

# Actualités du diagnostic des infections parasitaires et fongiques

## Update on the diagnosis of parasitic and fungal infections

Emilie Fréalle<sup>1,2</sup>  
Stéphane Valot<sup>3</sup>  
Renaud Piarroux<sup>4</sup>  
Jean Menotti<sup>5</sup>  
Laurence Lachaud<sup>6</sup>  
Florence Persat<sup>5</sup>  
Arezki Izri<sup>7</sup>  
Odile Villard<sup>8</sup>  
Hélène Yera<sup>9</sup>  
Eric Dannaoui<sup>10</sup>  
Florent Morio<sup>11,12</sup>  
Sandrine Houzé<sup>13</sup>  
Collégiale Anofel

<sup>1</sup> CHU Lille, Laboratoire de parasitologie-mycologie, Lille, France

<sup>2</sup> Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR9017 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France

<sup>3</sup> CHU Dijon, Laboratoire de parasitologie-mycologie, Dijon, France

<sup>4</sup> Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Laboratoire de parasitologie-mycologie, IPLESP, Inserm UMRS 1136, Sorbonne Université, Paris, France

<sup>5</sup> Hospices civils de Lyon, Institut des agents infectieux, Laboratoire de parasitologie-mycologie, Université Claude Bernard - Lyon 1, Lyon, France

<sup>6</sup> CHU Montpellier, Laboratoire de parasitologie-mycologie, Centre national de référence Leishmaniose, Université de Montpellier, UMR MiVEGEC, Montpellier, France

<sup>7</sup> Hôpital Avicenne, Laboratoire de parasitologie-mycologie, Bobigny, France

<sup>8</sup> CHU Strasbourg, Laboratoire de parasitologie-mycologie, Strasbourg, France

**Correspondance** : E. Fréalle  
<emilie.frealle@chru-lille.fr>

**Résumé.** Le diagnostic des infections parasitaires et fongiques, historiquement basé sur la détection de ces pathogènes par diagnostic direct (examen macro/microscopique, culture) ou sérologique, a connu durant les dernières décennies des évolutions importantes, avec notamment le développement d'approches moléculaires et de la spectrométrie de masse. Ces techniques, de même que la plupart des analyses en sérologie parasitaire et fongique, restent le plus souvent l'apanage des laboratoires de centres hospitaliers universitaires spécialisés en parasitologie-mycologie. En 2016, l'Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicales (Anofel) a mis à disposition un Catalogue des analyses rares en accès libre sur le site d'Anofel (<https://anofel.net/>), et régulièrement mis à jour. Cet outil, qui s'articule en 4 volets (parasitologie, sérologie parasitaire, mycologie et sérologie fongique) a pour objectif de faciliter l'accès aux informations sur les analyses disponibles et les laboratoires hospitaliers capables de les prendre en charge. Il complète les autres ouvrages de référence élaborés par la collégiale Anofel, dont le Guide des analyses et méthodes en parasitologie et mycologie, publié en 2018, et la base de données d'images et de vidéos, en accès libre sur internet (<http://www.eanofel.fr>). L'objectif de cet article est de dresser un état des lieux des techniques plus spécialisées disponibles dans les laboratoires de parasitologie-mycologie, présentées dans le Catalogue des analyses rares de la collégiale Anofel, et leur intérêt pour le diagnostic de ces infections.

**Mots clés** : parasitoses, mycoses, sérologie, biologie moléculaire, spectrométrie de masse

**Abstract.** The diagnosis of parasitic and fungal infections, historically based on the detection of these pathogens using direct diagnosis (macro/microscopic examination, culture) or serological methods, has considerably evolved in the last decades, especially with the development of molecular approaches and mass spectrometry. These techniques, as well as most analyses of parasitic and fungal serology, are mostly the preserve of Hospital University Centers Parasitology-Mycology laboratories. In 2016, the French association of medical parasitology and mycology teachers and hospital practitioners (Anofel) has provided a Catalogue of rare analyses, regularly updated and freely accessible on the Anofel website (<https://anofel.net/>). This tool, which hinges on 4 parts (parasitology, parasitic serology, mycology, and fungal serology), aims to provide information on all available analyses, and a list of hospital laboratories able to undertake them. It is complementary to the other reference works that were developed by our association, including the Guide of analyses and methods in parasitology and mycology, published in 2018, and the eANOFEL pictures and videos database, freely accessible online (<http://www.eanofel.fr>). In this article, we draw-up a state-of-the-art of the most

<sup>9</sup> Hôpitaux universitaires Paris Centre, Hôpital Cochin, Laboratoire de parasitologie-mycologie, Faculté de médecine, Université Paris-Descartes, Paris, France

<sup>10</sup> Hôpital européen Georges Pompidou, Unité de parasitologie-mycologie, Laboratoire de microbiologie, Paris, France

<sup>11</sup> CHU Nantes, Laboratoire de parasitologie-mycologie, Nantes, France

<sup>12</sup> EA1155 IICiMed, Institut de recherche en santé 2, Nantes Universités, Nantes, France

<sup>13</sup> AP-HP, Hôpital Bichat, Laboratoire de parasitologie-mycologie, UMR261 Merit, Université de Paris, Paris, France

Article reçu le 03 février 2020, accepté le 09 avril 2020

specialized techniques available in the parasitology-mycology laboratories and presented in the Catalogue of rare analyses of the Anofel collegium, and their interest for the diagnosis of these infections.

