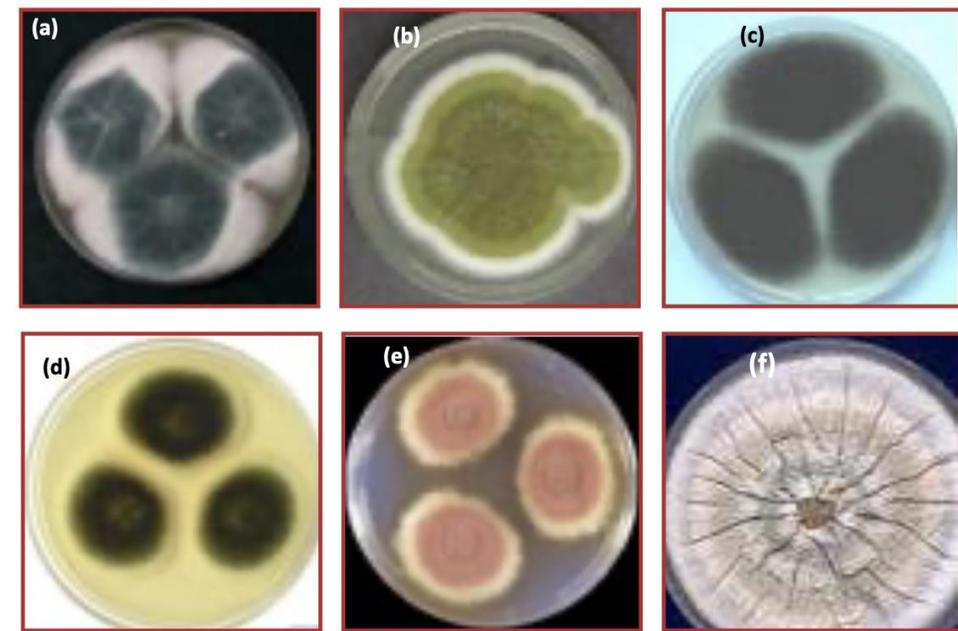
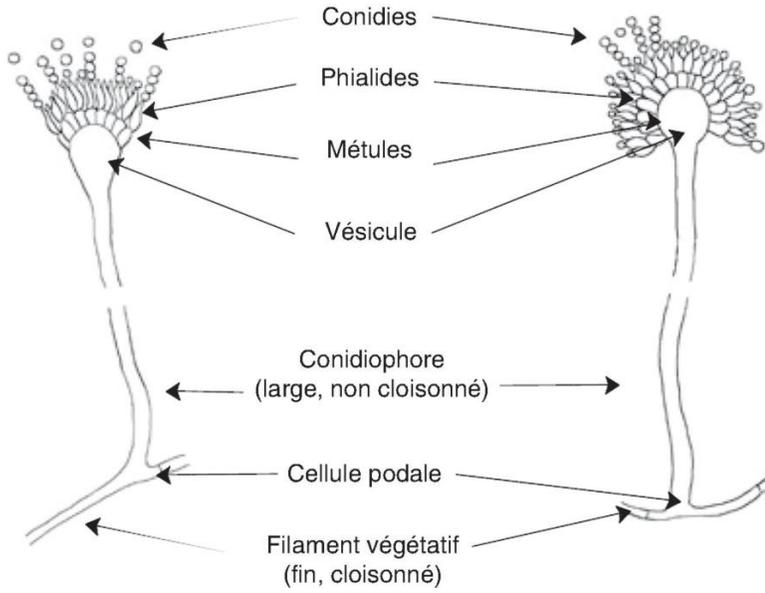
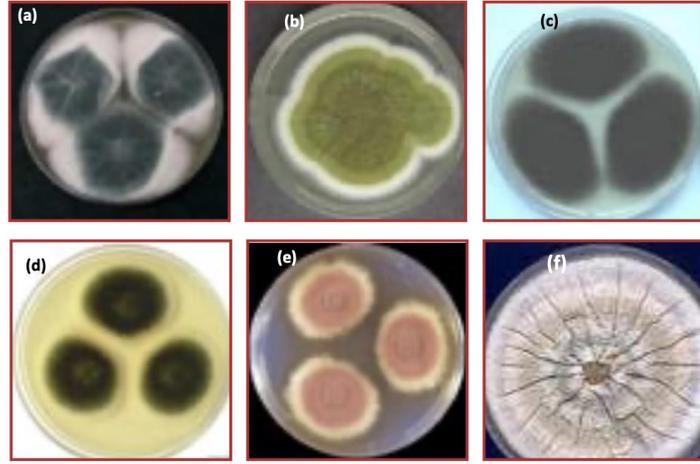


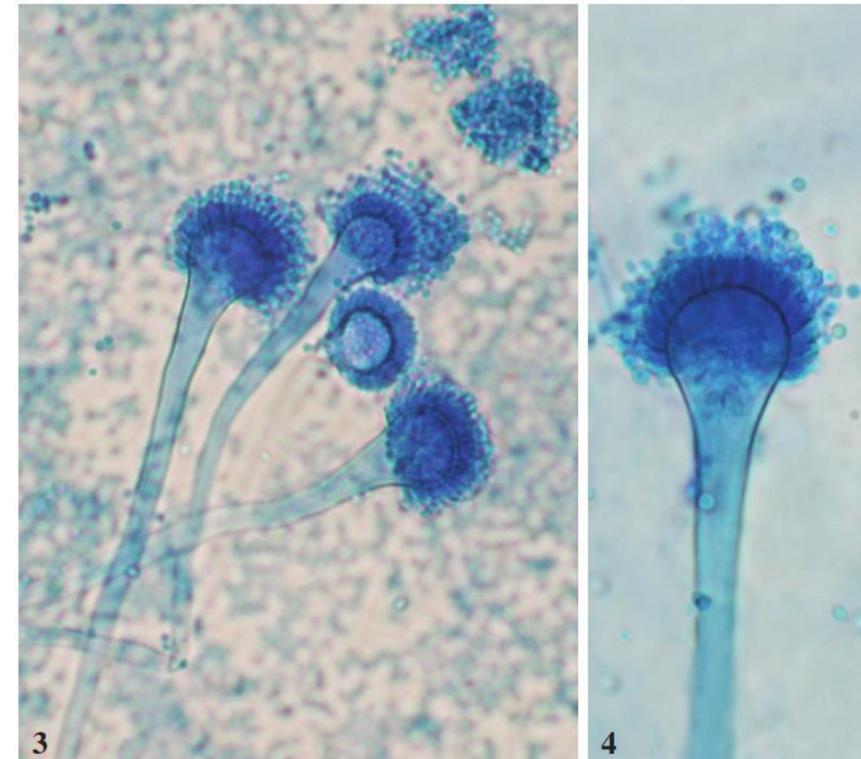
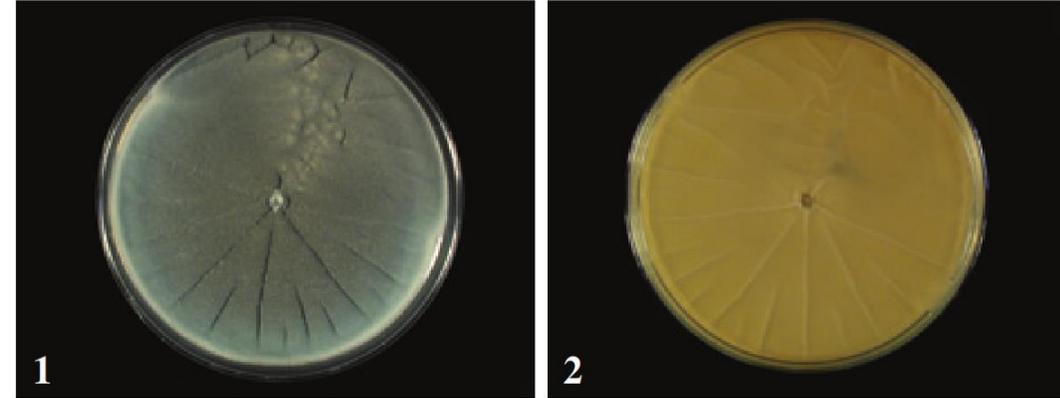
Tableau I - Récapitulatif des critères discriminants macroscopiques et microscopiques des différentes espèces aspergillaires.
(Données personnelles).

	<i>A. fumigatus</i> (Fig.3a)	<i>A. flavus</i> (Fig.3b)	<i>A. niger</i> (Fig.3c)	<i>A. nidulans</i> (Fig.3d)	<i>A. terreus</i> (Fig.3e)	<i>A. versicolor</i> (Fig.3f)
Aspect macroscopique	Recto : blanc puis vert, vert-gris puis vert foncé à gris-noirâtre	Recto : duveteux à pou- dreux, blanc puis jaune à jaune-vert	Recto : blanc puis jaune puis granuleux et noirâtre	Recto : duveteux à poudreux, vertes foncé à jaunâtres	Recto : duveteuse à poudreuses, beige à cannelle	Recto : ocre puis de couleur variée (jaune, ocre, vert ...)
	Verso : incolore, jaune, vert ou brun-rouge	Verso : incolore, rosé à brun rouge foncé	Verso : incolore à jaune pâle	Verso : rougeâtre, pourpre	Verso : aune à brun-orange	Verso : incolore ou jaune à brun-rougeâtre
Tête aspergillaire	Unisériée, en colonne	Uni ou bisériée, radiée	Bisériée, radiée	Bisériée, en colonne courte	Bisériée, en colonne longue (aspect en éventail)	Bisériée, radiée
Conidiophore	Court (300µm), lisse, incolore	Long (jusqu'à 2,5mm), souvent verruqueux	Long : 1,5-3mm et large 15-20µm	Court : 75-100µm, sinueux	100-250µm	Long (500-700µm)
	Évasement progressif au sommet (aspect en massue)	Incolore, à parois épaisses	Lisse, incolore à brun	Brun, lisse	Lisse, incolore	Lisse, jaunâtre
Vésicule	Hémisphérique, 20-30µm, phialides au sommet	Sphérique (25-45µm)	Sphérique (30-100µm)	Hémisphérique (8-10µm)	Hémisphérique (10-16µm)	Ovale (12-16µm)
Conidies	Rondes (2,5-3 µm), vertes, échinulées ou lisses	Grosses (3,5-4,5µm), (sub-)globuleuses, vert pâle, échinulées	Grosses et globuleuses (3,5-5µm), brunes, échinulées	Conidies (3-3,5µm), vertes, échinulées	Petites (1,5-2,5µm), lisses, globuleuses à elliptiques	Conidies (2-3,5µm), globuleuses, échinulées
Commentaires	Pousse bien à 50°C			<i>Forme sexuée :</i> <i>Emericella nidulans</i> Cléistothèces, asques, ascospores et cellules noisettes	Aleuries solitaires (sorte de pseudo- chlamydo-spores) à base tronquée, latéralement sur le mycélium	Pinceaux évoquant un <i>Penicillium</i> cellules noisettes de la coque



