

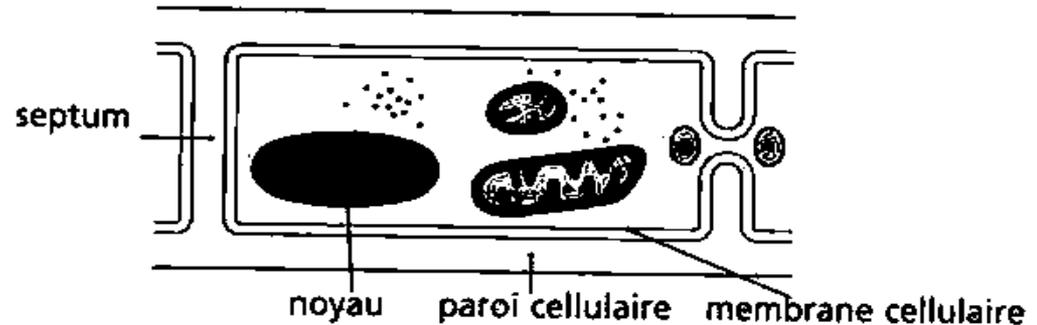
Diagnostique de laboratoire de l'aspergillose invasive (AI)

Youri Glupczynski
Hector Rodriguez-Villalobos

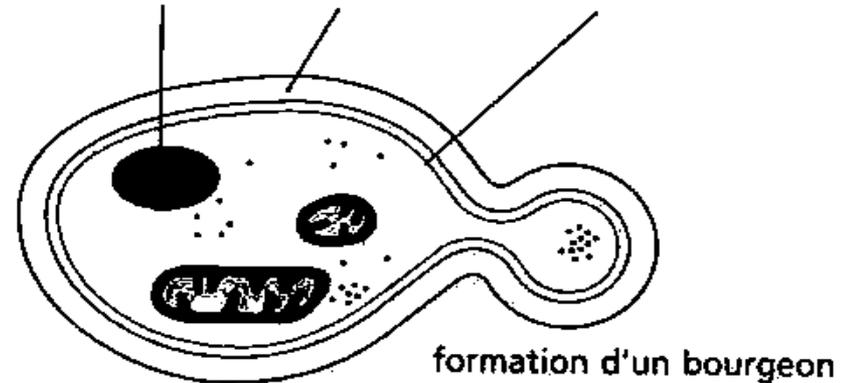
CHU Dinant-Godinne UCL I Namur
Cliniques Universitaires UCL Saint-Luc

La cellule fongique

Champignon filamenteux, par exemple le dermatophyte



Levure,
par exemple
Candida



Cellule eucaryote

- noyau avec membrane nucléaire
- paroi cellulaire constituée de polysaccharides polypeptides et chitine
- unicellulaires ou (multicellulaires)
- Formation de filaments/hyphes
- Division par des parois (septa) ou pas (aseptes)
- Polymorphisme: forme levure/filaments
- Dimorphique: forme selon T° de croissance

Fungi: de quoi parlons nous?



Glaciers antarctique

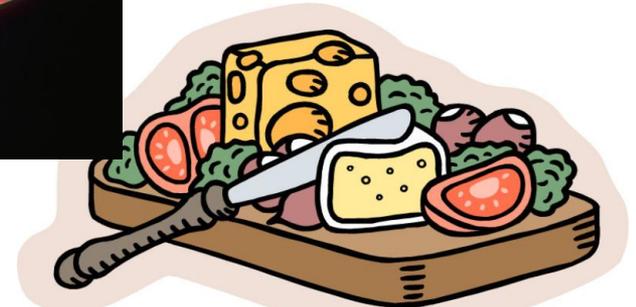


Tank/citernes électrolyse
(acide sulfurique pH 0.05)

animaux végétaux? la mo...



1850 Destruction Cultures de PDT
Famines; Exodes Irlande -> US



Mais aussi...les levures sont responsables
des meilleurs bières vins et fromages

Champignons les plus fréquents en pathologie humaine

- **Dermatophytes:**
 - Tichophyton, Microsporon, Epidermophyton..
- **Levures:**
 - Candida spp (C.albicans, C, glabrata...) et Cryptococque (C.neoformans)
- **Moisissures:**
 - Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Scedosporium, Mucorales
- **Dimorphiques:**
 - Histoplasma, Blastomyces..

Organisms group	Examples of specific pathogens	
Candida	C. albicans C. glabrata C. parapsilosis C. tropicalis	C. krusei C. lusitaniae C. guilliermondii C. rugosa
Other yeasts	Cryptococcus neoformans Trichosporon Blastoschizomyces Rhodotorula Malassezia	Saccharomyces Hansenula
Aspergillus	A. fumigatus A. flavus A. niger	A. versicolor A. terreus A. nidulans
Zygomycetes	Rhizopus Rhizomucor Mucor Absidia	Apophysomyces Cunninghamella Saksenaea Cokeromyces
Other hyaline moulds	Fusarium Acremonium Scedosporium apiospermum S. prolificans	Trichoderma Paecilomyces Chrysosporium
Dematiaceous moulds	Alternaria Bipolaris Curvularia Exophiala	Cladophialophora Phialophora Dactylaria Wangiella
Dimorphic moulds	Histoplasma Coccidioides Blastomyces Paracoccidioides	Sporothrix Penicillium marneffeii
Other	Pneumocystis jirovecii	

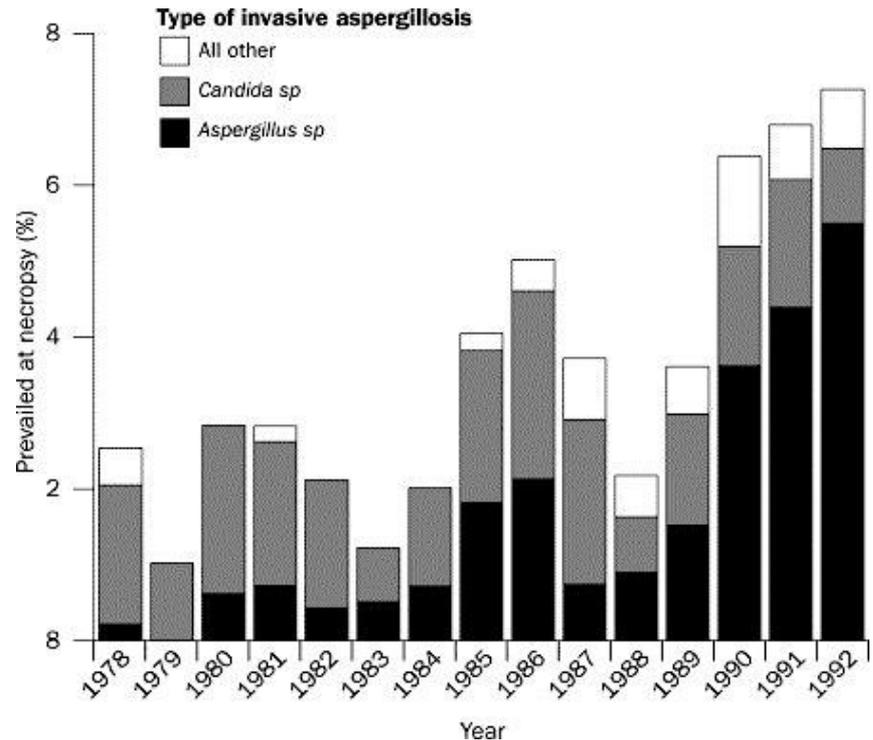
^aList not exhaustive.

Pathogénie

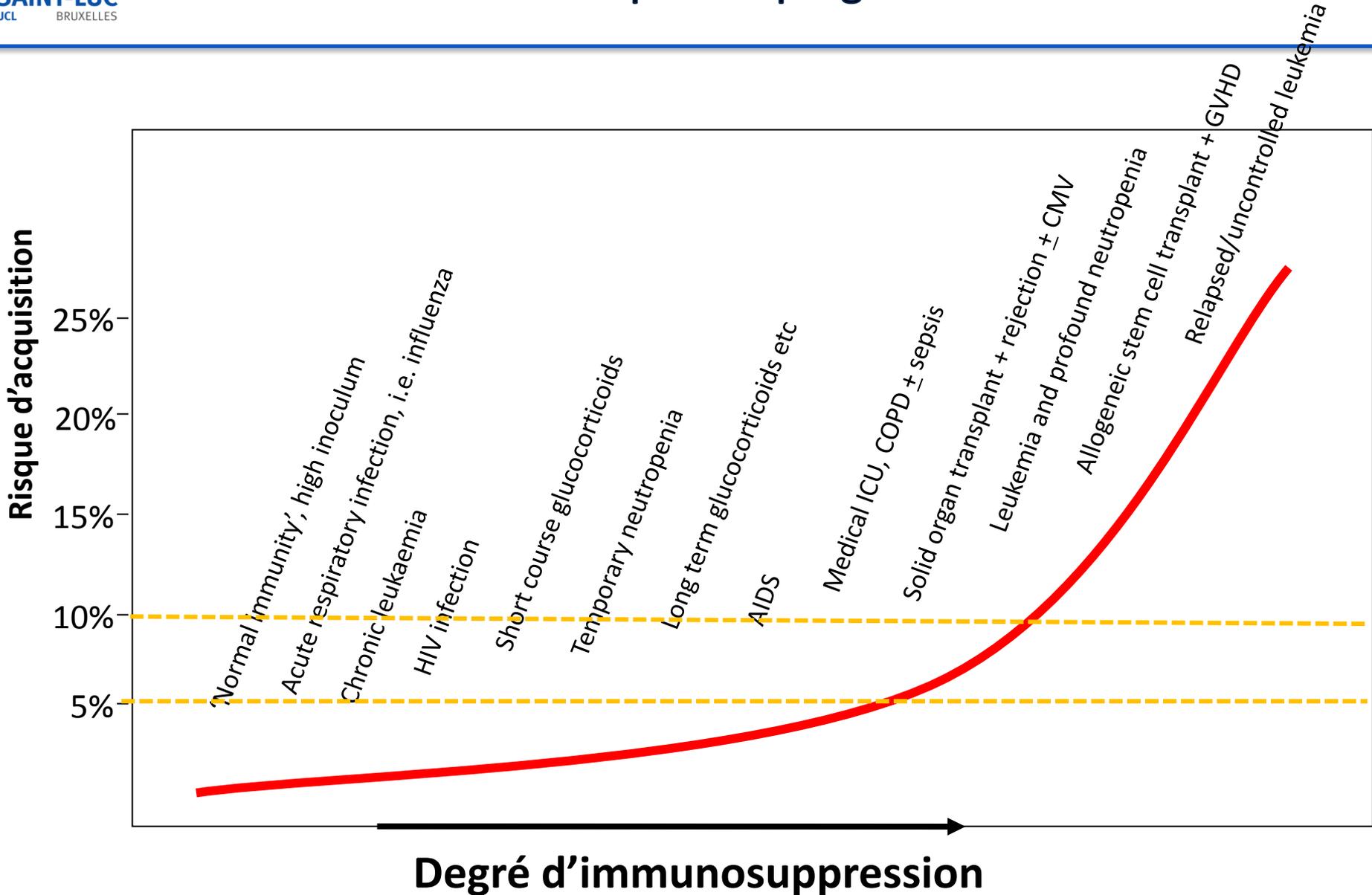
- **1.5 millions d 'espèces de champignons:** Environ 600 « pathogènes humains »
 - A l 'exception de quelques dermatophytes, n 'ont pas besoin de l 'homme
- Quelques champignons peuvent produire un maladie chez sujet normal mais **la majorité sont opportunistes**
- En générale les mycoses : en relation avec la situation du système immunitaire et le risque d'exposition
- Parmi les facteurs prédisposant:
 - Personne âgée-nourrisson
 - grossesse, anomalies épithéliales, affection endocrinienne (diabète)
 - Antibiothérapie, déficit en fer, ou en zinc
 - immunosuppression (médicamenteuse, congénitale, tumorale) touchant les neutrophiles et/ou lymphocytes T

Infections fongiques systémiques

- En augmentation constante (multiplication des facteurs d'immunodépression)
- Le plus souvent sont des opportunistes.