**Key words:** parasitic diseases, fungal infections, serology, molecular biology, mass spectrometry

Le diagnostic des infections parasitaires et fongiques, historiquement basé sur la détection de ces pathogènes par diagnostic direct (examen macro/microscopique, culture) ou sérologique, a connu durant les dernières décennies des évolutions importantes.

L'objectif de cet article est de présenter les techniques plus spécialisées disponibles dans les laboratoires de parasitologie-mycologie, et présentées dans le *Catalogue des analyses rares*, qui est disponible en ligne sur le site de l'Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicales (Anofel, <https://anofel.net/>). Nous aborderons en premier lieu les outils du diagnostic parasitaire, aussi bien sérologique (toxoplasmose et autres parasitoses), que moléculaire (toxoplasmose, parasitoses intestinales, autres parasitoses). Les applications de la spectrométrie de masse à l'identification des leishmanies et des ectoparasites seront également présentées. La seconde partie de l'article sera consacrée aux actualités du diagnostic des infections fongiques avec, dans un premier temps, les techniques de sérologie fongique, puis les approches moléculaires permettant la détection des agents fongiques et leur identification. L'intérêt de la spectrométrie de masse pour l'identification des levures et des champignons filamenteux sera ensuite présenté. Enfin, les outils disponibles pour la caractérisation de la résistance aux antifongiques (détermination des CMI et caractérisation moléculaire) seront abordés.

## Actualités du diagnostic des infections parasitaires

### Diagnostic sérologique

#### Toxoplasmose

Le dépistage sérologique de la toxoplasmose comprend en première ligne une détermination des IgM et des IgG par une technique d'immuno-analyse. En raison de faux positifs ou de faux négatifs en IgG pouvant faussement conduire à conclure à une immunisation ou une absence d'immunisation chez la femme enceinte, il est recommandé de réaliser lors du dépistage 2 techniques de principe différent pour la détermination des IgG [1, 2].

Dans certaines situations, des techniques de seconde ligne doivent être réalisées par un laboratoire expert de la toxoplasmose notamment en cas de :

- discordance entre les 2 techniques de dépistage des IgG ;
- présence douteuse d'IgG : la confirmation de la spécificité doit faire appel à une technique de principe différente de type immunoblot (*western blot*) ;
- présence douteuse d'IgM : la confirmation de leur spécificité est réalisée par une technique de principe différent idéalement de type Isaga.

Le diagnostic sérologique de la toxoplasmose congénitale fait appel à des techniques plus spécialisées réalisées par des laboratoires experts de la toxoplasmose et comprend :

- la comparaison des profils mère-enfant à la recherche d'une néo synthèse d'anticorps de type IgG et/ou IgM chez l'enfant qui confirmera ou non une toxoplasmose congénitale. Cette comparaison fait appel à une technique d'immunoblot (*western blot* ou Elifa) qui peut dès la naissance en cas de profil différent (bande supplémentaire chez l'enfant) poser le diagnostic d'une toxoplasmose congénitale ;
- la recherche d'IgM et/ou d'IgA chez l'enfant (isotypes clés car ils ne sont pas transmis par la mère) par une technique validée chez le nouveau-né (Isaga ou Elisa). Cette présence chez l'enfant, confirmée au-delà de 10 jours de vie (une positivité à la naissance peut être le résultat d'une contamination par du sang maternel) confirme également une toxoplasmose congénitale.

### Autres sérologies parasitaires

Le diagnostic sérologique dans les infections parasitaires concerne principalement la recherche d'anticorps sériques, la recherche des antigènes parasitaires solubles ne sera pas abordée dans ce chapitre.

### Indications

Le diagnostic de certitude d'une infection parasitaire repose idéalement sur la mise en évidence directe du parasite ou la détection d'antigènes solubles parasitaires, ou d'ADN parasitaire par amplification génique. Cependant, le diagnostic sérologique peut être plus précoce que l'observation du parasite en fonction du cycle parasitaire.

La mise en évidence des anticorps participera au diagnostic d'une infection parasitaire quand :

- les signes cliniques d'appel correspondent à la phase d'invasion du parasite ; dans ces conditions, le parasite est en phase de migration tissulaire de son cycle parasitaire (bilharziose) ou au stade larvaire. La mise en évidence des anticorps dirigés contre les antigènes parasitaires permet de faire le diagnostic de l'infection sans attendre le stade adulte, ce qui assure souvent une meilleure efficacité de la thérapeutique quand elle est administrée lors de cette phase ;
- le parasite est en impasse parasitaire chez l'homme, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de voie de sortie pour le parasite qui restera sous forme larvaire ou kystique (échinococcose, toxocarose, trichinellose, par exemple), ce qui limite les possibilités de diagnostic direct ;
- la recherche directe du parasite est difficile et/ou la charge parasitaire est faible : la sérologie est un argument complémentaire qui est actuellement souvent complétée par la mise en évidence de l'ADN parasitaire ou d'un antigène soluble qui confirmera l'étiologie parasitaire (amébose tissulaire, leishmaniose, trypanosomose) ;
- une infection qui a été traitée de façon empirique sans documentation parasitologique (diagnostic rétrospectif) ;

- il existe un contexte légal comme par exemple la détection obligatoire de porteurs potentiels lors des dons d'organe ou du don du sang (paludisme, trypanosomose).

