



Outils pour le diagnostic et le suivi des Infections fongiques invasives chez les patients immunodéprimés

Pr B.LMIMOUNI

Service de Parasitologie Mycologie, HMIMV, Rabat

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohamed V, Rabat



Conflits d'intérêt: Aucun



INTRODUCTION

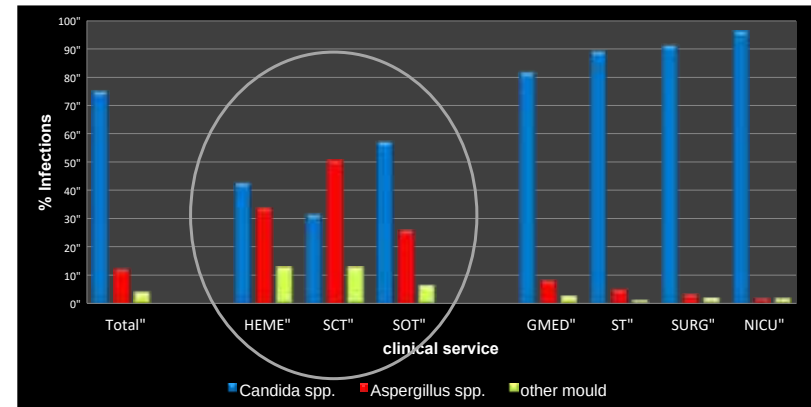
- Modifications des pratiques médicales en 25 ans (Antibiothérapie à large spectre, techniques invasives, chimiothérapie, greffe et transplantations, immunosuppresseurs, VIH)
 - ↗ De la survie de cette population à risque
 - Changement radical et récent dans différents aspects de l'épidémiologie et la prise en charge des IFI
- Nouvelles molécules antifongiques ➔ spectres plus spécifiques
- Amélioration de l'évaluation et de la stratification du risque d'IF chez le patient immunodéprimé



Pour une meilleure prise en charge:

- **Les infections fongiques à documenter:** Epidémiologie des IFI
- **Les outils disponibles:** Valeurs diagnostiques et intérêt dans le suivi des IFI

Distribution of invasive fungal pathogens based on the clinical service or the underlying patient condition



From D. Horn et al., CID 2009 ; D. Neofytos et al., CID 2009



■ Diagnostic mycologique:

- **Précoce:** retard de 12 à 48h à l'administration des ATF associé à une augmentation de la mortalité (Garey K, CID 2006; Labelle A, Crit Care Med 2008)
- **Précis:** patients ayant reçu un traitement ATF adéquat: augmentation de la survie (Morell M, AAC 2005; Parkins M, JAC 2007)

La **documentation** de l'IFI permet d'utiliser d'emblée un traitement ATF adapté et efficace → **Facteur pronostic essentiel**

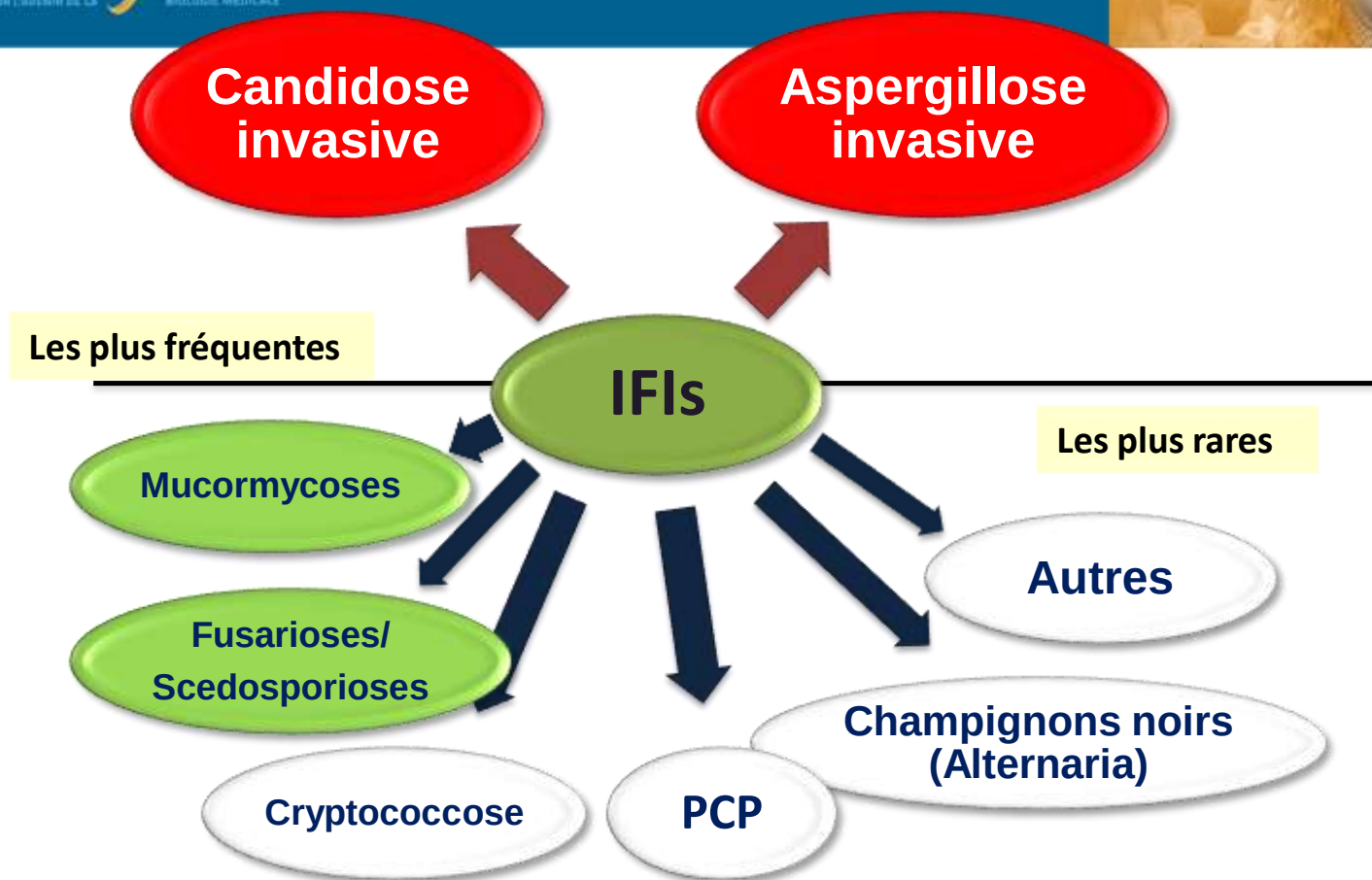
Documentation de nombreuses IFI
toujours insuffisante

D. Neofytos et al., CID 2009

Distribution des espèces d'*Aspergillus* isolées chez des patients AI après greffe de moelle (HCT) ou transplantation (SOT)

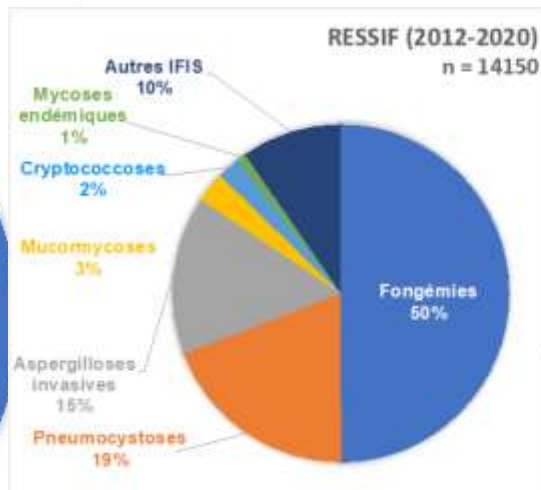
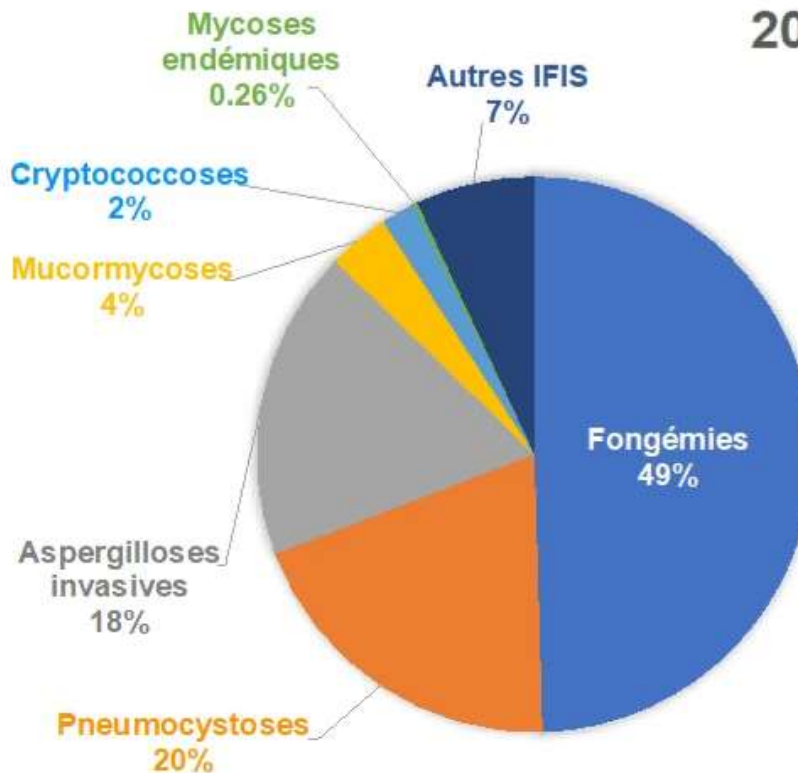
<i>Aspergillus</i> spp.	HCT (n=219)	SOT (n=228)
<i>A. fumigatus</i>	36.9	61.7
<i>A. flavus</i>	3.4	10.2
<i>A. niger</i>	3.4	10.2
<i>A. terreus</i>	0.6	3.1
other spp.	3.4	7.8
unknown spp.*	52.3	7