Patients à risque d'aspergillose invasive

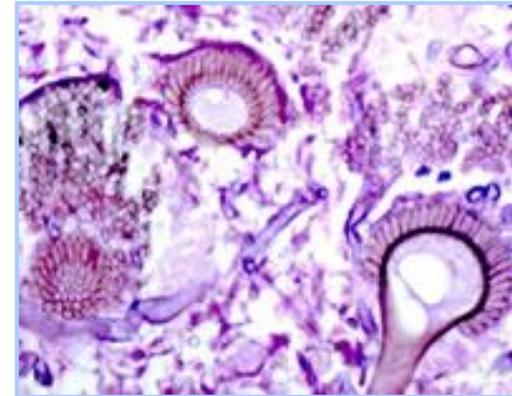
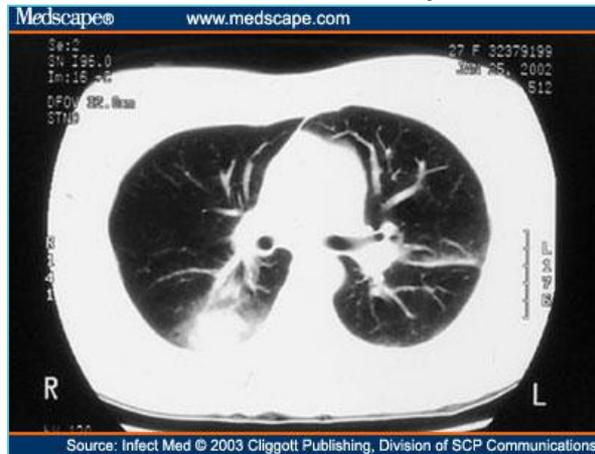


Moyen pour le diagnostic et le suivi des aspergilloses invasives

- Recherche systématique de champignons filamenteux chez patients à risque
- Seuls prélèvements tissulaires ou sites normalement stériles spécifiques (distinction colonisation/infection souvent impossible dans les prélèvements respiratoires)
- Examen direct oriente diagnostic et parfois seul argument biologique : systématique, réalisé rapidement avec techniques spécifiques.
- Histologie: caractère invasif de l'infection
- Présence d'Aspergillus à interpréter en fonction du risque de colonisation et de immunodépression

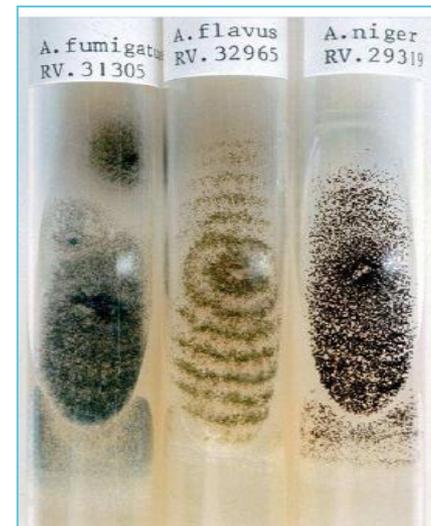
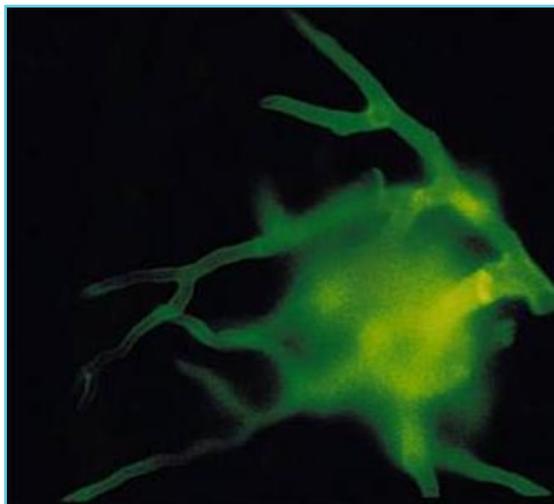
DIAGNOSTIC d'ASPERGILLOSE INVASIVE PULMONAIRE (AIP)

CT Scan thoracique



Histologie

Calcofluor



Culture sur milieu
de Sabouraud

Méthodes de diagnostic au labo

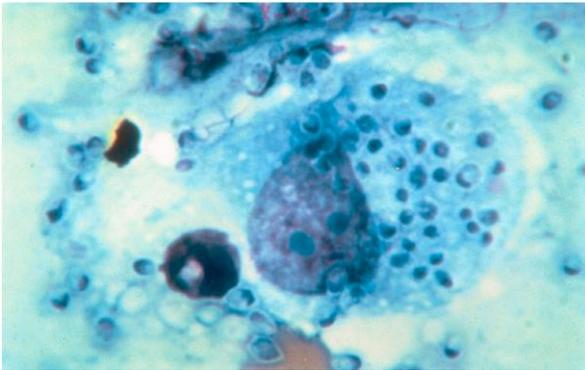
- Examens directs (colorations, UV)
- Culture
- Méthodes indirectes (non basées sur la culture)
 - Détection d'antigènes
 - Méthodes moléculaires (PCR-based)

Collection, transport et mise en culture des spécimens

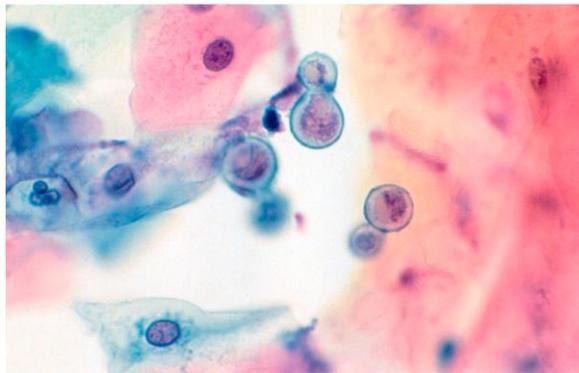
- Informations cliniques essentielles (FR patients !)
 - Pathogènes potentiellement dangereux:
 - Coccidioides, Histoplasma...
- Si délai d'ensemencement attendu:
 - Conservation à 4°C (24-48 h max)
- Ecouvillons (pas adéquats)
 - (sauf mycoses orales/génitales: Levures)
- Quantité de matériel biologique suffisante

Colorations et examens directs

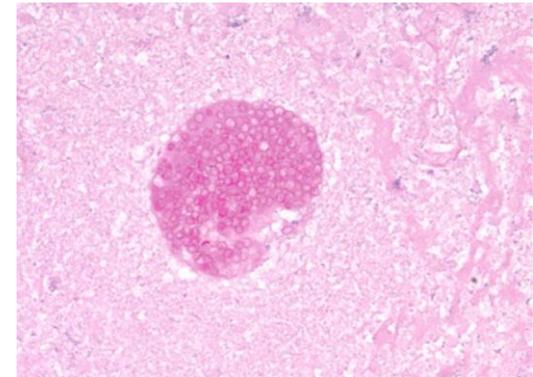
- Rapide, orientation ID suffisante pour diagnostic et Rx empirique
- \pm 20% rendement diagnostic (par rapport à culture) pour AI
- Morphologie distinctive -> approche diagnostique satisfaisante de l'ID



Giemsa: Macrophage with intracellular yeast forms of *H. capsulatum*



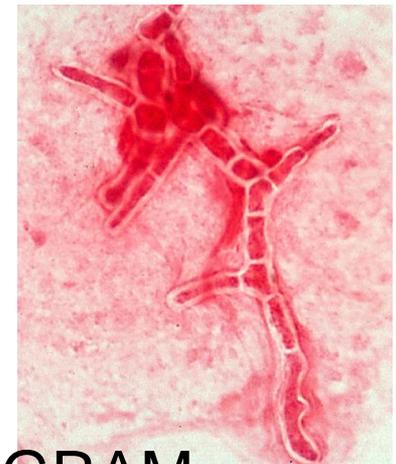
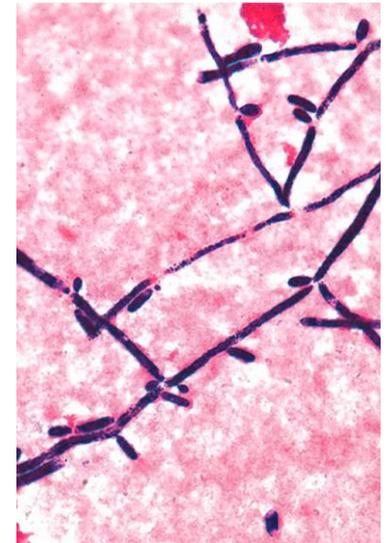
Papanicolaou: Broad-based budding yeast of *B dermatitidis*



PAS: spherule of *C immitis*

Colorations et examens directs

- Sensibilité faible
 - AI: Si expectos disponibles, Culture positive (et Ex. direct +) dans 8%-34% des cas (patients transplantés)
 - Lavages bronchiques, BAL ou biopsie transbronchique = meilleurs prélèvements 45%-62% culture/Ex.dir + dans AI chez patients transplantés)
 - Augmente si plus grand nbre d'échantillons obtenus
- Sensibilité améliorée par Ex. direct en microscopie optique UV (calcofluor)
- L'aspect morphologique ne permet pas l'ID précise des champignons



calcofluor

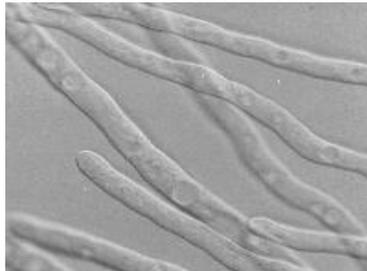
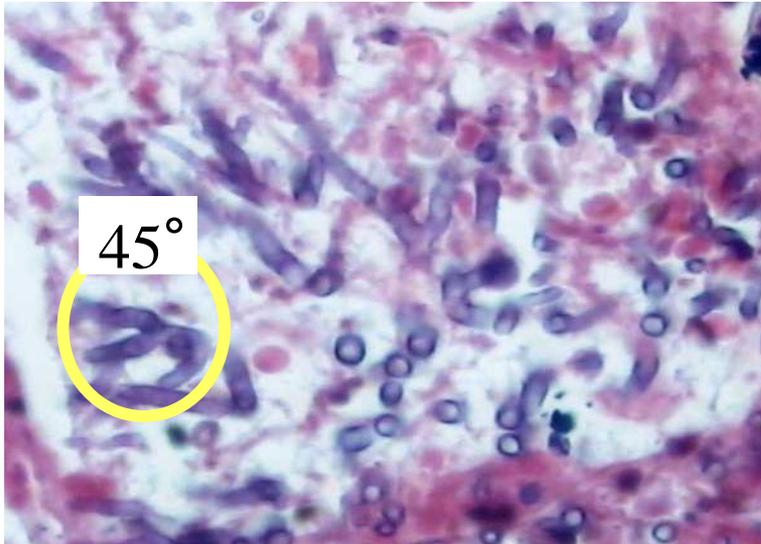


GRAM

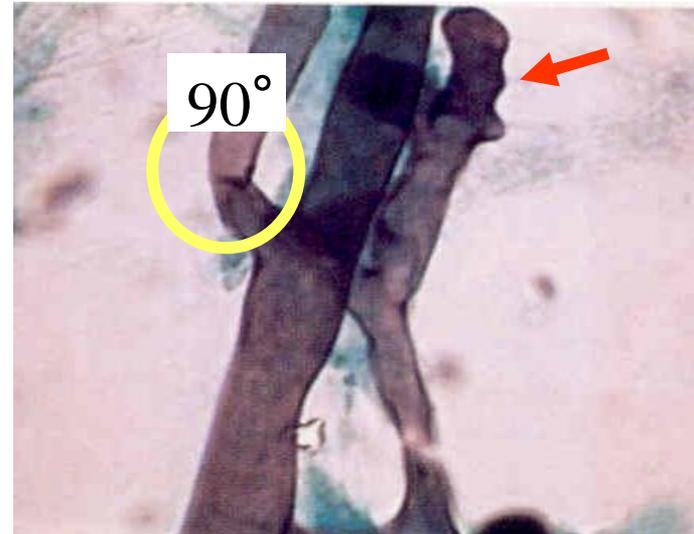
Histologie

- Ex. histopathologique de coupe de tissus/biopsies fixées/colorées
 - Souvent pas réalisable en clinique (condition critique des patients, troubles de la coagulation)
 - Certains champignons peuvent être très similaires (*Fusarium* spp, *Scedosporium*..) à l'ex. histologique (pas de diagnostic d'espèce)
 - Isolement de l'agent étiologique par culture est essentiel pour confirmation diagnostic
- ID plus précise peut être obtenue par méthodes immunohistochimiques

Aspergillus spp



Zygomycetes



Culture

- **Limitations: absence de détection des microorganismes par culture**
 - Sensibilité médiocre (ex..aspergillose)
 - Culture LBA: 50% de sensibilité en cas de AIP (lésions pulmonaires focales)
Inadéquation de qualité de prélèvement, conditions de transport, conditions de culture (durée d'incubation trop courte)
 - Hémocultures rarement positives pour *Aspergillus*, (plus souvent pos pour levures (*Candida*) et *Fusarium* (50%))
- **La plupart des champignons poussent facilement : croissance OK sur les milieux de cultures utilisés pour bactéries**
 - Mais, croissance peut être lente (développement de spores) -> ID parfois difficile
 - Milieux spécifiques : Sabouraud, BHI (plus riche), milieux chromogénique (levures)
 - Sélectifs avec antibiotiques (genta, chloramphenicol, vanco)
 - Avec agents antifongiques actidione (cycloheximide) pour dermatophytes et champignons dimorphiques
 - Pas pour zygomycetes, pas pour *Aspergillus*
 - Méthode de lyse-centrifugation (hémocultures) plus sensibles pour moisissures et champignons dimorphiques
- **Homogénéisation de biopsies peut diminuer le rendement des cultures** (p.ex: mucorales)

Culture

- **Incubation** à 25-30°C (dermatophytes) et à 35°C pendant 2-4 sem.
 - Aspergillus et Candida -> colonies identifiables après 24-72 h
- **Identification**
 - Peut prendre plusieurs parfois semaines (dermatophytes)
 - ID au niveau du genre: Implications thérapeutiques
 - Trichosporon, Cryptococcus: R aux échinocandines
 - ID au niveau de l'espèce : difficile, « time-consuming ».
- **Interprétation:** la présence d'un organisme à la culture n'établit pas nécessairement son rôle pathogène
 - Pathogènes: *H. capsulatum*, *T. rubrum*..
 - Opportunistes: voir si présence à l'Ex. direct, autres évidences (culture pos à partir d'un site stérile, Histologie, status du patient (immunocompromis))