La détection des anticorps pourra donc établir ou conforter le diagnostic d'une parasitose tissulaire, éventuellement permettre un suivi post-thérapeutique mais pourra difficilement différencier une infection en cours d'une exposition ancienne.

### Méthodes

La détection d'anticorps est pratiquée sur du sérum ou du plasma selon les réactifs utilisés. Dans certains contextes cliniques, la recherche d'anticorps peut se pratiquer à partir d'un prélèvement de liquide cérébro-spinal ou d'humeur aqueuse/humeur vitrée : il est fréquemment recommandé d'analyser en parallèle un prélèvement sérique pour déterminer la charge en anticorps entre les deux compartiments. Les méthodes mises en œuvre varient selon le parasite considéré et les antigènes utilisés :

- réactions d'agglutination de particules de latex sensibilisées ou d'hématies sensibilisées ;
- réactions d'immunofluorescence indirecte (IFI) sur antigènes figurés ;
- techniques immuno-enzymatiques (Elisa) et dérivés avec des extraits antigéniques totaux, des antigènes excrétés-sécrétés purifiés, ou des antigènes recombinants ;
- immuno-empreinte (*western-blot*) et immuno-précipitation (électrosynérèse, immunoélectrophorèse) avec des extraits antigéniques totaux ou des fractions antigéniques. Les antigènes peuvent être homologues, c'est-à-dire identiques au parasite contre lequel les anticorps sont recherchés, ou hétérologues, c'est-à-dire du même genre ou de la même famille que le parasite d'intérêt : on met dans ce cas à profit la présence d'épitopes communs à différents parasites.

Un antigène figuré entier ou un extrait antigénique total permettront de détecter l'ensemble des anticorps synthétisés par le patient, mais pourront exposer à des réactions croisées. L'usage de protéines recombinantes permet a priori une meilleure spécificité et une meilleure sensibilité si le choix des antigènes est approprié.

Selon la nomenclature des actes de biologie médicale, il sera réalisé initialement, une ou deux techniques de dépistage dont les principes et les antigènes impliqués seront complémentaires pour augmenter la sensibilité et/ou la spécificité des résultats [3] : en cas de résultat positif, une technique de confirmation sera mise en œuvre pour confirmer la spécificité des anticorps dépistés par les techniques de première intention.

Par les techniques de type Elisa et d'immunoempreinte, les isotypes recherchés sont habituellement les IgG. En IFI, il est possible de faire des titrages différenciés selon

l'isotype, mais l'intérêt est limité, à l'exception de la sérologie palustre.

Les sérologies réalisées en France sont dépendantes des antigènes disponibles ou des réactifs commercialisés. En cas d'indisponibilités, il peut être nécessaire d'adresser les prélèvements à des laboratoires à l'étranger : l'Institut de médecine tropicale de Bâle par exemple, ou plus spécifiquement, le Département d'helminthologie de la Faculté de médecine tropicale de Mahidol à Bangkok.

### Interprétation

L'interprétation des résultats nécessite un dialogue clinico-biologique : la sérologie pour le diagnostic des maladies parasitaires doit être prescrite dans un contexte clinique précis en raison des réactions croisées, de la cinétique des anticorps, du délai d'apparition et de disparition des anticorps. Si les anticorps apparaissent généralement, après un délai variable de 8 à 10 jours après l'infection, leur persistance et évolution sont très variables en fonction du parasite ainsi que du traitement éventuellement reçu par le patient. Les éléments en faveur d'une infection évolutive sont une séroconversion objectivée par l'apparition d'anticorps spécifiques ou une élévation significative du titre des anticorps entre deux sérums prélevés à 10-20 jours d'intervalle et analysés en parallèle.

La place de la sérologie dans la démarche diagnostique est fonction du parasite.

Dans l'amœbose tissulaire, une sérologie positive au retour d'un séjour en zone d'endémie devant un tableau algique avec une imagerie concordante est un résultat à forte valeur diagnostique malgré quelques réactions croisées avec d'autres protozooses et en cas d'hépatocarcinome [4]. Les helminthoses présentent de nombreuses réactions croisées, et la réalisation des différentes sérologies dans un même laboratoire facilitera l'interprétation des résultats par le biologiste pour orienter le clinicien sur le diagnostic [5]. La sérologie anguillulose aura surtout l'intérêt de dépister les porteurs chroniques afin d'orienter une recherche spécifique du parasite par la méthode de Baermann, ou de susciter un traitement antiparasitaire [6, 7]. Dans un bilan d'hyperéosinophilie, les sérologies distomatose, échinococcoses, schistosomose, toxocarose et trichinellose pourront être prescrites, selon le contexte épidémiologique et les signes d'appel : leurs valeurs diagnostiques ont été rappelées par la Haute autorité de santé (HAS) associées ou non aux recherches directes des parasites [8-12]. La sérologie distomatose ne détecte que les anticorps dirigés contre *Fasciola hepatica*. Pour le diagnostic sérologique des autres distomatoses (*Opisthorchis*, *Paragonimus*), les demandes doivent être adressées à l'étranger (cf catalogue des analyses rares de sérologie parasitaire). En cas de séjour en zone d'endémie, il pourra être prescrit, selon le contexte épidémiologique et les signes cliniques d'appel, une sérolo-

gie filariose (en cas de recherche négative des microfilaries) [13]. A noter que la sérologie cysticercose, réalisée dans le sérum et le LCR (moindre sensibilité mais forte valeur prédictive positive) permettra de confirmer un diagnostic de neurocysticercose devant un tableau épileptique avec une imagerie concordante, chez un patient originaire de zone d'endémie [14].

