

Nouveaux marqueurs pour le diagnostic de la maladie fongique invasive

New Markers for the Diagnosis of Invasive Fungal Disease

J. Poissy · E. Parmentier-Decrucq · B. Sendid · D. Mathieu · D. Poulain

Reçu le 11 décembre 2013 ; accepté le 15 février 2014
© SRLF et Springer-Verlag France 2014

Résumé Les infections fongiques invasives (IFI), aspergilloses (AI) et candidoses (CI) essentiellement, ont vu leur fréquence augmenter ces dernières décennies en réanimation. Leur pronostic est directement en rapport avec la précocité du traitement antifongique. Or, les techniques microbiologiques conventionnelles donnent des résultats trop tardifs pour permettre cette rapidité thérapeutique, voire sont mises à défaut : 50 % des CI s'accompagnent ainsi d'hémocultures négatives. Il est donc nécessaire d'appuyer les stratégies de traitement précoce sur l'utilisation de nouveaux outils, dont les biomarqueurs. Ceux-ci sont dérivés de composants structuraux, enzymatiques ou métaboliques des champignons. Les biomarqueurs commercialisés utilisables en routine sont pour l'instant des antigènes (Ag) polysaccharidiques de paroi ou les anticorps (Ac) les reconnaissant. Parmi ceux-ci, le β -D-1,3-glucane est un marqueur ubiquitaire, utilisable pour la CI, l'AI mais aussi la pneumocystose. Il semble précoce, sensible, mais peu spécifique pour les patients de réanimation. À l'inverse, le mannane est un Ag spécifique de *Candida* et de ce fait spécifique pour le diag-

nostic de CI, mais peu sensible et moins précoce que le β -D-1,3-glucane. Le galactomannane est lui spécifique de *Aspergillus* et représente un biomarqueur assez sensible, précoce et spécifique des AI, malgré de nombreuses causes de faux-positifs. Les Ac correspondant à ces Ag ont des performances imparfaites, mais leur cinétique, inverse de celle des Ag, peut être intéressante à suivre. L'utilisation de ces biomarqueurs dans le cadre d'une stratégie de traitement préemptif ou à l'inverse pour limiter des traitements empiriques non justifiés pourrait permettre de rationaliser les prescriptions d'antifongiques tout en améliorant la précocité des traitements. Les progrès à venir dans leur utilisation reposent sur l'utilisation d'autres cibles moléculaires et sur des techniques de dosage exploitant les avancées biotechnologiques.

Mots clés Biomarqueurs · Candidose invasive · Aspergillose invasive · Préemptif · Pronostic

Abstract The incidence in the intensive care unit of invasive fungal infections, including invasive aspergillosis (IA) and candidiasis (IC), increased during these last decades. Outcome remains tightly linked to the delay of treatment administration. Routine microbiological techniques give too late results to allow prompt antifungal therapy. They are even sometimes unable to diagnose the infection since almost 50% of the blood cultures are negative in IC. Therefore, other tools like biomarkers are needed to help building new therapeutic strategies. Biomarkers derive from structural, enzymatic, or metabolic components of fungi. Polysaccharide antigens from the cell wall or antibodies recognizing them can be routinely used. β -D-1,3-glucan is an ubiquitous biomarker, useful for IC, IA, and pneumocystis pneumonia diagnosis. It becomes early positive and represents a sensitive but not a specific biomarker. At the opposite, mannane is an antigen from *Candida*, specific but not sensitive for IC diagnosis and becoming positive later in the infection course than β -D-1,3-glucan. Galactomannane is specific and quite sensitive for *Aspergillus*. It becomes early positive for IA diagnosis, despite numerous causes of false positivity. Related antibodies have variable performance, but their kinetics

J. Poissy (✉) · E. Parmentier-Decrucq · D. Mathieu
Pôle de réanimation, hôpital Roger-Salengro,
CHRU de Lille, boulevard du Professeur-Leclercq,
F-59037 Lille cedex, France
e-mail : julien_poissy@hotmail.fr

J. Poissy · B. Sendid · D. Poulain
Inserm U995-2, régulation de l'interface glycanique
hôte-Candida, université Lille-II, faculté de médecine
Henri-Warembourg, place de Verdun,
F-59037 Lille cedex, France

B. Sendid · D. Poulain
Laboratoire de mycologie-parasitologie,
centre de biologie pathologie, CHRU de Lille,
boulevard du Professeur-Leclercq,
F-59037 Lille cedex, France

D. Poulain
Délégation à la recherche clinique et à l'innovation,
CHRU de Lille, avenue Oscar-Lambert,
F-59037 Lille cedex, France

appears interesting to follow-up. The use of these biomarkers for preemptive treatments or at the opposite to decrease the number of empiric prescriptions may help rationalizing antifungal management and increasing the rapidity of treatment administration. Further progresses are expected, relying on new molecular targets and assays based on new biotechnologies.

Keywords Biomarkers · Invasive candidiasis · Invasive aspergillosis · Preemptive · Prognosis

Introduction

Les infections fongiques invasives (IFI) représentent 19 % des infections en réanimation [1]. Les candidoses invasives (CI) en sont la première cause et les levures du genre *Candida* sont au quatrième rang des agents retrouvés dans les hémocultures prélevées dans un contexte nosocomial [2]. Malgré des progrès importants dans la compréhension de la physiopathologie et la mise à disposition de molécules antifongiques efficaces, la mortalité des CI reste élevée [3]. En réanimation, la prévalence des candidémies est de 7/1 000, avec une mortalité attribuable de 40 %, supérieure à celle relevée pour les bactériémies [4]. Le diagnostic positif des CI est difficile et repose traditionnellement sur l'association de signes cliniques non spécifiques à des signes histopathologiques et/ou la présence de levures dans un milieu normalement stérile (hémocultures, plèvre, LCR...). De ce fait, l'une des raisons de ce pronostic sombre est la mauvaise performance des techniques microbiologiques conventionnelles, à l'origine d'un défaut de diagnostic ou d'un retard dans l'introduction du traitement antifongique spécifique. Cela est lié au fait que la sensibilité des hémocultures pour le diagnostic de CI est évaluée à 50 % et que le délai minimum de rendu de positivité est d'au moins 48 heures [5] ; 24 à 48 heures supplémentaires sont en outre nécessaires pour l'obtention de l'antifongogramme, et entre deux et cinq jours pour l'identification de l'espèce. Ce délai d'identification a été considérablement réduit avec l'introduction de la spectrométrie de masse, en termes de rapidité et de fiabilité d'identification des espèces [6]. Quelques travaux concernent actuellement la détermination de la sensibilité aux antifongiques en spectrométrie sans passer par la culture [7]. Ces progrès sont importants à considérer, car il est clairement établi que le délai d'introduction du traitement antifongique est corrélé au pronostic [8,9]. Cette problématique est aussi rencontrée avec la deuxième IFI la plus fréquente en réanimation, l'aspergillose invasive (AI), dont la mortalité est supérieure à 40 %. Les champignons du genre *Aspergillus* et essentiellement l'espèce *fumigatus* sont rencontrés dans 1,4 % des infections en réa-

nimation [1]. L'AI peut concerner des patients immunocompétents, mais sa prévalence augmente de façon importante en cas d'immunodépression : *Aspergillus fumigatus* est ainsi par exemple la première cause d'IFI chez l'allogreffé de moelle osseuse [10]. Ici aussi, le délai d'introduction du traitement antifongique spécifique a un impact fort sur la mortalité et la durée d'hospitalisation [11], toute la difficulté étant de différencier la présence d'*A. fumigatus* dans l'arbre respiratoire de l'infection.