* Différents par morphologie ou par détecteur de marqueurs moléculaires

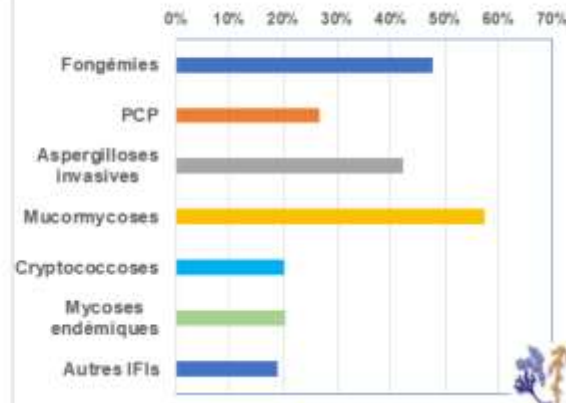




2020



Mortalité globale à 3 mois





HISTOPATHOLOGIE

IMAGERIE

**TOUTES LES PROCEDURES ONT
DES LIMITES
→ COMBINAISONS**

ED/CULTURE

**DIAGNOSTIC
INDIRECT**



Critères diagnostiques des IFI

- Difficultés diagnostiques
- Consensus international
- EORTC et mycoses study group
 - IFI prouvée
 - IFI probable
 - IFI possible

A Clinical Algorithm to Diagnose Invasive Pulmonary Aspergillosis in Critically Ill Patients

Stijn I. Blot¹, Fabio Silvio Taccone², Anne-Marie Van den Abeele³, Pierre Bulpa⁴, Wouter Meersseman⁵,
Nefie Brusselaers¹, George Dimopoulos⁶, José A. Paiva⁷, Benoit Misset⁸, Jordi Rello⁹,
Koenraad Vandewoude¹, Dirk Vogelaers¹, and the AspiCU Study Investigators*

Rev Med J 2007; 107: 763-769
DOI: 10.1007/s00135-006-0000-0
Copyright © 2006, Elsevier Ltd 2007

REVIEW

Invasive pulmonary aspergillosis in patients
with chronic obstructive pulmonary disease

P. Bulpa*, A. Dive* and Y. Sibille*



Revised Definitions of Invasive Fungal Disease
from the European Organization for Research
and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections
Cooperative Group and the National Institute
of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study
Group (EORTC/MSG) Consensus Group

Deo De Pauw,¹ Thomas J. Walsh,² J. Peter Donnelly,³ David A. Stevens,⁴ John E. Edwards,⁵ Thierry Colanthe,⁶
Peter G. Pappas,⁷ Johna Maertens,⁸ Olivier Lortholary,⁹ Carol A. Knaflitz,¹⁰ David W. Denning,¹¹ Thomas E. Patterson,¹²
Gregory Monconney,¹³ Jacques Bille,¹⁴ William E. Dismukes,¹⁵ Raula Hedderich,¹⁶ William W. Hope,¹⁷ Christopher C. Kibbler,¹⁸
Bart Jan Kullberg,¹⁹ Klaus A. Marr,²⁰ Patricia Maizus,²¹ Frank C. Odds,²² John R. Perfect,²³ Angela Restrepo,²⁴
Markus Ruhnke,²⁵ Erwin H. Sogal,²⁶ Jack D. Sobel,²⁷ Tania C. Sorrell,²⁸ Claudio Viscoli,²⁹ John R. Wingard,³⁰
Theodore Zenilts,³¹ and John E. Bennett*

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 Thomas J. Walsh,² Carol A. Knaflitz,³ William E. Dismukes,⁴ John M. Baddley,⁵ Paul G. Verweij,⁶ Gervasio J. Llanos,⁷ John R. Wingard,⁸
Shane N. Lockhart,⁹ Andreas H. Groll,¹⁰ Tania C. Sorrell,¹¹ Matteo Bassetti,¹² Harold Alsa,¹³ Barbara G. Alexander,¹⁴ David Andes,¹⁵ Clin Kibbler,¹⁶
Ralf Ruhnke,¹⁷ Robert M. Bruchner,¹⁸ Stephen D. Douglas,¹⁹ Henry Lichten,²⁰ Angela M. Groll,²¹ Clin Kibbler,²² Maria G. Groll,²³
Maurice Taveres-Davies,²⁴ Catherine F. Desjardins,²⁵ David R. Brown,²⁶ David Fisher,²⁷ Thomas Harrison,²⁸ Cesar Poma-Romero,²⁹ David E. Jensen,³⁰
Christopher C. Kibbler,³¹ Benjamin F. Knaflitz,³² Bart Jan Kullberg,³³ Erika Lagan,³⁴ Frederic Lemaire,³⁵ Thomas Lortholary,³⁶ Jozsef Lortholary,³⁷
Olivier Lortholary,³⁸ Johna Maertens,³⁹ Raula Hedderich,⁴⁰ Klaus A. Marr,⁴¹ Henry Maizus,⁴² Jacques I. Bille,⁴³ C. Edin Maizus,⁴⁴ Maurice Maizus,⁴⁵
Louis Oryshak-Denis,⁴⁶ Lora Pappas,⁴⁷ Thomas E. Patterson,⁴⁸ John R. Perfect,⁴⁹ Zdenek Ruzic,⁵⁰ Emmanuel Sifakis,⁵¹ Markus Ruhnke,⁵²
Gervasio J. Llanos,⁵³ David A. Stevens,⁵⁴ George K. Thompson III,⁵⁵ John A. Vazquez,⁵⁶ Claudio Viscoli,⁵⁷
Thomas J. Walsh,⁵⁸ Adria Wiersma,⁵⁹ L. Joseph Wiersma,⁶⁰ F. Leora Wiersma,⁶¹ David W. Denning,⁶² and Peter G. Pappas*

Ascioglu, CID 2002
De Pauw, CID 2008
Bulpa P, Eur Respir J 2007
Donnelly JP, CID 2020



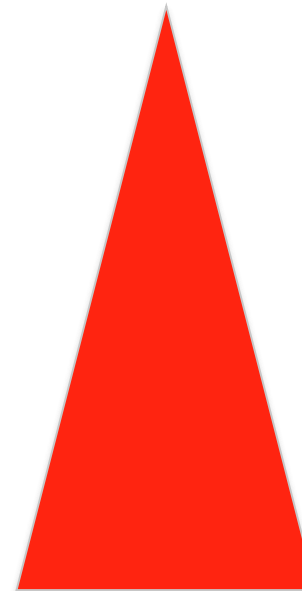
IFI Prouvée

IFI Probable

IFI Possible



**Probabilité
de l'infection**



**Rapidité du Traitement
AF**

Proven IFI

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 *Blastobotrys mycelii* may also form pseudohyphae or true hyphae.

Donnelly JP, CID 2020

***Aspergillus* in blood cultures should always be considered as contamination!!!**

Outils pour le diagnostic et le suivi des Infections fongiques invasives chez les patients immunodéprimés



Candidemia
Host factors
Recent history of neutropenia ($<15 \times 10^9$ neutrophils/L, <500 neutrophils/mm ³) for <15 days temporally related to the onset of invasive fungal disease
Hematologic malignancy
Receipt of an allogeneic stem cell transplant
Solid organ transplant recipient
Prolonged use of corticosteroids resulting among patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis at a therapeutic dose of ≥ 15.7 mg/kg or intravenous for ≥ 3 weeks in the past 90 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
Infected device (intracatheter) such as chronic granulomatous disease, STAT 3 deficiency, CARD deficiency, STAT1 gene mutation, 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
At least 1 of the following 2 criteria after an episode of candidemia within the previous 2 weeks:
Small, target-like lesions in liver or spleen 3-5 mm in diameter or in the lungs, ie, punched-out lesions
Progressive renal dysfunction or visual dysfunction on ophthalmologic examination
Mycological evidence
1,3- β -D-glucan (Fungitell) ≥ 80 ng/L (ng/mL) detected in at least 2 consecutive serum samples provided that other organisms have been excluded
(Positive T2/Gelatin)
Cryptococcosis
Host factors
Human immunodeficiency virus infection
Solid organ or stem cell transplant recipient
Hematologic malignancy
Antibody deficiency (eg, congenital variable immunoglobulin deficiency, immunosuppressive therapy including monoclonal antibodies)
End-stage liver or renal disease
Isolated, CD4 lymphocyte count
Clinical features
Meningeal inflammation
Neurological signs consistent with cryptococcal disease
Mycological evidence
Recovery of <i>Cryptococcus</i> from a specimen obtained from any vertebrate site
Pneumocystosis
Host factors
Low CD4 lymphocyte counts (<350 cells/mm ³ ($<10^6$ cells/L) to any degree)
Exposure to medication (antipneumocystis therapy, antimetabolites) or immunosuppressive treatment associated with T-cell dysfunction
Use of therapeutic doses of ≥ 1 mg/kg prednisone equivalent for ≥ 2 weeks in the past 90 days
Solid organ transplant
Clinical features
Any consistent radiographic features (peripherally bilateral ground glass opacities, consolidations, small nodules or unilateral infiltrates) (bilateral infiltrates, nodules without or without cavitation, nodular infiltrates, nodular pattern)
Respiratory symptoms with cough, dyspnea, and hypoxemia accompanying radiographic abnormalities including consolidations, small nodules, unilateral infiltrates, pleural effusions, or cystic lesions on chest X-ray or computed tomography scan