ID des champignons filamenteux

Microscopie



MALDI-TOF MS

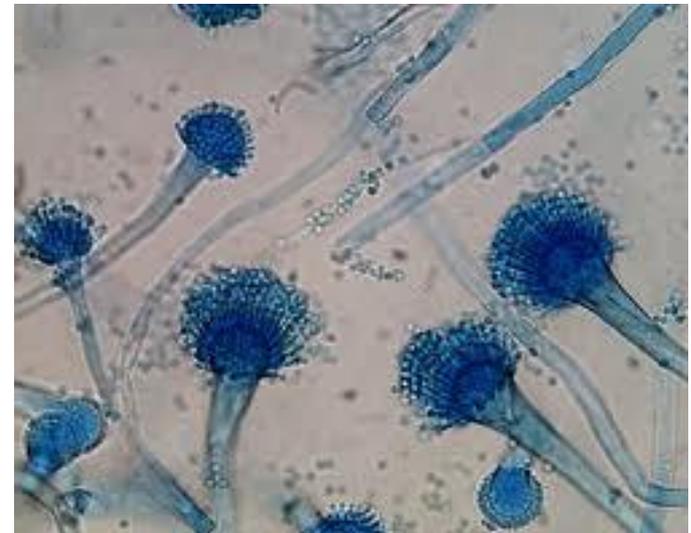
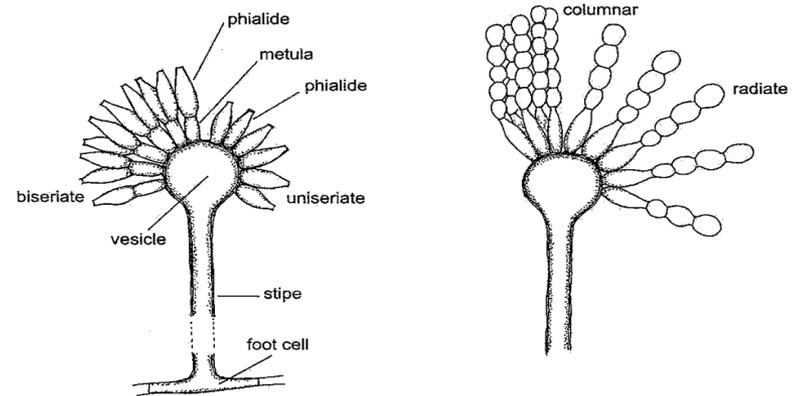


Pas optimal
(OK pour levures)
Pas (encore) pour champignons
filamenteux

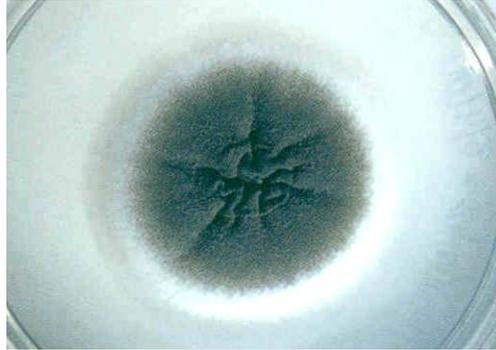
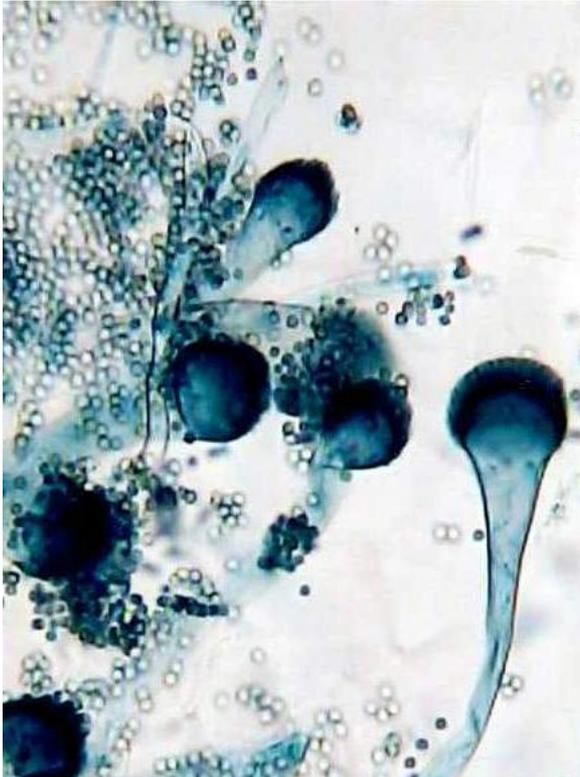
Antigen based methods
PCR based methods

Aspergillus spp: aspergillose

- **Sinusites:** forme non-invasive/invasive
- **Allergies:**
 - asthme réaginique
 - alvéolite allergique extrinsèque
 - ABPA
- **Colonisation:** Aspergillome
- **Infection/mycose:** envahissement tissus
 - groupes à risque:
 - neutropénie profonde (<500 PMNx2 semaine ou <100)
 - corticothérapie (1mg/kg/jour de prednisone)
 - transplantés, SIDA si neutropénie ou autres facteurs,
 - maladie chronique débilitante (diabète...)
 - nosocomiale ou non
- **Différentes atteintes:** pulmonaire, cérébrales (SNC), endophthalmitis, spondylodiscites, endocardites....;

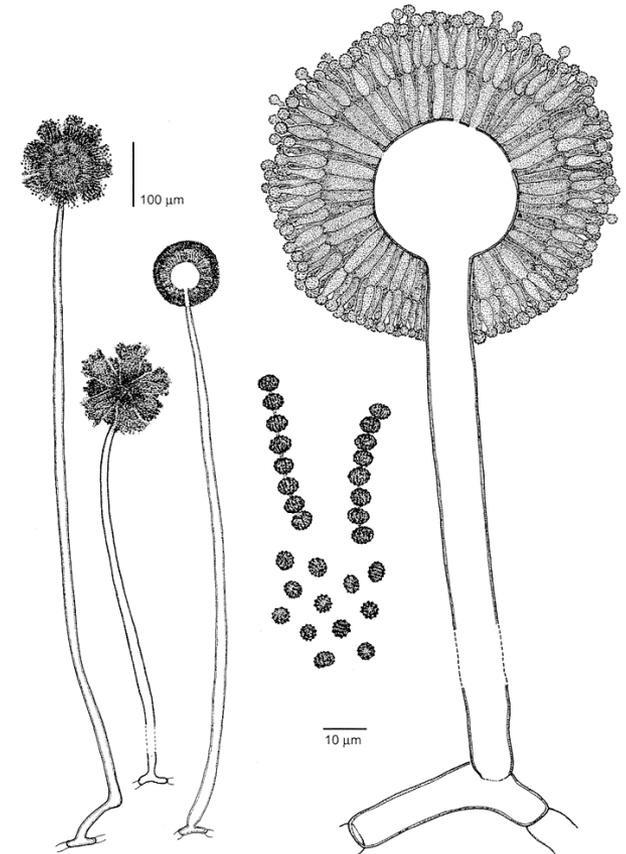
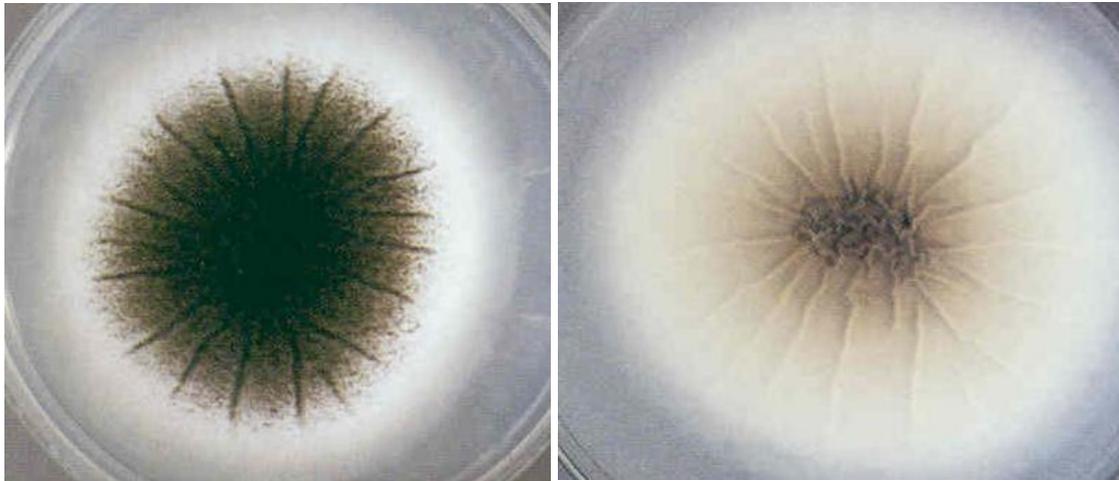


Aspergillus fumigatus



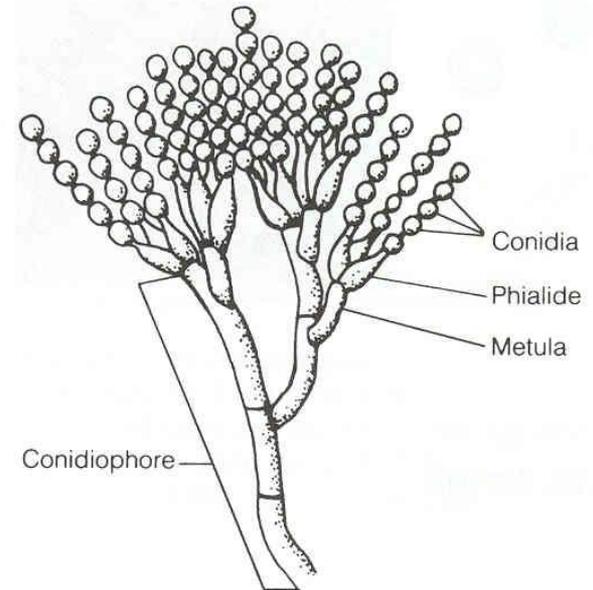
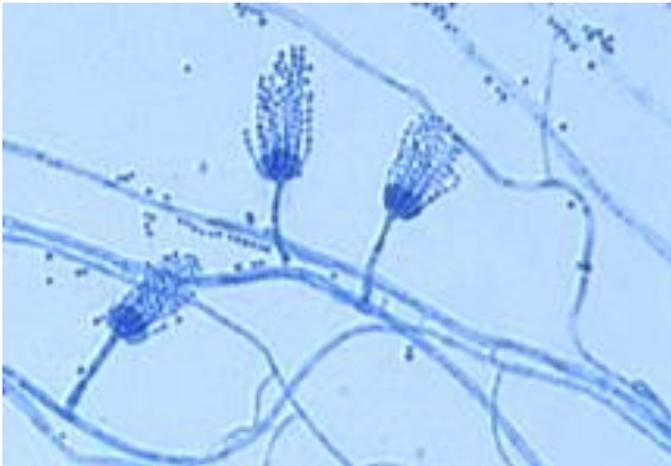
- Colonies vert-fumé; plus foncé en vieillissant
- colonies blanches atypiques mais + à 45°C
- conidiophore court, lisse, vésicules en forme de flasques
- un rangée de phialides (2/3) de la vésicule
- spores en chaînes parallèles

Aspergillus niger



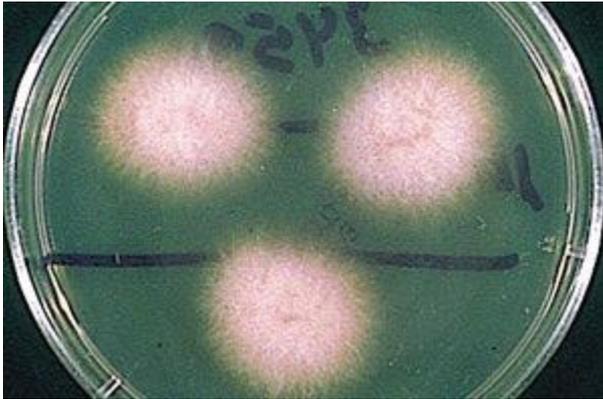
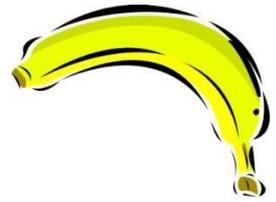
- Colonne blanc-noir (sel et poivre), reverse blanc.
- gros pompons noirs
- vésicule globuleuse, phialides en deux rangées sur toute la surface (radiate)
- spores verruqueuses

Penicillium spp



- Ubiquitaire: air, poussière, plantes..
- Contaminant
- Agent pathogène facultatif
- colonie: surface poudreuse ou veloutée, coloration principalement vert et bleu vert avec halo blanc. Reverse blanc mais aussi brun ou rouge
- conidiophores: s'élèvent à angle droit sur les hyphes
- conidies en forme de pinceau, chaînettes a maillons multiples

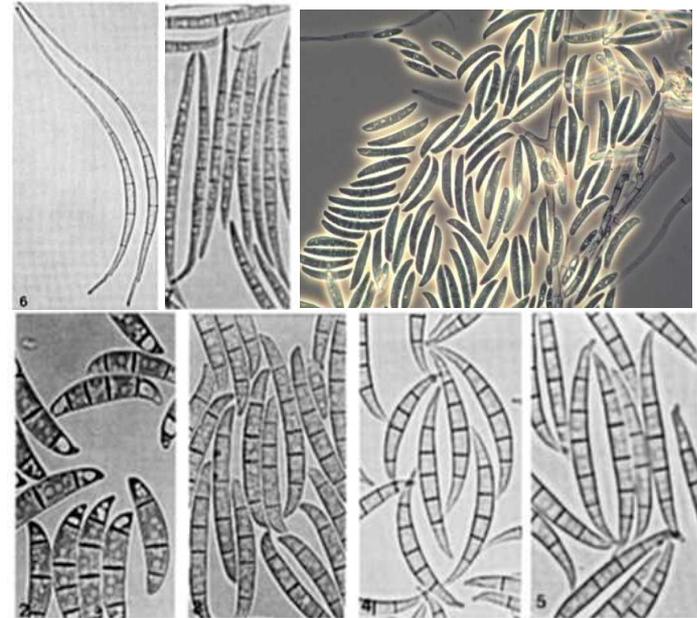
Fusarium spp



- colonie pâle, rose, mauve ou blanche
- La Taxonomie du genre est compliquée
- Identification difficile. Aspect typique des macroconidies.
- Kératite/infection disséminée