Les sérologies babésiose, leishmaniose et paludisme (à l'exception du paludisme viscéral évolutif) permettront de dépister un contact parasitaire, mais le diagnostic d'une infection active ne pourra être confirmé que par la détection directe du parasite ou de son ADN.

En l'absence de prise en charge thérapeutique préalable, les sérologies des trypanosomoses seront une aide au diagnostic dans ces parasitoses pour lesquelles il est difficile d'objectiver la présence du parasite [15].

Le sérodiagnostic présente peu d'intérêt :

- quand le parasitisme n'entraîne pas une réaction immunitaire suffisante pour permettre la mise en évidence d'anticorps spécifiques (ex : adultes de *Taenia* spp., *Giardia intestinalis*) ;

- quand les anticorps détectés ne sont pas spécifiques et/ou la détection est peu sensible (ex : ankylostomides, *Ascaris lumbricoides*).

Dans ces conditions, la recherche directe des éléments parasitaires est recommandée.

### Diagnostic moléculaire

#### Toxoplasmose

Le diagnostic moléculaire permet le diagnostic de toxoplasmose évolutive chez le fœtus ou le nouveau-né (toxoplasmose congénitale), le patient immunodéprimé ou dans la toxoplasmose oculaire. Sa positivité signe la multiplication du parasite et conduit à l'instauration d'un traitement parasiticide. Selon le contexte, sa réalisation relève d'une relative urgence et sa sensibilité est variable. L'utilisation d'une cible répétée (Rep529) dans le génome du parasite et de technologies de PCR en temps réel avec sonde permet d'obtenir de meilleures sensibilité et spécificité [16].

En cas d'infection pendant la grossesse, la patiente devra être orientée vers un centre clinique de référence présentant une expertise pour la prise en charge de la toxoplasmose congénitale [17]. L'équipe spécialisée pourra lui proposer un diagnostic prénatal (DPN) de la toxoplasmose congénitale, comprenant la recherche du parasite par PCR dans le liquide amniotique recueilli après amniocentèse [18]. Seul un laboratoire autorisé par les Agences régionales de santé peut effectuer les analyses du DPN. Sa réalisation nécessite le consentement de la patiente et une attestation d'information par le prescripteur. Sa sensibilité est aujourd'hui d'environ 85 % et sa spécificité de

100 % [19]. En cas de DPN négatif ou non fait, le parasite peut être recherché par PCR dans le liquide amniotique à l'accouchement (prélevé au moment de la rupture de la poche des eaux), le placenta ou le sang de l'enfant [20]. Dans ce contexte, la sensibilité de la PCR sur liquide amniotique est bonne (> 68 %) en particulier si l'infection maternelle est tardive. La spécificité est de 100 % dans le liquide amniotique et le sang de l'enfant [21, 22].

Chez l'immunodéprimé, la recherche du parasite par PCR se fera dans le sang, le liquide cérébro-spinal, le lavage broncho-alvéolaire, les fluides oculaires, la moelle, les biopsies [23, 24]. La PCR sur sang est également utilisée dans le suivi des patients allogreffés de cellules souches hématopoïétiques [24]. En cas de localisation cérébrale isolée, la sensibilité de la PCR sur liquide cérébro-spinal est de 69 %. Sa spécificité est de 100 % [25].

En cas de suspicion de chorioretinite toxoplasmique atypique ou pour confirmer une infection typique, la PCR peut être effectuée dans les fluides oculaires (humeur aqueuse, humeur vitrée). Sa sensibilité est de 55 % et sa spécificité de 100 % [26]. Si les volumes de prélèvements sont suffisants, l'association à des techniques sérologiques, qui mettent en évidence une synthèse locale d'anticorps spécifiques, augmente la sensibilité du diagnostic à 85 %. Sinon, la PCR sera privilégiée chez l'immunodéprimé et en cas de lésions récentes.

Récemment, des kits de PCR ont été commercialisés. Certains ont montré de bonnes performances pour le diagnostic de la toxoplasmose congénitale ou la toxoplasmose de l'immunodéprimé [27, 28].

### Parasites intestinaux

Le diagnostic des parasitoses digestives, historiquement, et encore actuellement basé sur les techniques microscopiques, est limité par son manque de sensibilité, de spécificité (quasi-impossibilité par exemple de différencier *Entamoeba histolytica*, agent de la dysenterie amibienne, de *Entamoeba dispar*, non pathogène), et demande à la fois du temps et une bonne expertise. Pour pallier ces difficultés, de nombreuses techniques de diagnostic moléculaire ont été mises au point dans les laboratoires des CHU depuis de nombreuses années. Elles ciblent en particulier le diagnostic des cryptosporidioses [29, 30], de la giardiose et de l'amébose [31-33], mais également celui de protozooses plus rares, *Cyclospora cayetanensis*, *Balantidium coli*, *Sarcocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Blastocystis* spp. [34], et celui des champignons de l'embranchement des microsporidies (*Encephalitozoon intestinalis* [35], *Enterocytozoon bieneusi* [36]). Des tests moléculaires existent également pour la détection des helminthes dans les selles (oxyure, *Ascaris*, anguillule, trichocéphale, ankylostomes, schistosomes, *Taenia*, *Hymenolepis*; cf catalogue des analyses rares), mais sont d'utilisation moins courante.