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
Receipt of an allogeneic stem cell transplant
Receipt of a solid organ transplant
Prolonged use of corticosteroids (exceeding among patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis at a therapeutic dose of ≥ 15.7 mg/kg or corticosteroids for >3 weeks in the past 90 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
Isolated 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 3 patterns on CT:
Damers, well-circumscribed lesion(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
Tracheobronchovascular ulceration, nodules, pleuropulmonary plaque, or nodular lesion 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, <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Scedosporium</i> species or <i>Mucorales</i> recovered by culture from sputum, BAL, bronchial brush, or aspirate
Microscopic detection of fungal elements in sputum, BAL, bronchial brush, or aspirate indicating a mold
Tracheobronchitis
<i>Aspergillus</i> 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
Nitrogen 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

Mycological evidence
1,3- β -D-glucan (Fungitell) ≥ 80 ng/L (ng/mL) detected in ≥ 2 consecutive serum samples provided other etiologies have been excluded
Detection of <i>Aspergillus</i> species DNA by quantitative real-time polymerase chain reaction in a respiratory tract specimen
Endemic mycoses
Host factors
Not applicable as these diseases affect both healthy and less healthy hosts
Clinical features
Evidence for geographical or occupational exposure (including removal) to the fungus and compatible clinical illness
Mycological evidence
Histoplasma or Blastomyces antigen in urine, serum, or body fluid
Antibody to <i>Coccidioides</i> in cerebrospinal fluid or 2-fold rise in 2 consecutive serum samples
Probable invasive fungal disease (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 invasive fungal disease can apply to any patient, regardless of whether the patient is immunocompromised. Except for endemic mycoses, probable IFD requires the presence of a host factor, a clinical feature, and mycologic evidence, whereas cases that meet the criteria for a host factor and a clinical feature but for which mycologic evidence has not been found are considered possible IFD.
*T2/Gelatin is a US Food and Drug Administration approved for the detection of <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida lusitana</i> , and <i>Candida glabrata</i> in blood.
*Cryptococcosis also occurs in phenotypically normal hosts.
*Definitions for human immunodeficiency virus-associated pneumocystosis are not included here.
*Bilateral, diffuse ground glass opacities with interstitial infiltrates are more common than other features such as consolidations, small nodules, thin-walled cavities, and unilateral infiltrates.

Microscopie/culture

Biomarqueurs

CSF: ≥ 1.0
Ispergillus 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
<i>Ispergillus</i> species recovered by culture from sputum, BAL, bronchial brush, or aspirate
Probable invasive fungal diseases (IFD) requires the presence of at least 1 host factor, a clinical feature and mycologic evidence and is proposed for immunocompromised patients only, whereas proven IFD can apply to any patient, regardless of whether the patient is immunocompromised. Probable IFD requires the presence of a host factor, a clinical feature, and mycologic evidence. Cases that meet the criteria for a host factor and a clinical feature but for which mycologic evidence has not been found are considered possible IFD. (1,3)- β -D glucan was not considered to provide mycologic evidence of any invasive mold disease.
Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; CSF, cerebrospinal fluid; CT, computed tomography; PCR, polymerase chain reaction.
Hematologic malignancy refers to active malignancy, in receipt of treatment for this malignancy, and those in remission in the recent past. These patients would comprise largely acute leukemias and lymphomas, as well as multiple myeloma, whereas patients with plasmic anemia represent a more heterogeneous group of individuals and are not included.

Probable IFI

Donnelly JP, CID 2020



Critères diagnostiques des IFI

- 1 critère d'hôte $\longrightarrow$ TTT prophylactique
- +
- 1 critère « clinique »
- +
- 1 critère mycologique fort (Histologie ou site stérile ou Ag crypto dans LCR) =
IFI prouvée: TTT documenté
- 1 critère mycologique moyen (ED, Culture, GM, BDG)= IFI probable:
TTT préemptif
- Aucun critère mycologique = IFI possible: TTT probabiliste / empirique



Les moyens diagnostiques

- **Diagnostic direct**
 - Mise en évidence du champignon: **cytologie, ED et culture**
- **Diagnostic indirect**
 - **Polysaccharides de l'enveloppe (paroi, capsule)**
 - **Détection d'antigènes spécifiques**
 - Galactomannane (sérum, LBA, LCR) → (*Aspergillus*)
 - Ag glucuronoxylomannane (GXM) → (*Cryptococcus neoformans*)
 - Ag mannane → (*Candida*)
 - **Détection antigène « pan fongique »** Bêta (1-3) D-glucane (sérum) → (*Aspergillus* et *Candida*)
 - **Détection anticorps** Ac anti-mannanes et Ac anti-aspergillus → (*Aspergillus* et *Candida*)



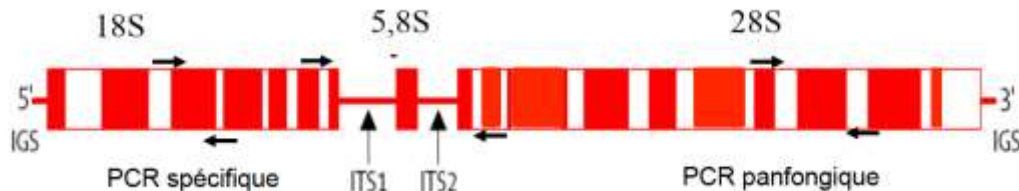
- **Diagnostic indirect**

- **Détection ADN fongique (LBA et sérum) :** PCR spécifiques (*Aspergillus*, *Mucorales*, *Candida*, *Pneumocystis*) et PCR « pan fongique » (ITS/28S)

Plusieurs options

- **PCR panfongique :**
PCR standard + séquençage
- **PCR plusieurs espèces.**
 - PCR quantitative + séquençage
 - PCR multiplex
- **PCR spécifique d'espèce :**
 - PCR quantitative

→ amorces consensus : régions conservées présentes chez tous les champignons PCR ITS et 28S
→ amorces judicieusement choisies régions conservées entre plusieurs espèces fongiques
→ amorces spécifiques : régions spécifiques d'une espèce



Sous unités
(18S; 5,8S; 28S)
régions conservées
et régions variables
spécifiques d'espèce



Examen Direct / Histologie

Méthodes	Use	Commentaires
Gram	Bactérie et champignons	Non recommandée
KOH + Calcofluor + Sérum physiologique	Tout champignon	Non spécifique
Encre de chine	Levure encapsulée	<i>C. neoformans</i> (LCR) Sensibilité (40%)
Giemsa	BM and LRT samples	Histoplasmoses et <i>P. jirovecii</i>
Cytologie / Histologie	PAS Grocott	Non spécifique Spécifique

- Rapide, simple, pas cher
- **Peu sensible, pas d'identification d'espèces**
- Très important pour prendre une décision dans des situations d'urgence (suspicion de mucormycose rhino-orbital)

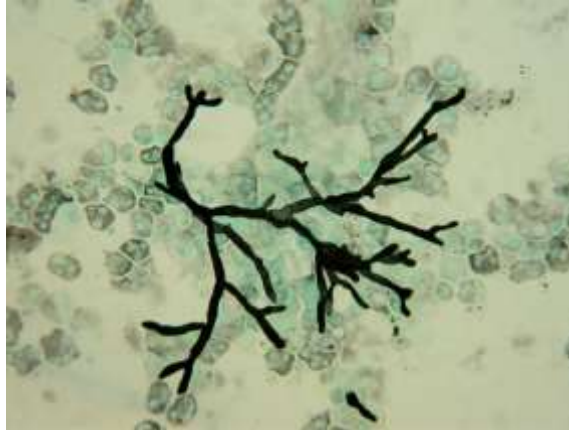
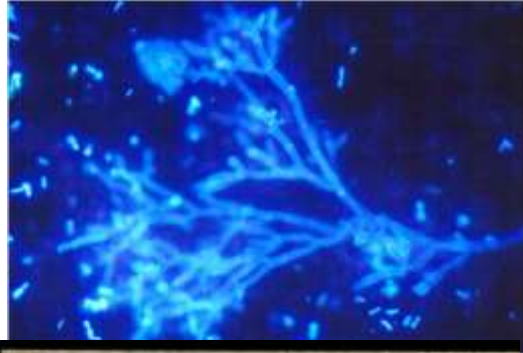


ED et Histologie

Sensibilité 80%

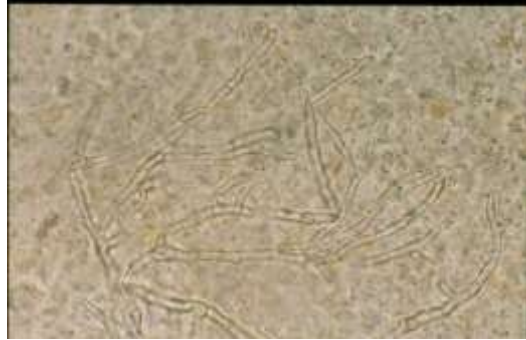
- Coloration non spécifique des champignons
 - Aspects morphologiques des filaments ++++
- Filaments septés de 2 à 5 μm de diamètre avec branchements à 45° (Type *Aspergillus*)
- Ne permet pas de différencier les différentes espèces de *Aspergillus*
 - Ne permet pas de séparer d'autres champignons filamenteux septés (*Scedosporium* sp., *Fusarium* sp.)
- Filaments non septés (type Mucorale)
- Filaments pigmentés (*Alternaria* sp. Ch noires)
- Pseudo filaments : levures