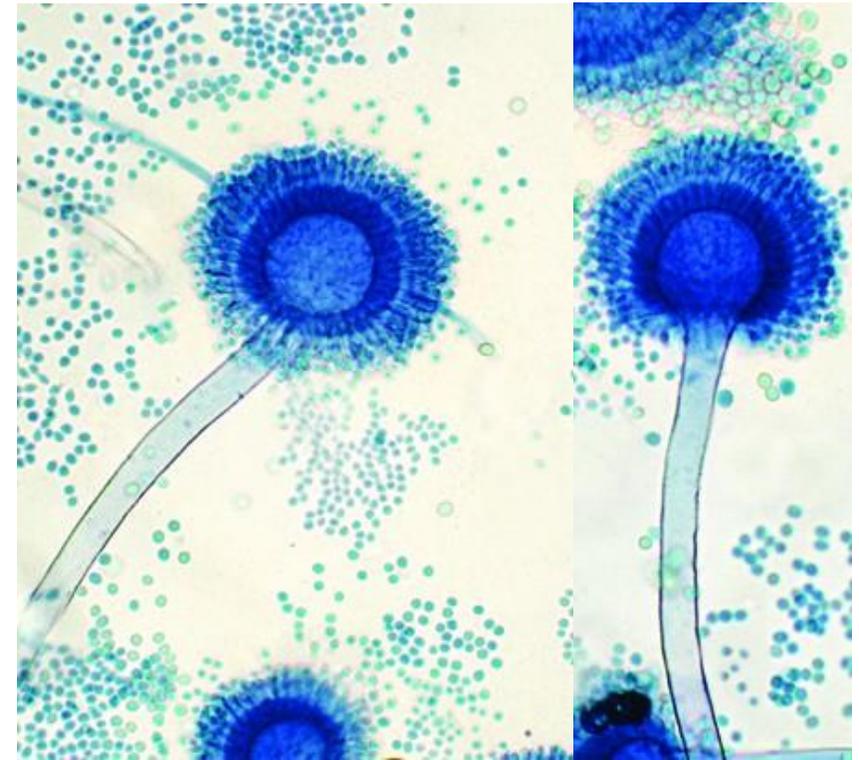
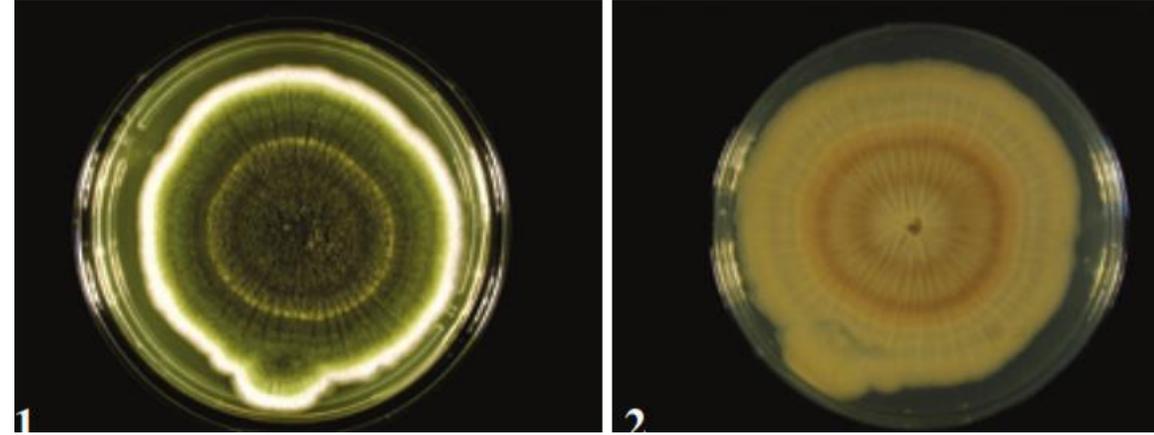
Aspergillus fumigatus (*Aspergillus* section *Fumigati*)

- *A.fumigatus* est l'espèce la plus fréquemment retrouvée en pathologie humaine (littérature)
- **Croissance rapide** en 24-48 heures à 35 °C,
- donnant des colonies blanches devenant rapidement bleu-vert, puis vert foncé à gris noirâtre (croissance possible au-delà de 50 °C)
- Le verso est incolore, jaune, vert ou brun-rouge suivant les souches.
- À l'examen microscopique, le conidiophore est court (300 µm), lisse et incolore avec évasement progressif au sommet portant une vésicule hémisphérique (20 à 30 µm). Les phialides sont directement insérées sur la vésicule (absence de métule) et produisent des conidies globuleuses, vertes, échinulées, petites (2,5 à 3 µm) donnant un aspect de tête unisériée en colonne compacte (100 µm). Absence de Hülle cells .



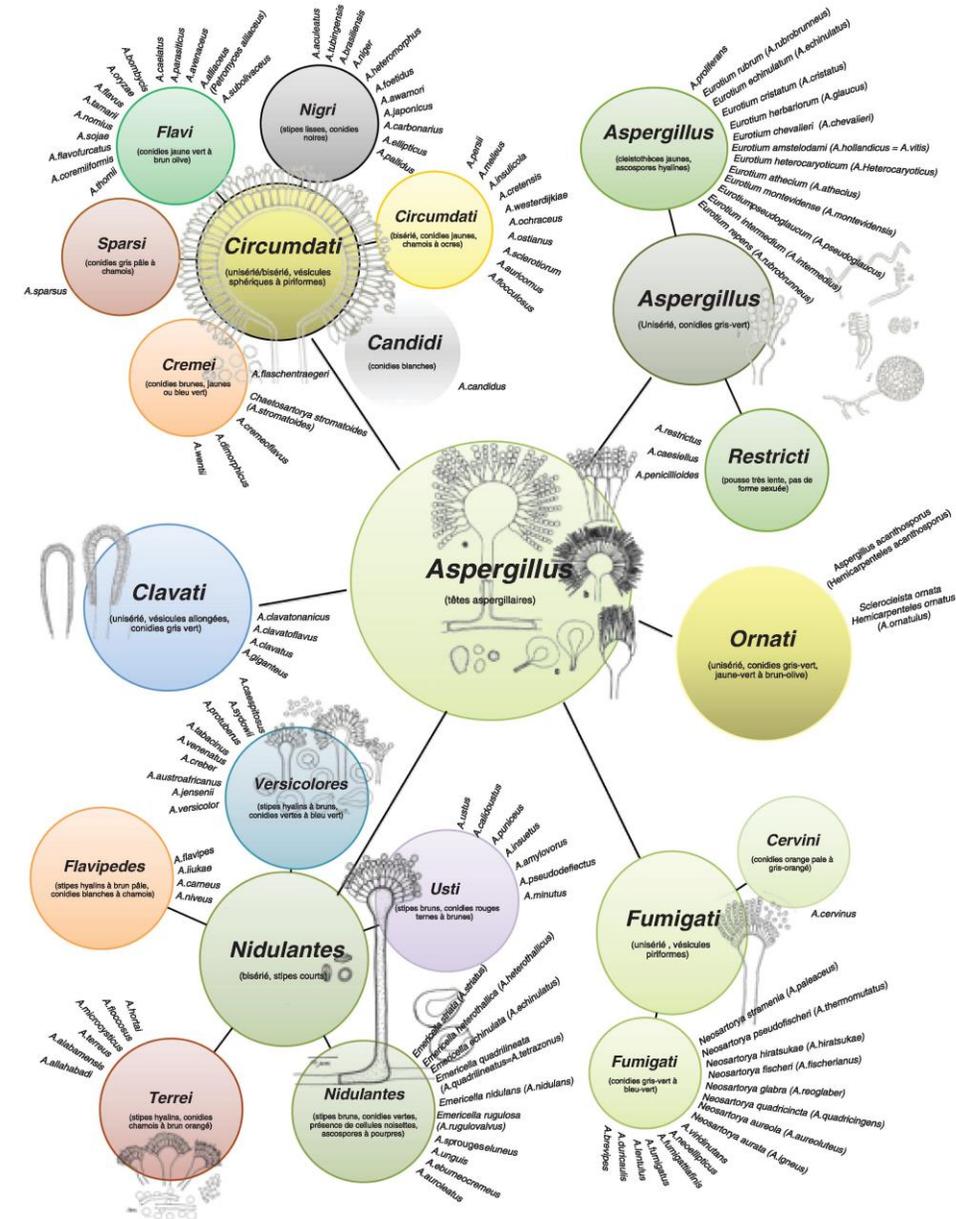
Aspergillus flavus (*Aspergillus* section *Flavi*)

- Le plus isolé en Tunisie
- Croissance rapide en 2 à 3 jours à 35 °C
- des colonies blanches devenant rapidement jaunes puis vert-jaune. Le verso est incolore, rosé ou brun foncé.
- À l'examen microscopique, le conidiophore est long (1 mm et parfois jusqu'à 2,5 mm), hyalin, habituellement recouvert d'aspérités (verruqueux) surtout près de l'apex, et porte une vésicule sphérique (25 à 45 µm)
- Les cultures jeunes sont souvent microscopiquement très polymorphes. À maturité, les phialides sont typiquement portées par des métules, produisent des conidies globuleuses, vert pâle, échinulées (3,5 à 4,5 µm), donnant un aspect de tête bisériée, radiée (300-400 µm). Absence de Hülle cells



Culture et identification

- En revanche, cette identification morphologique reste **limitée à la section** (par exemple *Aspergillus* section *Fumigati*, *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Nigri*, etc.) du fait de la diversité des espèces potentiellement impliquées en clinique et de l'existence d'espèces cryptiques
- **La spectrométrie de masse MALDI-TOF** permet une identification rapide et fiable à l'espèce, notamment des espèces cryptiques
- **L'identification moléculaire par séquençage des gènes codant la β -tubuline et la calmoduline** reste la référence pour la détermination de l'espèce des champignons du genre *Aspergillus*
- L'importance d'une identification précise à l'espèce est justifiée, notamment en cas d'infection invasive, car la sensibilité aux antifongiques peut varier considérablement d'une espèce à l'autre au sein d'une même section



Classification simplifiée des sections et espèces du genre *Aspergillus*.
 Source : d'après Gautier M, Normand AC, Ranque S. Previously unknown species of *Aspergillus*. Clin Microbiol Infect 2016 ; 22(8) : 662-9.

Diagnostic Mycologique



➡ **Nécessité de répéter les prélèvements +++** afin d'améliorer la sensibilité

- Le manque de spécificité pose des **difficultés d'interprétation** du fait de la **possibilité de contamination du prélèvement** ou du **portage fortuit dans l'arbre respiratoire** de spores aspergillaires
- La **culture reste essentielle**: permet l'isolement de la souche (délai de réponse d'au moins 48 heures), nécessaire pour une identification précise et l'évaluation de la sensibilité in vitro aux antifongiques

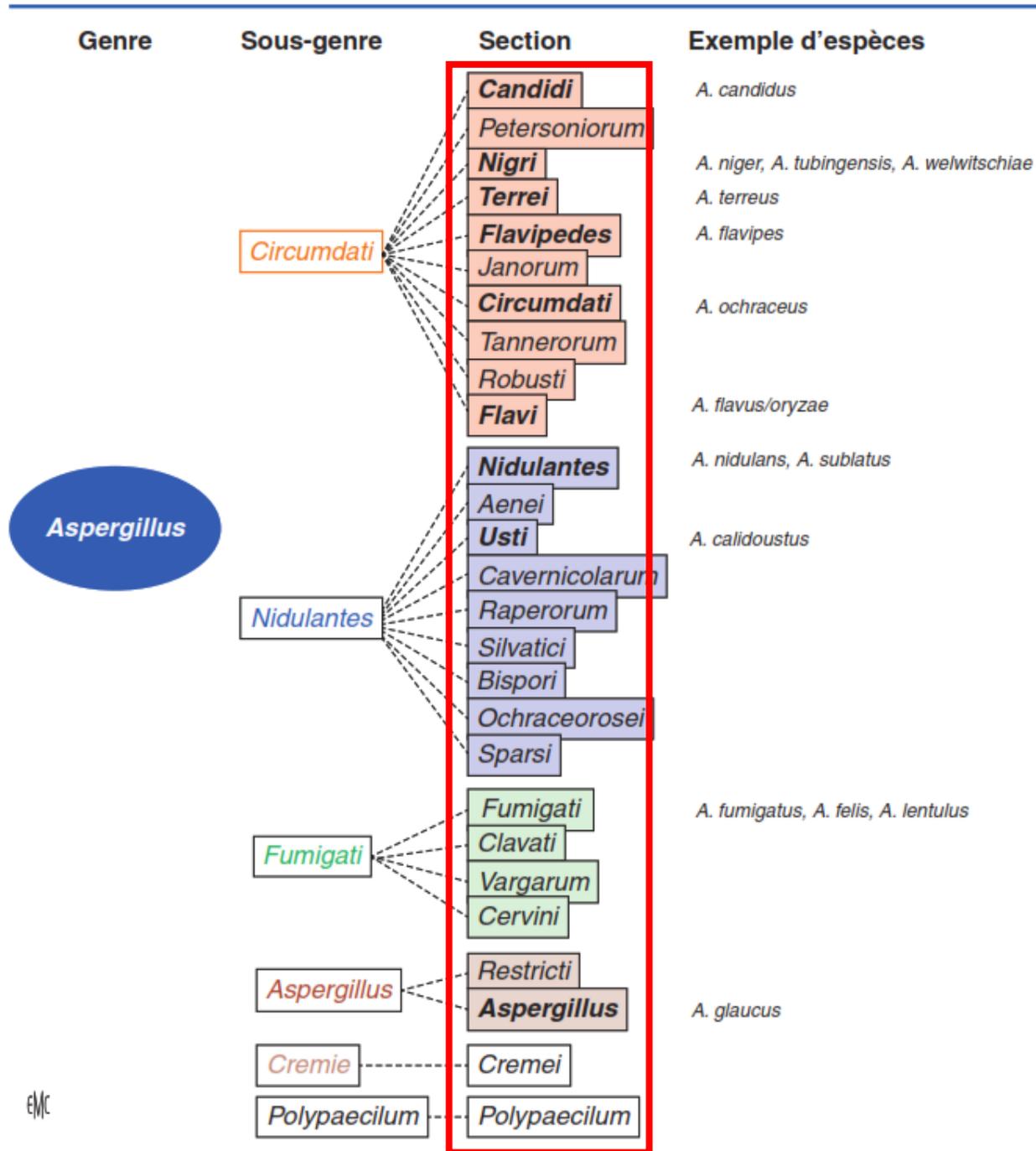


Figure 1. Représentation des sous-genres et sections appartenant au genre *Aspergillus* (d'après [6]). En gras sont représentées les sections les plus fréquemment cultivées à partir de prélèvements humains (non exhaustif).