Il est donc nécessaire de disposer d'outils alternatifs aux techniques mycologiques conventionnelles pour améliorer ce délai d'introduction du traitement. Différentes approches diagnostiques non basées sur la culture ont été développées. Ces techniques sont la détection d'antigènes (Ag), d'anticorps (Ac) et/ou d'acide désoxyribonucléique (ADN) [12]. Les tests actuellement disponibles en routine et les mieux évalués sont la détection de polysaccharides pariétaux circulant dans le sérum des patients ou d'Ac dirigés contre ces composants. Cette démarche est appliquée à la CI et à l'AI sur lesquelles nous focaliserons cet exposé. La survenue tardive de la CI en réanimation [4] rend leur utilisation conceptuellement intéressante, car pouvant être déployés dans le cadre d'une stratégie de *screening* [13]. Ces biomarqueurs sont recommandés par l'Infectious Diseases Society of America [14] et dans les recommandations 2012 de la Surviving Sepsis Campaign [15]. Cependant, la place et les performances des tests en réanimation restent imprécises. Dans cette revue, nous présenterons dans un premier temps les molécules utilisées comme biomarqueurs, puis analyserons les performances des tests qui les concernent, pour conclure par une proposition concernant leur utilisation possible en réanimation.

Nature moléculaire des biomarqueurs

Les biomarqueurs les plus utilisés en clinique sont des composants saccharidiques de la paroi des champignons. Quelques travaux concernent les protéines structurales ou enzymatiques. Les Ac dirigés contre ces molécules peuvent aussi être utilisés. Nous n'aborderons pas ici le détail des techniques de biologie moléculaire, semblant pour certaines prometteuses, mais pour l'instant non utilisées en routine. La raison en est que les techniques sont variées, tant en termes de produit biologique utilisé (sang total, sérum, urines ou même produit de lavage bronchoalvéolaire pour les aspergilloses) que de cible amplifiée (acide ribonucléique [ARN] ribosomal, cytochrome P450...) [16,17]. Par ailleurs, les problèmes d'extraction ne sont pas encore parfaitement résolus, à l'origine de faux-négatifs. À l'inverse, des faux-positifs peuvent être liés à la contamination par des saprophytes environnementaux [18].

Composants glycaniques de la paroi fungique

Candida est un champignon unicellulaire (levure), eucaryote, pourvu d'une paroi à l'extérieur de sa membrane cytoplasmique. Les levures du genre *Candida* sont capables de filamenter en formant du pseudomycélium ou également du mycélium pour *Candida albicans*. Sous forme levure (blastoconidie), cette paroi est formée de plusieurs couches [19]. La couche la plus externe comporte des mannoprotéines enzymatiques et structurales et du phosphopeptidomannane, ou mannane, polymère de mannose. Les mannanes composent 40 % du poids de la paroi. Ils forment un édifice moléculaire complexe avec des branchements variés en α -1,2, α -1,3, α -1,6 et β -1,2, à l'origine de la conformation d'épitopes très variés. Les épitopes β -1,2 mannosidiques sont prépondérants chez *C. albicans* et *Candida glabrata*. Dans les parties plus profondes, on retrouve une couche de chitine près de l'espace périplasmique associée à une épaisse couche de β -glucanes (BDG). Ces BDG sont des résidus glucose liés en β -1,3, avec des ramifications latérales liées en β -1,6. Ils constituent le squelette fibrillaire de la paroi et représentent 50 à 60 % de son poids. L'organisation moléculaire de la paroi de *Candida* est représentée sur la Figure 1. La présence dans le sérum des patients de mannane et d'Ac antimannane peut être déterminée par des techniques d'*enzyme-linked immunosorbent assay* (Elisa) [20]. La recherche de BDG se fait par des tests biochimiques dérivés du limulus test [21]. Ce test utilise la capacité du limule, arthropode marin, de coaguler son hémolymphe en présence de lipopolysaccharides (LPS) ou de glucanes par l'activation d'une cascade enzymatique. Il s'agit d'un moyen de défense primitif non spécifique très efficace. Cette hémolymphe peut être prélevée et utilisée pour des tests de détection de LPS ou de BDG. Pour la détection spécifique des BDG, la cascade enzymatique est inactivée pour le LPS, et le produit final est marqué par un fluorochrome permettant une quantification sur l'in-

tensité du signal optique obtenu. On peut rechercher les BDG dans le sérum, mais aussi dans le LBA et dans le LCR.

A. fumigatus est un champignon filamenteux. Les filaments mycéliens donnent naissance à des conidies assurant la dissémination aérienne de l'espèce. L'architecture générale de la paroi s'organise également avec de la chitine sur laquelle viennent se fixer des branchements de β (1,3)/(1,4)-glucanes, β (1,3)/(1,6)-glucanes. On y trouve également de nombreuses autres molécules dont des α -1,3-glucanes et des polymères de mannose avec des ramifications de galactofuranose. Ce dernier composé est appelé galactomannane [22]. (Un schéma de l'organisation moléculaire d'*Aspergillus* peut être trouvé à la référence [23].) On peut donc aussi utiliser les limulus tests pour doser des dérivés de la paroi d'*Aspergillus*. La présence de galactomannane et d'Ac anti-*Aspergillus* est évaluable par des tests immunologiques Elisa.

Sur le plan clinique, on entrevoit ainsi que la recherche de BDG sera un test polyvalent révélant un polysaccharide ubiquitaire chez *Candida* et *Aspergillus*. On notera que ce composant est aussi présent chez *Pneumocystis jirovecii* [24]. À l'inverse, le mannane est spécifique de *Candida*, et le galactomannane est spécifique d'*Aspergillus*.