Examen Direct



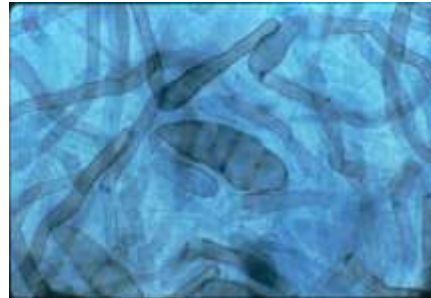
NON-SEPTEE

Mucorales



Aspergillus
Fusarium
Scedosporium

SEPTEE



**Filament noir =
Alternaria**



	Champignons filamenteux	Levures
Durée d'incubation	4 jours à 3 semaines	3-4 jours
Milieu	Sabouraud + ATB	Milieus chromogènes
Température	30 - 37°C	30 - 37°C

Blood

Lower RT

Upper RT

Non-sterile compartments
(GIT)

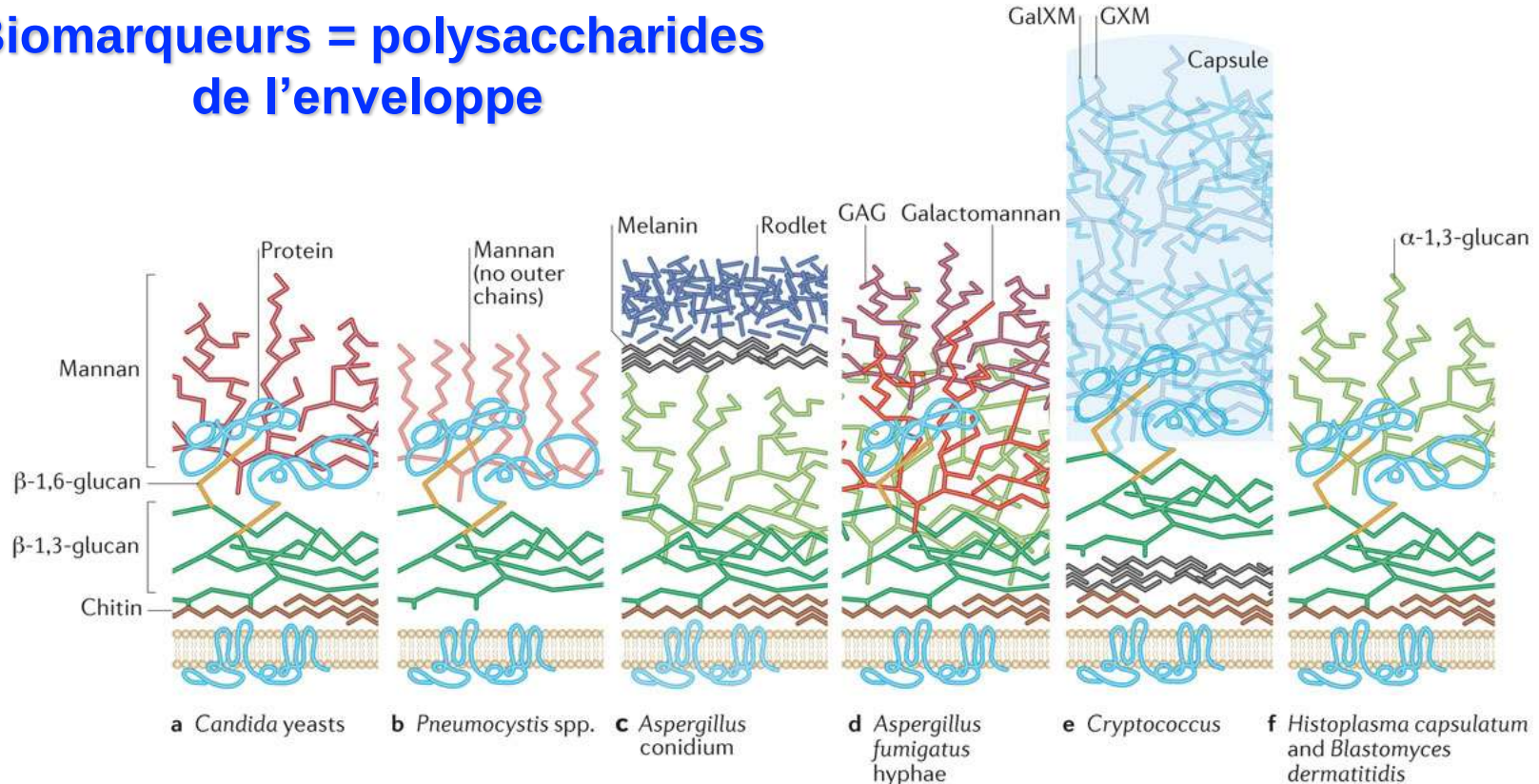
Identification de l'espèce et sensibilité
aux ATF

La culture

Infection

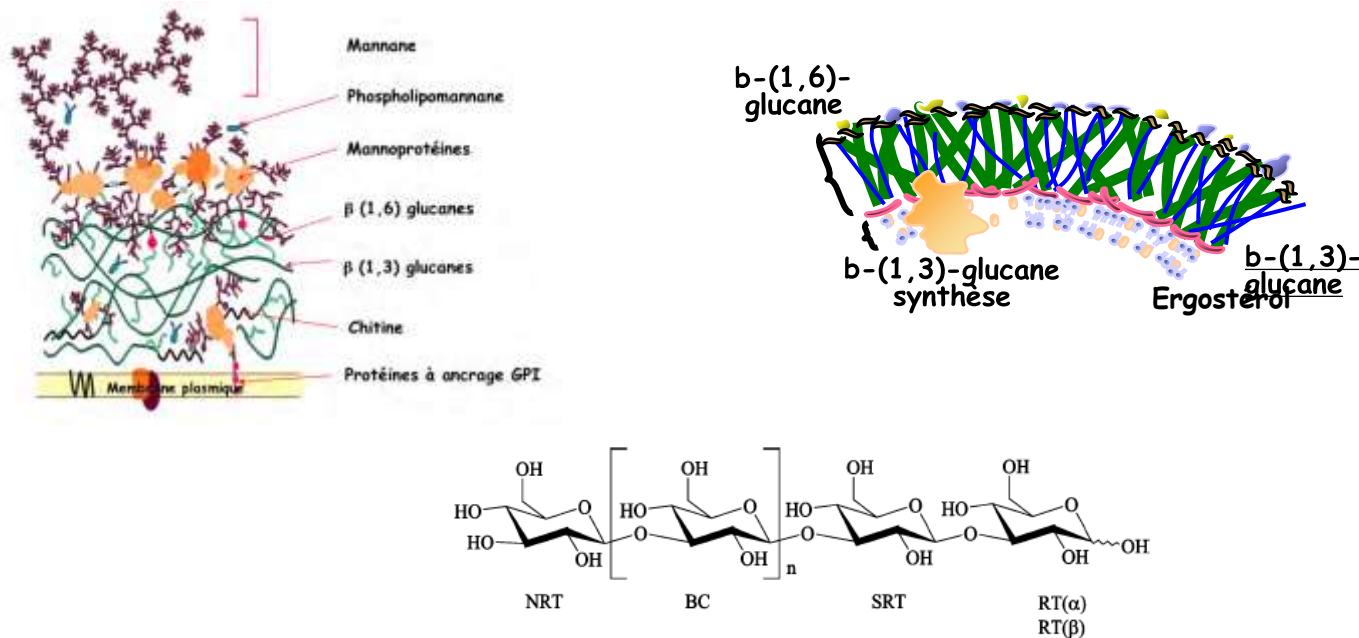
Colonisation

Biomarqueurs = polysaccharides de l'enveloppe





β 1-3 D Glucane (BDG): un marqueur panfongique ?



Longues chaînes de résidus glucose liées en β 1-3 et en β 1-6



Critères diagnostiques IFI probables

(critères EORTC révisés 2008, De Pauw B. et coll, CID 2008)

• Origine ?

- Composant pariétal majeur d'un grand nombre d'infections fongiques
- Test Fungitell® (seuil à 80 pg/ml), Aspergillus test®, B-G star®, β glucane test Walko®

• Quelles infections ?

- *Candida* sp, *Aspergillus* sp, *Pneumocystis jirovecii*, *Fusarium* sp, *Paecilomyces* sp, *Scedosporium* sp, *Trichosporon* sp, *Histoplasma capsulatum*
- Pneumonie à *Candida* > aspergillose, fusariose et histoplasmose
- Néocardiomycose et cryptococose

• Comment utiliser, quand le prescrire ?