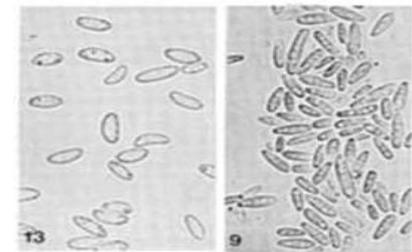
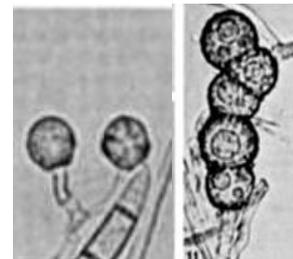


Macroconidies de différentes espèces

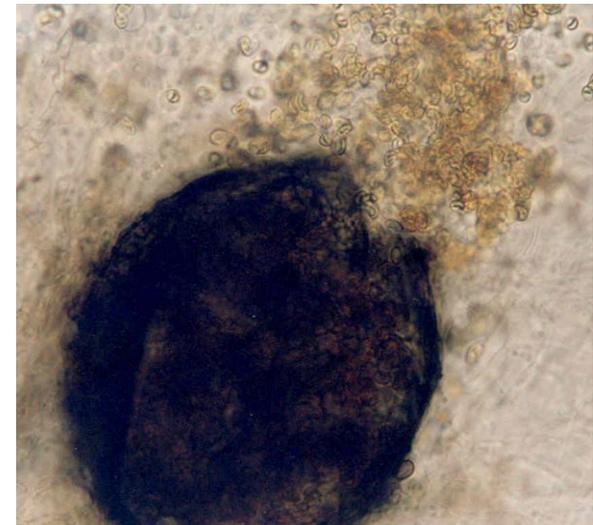
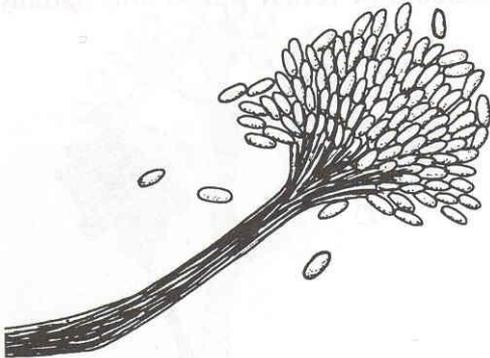


Chlamydoespores

Microconidies



Scedosporium-Pseudoallescheria boydii

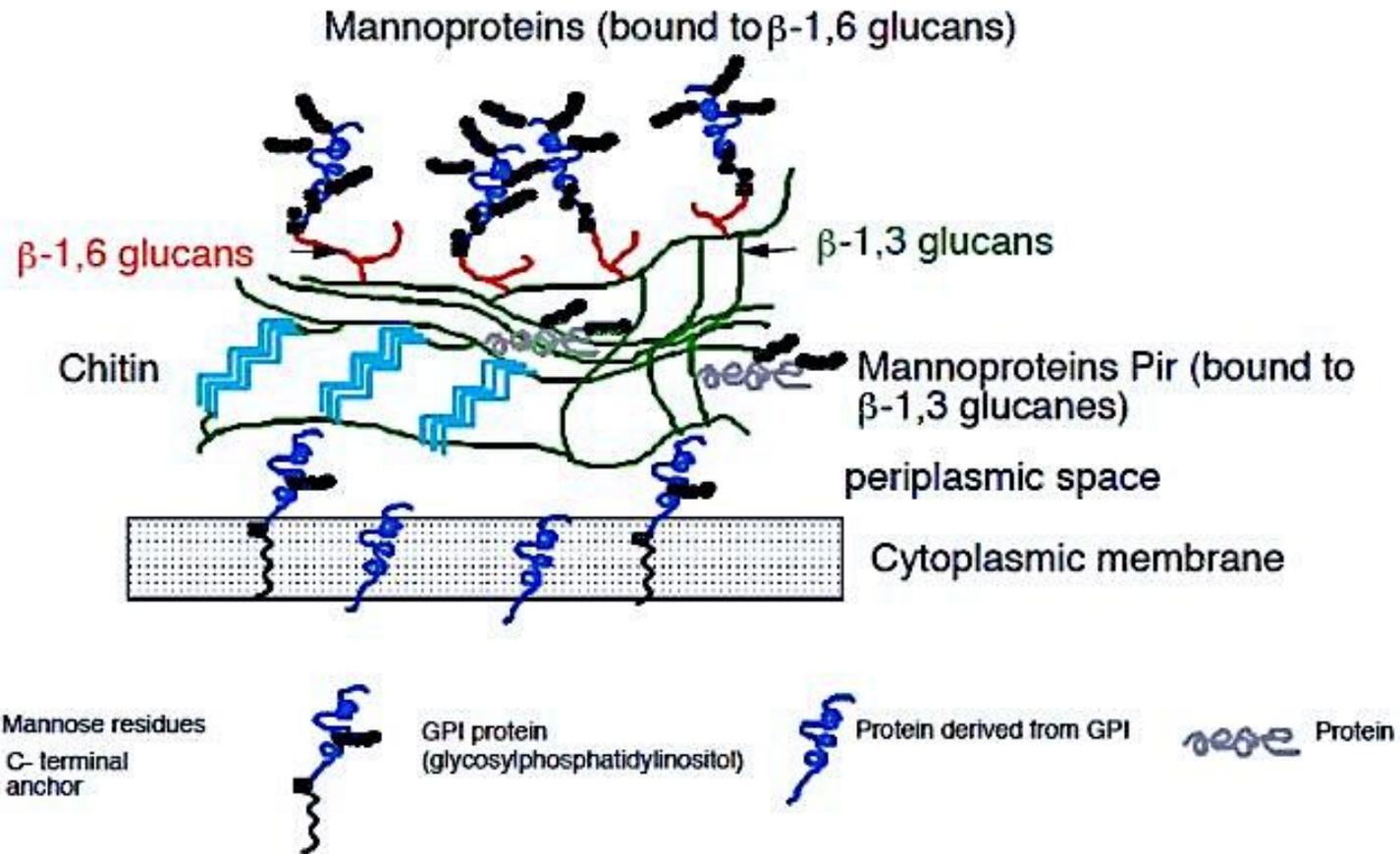


- Colonies cotonneuses, d 'abord blanches, puis grises. Verso brun/noir
- Pousse sur actidione et à 40° C
- conidies ovoïdes, produites une par une
- filaments agglomérés: Graphium

Scedosporium

- Agent cosmopolite (eaux d 'égouts, de ferme, bois immergé, déjections volaille..)
- Forme asexuée (*S. apioespermum*) et sexuée (*Pseudoallescheria boydii*) pousse sur actidione
- infection: mycétome, sinusite, kératite, pathologie pulmonaire (allergie, aspergillome), ostéomyélite
- dissémination: reins rate, cerveau, prostate et thyroïde.
- *S. prolificans*: ne pousse pas sur actidione mais 45°C +

Composants de la paroi Aspergillaire: Galactomannanes



- Galactomannane
 - Anticorps monoclonaux chez le rat (EB-A2)
 - Seuil limite
 - Latex agglutination (15 ng/ml)
 - Sandwich ELISA (0.5-1 ng/ml)

Méthode	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	PPV (%)	NPV (%)
LA	27.5 -95	53-100		
ELISA	60-100	81-98.1	60-95	80-99

Sabetta et al. JID 1985; 152: 946

Ansorg et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13: 582

Verweij et al. JCM 1995; 33: 3150

Maertens et al. Blood 2001; 97: 1604

Herbrecht et al. J Clin Oncol 2002; 20: 1898

GM assay for diagnosis of proven IA

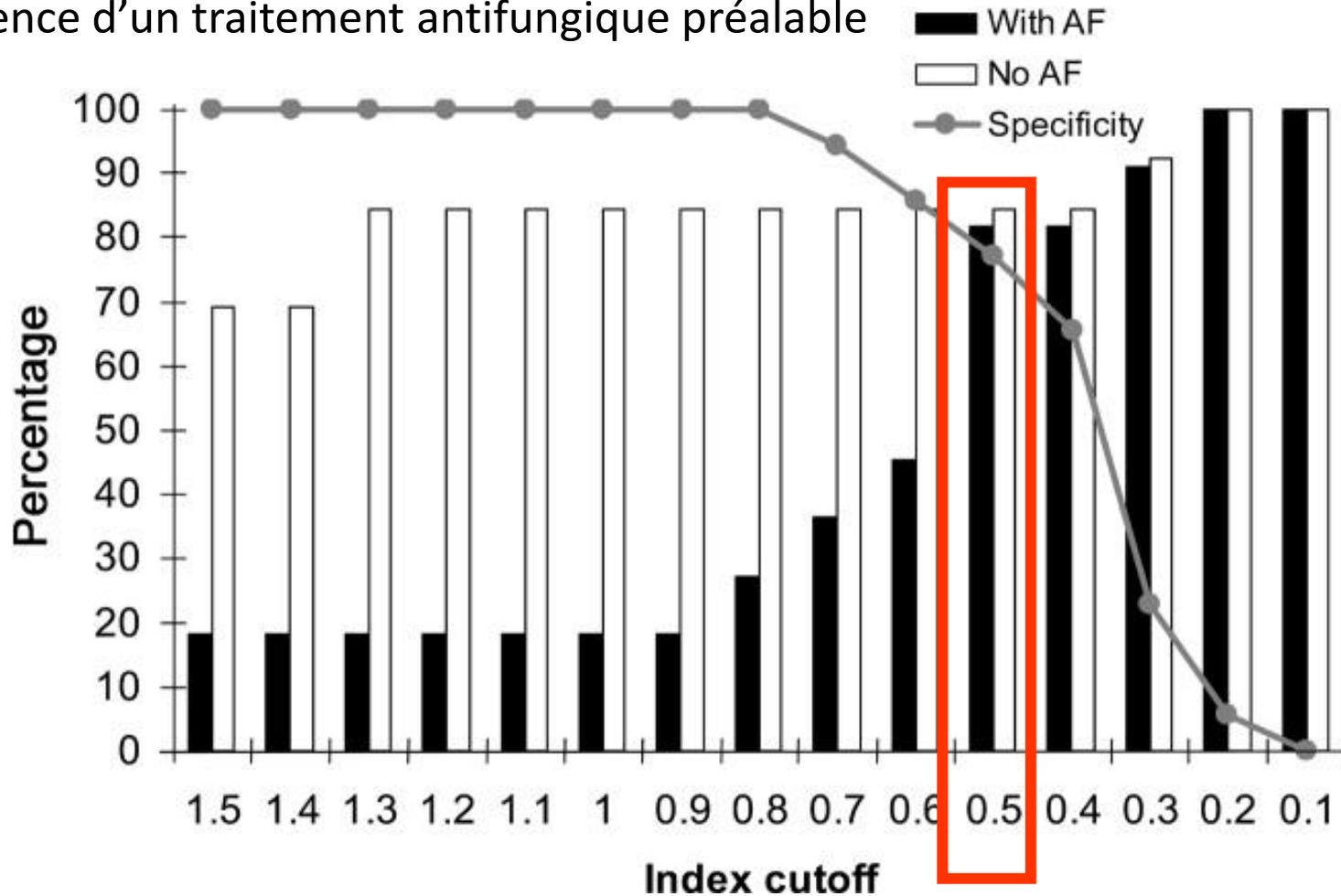
- Meta-analyse (27 études) par Pfeiffer
- Sens 71% et Spec 89%
- NPV 98% mais PPV 26%
- Bon test d'exclusion de l'AI (Ruling out), mais moins utile pour confirmation du Dx
- Meilleurs rendements chez patients avec BMT que transplantation organes solides (SOT)
- amélioration du rendement Dx si échantillons consécutifs "POS"(2-3x/semaines) = forte probabilité d'infection (LHR +)

Patient group	No. patients	%	
		Sens	Spec
All studies ^b	4284	71	89
Hematologic malignancy	2960	70	92
Bone marrow transplant recipients	903	82	86
Solid organ transplant recipients	224	22	84
Positive GM cut-off value			
0.5	352	27	79
1.0	1705	79	87
1.5	2227	68	92

^aData compiled from Pfeiffer et al.⁸¹
^bA total of 27 studies.