Détection d'enzymes et de produits du métabolisme

La détection de l'énolase par des techniques Elisa a donné des résultats prometteurs pour le diagnostic des CI, avec une spécificité de 100 % et une sensibilité d'environ 70 % lors des premières évaluations. Ce biomarqueur semblait aussi assez discriminant entre colonisation et infection [25]. Malheureusement, ce test a été abandonné. Ont aussi été évalués le dosage des Ac anti-énolase et antifructose biphosphate aldolase, dont la spécificité isolée pour le diagnostic de CI est supérieure à 90 %, et la sensibilité de 90 % en associant les deux tests [26]. Enfin, les ratios urinaires de D-arabinitol

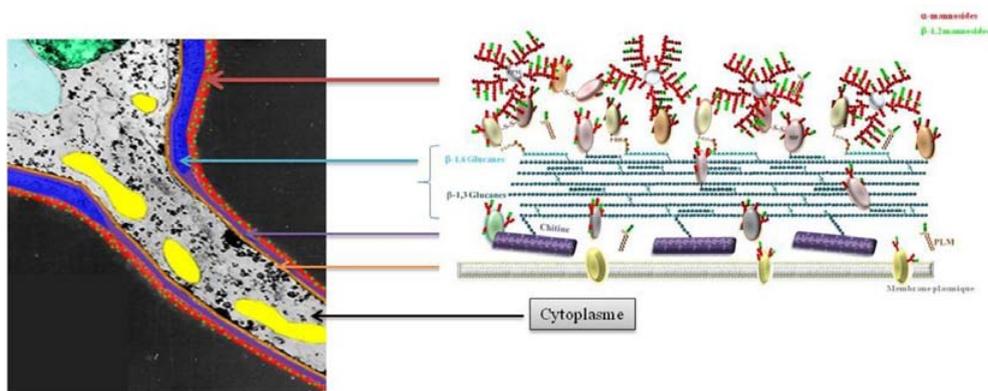


Fig. 1 Coupe de microscopie électronique de *Candida albicans* sous forme filamenteuse, fournie par le Pr Poulain, et représentation de l'organisation moléculaire (schéma fourni par Chantal Fradin, INSERM U995-éq2)

(d'origine fongique)/L-arabinitol (en rapport avec le métabolisme humain) ont été proposés pour faire le diagnostic de CI, avec des performances intéressantes [27]. Ce métabolite est non produit par *Candida krusei* et *C. glabrata* et peut être influencé par la prescription de fluconazole [28]. Il peut aussi être dosé dans le sérum, et son ratio avec la créatinine a été proposé pour évaluer le pronostic de la CI sous traitement [29]. Tous ces tests ne sont pour l'instant pas disponibles en routine.

Utilisation des protéines structurales

La protéine Hwp1 est exprimée sur le tube germinatif de *Candida* lors de sa filamentation. Il est possible de déterminer la présence dans le sérum d'Ac dirigés contre certains épitopes de cette protéine et ainsi avoir un outil pour le diagnostic des CI [30].

D'un point de vue pratique, la réalisation de ces tests à la paillasse prend deux à trois heures. Cependant, excepté le galactomannane aspergillaire qui peut être recherché de façon unitaire, ces tests sont réalisés sur des plaques multipuits, ce qui impose leur réalisation par série. De ce fait, il peut être nécessaire d'attendre plusieurs jours avant d'obtenir le résultat d'un prélèvement, en fonction du volume d'échantillons traité au laboratoire. On notera pour lever toute ambiguïté que la recherche d'Ac anti-aspergillaires par immunoprécipitation prend plus de temps, mais ne rentre pas dans le cadre de cet exposé, puisque ce test concerne la démarche diagnostique dans les aspergilloses bronchopulmonaires invasives essentiellement.

L'ensemble des biomarqueurs présenté est résumé dans le Tableau 1 avec leurs caractéristiques générales.

Performances

Nous n'aborderons ici que les tests commercialisés et disponibles en pratique clinique.

Candidoses invasives

La remarque générale concernant ces infections est que la majorité des études ayant évalué les performances des biomarqueurs ont concerné des populations d'hématologie ou de réanimation chirurgicale. Les données pour les services de réanimation ayant un recrutement « médical » ou polyvalent sont assez parcellaires. Par ailleurs, les CI regroupent les candidémies et les candidoses systémiques sans candidémie. La plupart des études ont concerné des patients candidémiques. Nous verrons que certaines études plus récentes ont essayé d'aborder le problème des CI sans candidémie.

La recherche de mannanes circulant dans le sérum a été suggérée comme aide au diagnostic de CI il y a plus de

30 ans. Le test était exploré chez le lapin et l'homme, en situation d'infection et de colonisation, et comparé au signal donné par les infections à *Aspergillus*. Il était spécifique puisqu'aucun des sujets sains, colonisés par *Candida* ou infectés par *Aspergillus* ne présentait de mannanémie, et la sensibilité était faible puisque 50 % des sujets infectés par *Candida* présentaient un test positif [31]. Cette mannanémie est transitoire [32], et la réaction Ag/Ac est problématique pour le dosage. C'est la raison pour laquelle il a été ensuite proposé de coupler le dosage mannane/Ac antimannane et d'utiliser des Ac dirigés contre différents épitopes. Il avait ainsi été montré dans un premier temps que la sensibilité et la spécificité pour le diagnostic de la CI étaient pour les mannanes seuls respectivement de 40 et 98 %, pour les Ac antimannane seuls de 53 et 94 % et pour l'association des deux tests de 80 et 93 %. Les auteurs décrivaient aussi la possibilité d'observer une cinétique inverse des Ac et des Ag mannane expliquée par la complexation Ag/Ac [20]. Leur positivité est cependant peu précoce, puisque plus souvent observée au moment ou après l'hémoculture, mais moins souvent dans les jours précédents [33]. Il existe ainsi un kit commercial détectant les Ac antimannane et un kit détectant les mannanes par méthode Elisa en utilisant un Ac monoclonal dit EB-CA1 et reconnaissant des α -1,2-mannanes. Il a été montré que l'association avec un Ac monoclonal 5B2 reconnaissant des β -1,2-mannanes améliore la sensibilité de la détection des mannanes et offre l'avantage de détecter des Ag dont la cinétique de relargage est un peu différente [34], mais cette approche n'a jamais fait l'objet d'un développement commercial. Quoi qu'il en soit, le test utilisable en routine peut détecter les mannanes issus des espèces *albicans*, *glabrata* et *tropicalis*, mais est moins performant pour *parapsilosis* et *kefyr* [35,36]. Ces tests ont été évalués chez des patients neutropéniques et permettaient un gain de temps pour le diagnostic de CI, notamment pour les patients avec des lésions hépatospléniques, en comparaison à l'apport de l'imagerie [37]. Une méta-analyse récente a déterminé les performances de ces tests dans des populations cependant hétérogènes : la sensibilité et la spécificité pour le diagnostic de CI étaient ainsi respectivement de 58 et 93 % pour le mannane seul, de 59 et 83 % pour l'Ac antimannane seul et de 83 et 86 % pour l'association des deux tests, ce qui tend à promouvoir l'usage de la combinaison Ag/Ac, recommandé par le groupe de travail à l'origine de cette méta-analyse [38].