Antifongigramme

- Indications :
 - Isolement d'*Aspergillus* sur un terrain à risque (neutropénie +++, ABPC)
 - Échec thérapeutique
- Aide à la décision thérapeutique
- *Aspergillus* : de plus en plus de résistances naturelles et acquises aux triazolés

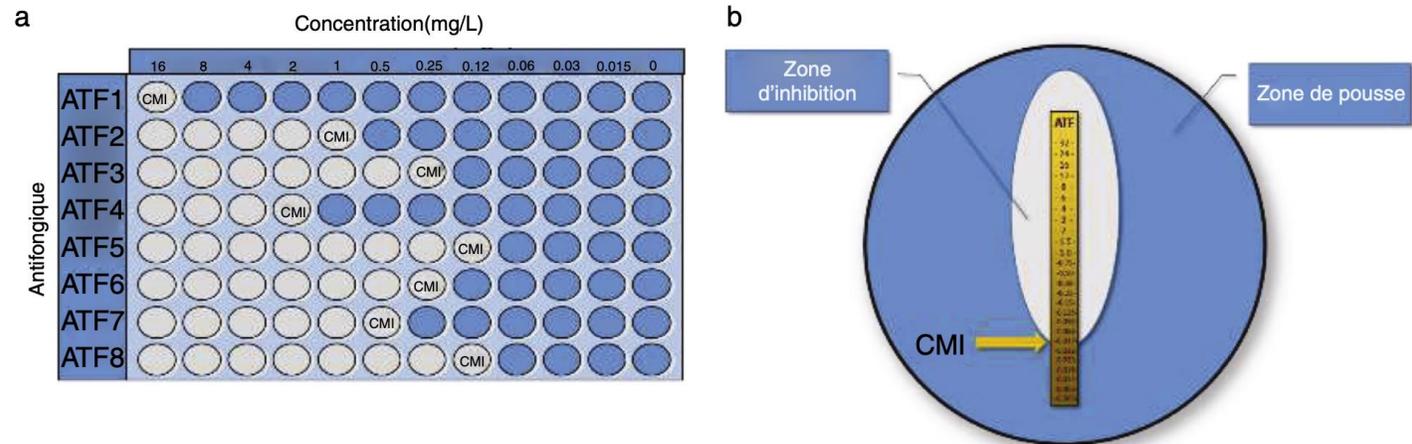


Figure 3.19. Principe de la méthode EUCAST (a) et de la méthode de diffusion par bandelette en milieu gélosé (b).
Source : collection ANOFEL, CHU de Grenoble et HEGP de Paris.

Antifongigramme : Etude de la sensibilité aux antifongiques (Azolés, AmB, Echinocandines)

Difficultés +++

- Conditions techniques : spores
- Particularités de la croissance des espèces
- Action de l'ATF sur *Aspergillus* : **fongistatiques (échinocandines)/ fongicides (AmB et azolés)**
- Niveau de corrélation in vitro/in vivo?
- Antifongigramme \neq Antibiogramme +++
- **Le choix de l'antifongique repose surtout sur l'espèce identifiée (*A.terreus*, *A.flavus*, *A.nidulans* R AmB)**

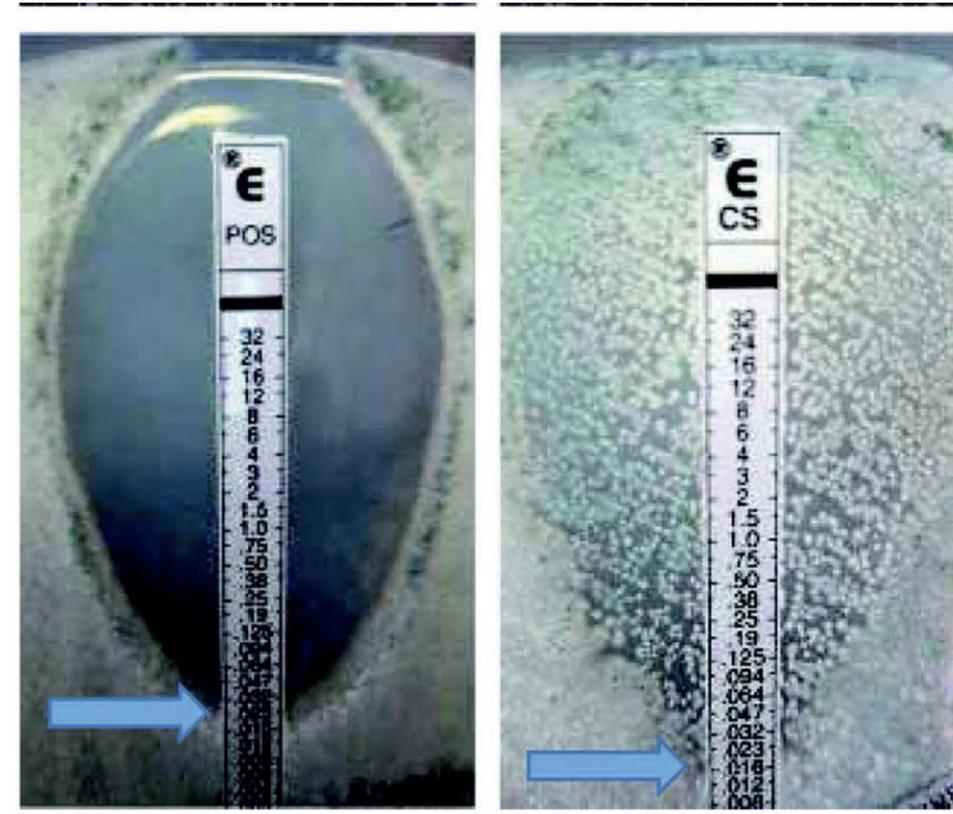


Tableau 3.6. Principe, avantages et inconvénients des différentes techniques d'évaluation de la sensibilité *in vitro* aux antifongiques.

Technique	Avantages	Inconvénients
Microdilution en milieu liquide (EUCAST, CLSI)	Techniques de référence. Disponibles pour levures et champignons filamenteux (dont les dermatophytes) Obtention d'une CMI CBP définis pour ces techniques	Non commercialisé
Microdilution en milieu liquide	Commercialisé Obtention d'une CMI Certaines techniques avec indicateur coloré (facilite la lecture visuelle) Certaines techniques automatisées	Tous les ATF sont testés (pas de test individuel) Panel d'ATF variable selon les tests
Diffusion en milieu gélosé – disques (CLSI)	Techniques de référence Disponibles pour levures et champignons filamenteux CBP disponibles	Pas de détermination de CMI
Diffusion en milieu gélosé – disques	Commercialisé Large choix d'ATF Test individuel possible	Uniquement pour les levures Lecture visuelle
Diffusion en milieu gélosé – bandelettes à gradient de concentration	Commercialisé Large choix d'ATF, y compris les plus récents Obtention de CMI Test individuel possible Disponibles pour levures et champignons filamenteux	Lecture visuelle
Gélose avec concentration fixe d'ATF	Simple, commercialisé	Uniquement pour le dépistage de la résistance aux azolés des <i>Aspergillus</i> spp.

ATF : antifongiques ; CBP : *Clinical Breakpoints* ; CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute ; CMI : concentration minimale inhibitrice ; EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

• Résistances à l'AmB

- Identification d'espèce et antifongogramme +++

8. Clinical data

EUCAST 2020

Aspergillus

Polyene antifungals were the cornerstone treatment for invasive aspergillosis for over 40 years. Whilst new treatment options have changed their role, lipid-associated amphotericin B regimens remain important therapeutic options for aspergillosis due to their broad-spectrum of activity and limited cross-resistance with triazole antifungals (14). Recent studies have demonstrated the importance of accurate speciation of *Aspergillus* species during amphotericin B therapy, as infections with some species, particularly *A. terreus*, *A. flavus*, and *A. nidulans* and potentially other respond poorly to amphotericin B therapy.

Amphotericin B is regarded first line antifungal therapy in patients with invasive aspergillosis resistant to voriconazole (14, 15). Amphotericin B formulations are alternative options for invasive aspergillosis, such as in patients who cannot tolerate voriconazole or with refractory aspergillosis. Selecting the most appropriate lipid-based formulation of amphotericin remains a challenge and high-quality evidence from randomized, controlled trials is limited.

L-AmB vs D-AmB: In the study by Leenders et al. (16) L-AmB 5 mg/kg/day was compared with D-AmB 1 mg/kg/day. The patient population was severely neutropenic and had proven or probable invasive fungal infections; overall complete/partial responses with L-AmB were better than with D-AmB (50% vs 24%, p=0.04). Ellis et al. compared L-AmB 1 mg/kg/day with 4 mg/kg/day for efficacy in proven or probable invasive aspergillosis patients (17). There was no overall statistical significance between the survival rates at 6 months between the groups. Invasive aspergillosis was the primary cause of death for the same number of patients in both groups, but the group with definite invasive aspergillosis at the time of randomisation comprised only 20 patients, and their response rate was numerically higher on L-AmB 4 mg than on 1 mg/kg/day (58% versus 37%). In another study, L-AmB administered at a daily dose of 3 mg/kg was associated with similar efficacy, less nephrotoxicity, and a trend toward improved 12-week survival, as compared with a dose of 10 mg as primary therapy for invasive aspergillosis (72% vs 59% with a favourable response of 50% vs 46%, respectively) (18); this study showed that increased doses of amphotericin B should not be equated with greater efficacy.

ABLC vs D-AmB: Bowden et al. (19) compared ABLC 6 mg/kg/day with D-AmB 1-1.5 mg/kg/day against invasive aspergillosis in cancer patients and the results showed similar success rates for the two groups (52% versus 51%, respectively). An analysis of a large data registry on the use of ABLC invasive aspergillosis showed encouraging findings regarding efficacy and safety, including the drug's tolerability in patients with renal impairment (20).

These studies did not include MICs by the EUCAST method so a correlation of *in vitro* MICs with clinical outcome has not been possible.

Candida

Amphotericin B was the cornerstone in the treatment of invasive *Candida* infections for many years. However, with the introduction of the echinocandin class of antifungals, amphotericin B is now regarded second line option for invasive candidiasis and first line option for resistant isolates (i.e. echinocandin-resistant *C. glabrata*) and for CNS infection (21). Clinical data for amphotericin B against *Candida* spp. was collated from the following clinical trials.

- Walsh et al. *NEJM*, 1999, 340:764-771 (22)
L-amphotericin B, 3mg/kg/d with 343 patients, mean treatment duration of 10.4 days. Showed a treatment success rate of 50.1%.
Amphotericin B deoxycholate, 0.6 mg/kg/d with 344 patients, mean treatment duration of 10.3 days. Showed a treatment success rate of 49.4%.
- Wingard et al. *CID* 2000, 31: 1155-1163 (23)
L-amphotericin B, 3mg/kg/d with 85 patients, mean treatment duration of 8.6 days. Showed a treatment success rate of 40%.
- Walsh et al. *NEJM* 2004, 351: 1391-1402 (24)
L-amphotericin B, 3mg/kg/d with 539 patients, mean treatment duration of 12 days. Showed a treatment success rate of 33.7%.