Les techniques moléculaires présentent dans la plupart des cas une meilleure sensibilité que les techniques microscopiques [33], et elles permettent de plus le diagnostic d'espèce et/ou le génotypage, par l'utilisation de sondes spécifiques ou par séquençage d'un ou plusieurs gènes d'intérêts. Ce diagnostic d'espèce par PCR est indispensable pour orienter le traitement dans le cas des microsporidioses, les microsporidies du genre *Encephalitozoon* étant sensibles à l'albendazole au contraire d'*Enterocytozoon bieneusi* pour lequel un traitement par fumagilline est requis. La caractérisation des souches présente un intérêt en cas d'épidémie, comme par exemple pour *Cryptosporidium* [37].

Des kits commerciaux de PCR simple et désormais multiplex [33] sont progressivement apparus sur le marché. Ces kits reprennent souvent les techniques déjà développées dans les laboratoires, mais permettent d'apporter une certaine standardisation. A l'instar d'autres pays européens [38], certains laboratoires utilisent désormais en première intention ces techniques multiplex dans le contexte de l'examen parasitologique des selles.

Une autre approche moléculaire qui se développe actuellement est l'approche syndromique : un panel de micro-organismes (bactéries, virus, champignons et parasites) potentiellement responsables d'une pathologie sont recherchés au cours d'une même réaction de PCR. Ces techniques permettent d'obtenir un résultat rapide et largement exhaustif sur un échantillon unique. Des panels respiratoires, méningo-encéphaliques mais également gastro-intestinaux sont disponibles sur le marché. Les parasites recherchés sont généralement limités à *Giardia* spp., *Entamoeba histolytica* et *Cryptosporidium* spp., mais certains panels détectent également *Dientamoeba fragilis*, *Blastocystis* spp. et *Cyclospora cayetanensis*. Un test récent propose un panel permettant la détection simultanée de plus d'une vingtaine de parasites incluant des protozoaires, des helminthes et les microsporidies. Ce dernier est en cours d'évaluation en France.

### Autres parasitoses (paludisme, leishmanioses, kératites amibiennes, trichomonose)

De nombreuses autres parasitoses ont bénéficié de l'apport des techniques de biologie moléculaire, tant en termes de sensibilité que pour le diagnostic d'espèce. Outre la toxoplasmose (cf ci-dessus), le paludisme bénéficie de nombreuses techniques moléculaires plus sensibles que les techniques classiques (frottis, goutte épaisse et antigènes solubles), mais permettant également le diagnostic d'espèce et la distinction plus aisée d'éventuelles infections pluri-parasitaires [39-41]. Ces techniques ont été intégrées dans les dernières recommandations de prise en charge et de prévention du paludisme d'importation [42]. Des techniques de *loop-mediated isothermal amplification*

(LAMP), plus récentes, sont désormais proposées pour remplacer le diagnostic microscopique initial d'infection palustre [43-45]. Les techniques moléculaires bénéficient également au diagnostic de la leishmaniose [46], des kératites amibiennes [47, 48] et de la trichomonose uro-génitale. Le diagnostic moléculaire de cette dernière parasitose peut être réalisé à l'aide de kits commerciaux multiplex permettant le diagnostic syndromique d'infections sexuellement transmissibles [49].

### Spectrométrie de masse

#### Leishmanies

Les leishmanioses sont des maladies dues à des protozoaires du genre *Leishmania* transmis par piqûre de phlébotome. Trois formes cliniques sont observées : la leishmaniose viscérale (LV) et deux formes tégumentaires, cutanée et cutanéomuqueuse. Une vingtaine d'espèces sont impliquées en pathologie chez l'homme. Pour la LV, l'identification d'espèce peut se faire sur les données épidémiologiques (schématiquement *L. infantum* dans le bassin méditerranéen et en Amérique du Sud, et *L. donovani* en Inde ; pour d'autres régions les deux espèces peuvent être présentes), car le traitement initial est identique pour les 2 espèces. Cependant, il n'en va pas de même pour les formes tégumentaires où l'identification d'espèce conditionne la prise en charge thérapeutique. L'identification moléculaire est utilisée en première ligne car elle est applicable directement sur l'échantillon (peau, muqueuse...). Par contre, la spectrométrie de masse à désorption/ionisation au laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS) est devenue très avantageuse pour l'identification d'espèce à partir d'une culture de *Leishmania*. Sa mise au point et la création d'une large base de données disponible en ligne gratuitement (<https://biological-mass-spectrometry-identification.com/msi/>) rendent cette technologie accessible à un très grand nombre de laboratoires. Simple (nécessite moins de 10<sup>6</sup> parasites), rapide (temps de préparation environ 10 min), performante (égale aux méthodes de référence mais avec un très faible coût), elle peut être utilisée en routine par les laboratoires qui pratiquent les cultures de *Leishmania* [50-52].