Les BDG ont fait l'objet d'évaluations multiples. Dans l'étude princeps, ayant inclus deux tiers de patients hématologiques, la sensibilité était de 90 % pour le diagnostic des IFI, et la spécificité de 100 %, pour un seuil fixé à 20 pg/ml. Les taux sériques étaient plus élevés en cas de CI qu'en cas d'aspergillose [21]. Les études ultérieures ont surtout été réalisées en hématologie. La méthodologie de ces différentes études est très variable : différents seuils de positivité,

Tableau 1 Principaux biomarqueurs pour le diagnostic des candidoses et aspergilloses invasives						
Biomarqueur	Nature du biomarqueur/ des épitopes	Champignon concerné	Site biologique de détection	Technique de détection	Disponibilité en routine	Durée d'exécution de l'analyse/ Délai de rendu des résultats^a
Mannane	Ag/ Polysaccharide pariétal	<i>Candida</i>	Sérum, LBA, LCR	Immunologique, Elisa	Disponible	3 heures
Anticorps antimannane	Ac/ Polysaccharide pariétal	<i>Candida</i>	Sérum	Immunologique, Elisa	Disponible	3 heures
B-D-1,3-glucane	Ag/ Polysaccharide pariétal	<i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> (<i>Pneumocystis</i>)	Sérum, LBA, LCR	Biochimique, limulus test	Disponible	2 heures
Galactomannane	Ag/ Polysaccharide pariétal	<i>Aspergillus</i>	Sérum, LBA	Immunologique, Elisa	Disponible	3 heures
Anticorps antiaspergillaire	Ac/extrait total, protéines recombinantes	<i>Aspergillus</i>	Sérum	Immunologique, Elisa	Disponible	3 heures
Enolase	Ag/Enzyme de la glycolyse	<i>Candida</i>	Sérum	Immunologique, Elisa	Commercialisation abandonnée	
Anticorps antiénolase	Ac/Enzyme de la glycolyse	<i>Candida</i>	Sérum	Immunologique, Elisa	Non commercialisé	
Anticorps antifructose biphosphate aldolase	Ac/ Polysaccharide enzyme	<i>Candida</i>	Sérum	Immunologique, Elisa	Non commercialisé	
D-arabinitol	Ag/Métabolite fongique	<i>Candida</i>	Sérum, urines	Chromatographie phase liquide	Non commercialisé	
Hwp1	Ag/Protéine du tube germinatif	<i>Candida</i>	Sérum	Immunologique, Elisa	Non commercialisé	

Ac : anticorps ; Ag : antigène ; Elisa : *enzyme-linked immunosorbent assay*; LBA : lavage bronchoalvéolaire ; LCR : liquide céphalorachidien.

^a Les délais de rendu des résultats sont variables selon les laboratoires en fonction du volume d'analyses traitées et du nombre de séries réalisées par semaine. En effet, la majorité des tests étant réalisée en microplaque, leur regroupement en série est nécessaire.

différents tests commerciaux, patients neutropéniques inclus ou exclus, évaluation des performances du BDG pour le diagnostic des IFI (candidoses, aspergillose, pneumocystose) de manière globale..., rendant l'extrapolation de ces études difficile à faire pour les réanimations. Par ailleurs, les patients y sont souvent classés en IFI prouvée/probable/possible selon les critères de l'European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) [39]. Cette classification a l'avantage de pouvoir comparer des groupes homogènes de patients, mais a pour inconvénient d'introduire un degré d'incertitude (par définition...) dans les caté-

gories probables et possibles. Les groupes témoins sont aussi assez variables, mais souvent composés de sujets sains. Il est légitime de s'interroger sur la pertinence de ces témoins, la problématique en clinique étant de disposer d'un test discriminant pour cibler dans une population à risque, selon des facteurs de risque bien connus, quels patients seraient à « sur-risque » de développer une candidose. Il serait donc sans doute plus adapté de prendre des témoins présentant les mêmes facteurs de risque que les cas, mais n'ayant pas présenté, et ce de façon certaine, de CI. Cela rend nécessaire de prendre avec un certain recul les résultats de ces études.

Les performances rapportées dans les travaux princeps d'Ostrosky-Zeichner et al. évaluant le test dans une population recrutée dans différents services étaient probablement surestimées, car le groupe témoin utilisé était composé essentiellement de sujets sains. Pour les CI, la sensibilité pour un seuil à 80 pg/ml était proche de 80 %, mais variait selon les espèces de 60 % pour *Candida parapsilosis* à 100 % pour *C. krusei* [40]. En utilisant comme témoins des patients hospitalisés, pour certains colonisés, et sans limiter la population évaluée aux patients de réanimation, Nguyen et al. trouvaient une sensibilité équivalente proche de 80 %, mais une spécificité plus faible autour de 70 % pour le diagnostic de CI. Dans cette étude, les auteurs concluaient à une supériorité de la PCR sur les BDG [41]. En se focalisant sur des patients de réanimation chirurgicale, non neutropéniques, le test est retrouvé sensible mais peu spécifique. Cette sensibilité varie de 90 % si on considère les catégories CI probable et possible à 100 % si on se focalise sur la catégorie CI prouvée. À l'inverse, la spécificité passe de 80 à 60–70 %. La spécificité augmente avec la multiplication des tests, au prix d'une perte de sensibilité. Ces dosages sériés de BDG paraissent nécessaires pour identifier les faux-positifs retrouvés dans les trois jours qui suivent une intervention chirurgicale [42]. Ce manque de spécificité a même été retrouvé comme ne permettant pas, devant un sepsis, de distinguer infection bactérienne d'infection fongique [43]. En regardant les données hors réanimation, plusieurs études convergent vers l'intérêt d'un monitoring des BDG chez les patients neutropéniques fébriles pour aider au diagnostic d'IFI et favoriser la précocité de ce diagnostic [44,45]. De la même manière, le test est décrit comme ayant une bonne valeur prédictive négative pour le diagnostic d'IFI, dont les CI, dans une population de patients souffrant de leucémie aiguë myéloïde (LAM) et de syndrome myélodysplasique. Dans cette dernière étude, les auteurs retrouvaient une spécificité de 90 % [46]. Plus récemment, dans une population non restreinte à la réanimation ou aux pathologies hématologiques, en prenant comme comparateurs des patients bactériémiques et des patients à hémocultures négatives, Held et al. trouvaient une sensibilité et une spécificité des BDG pour les candidémies de 85 % environ. Dans ce travail, l'Ag mannane était un biomarqueur spécifique mais peu sensible, et l'association de ces deux Ag semblait être la stratégie d'utilisation de biomarqueurs la plus performante si on la compare à la stratégie Ag mannane + Ac antimannane [47]. Pour ce qui est des infections intra-abdominales à *Candida*, les données sont très parcellaires. Une positivité des BDG peut permettre de gagner du temps sur le diagnostic d'infection intra-abdominale à *Candida*, avec une sensibilité de 65 % et une spécificité de 78 % pour deux tests consécutifs positifs, performances modestes mais supérieures à celles obtenues pour le *Candida* Score et l'évaluation de la colonisation [48]. Dans ce contexte nosographique particulier, il