- Screening bi-hebdomadaire en absence de fièvre, quotidien: aplasie fébrile
- Surveillance des patients à haut risque

Miyazaki T et al. *J Clin Microbiol* 1995 - Obayashi T et al. *Lancet* 1995 - Pazos C et al. *J Clin Microbiol* 2005 - Mitsutake KT et al. *J Clin Microbiol* 1996 - Marty H. & Koo S, *Med Myco* 2009 - Nakase K. et coll. *Int J Inf Dis* 2012 - Rivière S et coll. *AM J Trop Med* 2012

Ce test ne permet pas de faire la différence entre
infections à levures ou à champignons filamenteux



Patients tout venant

Performance diagnostique du glucane (BG)

- Prospective monocentrique 2004-2006
- 871 patients et 1308 prélèvements obtenus au moment de l'épisode
- Infections fongiques : n=116
 - Prouvées n= 80 (44 candidoses, 14 AI, 22 autres)
 - Probables n = 36 (1 candidose, 18 AI, 1 PCP, 4 autres)
 - Possibles n = 93

	Nb patient	Sensitivité	Spécificité	RV +	RV-
IFI vs non IFI	871	71 %	81%	3,71	0,36
Pts hématologie	497	62 %	84 %	4,55	0,44
Greffe de moelle	251	64 %	91%	7,26	0,39
Neutropénie fébrile	212	50 %	90 %	4,86	0,56
Pneumopathie	304	77 %	81 %	4	0,29

- **737 patients**
- **1 dosage à l'admission**
- **IFI: 10,6%**
 - Taux 144 vs 50 (IFI vs pas IFI): $p < 0,0001$
 - **Se:** 72%
 - **Sp:** 65%
 - **VPP:** 21%
 - **VPN:** 94%

Azoulay et al, Oncotarget 2016



Performance diagnostique (BG)

- Prospective monocentrique 2004-2006
- 871 patients et 1308 prélèvements obtenus au moment de l'épisode
- Infections fongiques : n=116
 - Prouvées n= 80 (44 candidoses, 14 AI, 22 autres)
 - Probables n = 36 (1 candidose, 18 AI, 1 PCP, 4 autres)
 - Possibles n = 93

	Nb patient	Sensitivité	Spécificité	RV +	RV-
IFI vs non IFI	871	71 %	81%	3,71	0,36
Pts hématologie	497	62 %	84 %	4,55	0,44
Greffe de moelle	251	64 %	91%	7,26	0,39
Neutropénie fébrile	212	50 %	90 %	4,86	0,56
Pneumopathie	304	77 %	81 %	4	0,29

Hématologie

- Performances variables en fonction du profil des patients, études retro/prospectives

- Performances identiques dans la CI et AI

- 2 prélèvements consécutifs: Se = 49,6%, Sp = 98,9%, VPP = 83,5% et VPN = 94,6%



Problème de spécificité: nombreux faux positifs

- **Réactions croisées avec des substances d'origine iatrogène**
 - Membrane de cellulose: hémodialyse
 - Compresses chirurgicales
 - Immunoglobulines IV, ATB (Amoxicillin-clavulanic ou pipe-tazo)
 - Transfusion, Albumine filtrée sur membrane de cellulose
- **Réactions croisées avec d'autres microorganismes**
 - Bactéries: variable selon les études
 - Colonisation à *Candida sp*

Faux négatifs : rapportés sous échinocandines

Pickering J et al. *J Clin Microbiol* 2005; Kelaher A et al. *Clin Lab Sci* 2006;
Ostrosky-Zeichner L *CID* 2004; Pazos C et al. *J Clin Microbiol* 2005 ; Vlieger
G et al; *JCM* 2011

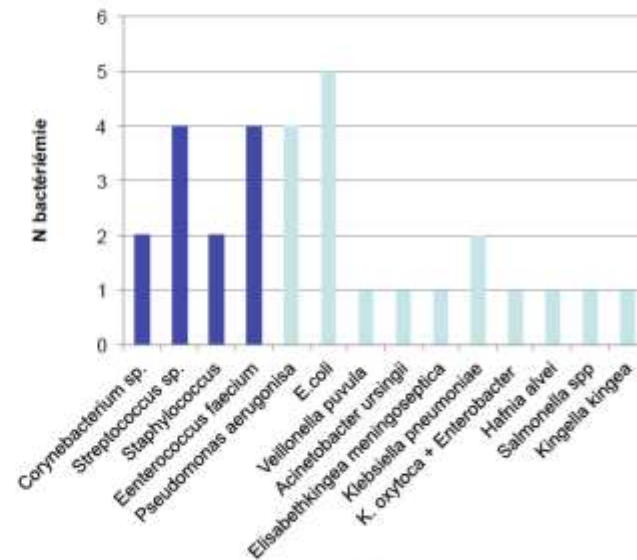


Réactions croisées Bactériémies et BDG ?

Etude prospective Hôpital Necker

- Inclusion :
 - enfants & adultes Hc positives à Gram+ et Gram-
 - BG prélevé dès résultats HC + (délai < 4 jours)
- Exclusion : IFI et IgIV
- Résultats : 27 pts, 30 épisodes
- Tous les BDG négatifs (< 80 pg/ml)

Episodes de bactériémies étudiés





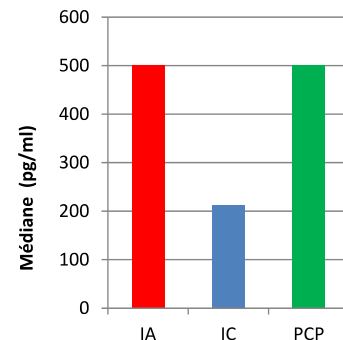
BDG: Cinétique au cours du traitement

- **Taux initial**
 - Non prédictif du pronostic
- **Cinétique post-diagnostique**
 - S1-S2: pas de diminution significative
 - Evolution des taux non prédictive du pronostic ou de la mortalité à S6 ou S12
- **Persistance** de la détection à S6

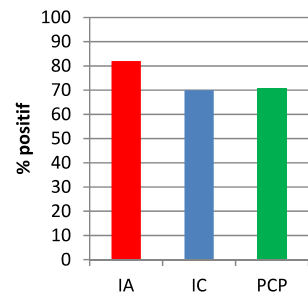
→ **Non influencé par les traitements antifongiques car décroissance lente**

Koos et al. *Clin Microbiol and Infect* 2012

BDG taux initial
IA n=53; IC n= 39; PCP n=18



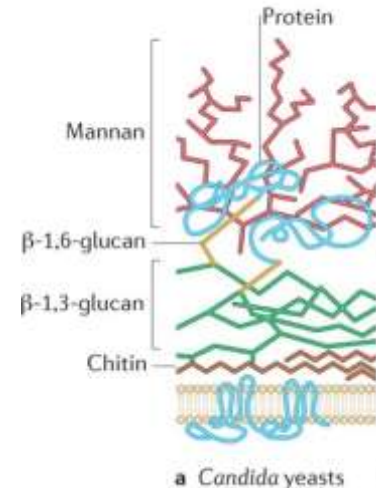
**Fréquence de la détection de BG
6S après début du traitement**





Candidoses

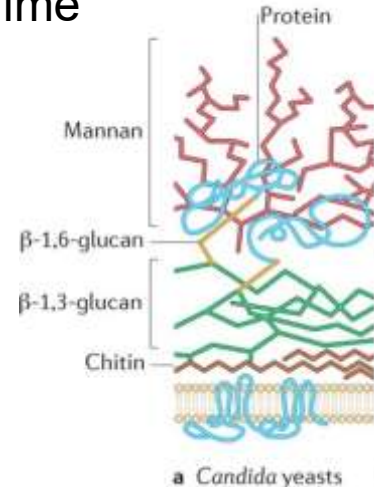
- **Limites du diagnostic**
 - Concentration médiane de *Candida* sp dans une hémoculture = 1 UFC/ml
 - Les hémocultures identifient 75% des Candidémies et seulement 50% des candidoses profondes
- **Marqueurs spécifiques: Ag mannanes, Ac anti-mannanes**
 - Combinaison des 2 tests (Platelia Candida®)
 - Diagnostic des candidémies (ESCMID II; ECIL CIII) et des candidoses chroniques disséminées (ESCMID II, ECIL BIII)
 - **Seuil: 0,5 ng/ml Ag et 10 U/ml AC**
 - Se = 83%, Sp = 86%, VPN > 85%
 - Se meilleure pour *C.albicans*, *C.glabrata* et *C.tropicalis*





- **Marqueurs spécifiques: Ag mannanes, Ac anti-mannanes**

- Nécessité des prélèvements sériés
- Positif en médiane 6j avant les hémocultures
- Pas de problème de détection des Ac chez l'immunodéprimé sévère (sous chimiothérapie, corticoïdes, neutropénique, greffé)
- Coût ?