GM Sensibilité et Spécificité à différentes valeurs d'index cutoffs

Influence d'un traitement antifongique préalable



Serum GM: Bonne sensibilité surtout chez les patients neutropéniques

Importance de la valeur de l'Index de cut-off
Index DO ≥ 0.5 : meilleure sensibilité chez patients neutropéniques

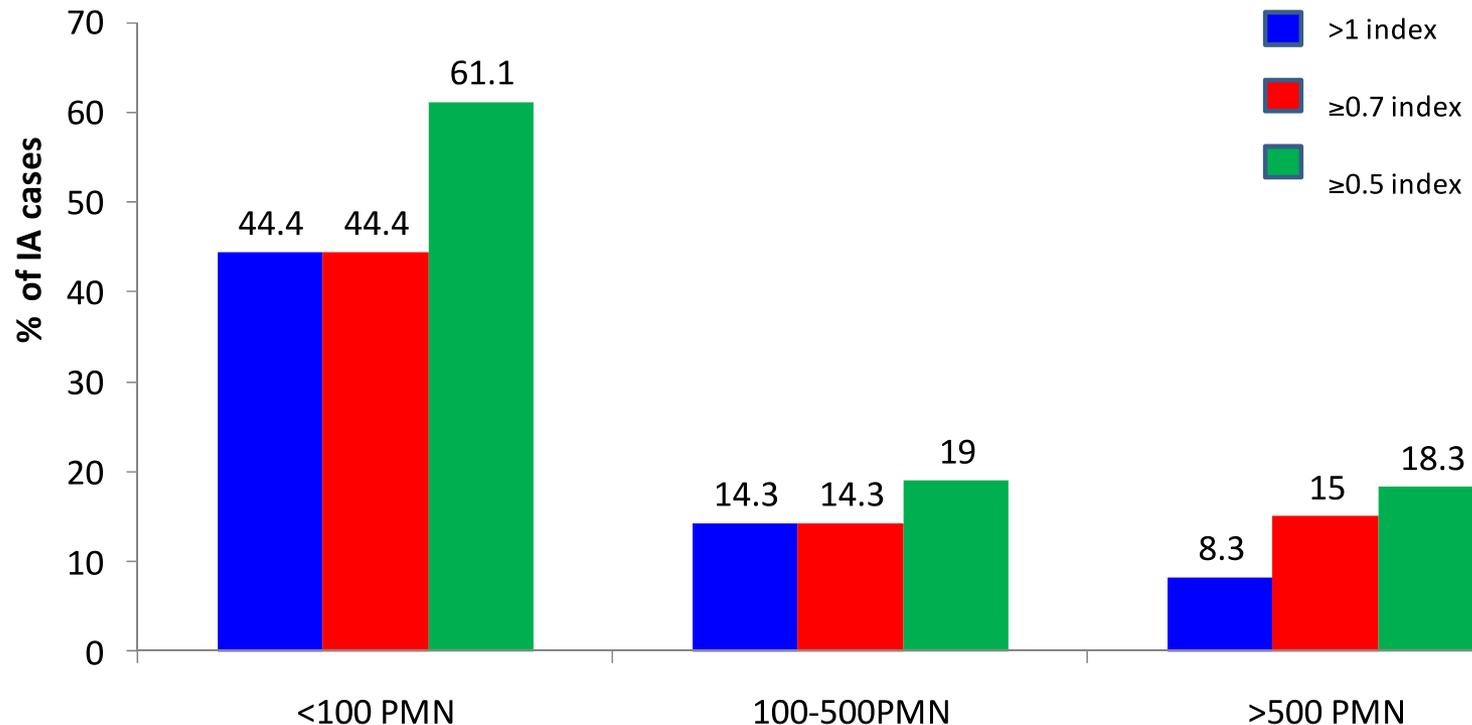




Table 2. Sensitivity and specificity of the Platelia *Aspergillus* EIA (Bio-Rad Laboratories), according to selected cutoff optical density (OD) indices and European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group classification of episodes of invasive aspergillosis (IA).

OD index cutoff value, episode classification	No. of episodes with positive results/no. of episodes tested	Sensitivity, % (95% CI)	No. of episodes with negative results/no. of episodes tested	Specificity, % (95% CI)
OD index ≥ 1.5				
Proven IA	19/19	100 (85.4–100)
Probable IA	10/19	52.6 (28.9–75.5)
Overall	29/38	76.3 (59.8–88.6)
Control group	196/201	97.5 (94.3–99.2)
OD index ≥ 1.0				
Proven IA	19/19	100 (85.4–100)
Probable IA	12/19	63.2 (38.4–83.7)
Overall	31/38	81.6 (65.7–92.3)
Control group	194/201	96.5 (93.0–98.6)
OD index ≥ 0.5				
Proven IA	19/19	100 (85.4–100)
Probable IA	18/19	94.7 (74.0–99.9)
Overall	37/38	97.4 (86.2–99.9)
Control group	182/201	90.5 (85.6–94.2)
OD index $\geq 2 \times 0.5$				
Proven IA	19/19	100 (85.4–100)
Probable IA	16/19	84.2 (60.4–96.6)
Overall	35/38	92.1 (78.6–98.3)
Control group	196/201	97.5 (94.3–99.2)

Aspergillose invasive:

Temps entre positivité des GM et diagnostic clinique

Table 4. Time between test positivity and clinical diagnosis.

Time, median (range)	GM index cutoff		
	1.5	1.0	0.5
Between test positivity and IA diagnosis	-1 (-41 to 19)	-1 (-41 to 19)	-10 (-59 to 19)
Between test positivity and clinical onset	0 (-21 to 19)	0 (-21 to 19)	-6 (-25 to 19)

NOTE. No. of days before an event (diagnosis or clinical onset) are represented with negative values; no. of days after an event are positive. IA, invasive aspergillosis.

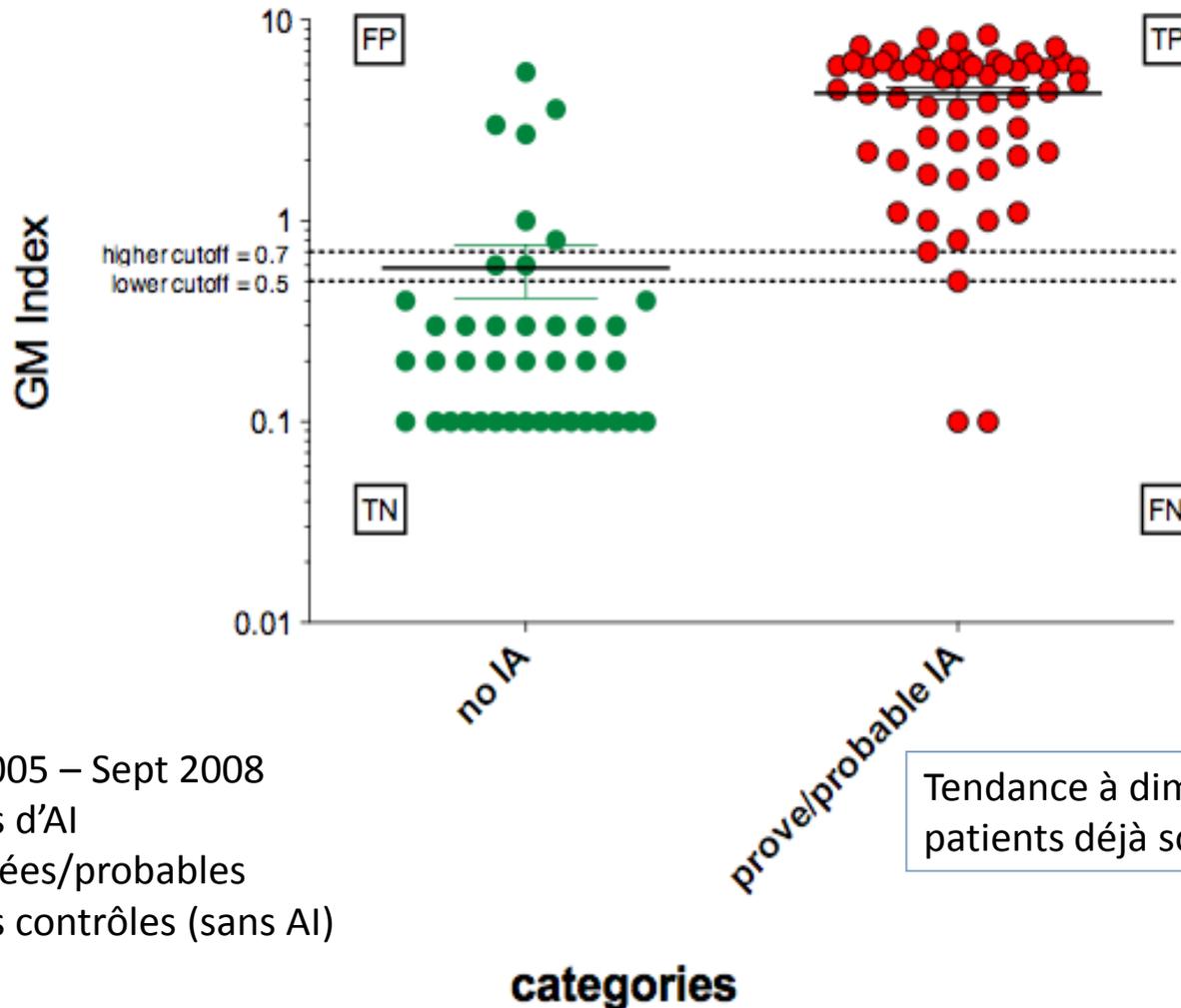
Test GM + en moyenne 7 j avant le début des symptômes cliniques
et 10 J avant le Dx d'AI

détection GM dans d'autres spécimens

- LCR pour le diagnostic d'aspergillose cérébrale
 - 100% sensibilité/spécificité (MS Kami.Br J Haematol 1999)
 - GM+ 45 jours avant résultat culture LCR
(Verweij J Clin Microbiol 1999)
 - Taux de GM significativement plus élevé vs. patients contrôle, par production intra-thécale de GM
(Viscoli J Clin Microbiol 2002)
- LBA et AET
 - Sensibilité 85%, SP 100%, PPV 100%, NPV 88%
 - Sensibilité détection GM sur LBA = 100% (≥ 0.5) dans cas AI prouvés si un second échantillon de LBA est pris en compte
 - Performance aussi bonne chez pts neutropéniques et non-neutropéniques
(Meersseman et al., Am J Respir Crit Care Med 2008, 177: 27-34)
- Liq. Péricarde
- Aspirations-abcès

Pas de valeurs d'Index de cutoff validées !!!

Dosage GM dans BAL chez des patients avec Néoplasies hématologiques



Index GM pas différents chez patients neutropéniques vs. Patients non neutropéniques

Jan 2005 – Sept 2008
 58 cas d'AI prouvées/probables
 41 cas contrôles (sans AI)

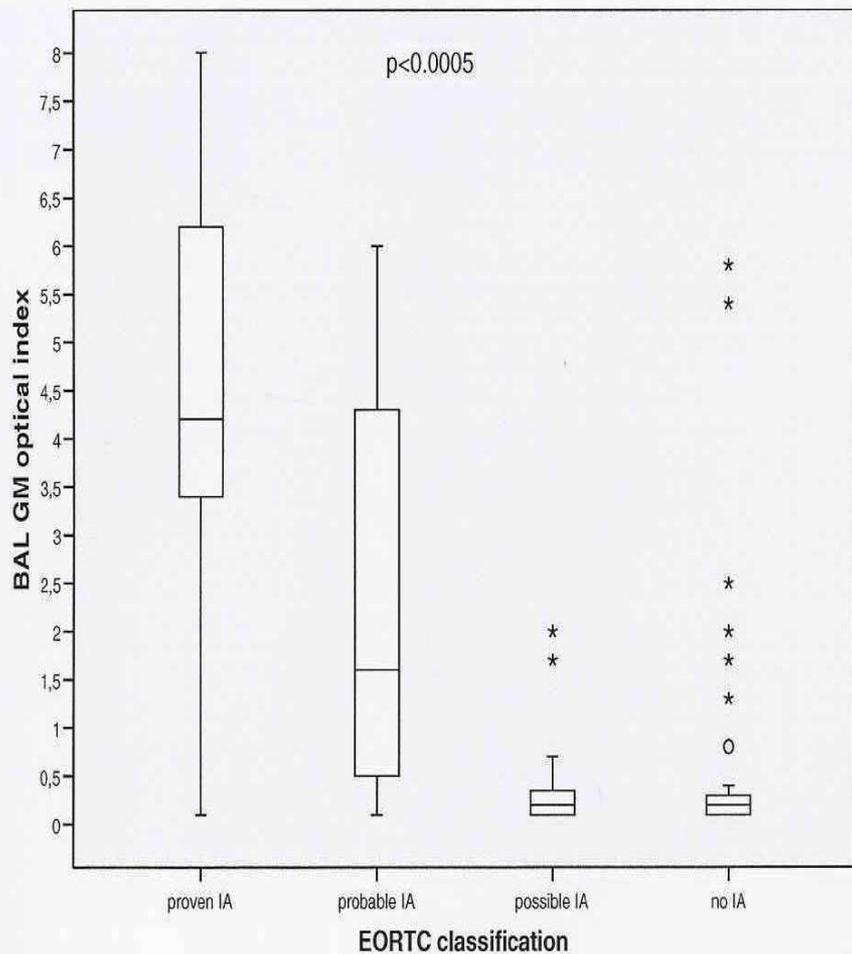
Tendance à diminution de sensibilité chez les patients déjà sous prophylaxie antifongique