#### Entomologie

Le diagnostic des principales ectoparasitoses (pédiculose du cuir chevelu, poux du pubis, gale) est habituellement clinique, épidémiologique et parasitologique. L'identification des ectoparasites (*Pediculus humanus*, *Phthirus pubis* ou morpions, *Sarcoptes scabiei*, punaises de lit) est morphologique. Les insectes ou acariens sont souvent identifiés macroscopiquement avec parfois l'aide d'une loupe binoculaire, ou microscopiquement selon l'agent en cause.

La spectrométrie de masse n'est réellement utilisée que dans le domaine de la recherche. Elle permet de distinguer des espèces proches difficiles à identifier morphologiquement y compris au microscope. C'est ainsi que les espèces de phlébotomes peuvent être distinguées les unes des autres par la mise en évidence de leur spectre spécifique [53]. Il en est de même des moustiques [54] ou d'autres arthropodes piqueurs, tels que les puces ou les tiques [55, 56]. Par ailleurs, la spectrométrie de masse permet d'identifier un agent pathogène transmissible par des vecteurs et permet de distinguer un insecte non infecté d'un insecte infecté et potentiellement vecteur [57].

## Actualités du diagnostic des infections fongiques

### Diagnostic sérologique

Concernant les sérologies fongiques, la détection des antigènes de *Cryptococcus* est considérée comme la méthode de référence pour le diagnostic des cryptococcoses disséminées et neuro-méningées. Les techniques d'immunochromatographie, sensibles et simples d'emploi, remplacent progressivement celles d'agglutination [58]. A noter que la détection de l'ADN de *Cryptococcus* par PCR multiplex est désormais disponible.

La recherche de l'antigène galactomannane dans le sérum par Elisa pour le diagnostic des aspergilloses invasives est particulièrement utile pour les patients d'hématologie à risque [59]. La mise en évidence d'aspergillose invasive chez d'autres types de patients, en particulier en réanimation (grippe sévère, BPCO traités au long cours par corticoïdes) donne un intérêt supplémentaire à ce test (patients rares mais détectés tardivement, donc plus graves). La détection dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA), plus sensible mais moins spécifique que dans le sérum, est possible et présente un intérêt pour les patients immunodéprimés non neutropéniques capables de circonscrire le champignon dans le poumon. Elle peut aussi permettre, par réaction croisée, le diagnostic de l'histoplasmosse. Le panel d'outils disponibles va probablement s'élargir prochainement avec l'arrivée de kits d'immunochromatographie ciblant d'autres antigènes aspergillaires sécrétés pendant la phase de croissance du champignon [60].

Le sérodiagnostic des candidoses est réservé aux formes invasives, dont les candidoses invasives chroniques (hépatospléniques). Il est recommandé d'associer la recherche des antigènes mannanes (plus précoces) et des anticorps anti-mannanes (complémentaires) par Elisa [61]. L'homme étant très souvent naturellement colonisé par *Candida* spp., les anticorps sériques peuvent être positifs : dans ce cas c'est la cinétique de leur taux qui est importante à suivre.

Leur détection en Elisa peut être assez spécifique mais très peu sensible. Un traitement ne doit pas être déclenché sur un résultat unique, mais leur détermination doit être répétée et intégrée à une démarche diagnostique globale incluant la clinique et l'imagerie (échographie) [62].

La recherche des  $\beta$ -1,3-D glucanes, marqueurs panfongiques de la paroi des champignons (hors mucorales et *Cryptococcus*) est réalisée par moins de laboratoires, en raison de son coût et d'une certaine difficulté de mise en œuvre (lecteur de cinétiques enzymatiques, faux positifs). Elle est utile pour aider au diagnostic des pneumocystoses, les taux sériques étant en général élevés en cas d'infection [63]. Elle peut être utile pour écarter une infection fongique (à répéter pour ne pas rater un début d'infection) [64].

La recherche d'anticorps seuls concerne plutôt les patients avec aspergilloses chroniques [65]. Les anticorps aspergillaires sont recherchés par un grand nombre de laboratoires. Le dépistage est réalisé avec différentes techniques Elisa, chacune utilisant ses propres unités et seuils d'interprétation. L'hémagglutination est régulièrement en défaut pour son manque de sensibilité lors des évaluations externes de qualité (source Probioqual). Les techniques de précipitation, non standardisées, sont encore utilisées, le *western blot* (un seul kit disponible) se développe mais des études complémentaires seraient nécessaires pour préciser sa place [66].

D'autres techniques sérologiques ciblées sur des infections fongiques plus rares (ex : histoplasme, coccidioïdomycose, scedosporiose) ou des pneumopathies d'hypersensibilité aux moisissures sont réalisées dans un nombre limité de centres (cf catalogue des analyses rares).