Etat de la résistance naturelle des *Aspergillus*

- Le choix de l'antifongique repose surtout sur l'espèce identifiée +++

	AmB	FCZ	ITZ	VCZ	5FC	CAS	ANI
<i>A.fumigatus</i>	S	R	S	S	R	S*	S*
<i>A.flavus</i>	R	R	S	S	R	S*	S*
<i>A.terreus</i>	R	R	S	S	R	S*	S*
<i>A.niger</i>	S	R	R	R	R	S*	S*
<i>A.nidulans</i>	R	R	S	S	R	S*	S*

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)													
	<i>A. flavus</i>			<i>A. fumigatus</i>			<i>A. nidulans</i>			<i>A. niger</i>		<i>A. terreus</i>		
	S _s	R ₂	ATU	S _s	R ₂	ATU	S _s	R ₂	ATU	S _s	R ₂	S _s	R ₂	ATU
Amphotericin B	.	.		1	1		.	.		1	1	.	.	

Etat de la résistance naturelle des *Aspergillus*

Espèces	Section	AmB	Azolés	Cas
<i>A. fumigatus</i>	<i>Fumigati</i>	Vert	Vert	Vert
<i>A. lentulus</i>		Rouge	Rouge	Rouge
<i>A. fumigatiaffinis</i>		Rouge	Vert	Vert
<i>A. viridinutans</i>		Vert	Rouge	Vert
<i>A. fumisynnematus</i>		Vert	Vert	Vert
<i>N. fischeri</i>		Vert	Vert	Vert
<i>N. pseudofischeri</i>		Vert	Rouge	Vert
<i>N. udagawae</i>		Rouge	Rouge	Vert
<i>N. fennelliae</i>		Vert	Vert	Vert
<i>N. hiratsukae</i>		Vert	Vert	Vert
<i>N. spinosa</i>		Vert	Vert	Vert

Etat de la résistance naturelle des *Aspergillus*

Espèces	Section	AmB	Azolés	Cas
<i>A. flavus</i>	Flavi	Resistant	Sensitive	Sensitive
<i>A. oryzae</i>		Sensitive	Sensitive	Sensitive
<i>A. tamarii</i>		Sensitive	Sensitive	Resistant
<i>P. alliaceus</i>		Resistant	Sensitive	Resistant
<i>A. terreus</i>	Terrei	Resistant	Sensitive	Sensitive
<i>A. niveus</i>		Resistant	Sensitive	Sensitive
<i>E. nidulans</i>	Nidulantes	Resistant	Sensitive	Sensitive
<i>E. quadrilineata</i>		Sensitive	Sensitive	Resistant
<i>A. versicolor</i>		Resistant	Sensitive	Sensitive
<i>A. sydowii</i>		Sensitive	Sensitive	Sensitive

Hedayani et al. 2005, Auberger et al. 2008,
Kontoyannis et al. 2002, Verweij et al. 2008

Etat de la résistance naturelle des *Aspergillus*

Espèces	Section	Amb	Azolés	Cas
<i>A. ustus</i>	<i>Usti</i>	Red	Red	Red
<i>A. calidoustus</i>		Red	Red	Red
<i>A. pseudodeflectus</i>		Red	Red	Red
<i>A. insuetus</i>		Red	Red	Red
<i>A. granulosis</i>		Red	Red	Red
<i>A. niger</i>	<i>Nigri</i>	Green	Red	Green
<i>A. tubingensis</i>		Green	Red	Green
<i>A. foetidus</i>		Green	Red	Green

Détection d'ADN par PCR

- **Performances très variables** selon la population étudiée et la nature du prélèvement
- L'extraction d'ADN sur un volume de plasma ou de sérum (le plasma serait préférable) d'au moins 500 µL ainsi que l'utilisation de **l'ADN ribosomique** comme cible de la PCR, permettant de compenser la faible quantité d'ADN circulant, ont montré des résultats particulièrement intéressants.
- Un consortium européen (European *Aspergillus* PCR Initiative) a travaillé à la **standardisation de la PCR** avec publication de recommandations techniques pour sa réalisation de la PCR ainsi qu'à son inclusion dans la récente révision des critères diagnostiques
- L'usage combiné de la PCR et du GM améliore nettement la sensibilité du diagnostic d'aspergillose invasive chez les patients à risque
- Kits de Détection d'ADN aspergillaire directement à partir des échantillons cliniques ayant subi un traitement préanalytique adapté; certains incluent les **principales mutations du gène CYP51A d' *A. fumigatus*** associées à la résistance aux azolés

Clinical Infectious Diseases

SUPPLEMENT ARTICLE



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

P. Lewis White,¹ Stephane Bretagne,² Angela M. Caliendo,³ Juergen Loeffler,⁴ Thomas F. Patterson,⁵ Monica Slavin,⁶ and John R. Wingard⁷

¹Public Health Wales Mycology Reference Laboratory, Cardiff, United Kingdom; ²Mycology Laboratory, Saint Louis Hospital, Paris and Université de Paris, France; ³Department of Medicine, Warren Alpert Medical School of Brown University, Providence, Rhode Island, USA; ⁴Department of Molecular Biology and Infection, University Hospital Wuerzburg, Medical Hospital II, Wuerzburg, Germany; ⁵Department of Medicine, University of Texas Health San Antonio and the South Texas Veterans Health Care System, San Antonio, Texas, USA; ⁶National Centre for Infections in Cancer, Sir Peter MacCallum Department of Medical Oncology, University of Melbourne, Melbourne, Australia; and ⁷Department of Medicine, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida, USA

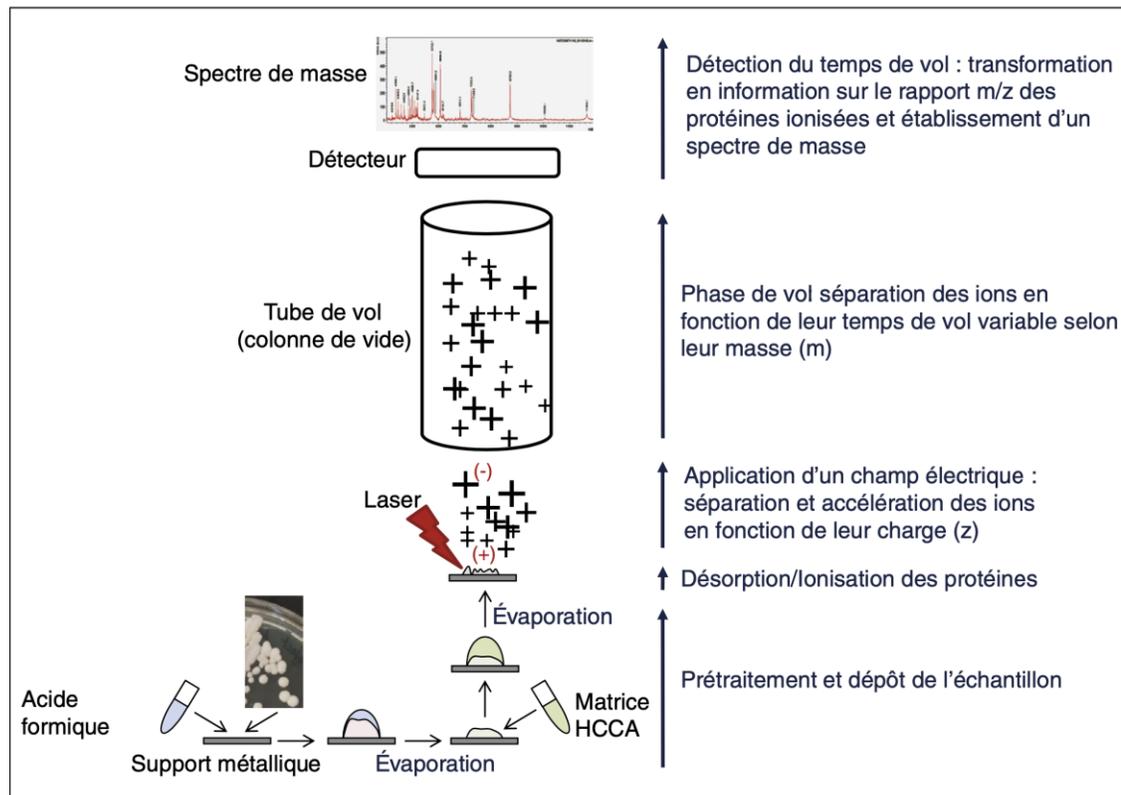
Aspergillus polymerase chain reaction testing of blood and respiratory samples has recently been included in the second revision of the EORTC/MSGERC definitions for classifying invasive fungal disease. This is a result of considerable efforts to standardize methodology, the availability of commercial assays and external quality control programs, and additional clinical validation. This supporting article provides both clinical and technical justifications for its inclusion while also summarizing recent advances and likely future developments in the molecular diagnosis of invasive aspergillosis.

Keywords. *Aspergillus* PCR; EORTC/MSGERC definitions; technical aspects; clinical performance.

Tableau 18.1. Exemples de couples d'amorces utilisables pour l'identification moléculaire des champignons d'intérêt médical.

Primers	Sens	Sequences (5' -> 3')	Cible	Principales applications
ITS1	forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Régions ITS1 et ITS2 de l'ADNr	Panfongique ¹
ITS4	reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
V9G	forward	TTACGTCCCTGCCCTTTGTA		
LS266	reverse	GCATTCCCAAACAACCTCGACTC		
NL1	forward	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	Régions D1D2 de la sous-unité 26S de l'ADNr	Panfongique
NL4	reverse	GGTCCGTGTTTCAAGACGG		
EF1-1018F	forward	GAYTTCATCAAGAACATGA	Facteur d'élongation alpha (TEF1- α)	Panfongique ²
EF1-1620R	reverse	GACGTTGAADCCRACRTTGTC		
btub1	forward	AATTGGTGCCGCTTTCTGG	Beta-tubuline	<i>Aspergillus</i> spp. (à l'espèce)
btub2	reverse	AGTTGTCGGGACGGAATAG		

Spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight mass spectrometry)



Standardisée, rapide (2h)+++, peu coûteuse

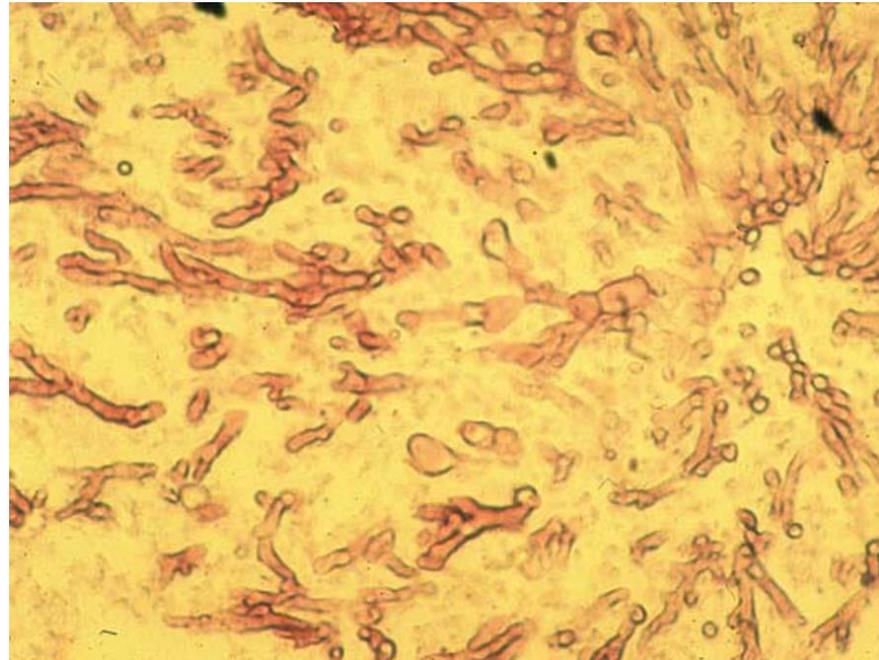
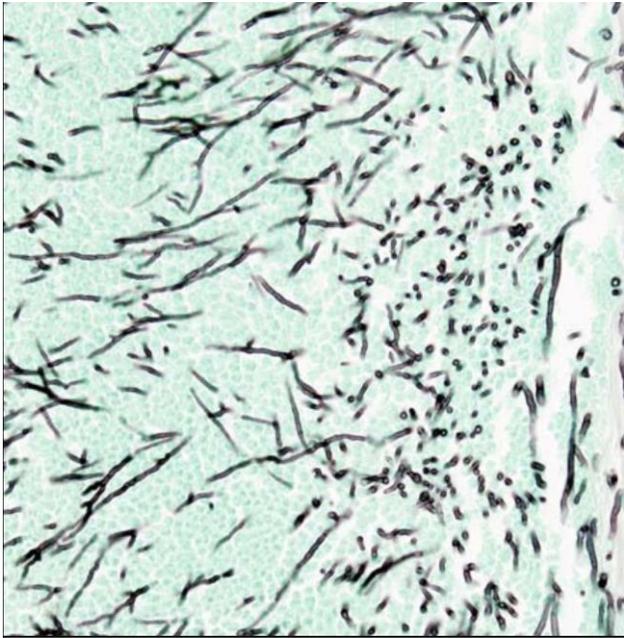
Figure 3.18. Principe de l'identification mycologique par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

Source : figure adaptée d'après Bournoux ME *et al.* Identification des levures par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Rev Francoph Lab 2013 ; 2013 : 63-9.