Performance du test de détection des GM sur LBA

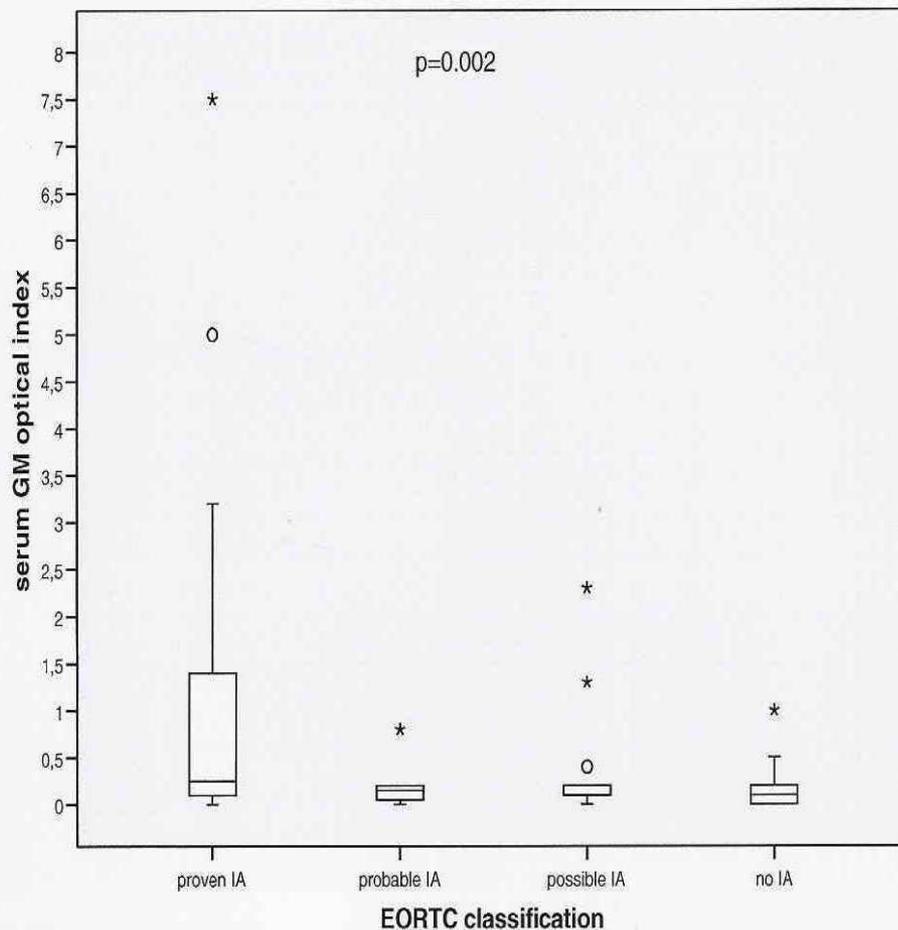
- Seulement 50% des cas d'AIP prouvées avaient une culture positive et/ou Ex. Direct positifs
- Résultats de culture/Ex.direct LBA et GM sérique étaient négatifs dans 11/26 (42%) cas d'AIP prouvées
- Sensibilité de détection des GM sur LBA ($DO \geq 0.5$) = 100% dans les cas AIP prouvées (si 2 prélèvements LBA obtenus)
- Détection de GM sur LBA : performance comparable chez patients neutropéniques et non-neutropéniques

Patients hospitalisés en USI

LBA



SERUM



Précautions chez les enfants

- 10% résultats GM Faux positifs chez les patients pédiatriques
 - Antigénémie GM transitoire sans infection aigüe aspergillaire *chez* enfants en bas âge (nourissons et prématurés)
 - Concentrations élevés de GM dans le lait de vache (index >1.5)
 - Colonisation par *Bifidobacterium* spp
- Résultat GM + doit être interprété en tenant compte de la diète des patients, même chez les NN alimentés aux lait artificiel

JP Gangneux. Lancet 2002.

A Sulahian. Cancer 2001

M Siemann. Mycoses 1998

A Warris. 11th ECCMID 2001

Résultats vrais positifs ou faux positifs ?

- 1 à 18% GM+ dans serum selon les séries
- Échantillons obtenus dans les 10 jours suivant une chimioRx cytotoxique ou dans les 30 jours post BMT
- cyclophosphamide (potential inducer)
- Réactions croisées
 - (exoantigens de bactéries ou levures)
- Alimentation (Pâtes, céréales, lait, café,..)
- Echantillons en coton (dans les tests antigeniques d'agglutination au latex)

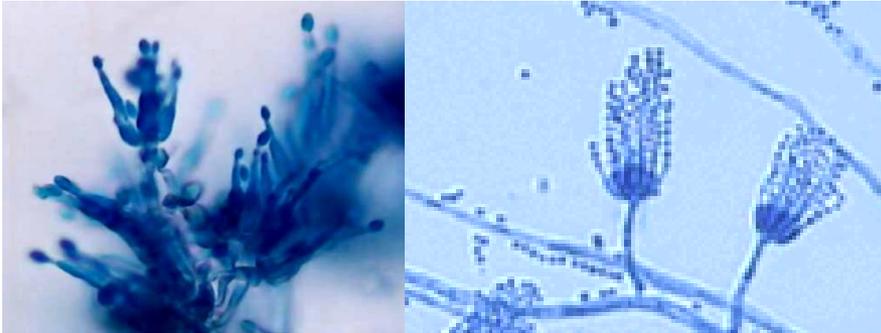
A.Warris. ICAAC 2001

JP.Gangneux Lancet 2002

F.Dale. Eur J Clin Microbiol Dis 2002

Résultats GM faux positifs:

Réactions croisées (Penicillium)



- *Penicillium chrysogenum*
- *Penicillium digitatum*
- *Paecilomyces variotii*
- *Rhodotorula rubra*
Swanink et al. JCM 1997; 35: 257
- *Bifidobacterium*
- *Eggerthella lenta*

Presence of the GM in the children's foods

Puffed chocolate cereal
corn petals, honeyed corn flakes
bread

Macarroni

Rice, puffed rice

Dry cakes

grilled sausage

Gratin dauphinoise

roast chicken, Bolognese sauce

Crips

Chips

Crème caramel

Letscher-Bru et al. J Mycol Med 1998; 8: 112

Résultats GM faux positifs: β -lactams, solutions IV Gluconate

Piperacilline-tazobactam

Adam et al. CID 2004; 38: 917

Singh et al. AAC 2004; 48: 1989

Sulahian 2003. N Eng J Med 2003; 349: 2366

Machetti et al AAC 2005:49: 3984

Presence de GM dans les solutions IV

- **86% flacons GM+**
- **Index Médian GM 1.99 (0.77 to 6.98)**
- **Grande variabilité des valeurs d'index POS**
- **Présence de lots négatifs**
- **Diminution rapide de l'index dès l'arrêt du traitement**

Amoxicilline-clavulanate

IV Gluconate solution (plasmalyte)

Surmont et al JCM 2007:45: 1373

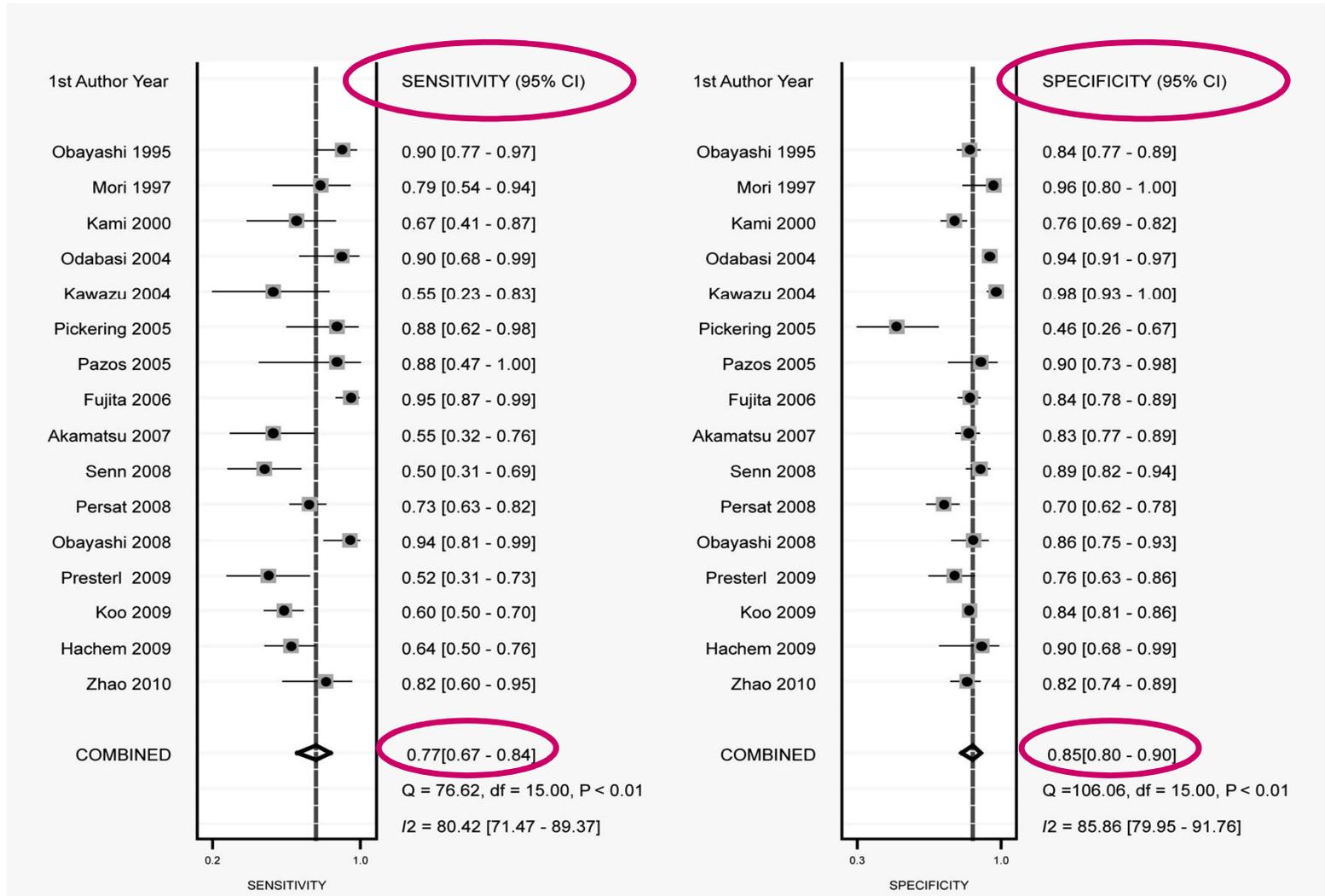
Résultats GM faux négatifs dans l'AI

- GM serum Faux négatifs: < 5%
 - Pfs chez patients non-neutropéniques avec AI, AND d'Aspergillus circulant et Ag (GM) non détectables pendant l'infection
 - Maladie granulomateuse chronique (CGD); infections intracellulaires (P.Verweij.J Clin Microbiol 2000)
 - Causes possibles:
 - Angioinvasion limitée
 - Faible charge fongique
 - Titres élevé d'anticorps anti-Aspergillus
 - Taux faible de GM libéré par le champignon;
 - Triatement prophylactique ou pré-emptif (par antifongiques)

Détection de (1-3) β -D-Glucan

- Polysaccharide de paroi spécifique de tous les champignons (sauf Zygomycetes: Mucorales et Cryptococcus)
- Plusieurs kits commerciaux : Fungitell™ (GlucateLL™), Fungitec-G™ glucan detection test, Wako-WB003 test en Europe et aux USA
- Nombreuses causes de résultats FP+, valeur NPV élevée (“rule out disease”), Nécessite combinaison avec autres tests pour diagnostic d’infection fongique invasive
- Test manuel (pas très user-friendly): coût, logistique complexe, problèmes techniques, contaminations
- Aspergillose invasive (AI): sens: 50-88%; SP: 81-89%
- Candidose invasive (CI): sens: 60-96.6%; SP: 93.3-100%

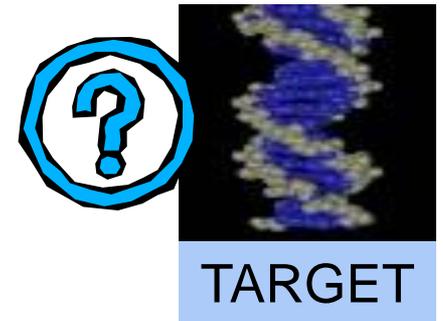
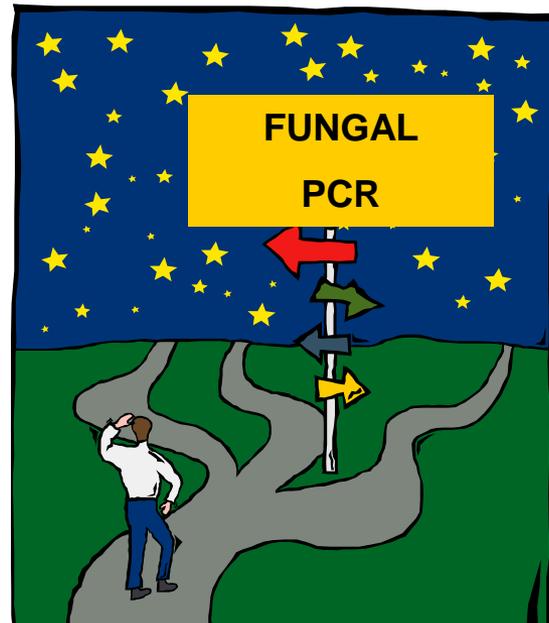
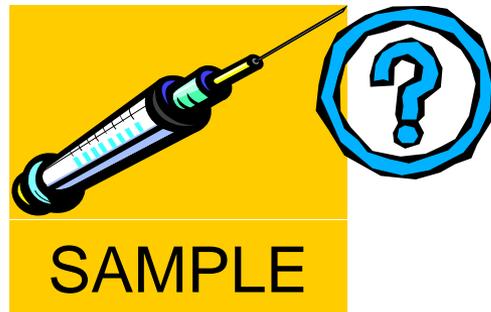
Sensibilité et spécificité des taux serum/plasma (1→3)-β- D-glucan pour le diagnostic des infections fongiques invasives (prouvées/probables)



Détection de (1-3) β -D-Gluca

- Faux-positifs
 - Bactériémie à Gram-positif (*S. pneumoniae*) et Gram – (*Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes*)
 - Hémolyse
 - Hémodialyse avec membrane cellulose
 - Traitement: immunoglobulines, albumine, facteurs coagulation, exposition à de la gaze ou matériaux contenant des glucanes
- Faux-négatifs
 - Concentration élevée de bilirubine et triglycérides
- Un résultat positif doit être confirmé (combinaison avec GM ou PCR)
- Chez patients USI
 - Performances du tests insuffisantes pour utilisé comme test de diagnostic de l'AI (screening -> confirmation par autre test si +)
 - CI chez patients chirurgicaux: 25% de résultats faux positifs pdt les 3 premiers jours de séjours à l'USI (colonisation vs infection ?)