### Diagnostic moléculaire

#### Détection d'agents fongiques par PCR temps réel

##### *Pneumocystose*

Bien que l'examen direct du LBA après coloration spécifique reste encore souvent la méthode de première intention (NABM 2019), sa sensibilité pour le diagnostic de pneumocystose est faible chez les patients non infectés par le VIH. La détection de l'ADN de *Pneumocystis jirovecii* par PCR en temps réel dans le LBA présente une meilleure sensibilité, et possède un intérêt majeur pour le diagnostic de pneumocystose, en particulier lorsque la microscopie est négative. Quand le LBA n'est pas réalisable, des prélèvements respiratoires non invasifs (crachat, rinçage oro-pharyngé) peuvent éventuellement être envisagés, mais la sensibilité de la technique est plus faible, rendant parfois difficile l'interprétation [63]. Il existe de nombreux kits commerciaux, qui ciblent le plus souvent la petite ou grande sous-unité de l'ARN ribosomal mitochondrial de *Pneumocystis*, et présentent de très bonnes performances [67]. La principale difficulté d'interprétation

de cette technique de PCR réside dans la distinction des patients colonisés, des patients réellement infectés par *P. jirovecii* (cet organisme pouvant être retrouvé dans les voies respiratoires en l'absence de symptomatologie clinique, en particulier chez des patients immunodéprimés ou atteints de pathologies respiratoires chroniques). La prise en compte du contexte clinique et radiologique est donc indispensable pour l'interprétation d'une PCR *Pneumocystis* positive. Par ailleurs, cette technique se doit d'être quantitative et non pas simplement qualitative. En effet, des seuils permettant de distinguer les infections (charge fongique élevée) des colonisations (charge fongique faible), pour des patients VIH ou non VIH, ont été proposés [68, 69]. A noter que les taux de  $\beta$ -1,3-D glucanes sériques peuvent également être utilisés [69] pour distinguer une infection d'une simple colonisation (présence de glucanes à taux généralement élevé dans la première situation).

##### *Aspergilloses*

La PCR *Aspergillus*, qui est réalisée dans un moins grand nombre de laboratoires que la PCR *Pneumocystis*, reste principalement réservée au diagnostic des infections invasives chez les patients immunodéprimés (hématologie, transplantation d'organes solides). Elle peut être réalisée à partir de prélèvements respiratoires (LBA), de sérum/plasma, voire de LCR, en complément de la détection de l'antigène galactomannane aspergillaire [70]. L'association de ces deux approches diagnostiques augmente la sensibilité et la spécificité. Des kits commerciaux sont disponibles. Ils ciblent tous *Aspergillus fumigatus*, espèce responsable de 90 % des infections respiratoires à champignons filamenteux, et dans certains cas permettent aussi la détection d'autres espèces d'*Aspergillus* (ex : *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger*) [71]. A noter que certains kits permettent de détecter simultanément la résistance aux antifongiques azolés (cf ci-dessous), qui constituent le traitement de première ligne des aspergilloses invasives.

##### *Mucormycoses*

En comparaison, l'existence de PCR à visée diagnostique pour le diagnostic des mucormycoses est beaucoup plus récente. Du fait du pronostic redoutable de ces infections dont le diagnostic reste difficile et affectant les patients les plus immunodéprimés ou présentant un diabète déséquilibré, l'apport de ce nouvel outil diagnostique est indéniable. La technique actuellement la plus utilisée en France a été développée au CHU de Besançon [72]. Il s'agit d'une PCR permettant de détecter spécifiquement les 4 principaux genres impliqués en pathologie humaine : *Lichtheimia* spp., *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp. et *Mucor* spp. A noter qu'une autre PCR permettant la détection du genre *Cunninghamella* a été développée plus récemment [73]. Évaluée initialement sur le sérum, elle est également applicable à d'autres liquides biologiques, comme le LBA ou les biop-

sies diverses, bien que ces deux derniers prélèvements sont de réalisation plus délicate chez les patients les plus fragiles [74]. Comme pour d'autres PCR fongiques, afin d'optimiser la détection de l'ADN circulant, il est recommandé de pratiquer l'extraction sur 1 mL de sérum. Dans ces conditions, la sensibilité a été évaluée à 81-92 % dans une étude nationale multicentrique récente [75]. La spécificité est excellente mais des faux positifs (à la limite du seuil de détection) ont été signalés, incitant en cas de doute à un contrôle sur un nouveau prélèvement. Au-delà de ces bonnes performances analytiques, il est intéressant de noter que la détection de l'ADN de mucorales dans les liquides biologiques peut précéder la positivité des outils mycologiques classiques et les signes radiologiques, permettant un diagnostic précoce. Les travaux actuels visent à étudier la possible valeur pronostique de ce test et son éventuel intérêt pour le suivi de l'efficacité du traitement antifongique.

Des kits commerciaux sont disponibles, mais leurs performances en pratique clinique restent à évaluer (à la différence des techniques disponibles dans les CHU évoquées plus haut).

### *Autres PCR*

Des PCR spécifiques d'autres champignons filamenteux (*Fusarium*, dermatophytes), de champignons dimorphiques responsables de mycoses exotiques (*Histoplasma*, *Coccidioides*), ou de levures (*Candida*), dont les indications sont plus ponctuelles ou limitées à des contextes très spécifiques, ont également été développées dans certains laboratoires.