Examen anatomopathologique

Il peut mettre en évidence des filaments mycéliens septés "de type aspergillaire" ou non septés « de type mucorale » et peut objectiver un processus d'invasion tissulaire

L'examen anatomopathologique fait appel à des **colorations non spécifiques** (hémalum éosine safran, periodic acide Schiff) ou spécifiques basées sur la coloration argentique qui colore la paroi fongique



Filaments mycéliens "de type aspergillaire"



Autres méthodes diagnostiques

- En pratique, la détection d'antigènes de paroi (galactomannane ou 1.3- β -D-glucane) et la détection d'ADN par PCR sont dédiées au diagnostic des formes invasives
- La recherche d'anticorps est principalement indiquée pour le diagnostic des formes allergiques et chroniques d'aspergillose

Antigène galactomannane

- L'antigène galactomannane aspergillaire (GM) : un polymère de mannose et de galactose de la **paroi d' *Aspergillus sp.*** (dispersé sous **forme soluble** au cours de la prolifération du champignon en cours d'infection)
- **Sur le sérum (pvt de sang total sur tube sec stérile sous vide)**
- **et le LBA (récipient stérile)**, mais est également possible sur le LCR
- Techniques: EIA++ (Immuno-chromatographie existe)
- La recherche de GM sérique:
 - largement utilisée en **criblage systématique bihebdomadaire** pour le dépistage de l'aspergillose invasive chez le patient à haut risque (**patient neutropénique**)
 - de façon ponctuelle en cas de **suspicion chez les autres patients (non neutropéniques)** (sensibilité du dosage sur le sérum est faible) la **détection du GM dans le LBA** présente un intérêt, en complément des méthodes de mycologie classique (examen direct, culture).

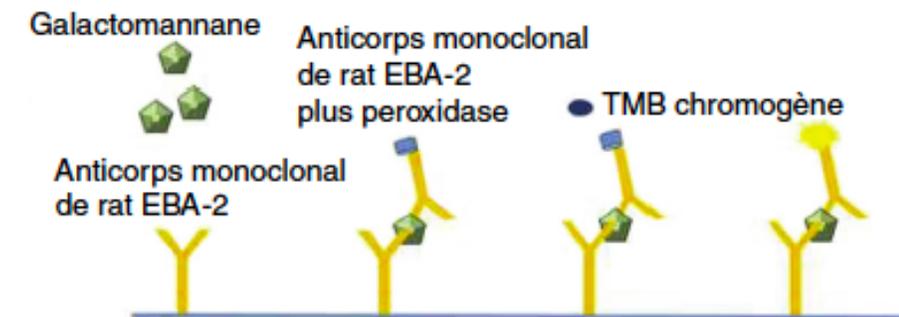
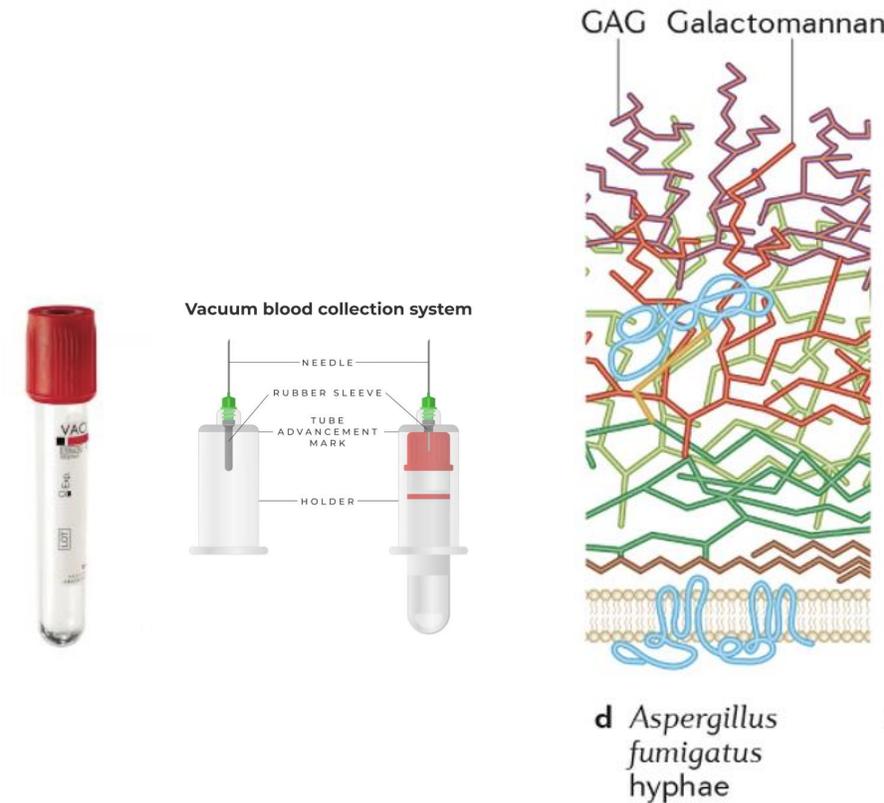


Figure 9.2. Principe du dosage du galactomannane.

Tableau 9.2. Récapitulatif qualité pour la recherche d'antigène aspergillaire (galactomannane).

Nature du prélèvement	Sérum, LBA
Recommandations pour la qualité du prélèvement	Les échantillons ne doivent pas être contaminés par des spores de champignon (prétraitement recommandé sous PSM2)
Conditions d'acheminement, milieux de transport	Transporter les échantillons dans des récipients scellés à l'abri de l'air
Mode de conservation	Sérum : +2 à +8°C pendant 5 jours avant réalisation du test ou congélation à -20°C LBA : +2 à +8°C pendant 24 heures avant réalisation du test ou congélation au minimum à -20°C
Principe méthodologique	Méthode ELISA sandwich après prétraitement. Les puits de la microplaque sont sensibilisés par des anticorps monoclonaux dirigés contre le GM d' <i>Aspergillus</i> . Les échantillons sérum et LBA sont traités à la chaleur en présence d'EDTA afin de dissocier les complexes immuns et de précipiter les protéines interférentes. Les échantillons traités et le conjugué sont ajoutés dans les puits sensibilisés par les Ac monoclonaux. Une solution de TMB (tétraméthylbenzidine) chromogène est ajoutée. Lors de la réaction avec les complexes liés au puits, une réaction colorimétrique se produit (figure 9.1). La lecture est réalisée par un spectrophotomètre
Type de méthode	Manuelle, colorimétrie Automatisable, sauf le prétraitement
Type de mesure	Quantitative
CIQ	Maison

Performances du test

La sensibilité, la spécificité, la VPP et la VPN varient selon les études, les populations de patients, le diagnostic retenu, la nature de l'échantillon et la prévalence de l'infection dans la population d'étude [2,4].

VPN > 98 % chez le patient neutropénique profond sans traitement prophylactique antifongique.

Cause d'erreur, limites du test

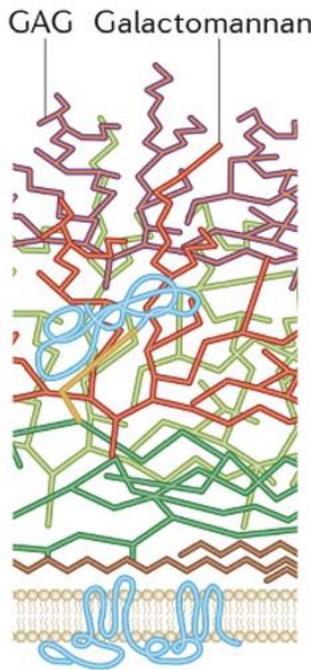
Un résultat négatif n'exclut pas un diagnostic d'aspergillose invasive.

Faux positifs : incidence plus élevée chez les nouveau-nés, jeunes enfants, patients recevant de l'amoxicilline ± pipéracilline/tazobactam, ou d'amoxicilline/acide clavulanique par voie parentérale, β-lactamines semi-synthétiques (certains lots).

Réaction croisée positive : patients dont la barrière intestinale peut être altérée (en particulier GVH de grade III ou IV) et ayant ingéré des céréales et leurs dérivés, des formulations à base de lait de vache. Patients recevant par voie parentérale ou par voie orale des produits contenant du GM (produit dont la fabrication nécessite la fermentation de micro-organismes fongiques).

Les résultats avec une valeur d'index proche du seuil de positivité du test (0,5 pour le sérum et entre 0,5 et 1 pour le LBA) doivent être confrontés aux données cliniques, radiologiques et biologiques.

- Aspergilloses pulmonaires invasives
 - Mortalité >50% (terrain sous-jacent +++)
- TERRAIN : **Facteurs liés à l'hôte +++** :
 - **Haut risque**
 - Greffe de moelle osseuse allogénique
 - PNN < 500 élts/mm³ pendant >10j
 - Corticothérapie à dose moyenne d'au moins 0,3mg/kg/j pd > 3semaines
 - Hémopathies (onco-hématologie)
 - Déficits immunitaires héréditaires (Granulomatose Septique Chronique)



d *Aspergillus fumigatus* hyphae

- GM dans le sang

- Sensibilité :

- Populations : Malades **d'hématologie+++**/malades transplantés d'organes/maladies systémiques/ttt corticoïdes/enfants

Cordonnier *Clin Microbiol Infect* 2009; 15 : 81-6

Husain *Am J Transplantation* 2004; 4 : 796-802

Guinea *Clin Microbiol Infect* 2010; 16 : 870-7

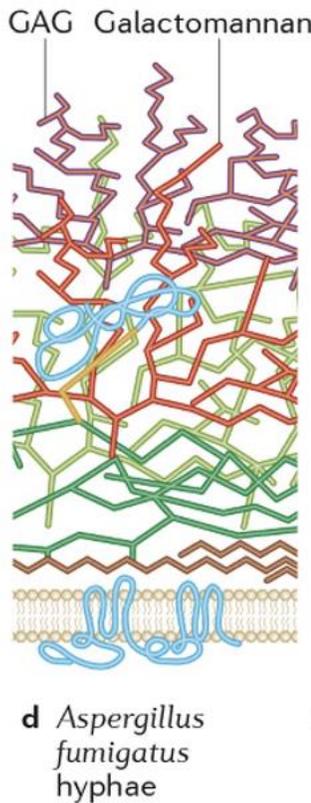
Sens de 93% chez le neutropénique, 70-92% chez les LA, 82-86% allogreffés , elle diminue sensiblement chez les autres malades.

Dépistage sérique ne doit être proposé qu'aux patients d'hématologie et non aux autres malades à risque chez qui on peut faire le dosage en cas de forte suspicion.