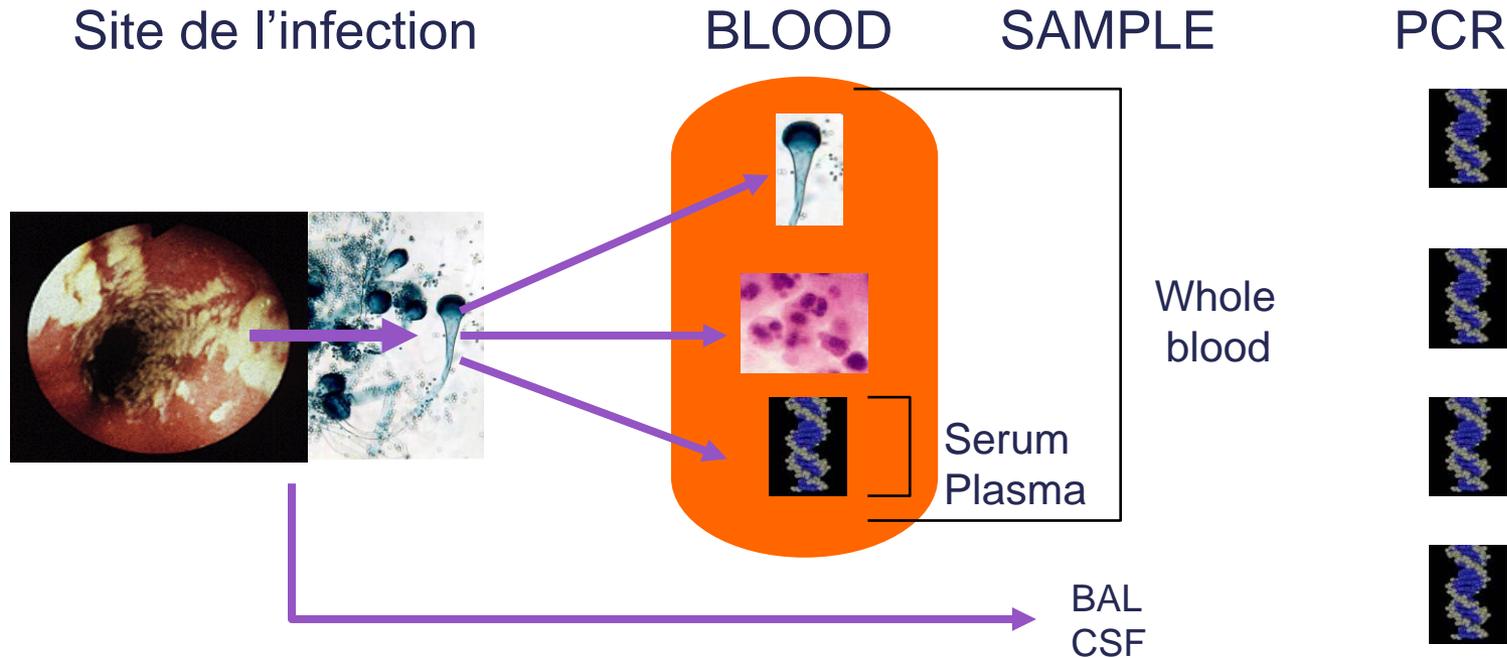
Detection of specific nucleic acid



Detection d'acides nucléiques spécifiques

Choix de l'échantillon

- Manque de compréhension sur la cinétique de l'ADN fongique chez les patients infectés

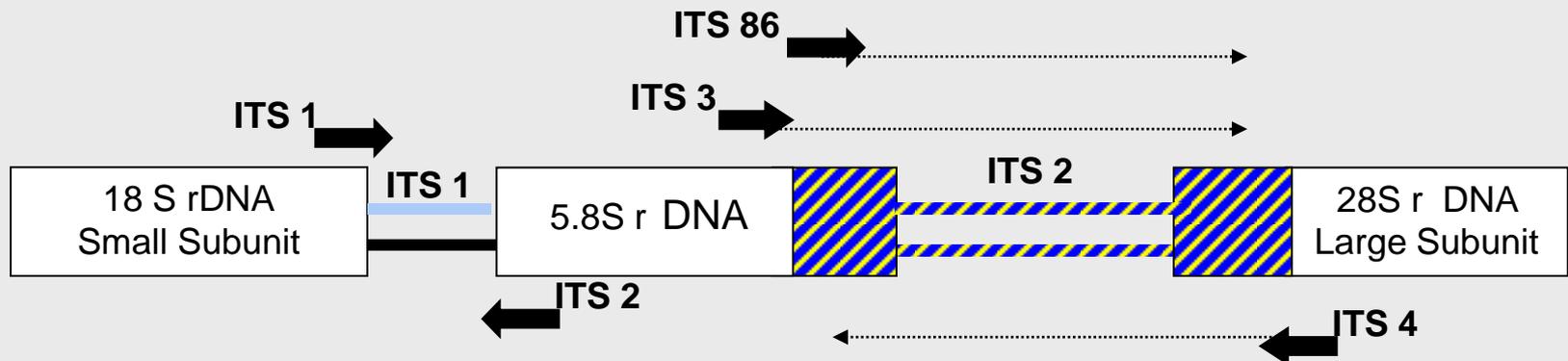


- Sous quelle forme l'ADN fongique est libéré au site de l'infection et circule dans le sang ?
- Pas de distinction (conidies vs hyphes filamenteuses en multiplication; ie: PCR ne différencie pas colonisation /infection au niveau des sites commensaux (muqueuses) non stériles
- Risque de contamination à partir de l'environnement

Detection d'acides nucléiques fongiques spécifiques pour ID et diagnostic

- “single gene”
- “Multicopy” gene
 - DNA mitochondrial:
 - Utilisé pour *Candida* et *Aspergillus* (primers spécifiques de l'espèce)
 - Variabilité inter-souches au sein de l'espèce peut être un facteur limitant
 - repetitive ribosomal DNA (50-500 copies)
 - Utilisé pour identification de moisissures non sporulées
 - Qualité / exactitudes variables des banques de données de séquences

Schematic diagram of ribosomal (r) DNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions



Détection d'acides nucléiques dans les AI prouvées

- PCR positive précède les signes cliniques en moyenne de 5.75 j (0-14 j)
- Rôle dans le monitoring/suivi de la réponse au Rx ? pas encore clairement démontré
- Real-time PCR diminue le risque de résultats Faux positifs
- Extraction ADN automatisée
- Tests PCR actuels plus homogènes mieux standardisés -> nouvelles opportunités pour études cliniques (diagnostic des infections fongiques invasives)

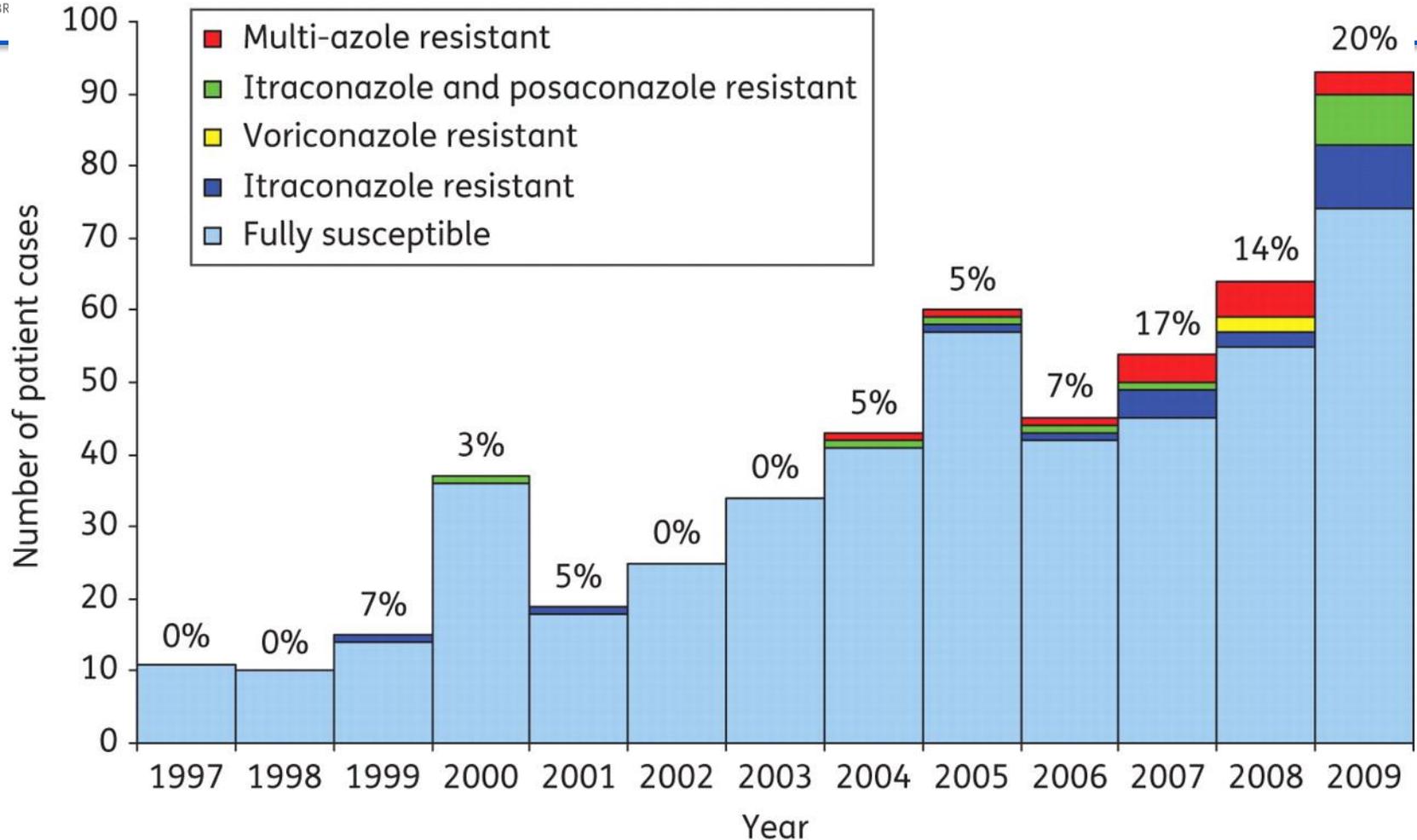
PCR Aspergillus spp

Gene target	Detection method	Sample	No. patients	%	
				Sens	Spec
18SrDNA	Gel	Blood	140	100	89
18SrDNA	Probe	Blood	84	100	65
18SrDNA	Probe	Blood	92	100	73
18SrDNA	Nested-PCR	BAL	67	100	93
18SrDNA	Nested-PCR	Blood	218	92	81
18SrDNA	Probe	Blood	122	79	92
18SrDNA	Nested-PCR	Blood	165	64	64
18SrDNA	Molecular beacon	BAL	99	67	100
Mitochondrial	PCR-ELISA	Serum	201	64	90
18SrDNA	Probe	Plasma	96	64	87
18SrDNA	PCR-ELISA	Blood	121	75	96
28SrDNA	Probe	Blood	203	92	95

Résultats faux positifs sur prélèvement BAL/lavage bronchique : présence transitoire de conidies

- Intérêt dans la candidose invasive
 - Identification: spec: 100% (M Guiver JCPathol 2001)
 - Test diagnostic (détection):
 - quantification inoculum (leviures) dans le sang
 - Seuil détection: 5 CFU/ml, >96% reproductibilité, S: 100%, SP: 96.5%
(Y Maaroufi, H Rodriguez, F Crokaert. RICAI 2002).
(Y Maaroufi et al JCM 2003)
- Intérêt dans l'Aspergillose
 - Seuil détection: 5 CFU/ml, >96 % reproductibility, S: 100%
(J Loeffler JCM 2000)
- Utilisation pour détection de mutations ponctuelles associés avec résistance aux antifongiques (azolés)
- Diminution du risque de contamination

Azole resistance frequency in *A. fumigatus* 1997–2009



Modification de la sensibilité selon l'incidence de l'aspergillose invasive

invasive aspergillosis (%)	Antigen detection		PCR	
	PPV (%)	NPV (%)	PPV (%)	NPV (%)
0.5	10	95.4	1.4	100
5	50	95.7	13	100
10	69	96.6	24	100