semblerait que les BDG puissent être intéressants pour distinguer colonisation d'infection [49], ce qui n'est pour l'instant pas extrapolable aux IFI autres que les infections intra-abdominales à *Candida*. En compilant les études, les performances du dosage des BDG pour le diagnostic des IFI prouvées et probables en excluant la pneumocystose sont de 76,8 % pour la sensibilité et de 85,3 % pour la spécificité [50]. Le manque de spécificité de BDG peut être dû aux faux-positifs possibles décrits lors de l'administration d'albumine, d'immunoglobulines intraveineuses, d'utilisation de membranes de cellulose pour les épurations extrarénales et de certaines compresses comprenant des dérivés glycaniques. Des interactions avec les antibiotiques ont aussi été décrites. Ainsi, des solutions reconstituées de colistine, ertapénème, triméthoprimé–sulfaméthoxazole, céfotaxime, céfépime et ampicilline–sulbactam semblent pouvoir donner des faux-positifs. Cependant, à des concentrations identiques aux concentrations plasmatiques rencontrées en thérapeutique, l'interférence avec le dosage de BDG est peu probable [51]. Nous avons pour notre part évalué les mannanes et BDG en réanimation de recrutement médicochirurgical, en incluant les patients souffrant d'hémopathies, y compris neutropéniques, et en utilisant des témoins hospitalisés dans le même service pour se placer en situation de vie réelle et évaluer le pouvoir discriminant d'un test entre deux populations présentant les mêmes facteurs de risque de CI. BDG est alors un test précoce, sensible, mais peu spécifique, alors que l'Ag mannane est un test spécifique, peu sensible et plus tardif, essentiellement positif le jour ou quelques jours avant l'hémoculture. Le meilleur rapport sensibilité/spécificité pour les BDG est obtenu pour un seuil aux environs de 450 pg/ml, et la spécificité devient supérieure à 90 % pour un seuil de plus de 800 pg/ml, c'est-à-dire bien au-dessus du seuil retenu par le fabricant. Nous avons confirmé le caractère fugace des mannanes et la décroissance très lente des BDG une fois la positivité obtenue. Ainsi, la surveillance de ces biomarqueurs n'a de sens qu'en cas de réascension, en faveur d'une récurrence à hémoculture négative [52] (manuscrit en préparation). Cela va à l'encontre de l'étude de Jaijakul et al., où la cinétique décroissante des BDG sous échinocandines était un facteur en faveur d'un pronostic favorable [53]. Cependant, seuls deux points rapprochés étaient évalués, et l'impact de cette décroissance sur le pronostic était très faible.

Aspergillose invasive

Comme pour les CI, l'une des difficultés principales va être de distinguer la présence du champignon dans l'arbre respiratoire sans infection d'une infection avérée. En dehors de l'approche basée sur les données radiologiques, histopathologiques et mycologiques, les biomarqueurs sont utilisables. Nous avons vu déjà dans la partie précédente sur les CI

quelques évaluations des BDG pour le diagnostic des IFI, dont l'AI. BDG, d'origine panfongique, est jugé sensible, mais peu spécifique pour le diagnostic de l'AI. Le galactomannane (ou galactofuranose), exprimé par plusieurs glycoconjugués d'*A. fumigatus*, est largement reconnu comme aide au diagnostic d'AI. Cet Ag est détectable dans le sérum, le liquide céphalorachidien et dans le produit de lavage bronchoalvéolaire. Son dosage peut être utilisé pour étayer un diagnostic suspecté sur d'autres arguments, dans le cadre d'un diagnostic précoce, ou comme marqueur pronostique. Une méta-analyse des principales études ayant évalué le test chez des patients immunodéprimés a montré que le galactomannane était plus performant chez les patients présentant une hémopathie (sensibilité/spécificité de 0,70/0,92 en considérant les AI prouvées) ou ayant eu une greffe de moelle (sensibilité/spécificité de 0,82/0,86) que chez les patients transplantés d'organe solide (sensibilité/spécificité de 0,22/0,84) [54]. Par ailleurs, le galactomannane se positive chez les patients à haut risque d'AI dans deux tiers des cas dans les huit jours qui précèdent les données tomodynamométriques [55]. Ces résultats sont cependant pondérés par l'étude de Weisser et al., dans laquelle une stratégie de dépistage par scanner hebdomadaire était plus performante, puisque seulement 10 % des patients avaient un taux de galactomannane positif avant l'imagerie [56]. Le suivi de la cinétique de décroissance a été suggéré pour vérifier l'efficacité du traitement : il semble en effet que l'augmentation du taux sérique de galactomannane la première semaine de traitement soit associée à un mauvais pronostic [57] et que les patients chez qui le galactomannane reste positif ont une mortalité supérieure aux patients chez qui le galactomannane se négative [58]. Des faux-positifs ont été décrits chez des patients recevant de l'amoxicilline-acide clavulanique [59], de l'amoxicilline seule ou l'association pipéracilline-tazobactam [60–62]. Cette dernière interférence semble cependant ne plus être observée avec les nouvelles préparations de cet antibiotique [63]. La recherche du galactomannane sur le liquide de lavage bronchoalvéolaire est une alternative intéressante, avec chez les malades d'hématologie une sensibilité rapportée de 67 % et une spécificité de 89 %, ce qui fait de ce biomarqueur un test plus performant que la culture et l'examen direct sur le lavage bronchoalvéolaire [58]. Cet examen doit être associé au dosage itératif de galactomannane sérique pour augmenter la spécificité du diagnostic.