- Nombre de prélèvements : screening 2 fois/sem

Maertens *Blood* 2001; 97 : 1604-10

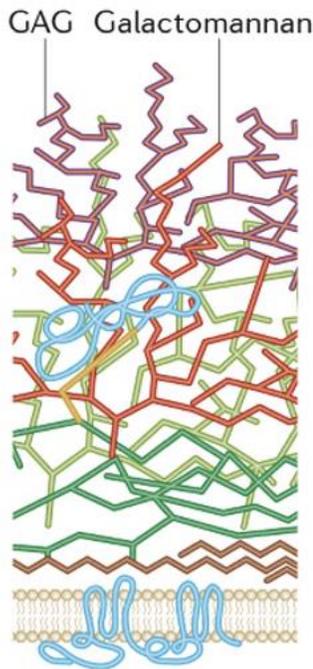
Suarez . *J Clin Microbiol* 2008; 46 : 3772-7



2019

Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium

J. Peter Donnelly,¹ Sharon C. Chen,² Carol A. Kauffman,³ William J. Steinbach,⁴ John W. Baddley,⁵ Paul E. Verweij,⁶ Cornelius J. Clancy,⁷ John R. Wingard,⁸ Shawn R. Lockhart,⁹ Andreas H. Groll,¹⁰ Tania C. Sorrell,¹¹ Matteo Bassetti,¹² Hamdi Akan,¹³ Barbara D. Alexander,¹⁴ David Andes,¹⁵ Elie Azoulay,¹⁶ Ralf Bialek,¹⁷ Robert W. Bradsher Jr,¹⁸ Stephane Bretagne,¹⁹ Thierry Calandra,²⁰ Angela M. Caliendo,²¹ Elio Castagnola,²² Mario Cruciani,²³ Manuel Cuenca-Estrella,²⁴ Catherine F. Decker,²⁵ Sujal R. Desai,²⁶ Brian Fisher,²⁷ Thomas Harrison,²⁸ Claus Peter Heussel,²⁹ Henrik E. Jensen,³⁰ Christopher C. Kibbler,³¹ Dimitrios P. Kontoyiannis,³² Bart-Jan Kullberg,³³ Katrien Lagrou,³⁴ Frédéric Lamothe,³⁵ Thomas Lehrnbecher,³⁶ Jurgen Loeffler,³⁷ Olivier Lortholary,³⁸ Johan Maertens,³⁹ Oscar Marchetti,⁴⁰ Kieren A. Marr,⁴¹ Henry Masur,⁴² Jacques F. Meis,⁴³ C. Orla Morrissey,⁴⁴ Marcio Nucci,⁴⁵ Luis Ostrosky-Zeichner,⁴⁶ Livio Pagano,⁴⁷ Thomas F. Patterson,⁴⁸ John R. Perfect,⁴⁹ Zdenek Racil,⁵⁰ Emmanuel Roilides,⁵¹ Marcus Ruhnke,⁵² Cornelia Schaefer Prokop,⁵³ Shmuel Shoham,⁵⁴ Monica A. Slavin,⁵⁵ David A. Stevens,⁵⁶ George R. Thompson III,⁵⁷ Jose A. Vazquez,⁵⁸ Claudio Viscoli,⁵⁹ Thomas J. Walsh,⁶⁰ Adilia Warris,⁶¹ L. Joseph Wheat,⁶² P. Lewis White,⁶³ Theoklis E. Zaoutis,⁶⁴ and Peter G. Pappas⁵

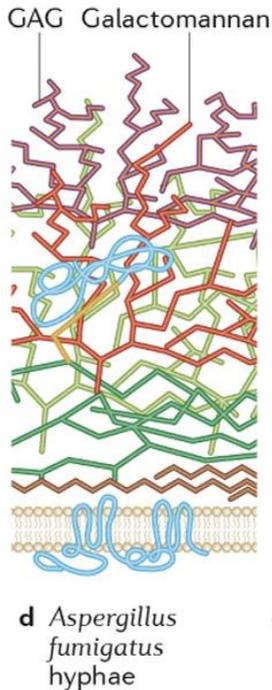


d *Aspergillus fumigatus* hyphae

- 1AA sérum ou plasma ≥ 1
- 1 AA LBA ≥ 1
- 1 AA LCR ≥ 1
- 1 AA sérum ou plasma $\geq 0,7$ et 1 AA LBA $\geq 0,8$

- Des défauts de spécificité liés à des faux positifs sont dus à de nombreux facteurs: 6-12%

- D'origine externe



- Galactomannane d'origine alimentaire (produits lactés+++)
- Alimentation parentérale
- ATB (l'administration concomitante de pénicillines hémisynthétiques contaminées par du GM (par exemple pipéracilline-tazobactam) (*Tazocilline*®))
- Réaction croisée avec d'autres champignons (*Penicillium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Cryptococcus*..)
- Réactions croisées au cours d'infections fongiques invasives rares (*Trichosporon* spp., champignons dimorphiques tels que *Histoplasma capsulatum*, *Talaromyces marneffe*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, etc.)
- Ig IV
- maladie du greffon contre l'hôte (GVH) digestives
- Enfants < 2 ans
- Aspergillose extra-pulmonaire

- D'origine int (technique elle-même : non reproductible dans 30% des cas)

Précautions+++ (tubes stériles en verre, signaler le ttt ATB, deux prélèvements consécutifs et répéter le dosage dans le même sérum ou sur un 2^{ème} pvt)

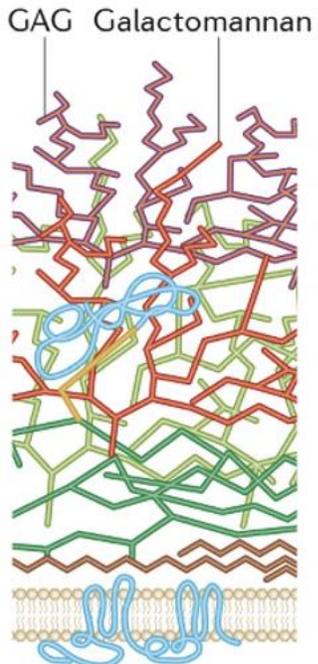
Une AA+ seule ne permet pas de distinguer colonisation d'infection

- L'antigénémie aspergillaire se positiverait pls jours avant l'apparition des signes cliniques et radiologiques au cours de la surveillance des patients à risque

J Clin Microbiol 1999;37:3223-8

Cancer 2001;91:311-8

screening 2 fois/sem chez les malades à risque

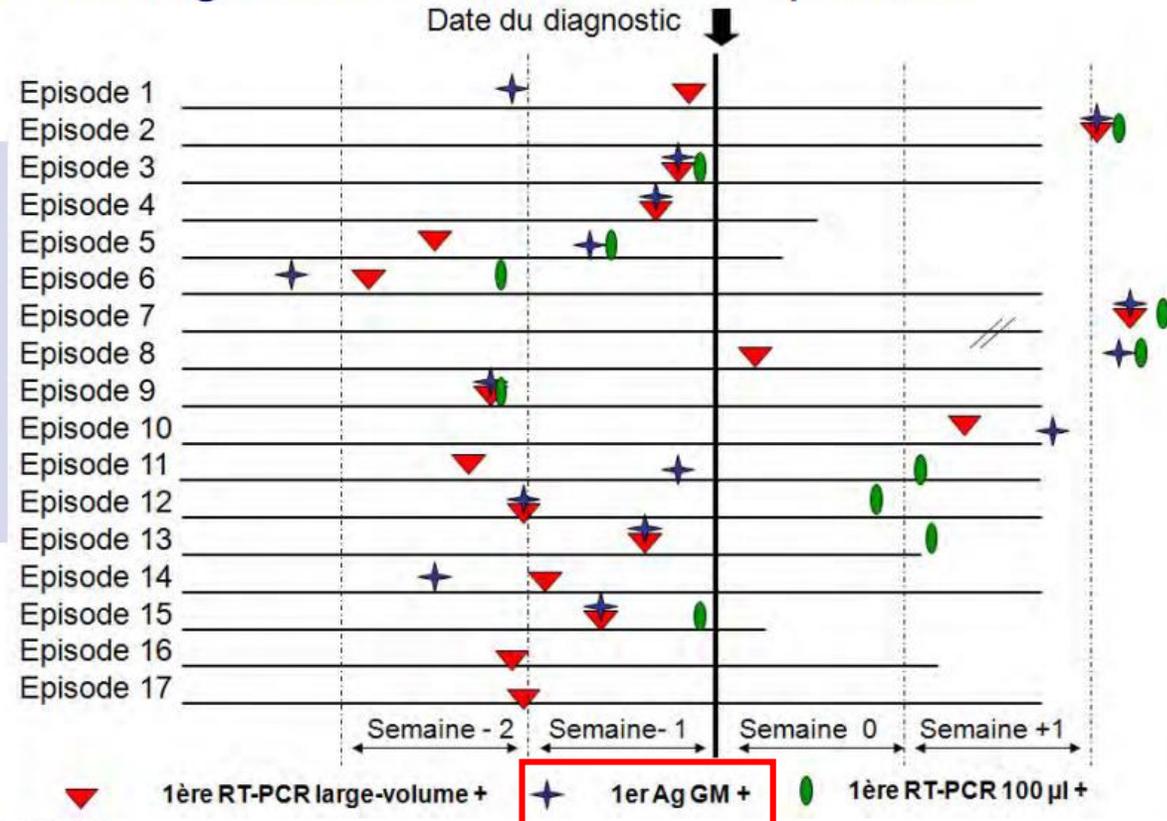


d *Aspergillus fumigatus* hyphae

Délai de positivité de la q-PCR et du GM en fonction de la date du diagnostic d'AI chez les 17 patients

PCR

PCR + :
 → Précède le diagnostic clinique : 13/ 17 cas AI
 → Précède la détection GM: 5 cas concomitant : 6 cas
 → seul marqueur sérique + AI : 2 cas



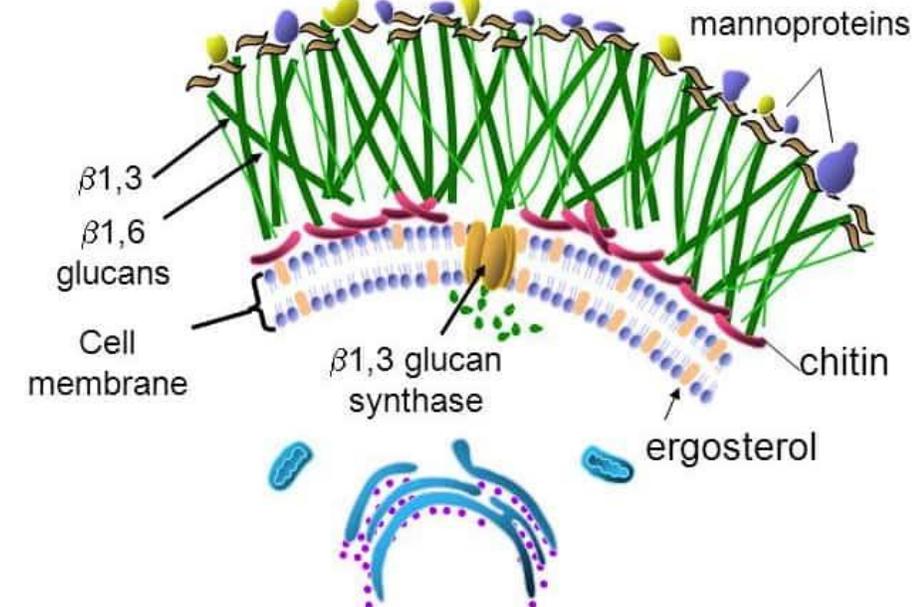
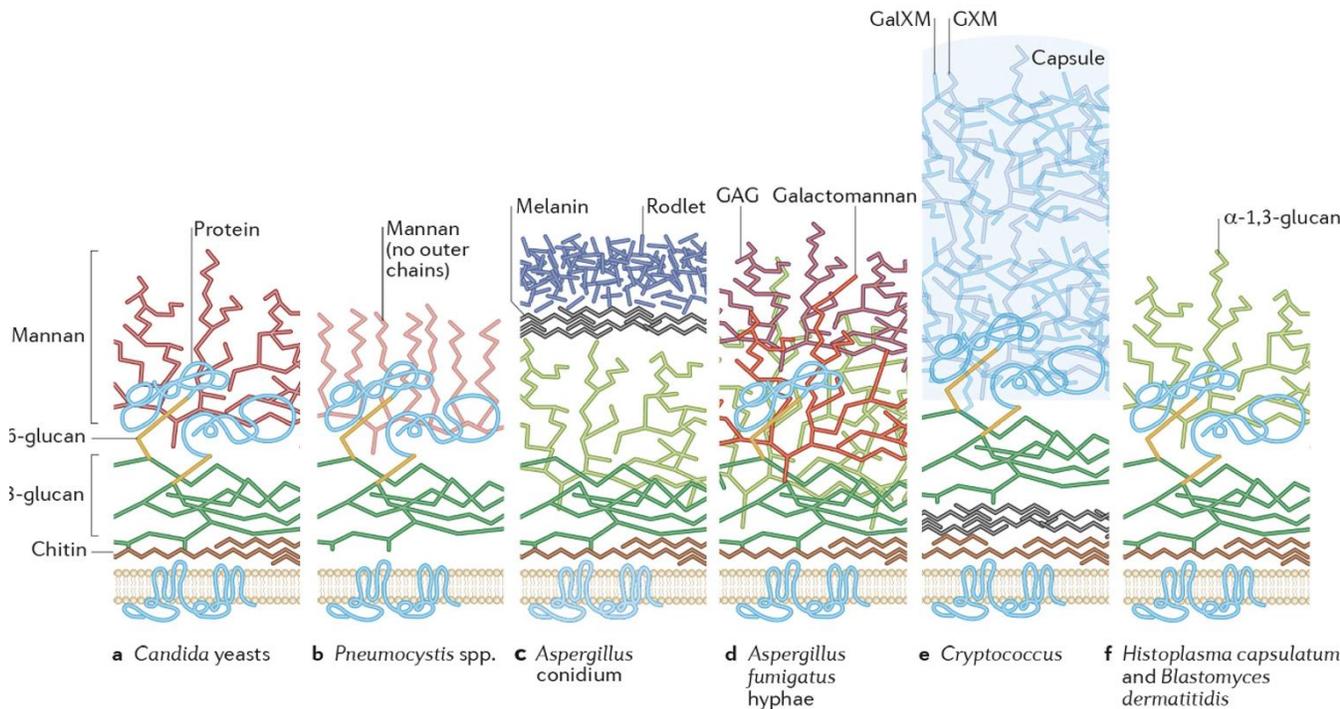
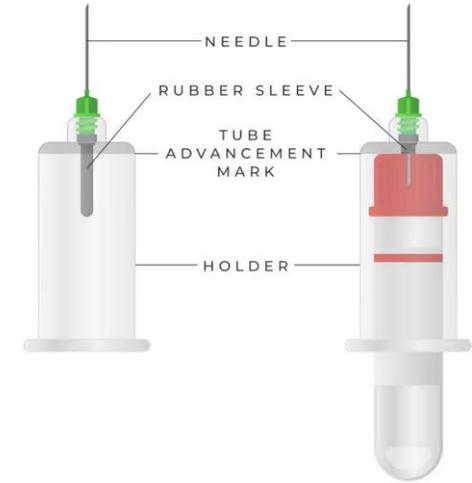
Suarez F et coll. JCM 2008