• PCR *Candida*

- Testée dans le sérum/sang total.
- Autres échantillons ?
- Positive plus précocement, suivi de l'infection possible si quantitative
- Pas de standardisation, pas de recommandations

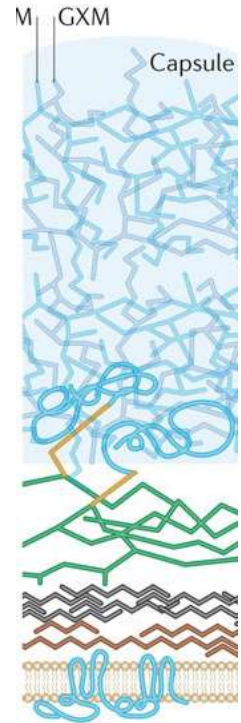
Assay	Invasive Candidiasis (n = 55)	Candidemia ^a (n = 22)	Deep-Seated Candidiasis ^{a,b} (n = 38)	Intra-abdominal Candidiasis (n = 34)
PCR^c				
Sensitivity	80% (44/55)	59% (13/22)	89% (34/38)	88% (30/34)
Specificity	70% (51/73)			
BDG (positive ≥80 pmol/mL)				
Sensitivity	56% (31/55)	68% (15/22)	53% (20/38)	56% (19/34)
Specificity	73% (53/73)			
BDG (positive ≥60 pmol/mL)				
Sensitivity	69% (38/55)	81% (18/22)	66% (25/38)	65% (22/34)
Specificity	63% (46/73)			
P value^d				
PCR vs BDG (positive ≥80 pmol/mL)	.03	.77	.004	.0015
PCR vs BDG (positive ≥60 pmol/mL)	.31	.23	.04	.06

Case definition	Se	Sp	HC +
Candidemia	0.95	0.92	100%
Proven/probable IC	0.93	0.95	38%
Proven/probable/ possible IC	0.73	0.91	29%



Cryptococcose

- **Marqueurs spécifiques: Ag GXM**
 - Polysaccharide spécifique de la capsule du cryptocoque
 - Détecté par latex agglutination
 - Dans sérum et LCR: si positif isolément dans sérum, faire une PL
 - Faux positifs: facteur rhumatoïde (Pronase), *Trichosporon* spp (Culture)
 - Autres localisations que cérébrale (cutanée et pulmonaire): Ag sérique peut être négatif



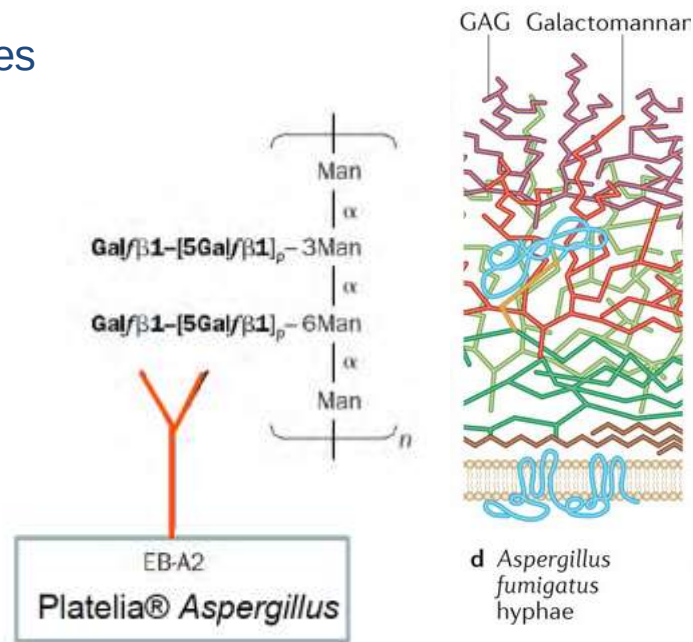
e Cryptococcus 1



Aspergilloses

Marqueurs spécifiques: Ag GM

- ✓ Polysaccharide (Mannane et galactofurane) libéré par les champignons du genre *Aspergillus* au cours de sa croissance
- ✓ Marqueur d'AI
- ✓ Détectable dans le sérum, LBA et LCR (Urines = seuil ?)
- ✓ **Approche diagnostique active**
- ✓ ELISA: Platelia®*Aspergillus*
- ✓ **Dans le sérum:** Cut-of > 0.5 ng/ml
2 fois/semaine (Oncohématologie)
1 fois/semaine (greffe)
- ✓ **Dans le LBA:** Cut-of à 1 ng/ml
- ✓ **Critère de positivité:**
 - ✓ Dès le 1^{er} sérum: Index ≥ 0.7
 - ✓ Ou 2 sérums: Index ≥ 0.5





GM: problème de spécificité

3 principales causes de fausses positivités

- **Réaction croisée avec des substances d'origine iatrogène**
- **Réaction croisée avec d'autres champignons**
- **Facteurs d'hôte**
 - **Faux négatifs : rapportés sous ATF**



→ Réaction croisée avec des substances d'origine iatrogène

- Solutions IV

- **ATB semi-synthétiques:** Pipéracilline-tazobactam; amoxicilline-acide clavulanique
- **Ig IV (Tégéline®):** Ig polyvalentes contenant du saccharose
- **Nutrition parentérale (Gluconate de calcium)**

- Alimentaire

- Lait et produits lactés



→ **Réaction croisée avec d'autres champignons opportunistes**

- *Cryptococcus neoformans*, *Géotrichum capitatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Fusarium spp*, *Penicillium spp*

→ **Facteurs d'hôte**

- Post allo greffe de MO au cours des GVH digestives
- Pédiatrie, rôle du Microbiote ? (*Bifidobacterium*)

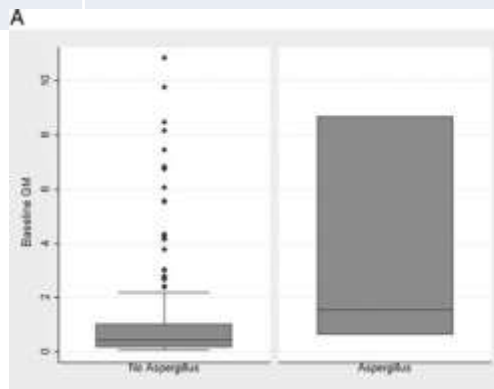


Validé: 2 méta-analyses en monitoring **hématologie**

	Design	Sensibilité	Spécificité
Pfeiffer et al. CID 2006	1996-2005 27 études retenues Analyse de l'effet « population » Performances globales: Se 71% et Sp 89%	Onco-hémato adulte 70% Greffe de CSH adulte 82% Onco-hémato et greffe enfant 89% Greffe organe 22%	92% 86% 85% 84%
Leeftang et al. Cochrane Database Syst Rev 2008	1996-2007 35 études retenues Analyse de l'effet « seuil »	Seuil à 0,5 78% Seuil à 1,0 75% Seuil à 1,5 64%	81% 91% 95%

Se = 55%, Sp = 93%

Singh, Transplantation 2015;
Barchiesi, Liver Transplant 2015



Études	Pts à risque	Nb échantillons	Nb AI	Sb%	Sp%
Verweij JCM 1995	61	532	10	90	84
Röhrlich P Inf Dis J 1996	37	209	10	100	94
Sulahian EJCMID 1996	215	2 161	25	76	81
Bretagne J Inf 1997	50	310	6	100	88
Machetti BMT 1998	22	364	5	60	82
Maertens JCM 1999	186	2 172	71	92,6	95,4
Sulahian Cancer 2001	797	6 209	53	90,6	94
Pinel JCM 2003	807	3327	34	50	99,6



Attention : Variation des performances en fonction de la profondeur de la neutropénie !!

Attention : Variabilité des performances selon le terrain sous-jacent !!

- **Sensible** si répété et **spécifique** si confirmé sur un 2^{ème} prélèvement à 24-48h
- Dosage systématique 2 fois par semaine durant toute la période d'aplasie

Sensibilité	Hémopathies	Cancérologie	TOS	Pathologies pulmonaires chroniques
Antigénémie GM	58% tous patients 65% HSCT (25%-100%)	29%	22%-60%	42%-48%

Reichenberger BMT 1999; Maertens JCM 1999; Pfeiffer CID 2006; Cordonnier CMI 2009; Koo CID 2009; Mengoli Lancet ID 2009 ; White JCM 2010; Bulpa ERJ 2007 ; Singh CMR 2005 ; Guinea CMI 2009 ; Meersseman CCM 2004 ; Cornillet CID 2006 ; Husain Transplantation 2007; Herbrecht J Clin Oncol 2002



Chez les enfants : une réelle difficulté d'interprétation

- Peu d'études → disparité des résultats
- Plus haute incidence de faux positifs chez les enfants que chez les adultes ?

Auteurs	N° patients	Age moyen	Cut off	Faux positifs (% de patients)
Rohrlich P	37	8,5 ans	0,9	5,7
Sulahian A	347	17,5 ans	1,5	10,1
Herbrecht R	48	-	1,5	44
Chachati E	36	7,1 ans	1,5	27,3
Hayen R	56	3 m-18 ans	0,5	12,8
Steinbach W	64	8 ans	0,5	12,7

→ Adultes : 0,9 – 5%

→ Enfants : 5,7 – 44%

Steinbach W et coll. Ped Inf Dis 2007
Ostrosky-Zeichner L. Am J Med 2012



GM: indicateur de la charge fongique et du pronostic ?

- **Charge fongique: valeurs plus élevées**
 - Aspergillose angio-invasive
 - Patients neutropéniques (données autopsiques: lésions histologiques plus extensives et plus angio-invasives chez les patients neutropéniques que chez les non neutropéniques.
- **Suivi thérapeutique: marqueur pronostique**
 - Diminution et disparition du GM: **bon pronostic**
 - Persistance associée à un échec thérapeutique



GM en oncohématologie

- **Critères de positivité dans le sérum**
 - Cut off: index $\geq 0,5$
 - Si 1 GM index $\geq 0,7$ faire TDM thoracique
 - Si index entre 0,5 et 0,7, attendre 2^{ème} GM +
- **Baisse de sensibilité si patient sous antifongique mais data contradictoires**



GM et LBA : intérêt diagnostique AI démontré chez les patients d'hématologie adultes

- 2 principales études : GM/LBA

Auteurs	N° patients	Prévalence AI	Cut off $\geq$	Se.	Sp.
A. Bergeron et al.	101	33 %	0,5	57,6 %	95,6 %
J. Maertens et al.	99	30 %	1	91,3 %	87,8 %

- Etude J. Maertens :
 - LBA : Se GM > ED et culture (91, 3% vs 53,3 et 50%)
 - LBA GM : VPP = 76% et VPN = 96%
 - Performances GM : pts neutropéniques = non-neutropéniques
- Etude A. Bergeron :
 - Performances GM : pts neutropéniques $\neq$ non-neutropéniques



Apports de l'antigénémie

- GM+ avant les cultures mycologiques
- GM+ avant les signes radiologiques
- GM+ avant les signes cliniques
- Permet de suivre le traitement

✓ 1 GM+ dans sérum ou LBA = Critère mycologique d' AI
(De Pauw 2008)



GM Recommandations

- En hématologie, adulte et pédiatrique, chez les patients à haut risque d'AI en screening (2 fois par semaine)
- Pas chez les patients déjà sous prophylaxie antifongique
- Pas chez les transplantés d'organe



PCR *Aspergillus*

- Sur sérum ou sang total et sur LBA
- Se et Sp variables, VPN > 95%. **Marqueur précoce et spécifique d'AI**
- **Standardisation toujours pas aboutie** mais

Pas de données hors hématologie !!