Nous disposons de moins de données pour les patients immunocompétents, mais il semble que les performances du galactomannane soient moins bonnes, du fait a priori du rôle des polynucléaires neutrophiles dans la clairance de cet Ag. La sensibilité a en effet été évaluée à 53 % en considérant les IA prouvées et probables, 70 % pour les IA prouvées [64]. Cependant, cela est remis en cause par Cornillet et al. qui ont trouvé une sensibilité identique, mais faible à 65 % en comparant les IA chez les neutropéniques et les non-

neutropéniques [65]. Par ailleurs, chez les patients souffrant de bronchopneumopathie chronique obstructive, il peut être difficile de différencier la colonisation de l'infection, et le seuil de significativité du galactomannane n'est pas établi. Pour une approche générale de l'AI chez le sujet immunocompétent hospitalisé en réanimation, on pourra se référer à un article de synthèse récemment publié dans ce journal [66].

La recherche d'Ac anti-*Aspergillus* à l'inverse s'avère plus sensible chez les immunocompétents que chez les neutropéniques, bien que la Se reste faible chez ces derniers, inférieure à 50 % [65]. Globalement, ce test a peu d'intérêt pour le diagnostic de l'AI au cours de l'aplasie, mais son intérêt est entier dans l'aspergillose bronchopulmonaire allergique et son suivi.

Les principales études portant sur le mannane et le BDG, pour le diagnostic des CI et des AI, ont été reportées dans le Tableau 2.

Proposition d'utilisation pratique

Pour des raisons de difficultés diagnostiques de la maladie fongique invasive en réanimation, associées à un pronostic directement en rapport avec la précocité du traitement antifongique, les médecins prescrivent souvent un traitement antifongique empirique, c'est-à-dire fondé sur l'analyse de facteurs de risque et de signes cliniques compatibles avec une IFI (fièvre), sans preuve microbiologique ou sérologique, afin de traiter précocement les patients suspects de maladie fongique invasive. Le traitement préemptif ajoute un degré à cette stratégie grâce à l'usage d'une documentation microbiologique ou sérologique, via l'index de colonisation à *Candida* ou les biomarqueurs, sans preuve formelle d'IFI [14,67]. Nous retiendrons les définitions présentées ici pour la compréhension de l'approche préemptive. On notera cependant qu'il existe dans la littérature une certaine ambiguïté, pour ne pas dire parfois une contradiction sur les termes employés et leur définition.

Si on essaye de synthétiser les données présentées sur les biomarqueurs, nous avons à notre disposition :

- un biomarqueur sensible des IFI (CI, AI et pneumocystose), le BDG, mais non spécifique, avec de nombreuses causes de faux-positifs au seuil recommandé actuellement ;
- des biomarqueurs spécifiques des candidoses, l'Ag mannane et des AI, le galactomannane.

Nous savons par ailleurs que les approches thérapeutiques antifongiques empiriques sont insatisfaisantes [68,69]. On pourrait donc envisager une stratégie de dépistage des patients à sur-risque basée sur le BDG, de façon à sélectionner des patients pouvant bénéficier d'un traitement empirique plus ciblé en exploitant la bonne valeur prédictive

Tableau 2 Récapitulatif des principales études ayant évalué les performances des antigènes mannanes et β -D-1,3-glucanes et des anticorps antimannanes pour le diagnostic d'IFI

Premier auteur [Réf]	Biomarqueur analysé	IFI ciblée(s)	Population analysée	Témoins	Performances Se/Sp (%)
Weiner MH [31]	Ag Mn	CI	Modèle lapin ; candidémie et CI tous services	AI, patients colonisés par <i>Candida</i> sans CI	50/100
Poulain D [32]	Ag Mn	CI	CI tous services	Pas de groupe témoin	50/NA
Sendid B [20]	• Ag Mn • Ac anti-Mn • Ag + Ac	CI	Candidémie tous services	Patients de réanimation sans CI, éventuellement colonisés ; autre IFI que CI (AI, cryptococcose, pneumocystose) donneurs de sang	• Ag Mn : 40/98 • Ac anti-Mn : 53/94 • Tests couplés Ag + Ac : 80/93
Mikulska M [38]	• Ag Mn • Ac anti-Mn	CI	Méta-analyse		• Ag Mn: 58/93 • Ac anti-Mn : 59/83 • Tests couplés Ag + Ac : 83/86
Obayashi T [21]	BDG	CI, AI	CI et AI tous services	Patients fébriles sans IFI, d'origine infectieuse ou non ; sujets sains	90/100
Ostrozky-Zeichner L [40]	BDG	CI, AI, fusariose, cryptococcose	IFI Tous services	Sujets sains ; patients hospitalisés sans IFI	• IFI : 70/90 • CI : 80
Nguyen MH [41]	BDG	CI	Tous services	Patients hospitalisés sans CI ; deux tiers colonisés. Pas d'hétopathie ni de neutropénie	80/70
Mohr JF [42]	BDG	CI	Réanimation chirurgicale	Patients hospitalisés. Exclusion des neutropéniques	• CI prouvée : 100/60 • CI probable + possible : 90/80
• Semm L [44] • Ellis M [45] • Odabasi Z [46] Held J [47]	BDG • Ag Mn • BDG+Ag Mn	CI, AI, pneumocystose (fusariose, trichosporonose)	hématologie	• Neutropéniques [42,43] • LAM, syndrome myélodysplasique [44] Patients hospitalisés avec et sans bactériémie	• 63/90 (2 prélèvements +) • 87/76 (2 prélèvements +) • 100/90 • 87/85 • 59/97 • 89/85
Karageorgopoulos DE [50]	BDG	IFI prouvée ou probable sans pneumocystose	Méta-analyse		77/85

Ac : anticorps ; Ag : antigène ; BDG : β -D-1,3-glucanes ; Mn : mannanes ; IFI : infection fongique invasive ; CI : candidose invasive ; AI : aspergillose invasive ; LAM : leucémie aiguë myéloïde ; NA : non applicable.

négative de ce test, ou un traitement préemptif, mais non basé, ou pas seulement, sur l'index de colonisation parfois proposé [70], en fonction des stratégies adoptées. La confirmation de la positivité des BDG par un test sensible, mannane ou galactomannane en fonction de la pathologie ciblée, permettrait aussi de restreindre le champ de prescription inapproprié des antifongiques, de façon à bien traiter précocement les patients présentant une IFI, sans surtraiter inutilement des patients non infectés. En effet, le volume de prescription actuel des antifongiques nécessite d'être rationalisé, d'autant plus que leur impact écologique ne peut plus être nié [71]. On remarquera d'ailleurs que les recommandations 2012 de l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) concernant les procédures diagnostiques des CI préconisent l'utilisation du BDG et de l'association mannane/antimannane afin d'écarter le diagnostic de CI et de réduire la prescription injustifiée d'agents antifongiques utilisés dans des stratégies prophylactiques ou empiriques chez les patients de réanimation, étant donné leur bonne valeur prédictive négative (> 85 % pour chacun de ces tests). Ces différentes stratégies, y compris celle préconisée par l'ESCMID, nécessitent toujours d'être évaluées et validées [72].