Antigène (1,3) β -D-glucane (BDG)

- Prélèvement de sang total sur tube stérile sous vide
- Il s'agit d'un polymère de glucose présent dans la paroi de nombreux champignons tels qu'*Aspergillus sp.*, *Candida sp.* et *Pneumocystis sp.* sauf *Cryptococcus* et Mucorales
- Non spécifique de l'aspergillose invasive.



Vacuum blood collection system



Antigène (1,3) β -D-glucane (BDG)

- Les tests commerciaux utilisent une **réaction protéase zymogène issue de la modification du mécanisme de lysat d'amœbocytes de limule** : cette réaction est mesurée en cinétique
- Sa réalisation nécessite des **précautions particulières** et l'usage de consommables exempts de glucane.
- La sensibilité pour le diagnostic d'aspergillose invasive est inférieure à celle du GM et varie entre 60 % et 80 %.



Vacuum blood collection system

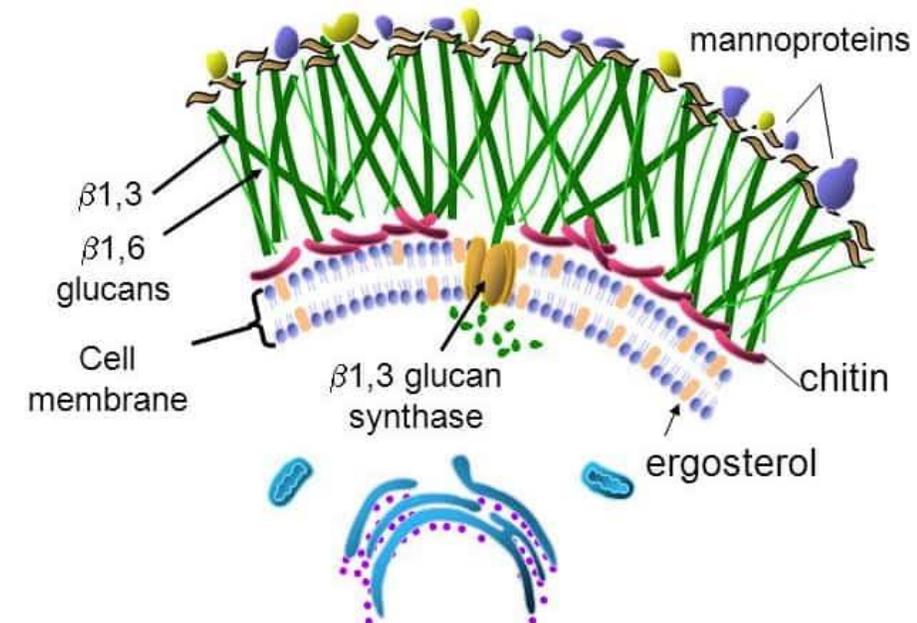
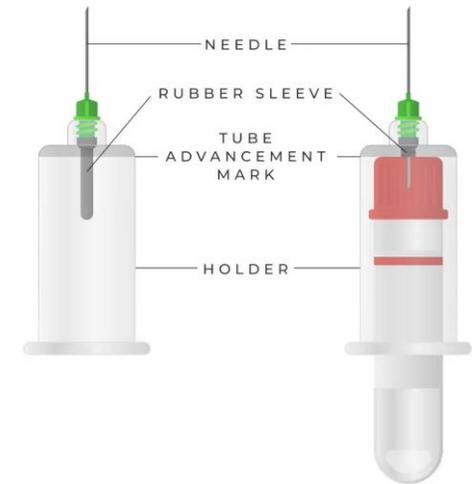


Tableau 9.5. Récapitulatif qualité pour la recherche de l'antigène 1,3-β-D-glucane.

Nature du prélèvement	Sérum
Recommandations pour la qualité du prélèvement	Le prélèvement doit être réalisé sur un tube sec et doit être décanté selon des procédures adaptées pour éviter les sources de contaminations
Conditions d'acheminement, milieux de transport	Réfrigéré (+2 à +8°C) ou congelé (-20°C)
Mode de conservation	Congelé (-20°C) (selon les recommandations du fournisseur)
Principe méthodologique	Réaction enzymatique révélée par méthode colorimétrique ou turbidimétrique, issue de la modification du mécanisme de lysat d'amœbocyte de limule Lecture en cinétique
Type de méthode	Manuelle, colorimétrie ou turbidimétrie, mesure en cinétique
Type de mesure	Quantitative (pg/mL). Seuils différents selon les kits
CIQ	Maison
EEQ	Oui
Performances du test	La sensibilité et la spécificité sont variables selon les études, les populations de patients et le diagnostic retenu [4,8]
Cause d'erreur, limites du test	Interférences : faux positifs – Hémodialyse en membrane de cellulose – Immunoglobulines IV – Albumine – Filtres de cellulose pour perfusion IV – Amoxicilline-acide clavulanique (IV) – Certaines bactériémies et compresses chirurgicales

Détection du (1,3) β -D-glucane (BDG) dans le sérum

- Des **faux positifs** sont observés fréquemment dans certaines situations : en **postchirurgie**, **dialyse** (en cas d'utilisation de membranes en cellulose) ou lors de l'administration **d'antibiotiques** ou encore lors de **sepsis bactériens**.

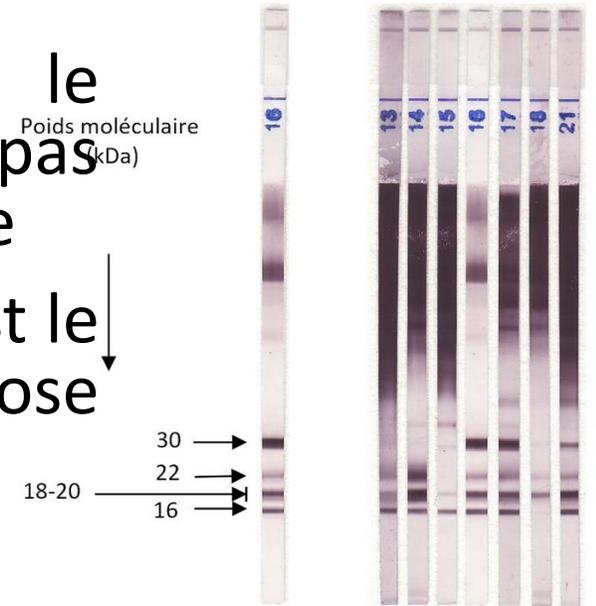
Tableau 2 Causes possibles de faux positif avec le test BG (d'après [37])

Liées à des traitements	Immunoglobulines intraveineuses Albumine Fractions plasmatiques Facteurs de la coagulation Antibiotiques : B-lactamines (pipéracilline + tazobactam) Autres (putatifs) : polysaccharides antitumoraux, chimiothérapies, radiothérapies
Liées au matériel de soins	Hémodialyse Compresse ou autre matériel contenant du BG Nature des tubes de prélèvements et le nombre de manipulations de ces tubes
Liées à des infections bactériennes	Bacilles Gram négatif Streptocoques
Liées au patient	Altérations muqueuses (chimiothérapies, irradiation) qui permettraient au BG des levures colonisant le tube digestif d'être absorbé Sérum hémolysé ou lipémique

VPN+++ infection fongique invasive

Méthodes de diagnostic indirect

- On commence par une **technique sensible** puis on **confirme** par le **Western blot**
- Plusieurs techniques (EIA, double diffusion, coélectrosynérèse, immunoélectrophorèse, et plus récemment Western Blot)
- Le Western Blot: sensibilité supérieure à 90 %, pour le diagnostic des aspergilloses chroniques ; il ne permet pas d'exclure les colonisations chroniques de l'arbre respiratoire
- La détection d'IgG et/ou de précipitines anti- *Aspergillus* est le test le plus sensible pour le diagnostic d'aspergillose chronique cavitaire



Sur le plan pratique:

- Aspergilloses pulmonaires chroniques (plusieurs entités)

Toux hémoptysie AEG

- Aspergillome pulmonaire
- L'aspergillose pulmonaire chronique cavitaire (APCC)
- L'aspergillose pulmonaire chronique fibrosante (APCF)
- Aspergillose pulmonaire semi-invasive ou Aspergillose pulmonaire chroniques nécrosante (APCN)



• Diagnostic des Aspergilloses pulmonaires chroniques

• Dg mycologique :

- Répéter les pvts +++
- PCR +++

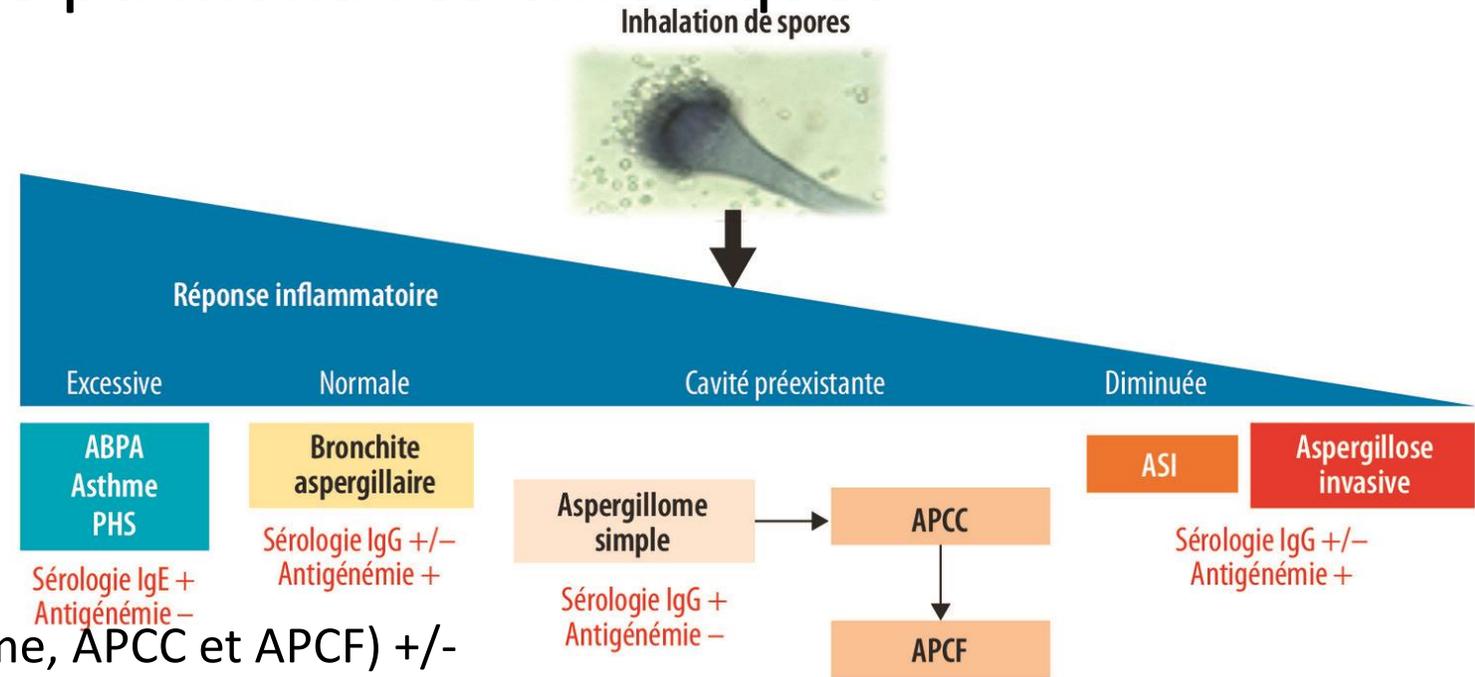
• Marqueurs sériques:

• Galactomannane

- Sur LBA +++
- Sur sérum -
- 1-3 β D glucane sérum (Aspergillome, APCC et APCF) +/-

• Sérologie:

- Aspergillome, APCC et APCF +++
- APCN +/-



ABPA : aspergillose bronchopulmonaire allergique ; APCC : aspergillose pulmonaire chronique cavitaire ; APCF : aspergillose pulmonaire chronique fibrosante ; ASI : aspergillose semi-invasive ; PHS : pneumopathie d'hypersensibilité.