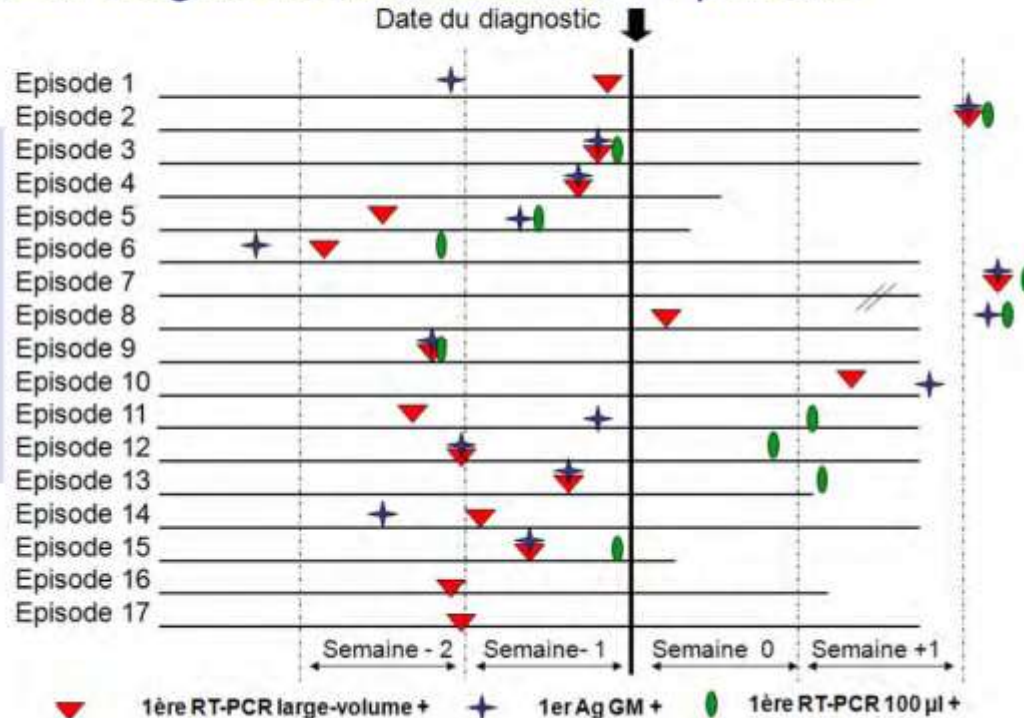
Design	Sens (%)	Spéc	
Pan-fungal	100		
Pan-fungal	75		
Asp. sp.	100		1713-9
Asp. sp.	91.7		2001;33:428-35
Asp. sp.	79		CID 2001;33:1504-12
Asp. sp.	64	64	BJH 2004;125:196-202
Asp. sp.	92	95	CID 2006;42:479-82

- Ne pas utiliser seule;
pas de différenciation
colonisation/infection
- Se diminuée par les
ATF
- **Faus positifs possibles**
(contamination,
environnement,
colonisation)



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

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





AI: Stratégies diagnostiques basées sur les biomarqueurs

- Intérêt d'associer plusieurs marqueurs
→ GM + PCR
- Dans le LBA: Sp = 100%, pas d'augmentation de la sensibilité
- Dans le sérum: réduit l'utilisation d'antifongiques de 17 à 78%

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



Clinical Infectious Diseases Advance Access published November 16, 2014

MAJOR ARTICLE

C Orla Morrissey,¹ Sharon C-A Chen,¹ Tania C Sornell,¹ Samuel Miliken,¹ Peter G Bards,¹ Kenneth F Bradstock,¹ Jeffrey Sze,¹ Catriona L Halliday,¹ Nicole M Gilroy,¹ John Moore,¹ Anthony P Schwarzer,¹ Stephen Guy,¹ Ashish Bajaj,¹ Adrian R Tramontana,¹ Timothy Spelman,¹ Monica A Sloan,¹ for the Australasian Leukaemia Lymphoma Group and the Australia and New Zealand Mycology Interest Group

Summary

Background Empirical treatment with antifungal drugs is often used in haematology patients at high risk of invasive aspergillosis. We compared a standard diagnostic strategy (culture and histology) with a rapid biomarker-based diagnostic strategy (aspergillus galactomannan and PCR) for directing the use of antifungal treatment in this group of patients.

Lancet Infect Dis 2013;
13: 519–28
Published Online
April 30, 2013
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70010-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70010-0)

Serum Galactomannan Versus a Combination of Galactomannan and Polymerase Chain Reaction–Based *Aspergillus* DNA Detection for Early Therapy of Invasive Aspergillosis in High-Risk Hematological Patients: A Randomized Controlled Trial

José María Aguado,¹ Lourdes Vázquez,¹ María Fernández-Rodríguez,¹ Teresa Villanueva,¹ Isabel Ruiz-Camps,¹ Pere Barba,² José T. Silva,³ Montserrat Belli,⁴ Carlos Solano,⁵ David Gallardo,⁶ Inmaculada Herra,⁷ Marta Polo,⁸ Rosario Varea,⁹ Carlos Vallejo,¹⁰ Teresa Glava,¹¹ Javier López-Jiménez,¹² Montserrat Rovira,¹³ Rocío Parody,¹⁴ and Manuel Caicedo-Camello,¹⁵ for the PCRAA Study Group, the Spanish Stem Cell Transplantation Group, the Study Group of Medical Mycology of the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, and the Spanish Network for Research in Infectious Diseases



AI: Stratégies diagnostiques basées sur les biomarqueurs

- Intérêt d'associer plusieurs marqueurs
- GM + BDG
- BDG: plus grande sensibilité mais moins bonne spécificité
- **Association des 2: meilleure valeur diagnostique**

Sulahian, JCM 2014

Variable	No. (%)		LR (95% CI)
	IA ^a (n = 69)	Control (n = 147)	
Galactomannan test ^b			
Negative	35 (51)	142 (97)	0.53 (0.42–0.66)
Positive	34 (49)	5 (3)	14.5 (5.92–35.4)
(1-3)-β-D-Glucan test ^c			
Negative	13 (19)	120 (82)	0.23 (0.14–0.38)
Positive	56 (81)	27 (18)	4.42 (3.09–6.33)
GM test/BG test			
Negative/negative	11 (16)	116 (79)	
Positive			0.20 (0.12–0.35)
Negative			3.99 (2.87–5.54)
Negative/positive	24 (35)	26 (18)	
Positive			1.97 (1.22–3.16)
Negative			0.79 (0.66–0.96)
Positive/negative	2 (3)	4 (3)	
Positive			1.07 (0.20–5.68)
Negative			1.00 (0.95–1.05)
Positive/positive	32 (46)	1 (1)	
Positive			68.2 (9.51–488.7)
Negative			0.54 (0.43–0.67)



Biomarqueurs en pédiatrie

- Métaanalyse, 25 études chez des enfants atteints de cancer ou HSCT
- GM, BDG et PCR utilisés soit en screening, soit pour le diagnostic
- Grande hétérogénéité des études et variabilité des résultats
- Bonne VPN (70 à 100%) du GM dans le sérum → **screening**
- Mauvaise VPP pour l'ensemble des marqueurs → **ne pas utiliser pour le diagnostic**



Pneumocystose

- **PCR**

- Sensibilité des examens dépend du statut VIH/ non VIH, du type de gènes utilisés et du type de prélèvement (LBA, crachats induits)
- Sensibilité de l'ED et l'IF < chez patients non VIH (38-53%)

	Crachats	LBA
ED	35-78%	60-92%
IF	43-78%	89-98%
PCR conventionnelle	86-100%	86-100%
PCR quantitative	-	100%



- **PCR conventionnelle**

- Sensibilité > aux techniques conventionnelle
- Spécificité basse, VPP basse
- Bonne VPN, arrêt du TTT si négative