Remarquons que le suivi de la cinétique de ces Ag peut être intéressant pour le diagnostic de récurrence de CI, mais pas pour le suivi de l'efficacité du traitement à proprement parler, à l'inverse de ce qui est suggéré pour les aspergilloses et le galactomannane.

Pour ce qui est des Ac, leur performance est médiocre si on s'intéresse à un dosage ponctuel. Nous avons vu cependant que c'est l'évaluation de leur cinétique en parallèle à celle de l'Ag mannane qui est intéressante. Cette approche, sans doute contraignante et complexe, n'a jamais vraiment été évaluée.

L'avenir ?

Nous avons vu que certains biomarqueurs sont encore en développement, mais ils sont pour l'instant non ou mal évalués et non utilisables en routine. L'approche alternative à la recherche de nouvelles cibles moléculaires est l'utilisation d'autres techniques de dosage que les méthodes immunologiques et enzymatiques actuellement utilisées. Le Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF) faisant une percée dans les laboratoires de microbiologie, on peut légitimement s'interroger sur son utilisation potentielle. Nous avons ainsi pu montrer que les IFI, particulièrement les CI, s'accompagnaient d'une « signature disaccharidique » objectivable en MALDI-TOF après une procédure physicochimique d'extraction des sucres du sérum des patients, avec une sensibilité et une spécificité satisfaisantes. Ces résultats préliminaires nécessitent confir-

mation et développement [73], et devront être analysés en comparaison avec les résultats obtenus avec des infections bactériennes variées, certaines bactéries étant riches en sucres divers (*Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*).

Pour le diagnostic de l'aspergillose, les progrès sont à attendre dans l'utilisation de l'immunochromatographie au lieu de l'immunoprécipitation et dans l'utilisation des protéines recombinantes pour la détection des Ac [74].

Conclusion

Les IFI en réanimation ont un impact important en termes de morbidité, malgré le développement de nouvelles molécules antifongiques très efficaces. L'enjeu est maintenant de parvenir à raccourcir le délai d'introduction du traitement spécifique, ce qui passe par la mise à disposition d'outils diagnostiques alternatifs aux techniques microbiologiques conventionnelles, de façon à étayer les stratégies préemptives et rationaliser les stratégies empiriques. C'est dans ce contexte que les biomarqueurs, essentiellement pour l'instant oligosaccharidiques, prennent tout leur sens. L'utilisation de « nouveaux » biomarqueurs est pour l'instant limitée, et les progrès les plus récents sont surtout en rapport avec la compréhension de leur intérêt potentiel. Leurs limites nécessitent cependant de les coupler entre eux d'une part, à d'autres approches d'autre part, telles que la détermination de la colonisation, les scores cliniques ou l'évaluation du terrain génétique. Il est encore nécessaire de concevoir et d'évaluer les algorithmes diagnostiques les utilisant. L'avenir de leur développement est en lien étroit avec les avancées technologiques.

Remerciements Chantal Fradin pour le schéma de l'organisation moléculaire de la paroi de *Candida*.

Conflit d'intérêt : J. Poissy, E. Parmentier-Decrucq, B. Sennid, D. Mathieu et D. Poulain déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

1. Vincent JL, Rello J, Marshall J, et al (2009) International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 302:2323-9
2. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348:1546-54
3. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, et al (2003) Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 37:1172-7
4. Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL (2011) *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the

- extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med* 39:665–70
5. Meyer MH, Letscher-Bru V, Jaulhac B, et al (2004) Comparison of Mycosis IC/F and plus Aerobic/F media for diagnosis of fungemia by the bactec 9240 system. *J Clin Microbiol* 42:773–7
 6. Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, et al (2013) Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect* 20:153–8
 7. Vella A, De Carolis E, Vaccaro L, et al (2013) Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis. *J Clin Microbiol* 51:2964–9
 8. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH (2005) Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3640–5
 9. Kollef M, Micek S, Hampton N, et al (2012) Septic shock attributed to *Candida* infection: importance of empiric therapy and source control. *Clin Infect Dis* 54:1739–46
 10. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, et al (2010) Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis* 50:1091–100
 11. Baddley JW, Stephens JM, Ji X, et al (2013) Aspergillosis in Intensive Care Unit (ICU) patients: epidemiology and economic outcomes. *BMC Infect Dis* 13:29
 12. Stevens DA (2002) Diagnosis of fungal infections: current status. *J Antimicrob Chemother* 49:11–9
 13. Eggimann P, Bille J, Marchetti O (2011) Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU. *Ann Intensive Care* 1:37
 14. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, et al (2009) Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48:503–35
 15. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al (2013) Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012. *Crit Care Med* 41:580–637
 16. Avni T, Leibovici L, Paul M (2011) PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 49:665–70
 17. Avni T, Levy I, Sprecher H, et al (2012) Diagnostic accuracy of PCR alone compared to galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a systematic review. *J Clin Microbiol* 50:3652–8
 18. Khot PD, Fredricks DN (2009) PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7:1201–21
 19. Klis FM, De Groot P, Hellingwerf K (2001) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* 39:1–8
 20. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, et al (1999) New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 37:1510–7
 21. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, et al (1995) Plasma (1→3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 345:17–20
 22. Bernard M, Latge JP (2001) *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol* 39:9–17
 23. Abad A., Fernandez-Molina JV, Bikandi J, et al (2010) What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* 27:155–82
 24. Kottom TJ, Limper AH (2000) Cell wall assembly by *Pneumocystis carinii*. Evidence for a unique gsc-1 subunit mediating beta-1,3-glucan deposition. *J Biol Chem* 275:40628–34
 25. Mitsutake K, Miyazaki T, Tashiro T, et al (1996) Enolase antigen, mannan antigen, Cand-Tec antigen, and beta-glucan in patients with candidemia. *J Clin Microbiol* 34:1918–21
 26. Li FQ, Ma CF, Shi LN, et al (2013) Diagnostic value of immunoglobulin G antibodies against *Candida* enolase and fructose-bisphosphate aldolase for candidemia. *BMC Infect Dis* 13:253
 27. Lehtonen L, Anttila VJ, Ruutu T, et al (1996) Diagnosis of disseminated candidiasis by measurement of urine D-arabinitol/L-arabinitol ratio. *J Clin Microbiol* 34:2175–9
 28. Eisen DP, Bartley PB, Hope W, et al (2002) Urine D-arabinitol/L-arabinitol ratio in diagnosing *Candida* infection in patients with haematological malignancy and HIV infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 42:39–42
 29. Yeo SF, Huie S, Sofair AN, et al (2006) Measurement of serum D-arabinitol/creatinine ratios for initial diagnosis and for predicting outcome in an unselected, population-based sample of patients with *Candida fungemia*. *J Clin Microbiol* 44:3894–9
 30. Lain A, Elguezal N, Brena S, et al (2007) Diagnosis of invasive candidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay using the N-terminal fragment of *Candida albicans* hyphal wall protein 1. *BMC Microbiol* 7:35
 31. Weiner MH, Coats-Stephen M (1979) Immunodiagnosis of systemic candidiasis: mannan antigenemia detected by radioimmunoassay in experimental and human infections. *J Infect Dis* 140:989–93
 32. Poulain D, Robert R, Mesnard F, et al (1997) Clearances of *Candida albicans*-derived alpha- and beta-linked mannose residues in sera from patients with candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16:16–20
 33. Sendid B, Poirot JL, Tabouret M, et al (2002) Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J Med Microbiol* 51:433–42
 34. Sendid B, Jouault T, Coudriau R, et al (2004) Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of alpha- and beta-linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 42:164–71
 35. Rimek D, Singh J, Kappe R (2003) Cross-reactivity of the PLATELIA CANDIDA antigen detection enzyme immunoassay with fungal antigen extracts. *J Clin Microbiol* 41:3395–8
 36. Sendid B, Caillot D, Baccouch-Humbert B, et al (2003) Contribution of the Platelia *Candida*-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic *Candida tropicalis* infection in neutropenic adults. *J Clin Microbiol* 41:4551–8
 37. Prella M, Bille J, Pugnale M, et al (2005) Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51:95–101
 38. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, et al (2010) The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care* 14:R222
 39. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al (2008) Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 46:1813–21
 40. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, et al (2005) Multicenter clinical evaluation of the (1→3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* 41:654–9
 41. Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, et al (2012) Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, beta-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 54:1240–8