Diagnostic d'Aspergillose pulmonaire invasive en onco-hématologie: Critères de l'EORTC chez

Clinical Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE



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

J. Peter Donnelly,¹ Sharon C. Chen,² Carol A. Kauffman,³ William J. Steinbach,⁴ John W. Baddley,⁵ Paul E. Verweij,⁶ Cornelius J. Clancy,⁷ John R. Wingard,⁸ Shawn R. Lockhart,⁹ Andreas H. Groll,¹⁰ Tania C. Sorrell,¹¹ Matteo Bassetti,¹² Hamdi Akan,¹³ Barbara D. Alexander,¹⁴ David Andes,¹⁵ Elie Azoulay,¹⁶ Ralf Bialek,¹⁷ Robert W. Bradsher Jr,¹⁸ Stephane Bretagne,¹⁹ Thierry Calandra,²⁰ Angela M. Caliendo,²¹ Elio Castagnola,²² Mario Cruciani,²³ Manuel Cuenca-Estrella,²⁴ Catherine F. Decker,²⁵ Sujal R. Desai,²⁶ Brian Fisher,²⁷ Thomas Harrison,²⁸ Claus Peter Heussel,²⁹ Henrik E. Jensen,³⁰ Christopher C. Kibbler,³¹ Dimitrios P. Kontoyiannis,³² Bart-Jan Kullberg,³³ Katrien Lagrou,³⁴ Frédéric Lamothe,³⁵ Thomas Lehrnbecher,³⁶ Jurgen Loeffler,³⁷ Olivier Lortholary,³⁸ Johan Maertens,³⁹ Oscar Marchetti,⁴⁰ Kieren A. Marr,⁴⁰ Henry Masur,⁴¹ Jacques F. Meis,⁴² C. Orla Morrissey,⁴³ Marcio Nucci,⁴⁴ Luis Ostrosky-Zeichner,⁴⁵ Livio Pagano,⁴⁶ Thomas F. Patterson,⁴⁷ John R. Perfect,¹⁴ Zdenek Racil,⁴⁸ Emmanuel Roilides,⁴⁹ Marcus Ruhnke,⁵⁰ Cornelia Schaefer Prokop,⁵¹ Shmuel Shoham,⁴⁰ Monica A. Slavin,⁵² David A. Stevens,⁵³ George R. Thompson III,⁵⁴ Jose A. Vazquez,⁵⁵ Claudio Viscoli,⁵⁶ Thomas J. Walsh,⁵⁷ Adilia Warris,⁵⁸ L. Joseph Wheat,⁵⁹ P. Lewis White,⁶⁰ Theoklis E. Zaoutis,⁶¹ and Peter G. Pappas⁵

Donnelly J.P., Chen S.C., Kauffman C.A., 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: pp. 1367-1376.

Diagnostic de l'Aspergillose invasive :difficile

- Classification des API (EORTC/MSG):
 - API possible
 - 1 Facteur lié à l'hôte + 1 critère clinique (clinico-Rx) **sans** critère microbiologique
 - API probable
 - 1 Facteur lié à l'hôte + 1 critère clinique (Rx+++)
 - + 1 critère microbiologique (isolement et identification du champignon ou **PCR+** dans les prélèvements respiratoires y compris le LBA, AA+)
 - API prouvée
 - Examen anapath (**ou ED**) montrant la présence de filaments mycéliens **et** culture positive à *Aspergillus* dans un prélèvement stérile (PTP ou biopsie) **ou PCR *Aspergillus* + dans un prélèvement stérile (PTP ou biopsie)**

De Pauw et al. CID 2008; 46 : 1813-21

IDSA 2019

Table 1. Criteria for Proven Invasive Fungal Disease

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

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

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

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

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

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

Table 2. Probable Invasive Pulmonary Mold Diseases

Host factors
Recent history of neutropenia ($<0.5 \times 10^9$ neutrophils/L [<500 neutrophils/ mm^3] for >10 days) temporally related to the onset of invasive fungal disease
Hematologic malignancy ^a
Receipt of an allogeneic stem cell transplant
Receipt of a solid organ transplant
Prolonged use of corticosteroids (excluding among patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis) at a therapeutic dose of ≥ 0.3 mg/kg corticosteroids for ≥ 3 weeks in the past 60 days
Treatment with other recognized T-cell immunosuppressants, such as calcineurin inhibitors, tumor necrosis factor- α blockers, lymphocyte-specific monoclonal antibodies, immunosuppressive nucleoside analogues during the past 90 days
Treatment with recognized B-cell immunosuppressants, such as Bruton's tyrosine kinase inhibitors, eg, ibrutinib
Inherited severe immunodeficiency (such as chronic granulomatous disease, STAT 3 deficiency, or severe combined immunodeficiency)
Acute graft-versus-host disease grade III or IV involving the gut, lungs, or liver that is refractory to first-line treatment with steroids

Clinical features

Pulmonary aspergillosis

The presence of 1 of the following 4 patterns on CT:

Dense, well-circumscribed lesions(s) with or without a halo sign

Air crescent sign

Cavity

Wedge-shaped and segmental or lobar consolidation

Other pulmonary mold diseases

As for pulmonary aspergillosis but also including a reverse halo sign

Tracheobronchitis

Tracheobronchial ulceration, nodule, pseudomembrane, plaque, or eschar seen on bronchoscopic analysis

Sino-nasal diseases

Acute localized pain (including pain radiating to the eye)

Nasal ulcer with black eschar

Extension from the paranasal sinus across bony barriers, including into the orbit

Central nervous system infection

1 of the following 2 signs:

Focal lesions on imaging

Meningeal enhancement on magnetic resonance imaging or CT

Mycological evidence

Any mold, for example, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* species or Mucorales recovered by culture from sputum, BAL, bronchial brush, or aspirate

Microscopical detection of fungal elements in sputum, BAL, bronchial brush, or aspirate indicating a mold

Tracheobronchitis

Aspergillus recovered by culture of BAL or bronchial brush

Microscopic detection of fungal elements in BAL or bronchial brush indicating a mold

Sino-nasal diseases

Mold recovered by culture of sinus aspirate samples

Microscopic detection of fungal elements in sinus aspirate samples indicating a mold

Aspergillosis only

Galactomannan antigen

Antigen detected in plasma, serum, BAL, or CSF

Any 1 of the following:

Single serum or plasma: ≥ 1.0

BAL fluid: ≥ 1.0

Single serum or plasma: ≥ 0.7 and BAL fluid ≥ 0.8

CSF: ≥ 1.0

Aspergillus PCR

Any 1 of the following:

Plasma, serum, or whole blood 2 or more consecutive PCR tests positive

BAL fluid 2 or more duplicate PCR tests positive

At least 1 PCR test positive in plasma, serum, or whole blood and 1 PCR test positive in BAL fluid

Aspergillus species recovered by culture from sputum, BAL, bronchial brush, or aspirate

Probable invasive fungal diseases (IFD) requires the presence of at least 1 host factor, a clinical feature and mycologic evidence and is proposed for immunocompromised patients only, whereas proven IFD can apply to any patient, regardless of whether the patient is immunocompromised. Probable IFD requires the presence of a host factor, a clinical feature, and mycologic evidence. Cases that meet the criteria for a host factor and a clinical feature but for which mycological evidence has not been found are considered possible IFD. (1,3)-beta-D glucan was not considered to provide mycological evidence of any invasive mold disease.

Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; CSF, cerebrospinal fluid; CT, computed tomography; PCR, polymerase chain reaction.

^aHematologic malignancy refers to active malignancy, in receipt of treatment for this malignancy, and those in remission in the recent past. These patients would comprise largely acute leukemias and lymphomas, as well as multiple myeloma, whereas patients with aplastic anemia represent a more heterogeneous group of individuals and are not included.

CSF: ≥ 1.0

Aspergillus PCR

Any 1 of the following:

Plasma, serum, or whole blood 2 or more consecutive PCR tests positive

BAL fluid 2 or more duplicate PCR tests positive

At least 1 PCR test positive in plasma, serum, or whole blood and 1 PCR test positive in BAL fluid

Aspergillus species recovered by culture from sputum, BAL, bronchial brush, or aspirate

Probable invasive fungal diseases (IFD) requires the presence of at least 1 host factor, a clinical feature and mycologic evidence and is proposed for immunocompromised patients only, whereas proven IFD can apply to any patient, regardless of whether the patient is immunocompromised. Probable IFD requires the presence of a host factor, a clinical feature, and mycologic evidence. Cases that meet the criteria for a host factor and a clinical feature but for which mycological evidence has not been found are considered possible IFD. (1,3)-beta-D glucan was not considered to provide mycological evidence of any invasive mold disease.

Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; CSF, cerebrospinal fluid; CT, computed tomography; PCR, polymerase chain reaction.

^aHematologic malignancy refers to active malignancy, in receipt of treatment for this malignancy, and those in remission in the recent past. These patients would comprise largely acute leukemias and lymphomas, as well as multiple myeloma, whereas patients with aplastic anemia represent a more heterogeneous group of individuals and are not included.

Tableau 1.
Pertinence des différentes stratégies diagnostiques en fonction du contexte clinique.

	Aspergillome/aspergillose localisée	Aspergillose invasive	Aspergilloses immunoallergiques		
			ABPA	Asthme allergique	Alvéolite allergique extrinsèque
Examen direct	+	+	±		
Culture mycologique					
Histologie					
PCR sur tissu					
Détection d'antigènes sériques (galactomannane et β -(1,3)-D-glucane)		+			
Détection d'ADN fongique circulant		+			
Détection d'anticorps IgG circulants	+	± a posteriori	+		+
Marqueurs non spécifiques (éosinophilie sanguine et IgE totales)			+	+	

ABPA : aspergillose bronchopulmonaire allergique ; ADN : acide désoxyribonucléique ; IgG/IgE : immunoglobulines G/E ; PCR : *polymerase chain reaction*.

Principales indications des tests diagnostiques

		Mise en évidence du champignon (mycologie, histologie, biologie moléculaire)	Détection d'anticorps circulants	Détection d'antigènes circulants	Marqueurs non spécifiques (éosinophilie, et IgE totales)
Aspergillome		+	++		
Aspergillose localisée		+	+		
Aspergillose invasive		+	+/-	+	
Aspergilloses immuno-allergiques	ABPA	+/-	+		+
	Asthme				+
	Alvéolite allergique extrinsèque		+		

Conclusion

- Les champignons du genre *Aspergillus* sont responsables d'un large spectre de pathologies
- Le diagnostic des aspergilloses nécessite une **collaboration étroite entre biologistes et cliniciens**
- La phase préanalytique: la qualité du prélèvement+++



An anatomical illustration of the human respiratory system, showing the lungs, heart, and trachea. A circular inset on the right side provides a magnified view of a bronchus, which is heavily infected with a dense cluster of red, spherical fungal spores. The background is a dark green gradient.

Merci pour votre attention