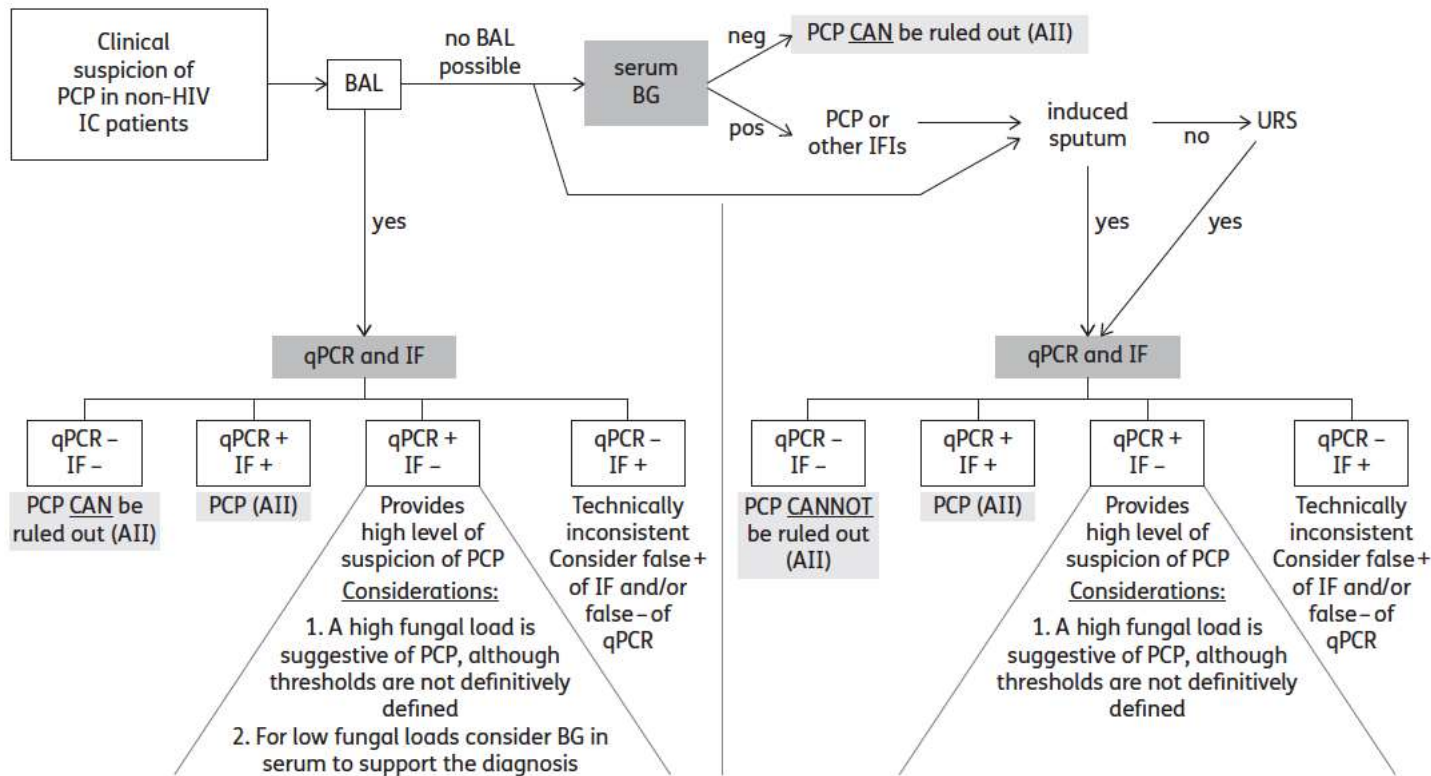
- **PCR quantitative**

- Sensibilité proche de 100%, Sp > 80%, bonne VPN
- Seuil pour différencier colonisation d'une infection?

- **BDG**

- Aide pour différencier colonisation d'une infection, seuil à 100 pg/ml en association avec qPCR
- Sensibilité = 94,8%, Sp = 86,3%, si négatif = pas de PCP

Outils pour le diagnostic et le suivi des Infections fongiques invasives chez les patients immunodéprimés





Champignons filamenteux en dehors de l'aspergillose

- **Moyens diagnostiques rapportés**

- ED / Histologie / Cultures

- 1- **β 1-3 D Glucane**

- Zygomycoses : non valables
- autres mycoses : peu de données

- 2- **PCR** : pas de vraie PCR panfongique, manque de sensibilité (ECIL-3)



Bone Marrow Transplantation (2012) 47, 846–854
© 2012 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved. 0268-3369/12
www.nature.com/bmt

ORIGINAL ARTICLE

ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients



Diagnostic des Mucormycoses

- Diagnostic extrêmement **difficile**
- Pas de marqueurs sériques disponibles

MAJOR ARTICLE

qPCR Diagnosis of Mucormycosis • CID 2013:56 (15 May) • e95

Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection of Circulating DNA in Serum for Early Diagnosis of Mucormycosis in Immunocompromised Patients

Laurence Millon,^{1,2} Fabrice Larosa,³ Quentin Lepiller,^{2,4} Faezeh Legrand,³ Steffi Rocchi,¹ Etienne Daguindau,³
Emeline Scherer,^{1,2} Anne-Pauline Bellanger,^{1,2} Joel Leroy,⁵ and Frederic Grenouillet^{1,2}



Détection d'ADN circulant dans le sérum de patients atteints de Mucormycoses ?

- Etude rétrospective
- 10 patients atteints de différentes formes cliniques de Mucormycoses (cutanée, rhino cérébrale ou disséminée)
- qPCR : cibles 18S
 - 3 qPCRs → *Mucor/Rhizopus*, *Lichtheimia* et *Rhizomucor*
- Intérêt diagnostique : Positive dans le sérum 9/10 pts
- Suivi thérapeutique



PCR Mucorales

- 34 patients hématologie (LA, HSCT, SMD), 3 diabètes, 2 SOT, 5 autres (trauma et noyade)
- Volume du sérum > 500 µl
- **qPCR + 2j [0-18] avant les signes radiologiques pulmonaires**
- Intérêt des sérums itératifs avant et après traitement

Mucormycose	≥ 1 qPCR +	qPCR négativée après TTT	qPCR non négativée après TTT
Prouvée (N=25)	22	9	11
Probable (N=19)	14	5	8
Total (N=44)	36 (81%)	14 (100% de survie à J10)	19 (100% de décès à J10)



Quels marqueurs indirects pour quelles situations ?

	Ag GM	Mannane/ anti- mannane	Ac GXM	BDG	PCR
Candidose	-	+	-	+	+
API	+	-	-	+	+
Cryptococcose	-	-	+	-	-
Mucormycose	-	-	-	-	+
Pneumocystose	-	-	-	+	+
Fusariose	+	-	-	+	-



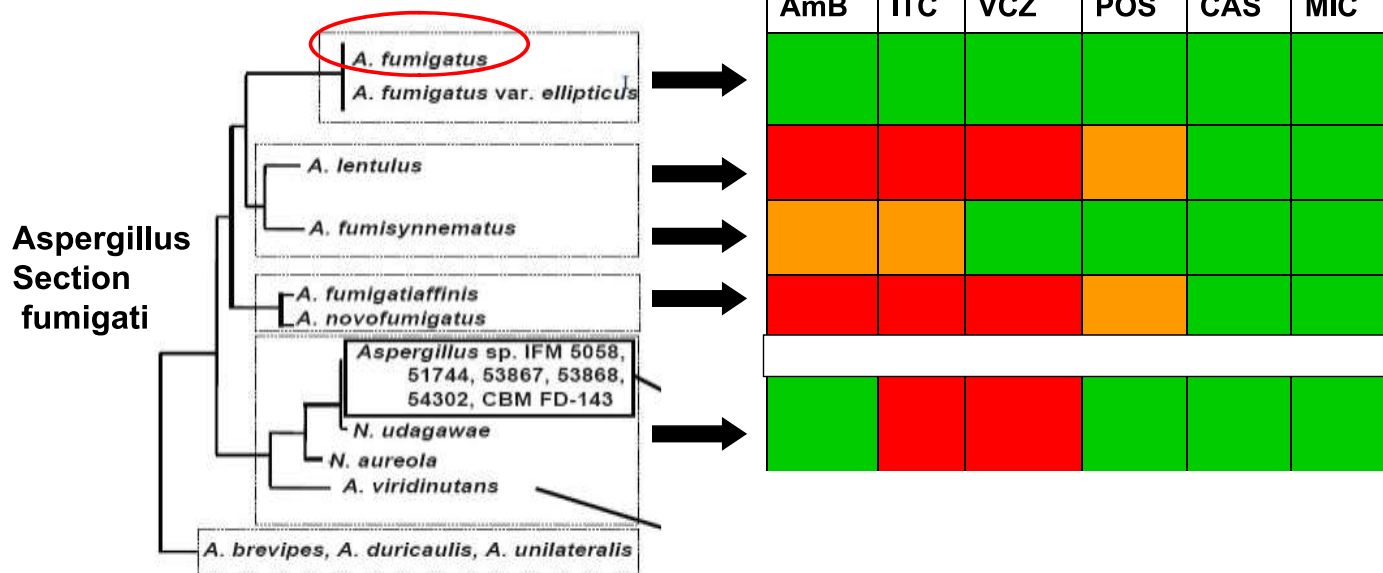
Limites des marqueurs indirects

- Gold standard = Hémoculture fongique avec faible sensibilité → comment comparer les tests ?
- Impact de l'ID sur les biomarqueurs ?
- Impact des prophylaxies et des traitements sur la performance des tests ?
- Impact de la colonisation ou d'un ATCD d'infection ?
- Quelle est leur cinétique ?
- Quel est le seuil adapté ?
- Association des biomarqueurs ? Coût ?



3 règles pour améliorer la prise en charge des IFI

- **Documenter les IFI** : isolement de la souche
 - Infections dues à des moisissures : histologie
 - *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Geosmithia* sp., Mucorales, *Alternaria* sp. et autres champignons noirs
- **Diagnostic d'espèce précis**
 - Au sein des complexes d'espèces : spectre de sensibilité aux antifongiques spécifiques
 - Résistance intrinsèque de certaines espèces
- **Tester les sensibilités des souches d'*Aspergillus***





MERCI DE VOTRE ATTENTION