42. Mohr JF, Sims C, Paetznick V, et al (2011) Prospective survey of (1->3)-beta-D-glucan and its relationship to invasive candidiasis in the surgical intensive care unit setting. *J Clin Microbiol* 49:58–61
43. Digby J, Kalbfleisch J, Glenn A, et al (2003) Serum glucan levels are not specific for presence of fungal infections in intensive care unit patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:882–5
44. Senn L, Robinson JO, Schmidt S, et al (2008) 1,3-Beta-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. *Clin Infect Dis* 46:878–85
45. Ellis M, Al-Ramadi B, Finkelman M, et al (2008) Assessment of the clinical utility of serial beta-D-glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. *J Med Microbiol* 57:287–95
46. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al (2004) Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 39:199–205
47. Held J, Kohlberger I, Rappold E, et al (2013) Comparison of (1->3)-beta-D-glucan, mannan/anti-mannan antibodies, and Cand-Tec Candida antigen as serum biomarkers for candidemia. *J Clin Microbiol* 51:1158–64
48. Tissot F, Lamoth F, Hauser PM, et al (2013) Beta-glucan antigenemia anticipates diagnosis of blood culture-negative intraabdominal candidiasis. *Am J Respir Crit Care Med* 188:1100–9
49. Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, et al (2012) Value of beta-D-glucan and *Candida albicans* germ tube antibody for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in patients with severe abdominal conditions. *Intensive Care Med* 38:1315–25
50. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, et al (2011) Beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 52:750–70
51. Marty FM, Lowry CM, Lempitski SJ, et al (2006) Reactivity of (1->3)-beta-d-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3450–3
52. Poissy J, Sendid B, François N, et al (2012) Évaluation des performances diagnostiques du dosage des B-D-1,3-glucanes chez les malades de réanimation au cours des candidémies. In Congrès de la SRLF, Paris
53. Jaijakul S, Vazquez JA, Swanson RN, Ostrosky-Zeichner L (2012) (1,3)-beta-D-glucan as a prognostic marker of treatment response in invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 55:521–6
54. Pfeiffer CD, Fine JP and Safdar N (2006) Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 42:1417–27
55. Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P, et al (2001) Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer* 91:311–8
56. Weisser M, Rausch C, Droll A, et al (2005) Galactomannan does not precede major signs on a pulmonary computerized tomographic scan suggestive of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis* 41:1143–9
57. Boutboul F, Alberti C, Leblanc T, et al (2002) Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease. *Clin Infect Dis* 34:939–43
58. Caillot D, Mannone L, Cuisenier B, Couaillier JF (2001) Role of early diagnosis and aggressive surgery in the management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *Clin Microbiol Infect* 7:54–61
59. Metan G, Durusu M, Uzun O (2005) False positivity for *Aspergillus antigenemia* with amoxicillin-clavulonic acid. *J Clin Microbiol* 43:2548; author reply 2548–9
60. Aubry A, Porcher R, Bottero J, et al (2006) Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus galactomannan* test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 44:389–94
61. Adam O, Auperin A, Wilquin F, et al (2004) Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive *Aspergillus galactomannan* antigen test results for patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis* 38:917–20
62. Sulahian A, Touratier S, Ribaud P (2003) False positive test for aspergillus antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam. *N Engl J Med* 349:2366–7
63. Mikulska M, Furfaro E, Del Bono V, et al (2012) Piperacillin/tazobactam (Tazocin) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. *J Antimicrob Chemother* 67:1746–8
64. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, et al (2004) Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *Am J Respir Crit Care Med* 170:621–5
65. Cornillet A, Camus C, Nimubona S, et al (2006) Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin Infect Dis* 43:577–84
66. Chebib N, Delsuc C, Senechal A, Ader F (2013) Invasive pulmonary aspergillosis in critically ill immunocompetent patients. *Reanimation* 22:314–23
67. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, et al (2012) ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect* 18:19–37
68. Schuster MG, Edwards JE Jr, Sobel JD, et al (2008) Empirical fluconazole versus placebo for intensive care unit patients: a randomized trial. *Ann Intern Med* 149:83–90
69. Golan Y, Wolf MP, Pauker SG, et al (2005) Empirical anti-*Candida* therapy among selected patients in the intensive care unit: a cost-effectiveness analysis. *Ann Intern Med* 143:857–69
70. Eggimann P, Garbino J, Pittet D (2003) Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect Dis* 3:772–85
71. Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, et al (2011) Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother* 55:532–8
72. Cuenca-Estrella M, Vermeij PE, Arendrup MC, et al (2012) ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect* 18:9–18
73. Poissy J, Sendid B, Jawhara S, et al (2013) Signature disaccharidique des infections invasives à *Candida* mise en évidence par MALDI-TOF. In Congrès de la SFM, Lille
74. Guitard J, Sendid B, Thorez S, et al (2012) Evaluation of a recombinant antigen-based enzyme immunoassay for the diagnosis of noninvasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 50:762–5