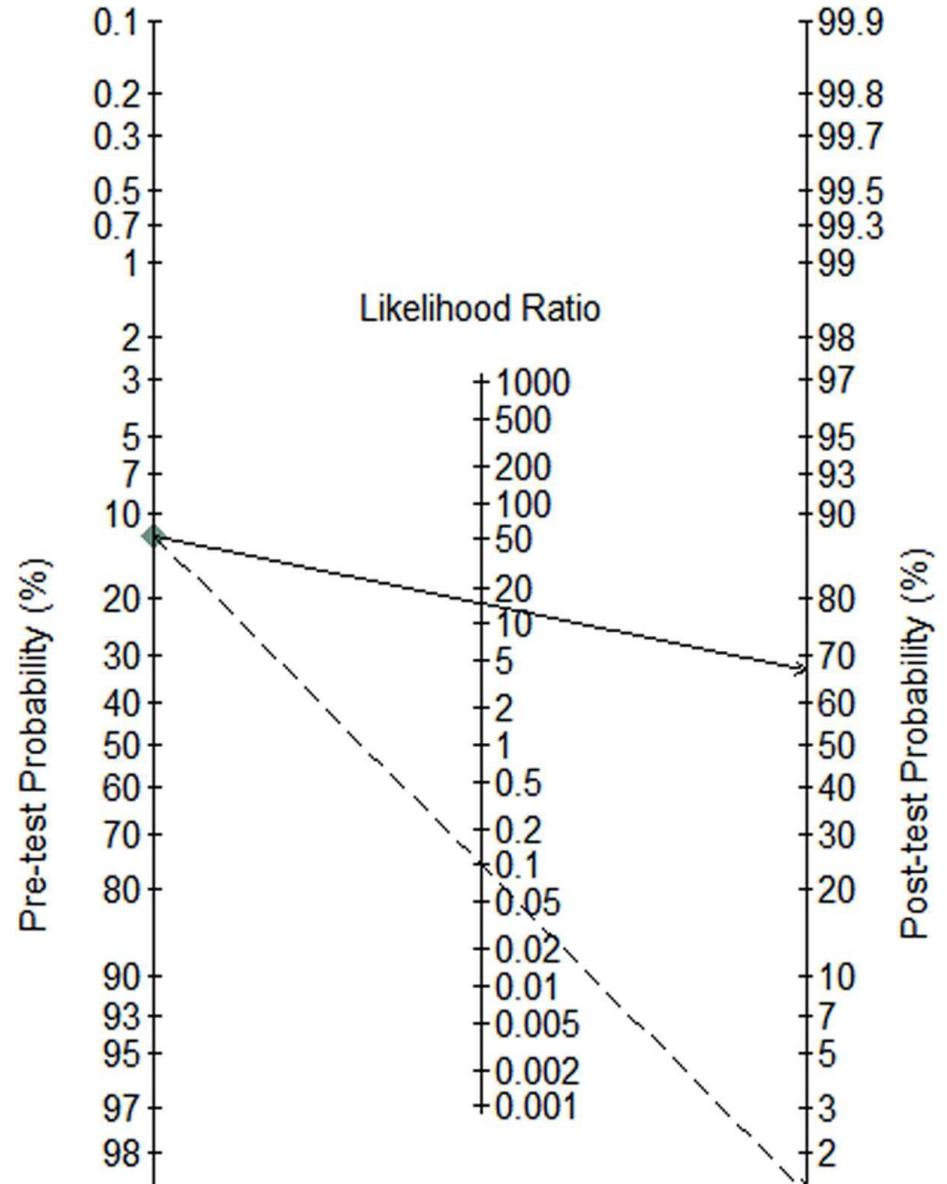
- L'incidence de l'AI influence de manière majeure les PPVs et NPV des tests diagnostics
- La détection de l'antigène GM a une meilleure PPV à incidence faible (que celle de la PCR sur sang total)
- L'avantage de la PCR est qu'un résultat négatif corrèle toujours avec absence de la maladie (AI) (Rule out disease)

Fagan's monogram

Prévalence de l'AI = 12%

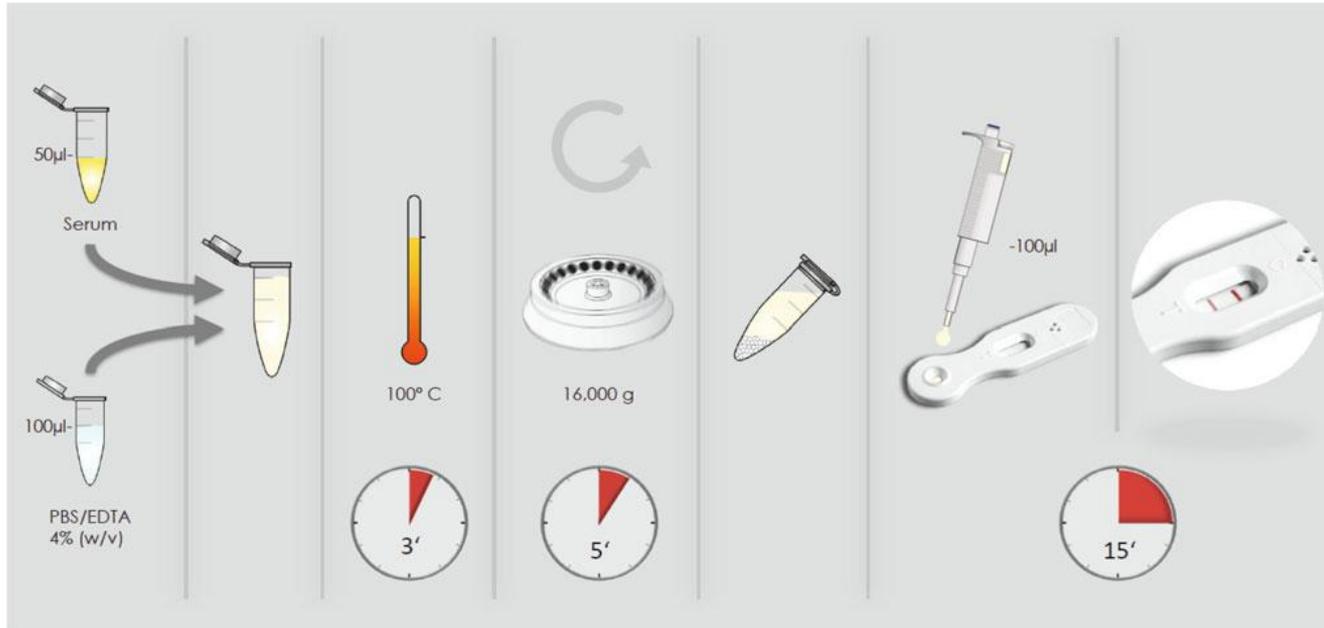
Résultat GM "POS":
Probabilité d'AI = 68%

Résultat GM "NEG":
Probabilité d'AI = 1%



PPV > 10, évidence pour AI (Rule in)
 NPV < 0.1 évidence contre AI (Rule out)
 Test permettant d'obtenir une grande différence
 (concluante sur le plan diagnostic entre les
 probabilités pré- et post-test du diagnostic)

Test antigénique rapide: immunochromatographie Aspergillus lateral-flow device (LFD)



Avantage sur test GM sur serum:

- TAT plus court (15 min vs 3h)
- Pas d'équipement spécifique labo nécessaire
- Test réalisé au cas par cas possible (POCT) versus batch 2-3x sem pour GM)
- Côté moindre ? (GM 45 €/sem si test effectué 3x)



Détection AI par Test direct rapide *Aspergillus* LFD Versus GM serum

Etude monocentrique; 101 patients avec allogreffe médullaire suivi prospectif pdt 12 mois pour suspicion clinique de AI (cas prouvés/cas suspects) selon critères classification EORTC/MSG
10 AI en fin de séjour (1 cas prouvé; 9 cas probables) ! Prévalence 9.9%

Table 1 Diagnostic performance of the index tests for a diagnosis of proven + probable IFD

Criteria for positivity	Index test	TP	FP	FN	TN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	LR+	LR-	DOR
One positive serum required	<i>Aspergillus</i> -LFD	4	12	6	79	40.0 % (13.7–72.6)	86.8 % (77.7–92.7)	25.0 % (8.3–52.6)	92.9 % (84.7–97.1)	3.03 (1.20–7.64)	0.69 (0.42–1.15)	4.39 (1.08–17.86)
	GM-EIA	4	10	6	81	40.0 % (13.7–72.6)	89.0 % (80.3–94.3)	28.6 % (9.9–60.0)	93.1 % (85.0–97.2)	3.64 (1.40–9.49)	0.67 (0.41–1.12)	5.40 (1.30–22.47)
Two consecutive positive sera required	<i>Aspergillus</i> -LFD	2	2	8	89	20.0 % (3.5–55.8)	97.8 % (91.5–99.6)	50.0 % (9.2–90.8)	91.8 % (83.9–96.1)	9.10 (1.43–57.76)	0.82 (0.60–1.12)	11.13 (1.38–89.88)
	GM-EIA	3	1	7	90	30.0 % (8.1–64.6)	98.9 % (93.2–99.9)	75.0 % (21.9–98.7)	92.8 % (85.2–96.8)	27.30 (3.13–238.38)	0.71 (0.47–1.06)	38.57 (3.53–421.08)

IFD invasive fungal disease, TP true-positives, FP false-positives, FN false-negatives, TN true-negatives, PPV positive predictive value, NPV negative predictive value, LR+ likelihood ratio positive, LR- likelihood ratio negative, DOR diagnostic odds ratio, LFD lateral-flow device, GM-EIA Platelia® *Aspergillus* EIA

Performance comparable de *Aspergillus* LFD vs GM-EIA (si un seul test utilisé)

Sensibilité faible pour les 2 tests (Nombreux patients déjà sous Tx antifongiques)

Valeur d'exclusion (Rule out) si un test *Aspergillus* LFD nég (VPN élevée)

Si test + => confirmer par un autre deuxième test (GM-EIA, PCR)

STRONG EVIDENCE

Galactomannan detection in serum (A II)

Cryptococcus antigen in serum and CSF (AII)

MODERATE EVIDENCE

(1→3)-β-D-glucan detection in serum (BII)

Combined mannan/anti-mannan testing for
hepatosplenic candidiasis (BIII) and candidemia (CII)

NO RECOMMENDATIONS

PCR

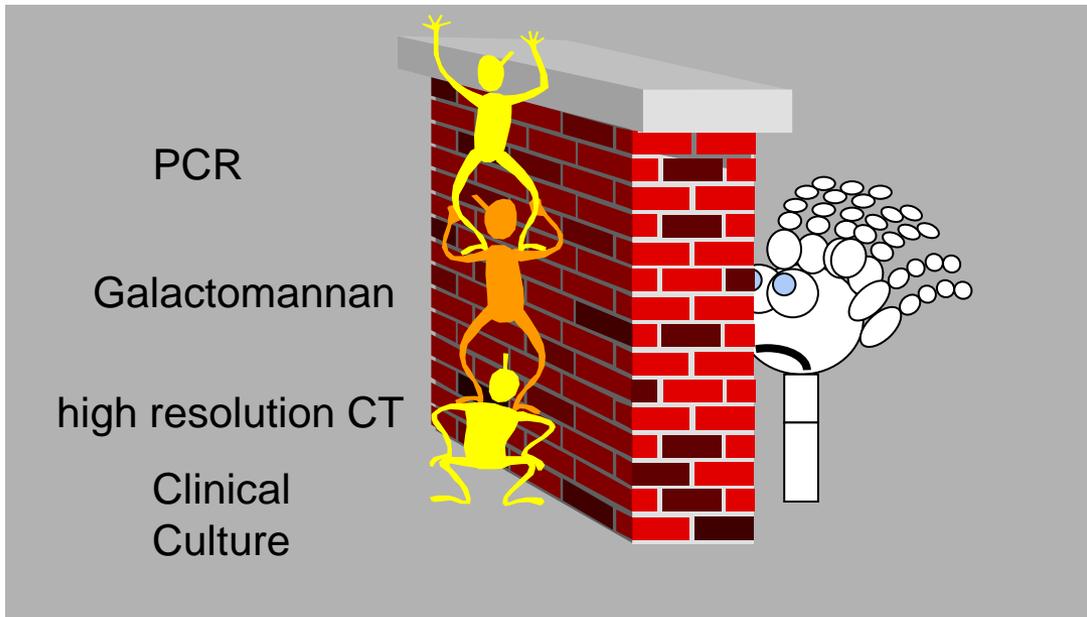
Stratégies de Management de l'AI

Dépistage des patients à haut risque
 Pdt la période de plus haut risque
 2-4 X/week

Détection de marqueurs
 Et confirmé
 Index ≥ 0.5

Bilan diagnostic
 CT scan
 Fibro/bronchoscopie

APPROCHE MULTIDISCIPLINAIRE



Traitement
 Pre-emptif

Traitement

Monitoring des
 biomarqueurs
 circulants

Utilisation combinée Aspergillus Ag
 LFD/GM + PCR augmente sensibilité
 et NPV

Points à considérer avant et pendant l'implémentation de tests diagnostic de l'AI...

- Test avec haute Sens: Un résultat négatif «rules out» le diagnostic
- Test avec haute SP : Un résultat positif «rules in» the le diagnostic
- Focus pour des tests qui ont un impact sur le traitement des patients (consider tests that generate large shifts from pretest to posttest probability)
- Inclure l'élément coût et TAT (temps de résultat) dans les process décisionnels
- Définir clairement les conditions/indications (et critères d'exclusion/élimination) des tests