### **PCR panfongique et identification moléculaire des pathogènes fongiques**

Il s'agit d'une autre approche diagnostique utilisée en mycologie (semblable à la détection de l'ADN 16S en bactériologie). A la différence des techniques précédentes, elle ne repose pas sur l'utilisation d'amorces spécifiques d'une espèce ou d'un genre donné. Au contraire, cette approche réside sur l'utilisation d'amorces universelles capables de s'hybrider sur des régions de l'ADN conservées entre tous les champignons. La région amplifiée par PCR (se situant entre ces deux amorces universelles), est quant à elle extrêmement polymorphe, variant d'une espèce à l'autre. Une fois amplifié, le produit de PCR est séquencé et la séquence obtenue (qui est en quelque sorte un code-barres moléculaire) est comparée aux bases de données internationales afin d'identifier l'espèce fongique. En pratique, cette approche est le plus souvent utilisée sur les cultures, en cas d'échec des techniques traditionnelles (méthodes phénotypiques, spectrométrie de masse...), mais également sur les cultures stériles de champignons filamenteux. Un dernier intérêt est de permettre, l'identification de l'agent causal directement à partir du prélèvement, utile par exemple en cas d'examen direct positif avec des cultures négatives.

La PCR panfongique la plus utilisée cible la région ITS (*internal transcribed spacer*). Cette région de l'ADN ribosomal a d'ailleurs été désignée comme 1<sup>er</sup> code-barres moléculaire par un comité d'experts internationaux de l'*International society for human and animal mycology* (ISHAM) [76]. D'autres régions peuvent être utilisées et notamment la région D1D2 de l'ADN ribosomal ou le gène codant pour la facteur d'élongation alpha (TEF1) qui a d'ailleurs été retenu comme second code-barres moléculaire [77]. Pour certains groupes, tels que les filamenteux du genre *Aspergillus*, d'autres régions comme le gène codant la  $\beta$ -tubuline peuvent également s'avérer utiles pour une identification à l'espèce [78].

Les performances de cette approche sont intrinsèquement liées à la qualité des bases de données servant de référence. Dans ce contexte, le même groupe international a développé une base spécifique, régulièrement implémentée avec de nouvelles espèces, pour l'identification moléculaire en mycologie (<http://its.mycologylab.org/>). Cette base et la base développée aux Pays-Bas par le Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS : <http://www.mycobank.org/defaultinfo.aspx?Page=Home>) constituent de bonnes alternatives à la base de données généraliste et publique Genbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) dont on estime que près de 10 % des séquences sont erronées.

### *Identification des levures et champignons filamenteux par spectrométrie de masse*

Au cours de la dernière décennie, Maldi-TOF MS a d'abord été adaptée à l'identification des levures [79, 80] puis des champignons filamenteux [81, 82]. Comme pour les bactéries et les leishmanies, l'identification des agents fongiques par Maldi-TOF MS passe par la vaporisation et l'ionisation des molécules fongiques grâce à un rayon laser. Les molécules ionisées sont ensuite accélérées à travers un champ électrique puis migrent dans un tube à vide à une vitesse dépendant du ratio masse/charge (m/z). Un détecteur situé au bout du tube à vide les détecte et mesure leur "temps de vol" et leur abondance dans le temps. On obtient ainsi un spectre de masse que l'on peut résumer par un graphique représentant l'intensité du signal obtenu en fonction des valeurs m/z. Etant données les valeurs de masses prises en compte par l'identification Maldi-TOF MS (entre 2000 et 20000 kDa) les pics obtenus représentent surtout le protéome du champignon. Cependant, la méthode ne requiert pas de connaître la composition protéique exacte de l'échantillon car dans la démarche d'identification, les pics sont envisagés dans leur ensemble, comme une sorte de code-barres que divers algorithmes vont ensuite comparer aux codes-barres d'une banque de spectres de références connues. Sur la base de la similitude du spectre de l'échantillon avec les spectres de référence,



l'agent fongique peut alors être identifié comme appartenant au même genre, espèce ou sous-espèce que la référence dont le spectre est le plus ressemblant.

L'identification par Maldi-TOF MS d'une levure ou d'une moisissure nécessite une étape de culture préalable car le matériel protéique doit être suffisamment pur pour donner lieu à une identification fiable. En règle générale, il s'agit d'une culture en milieu solide, sur gélose Sabouraud ou sur un milieu chromogène, mais la plupart des milieux de cultures peuvent convenir, y compris les géloses utilisées en bactériologie. L'identification à partir des hémocultures est possible [83, 84] mais requiert des étapes de lavages et de purification qui obèrent la généralisation de son utilisation en routine.

La paroi des champignons étant plus difficile à rompre que celle de la plupart des bactéries, il est nécessaire de réaliser un traitement chimique avant de mettre en œuvre la technique de Maldi-TOF MS. Pour les levures, les premières études menées entre 2010 et 2011 avaient conclu que l'identification de la colonie sans extraction préalable donnait des spectres de qualité nettement inférieure à ceux obtenus avec une méthode d'extraction complète en tube à l'aide d'acide formique et d'acétonitrile [82, 85, 86]. Cependant, d'autres études ont proposé des solutions plus simples, comme l'ajout d'une goutte d'acide formique directement sur l'échantillon déjà déposé sur la cible [87-89]. Une étude multicentrique publiée en 2019 confirme qu'une procédure simplifiée peut donner des résultats corrects sous réserve d'utiliser des cibles adaptées pour déposer les échantillons [90]. Pour l'identification des moisissures et des dermatophytes, la grande majorité des équipes conseillent de procéder à une extraction complète. Il est néanmoins possible de procéder à une identification rapide des dermatophytes les plus fréquents à partir d'un dépôt direct d'un fragment de la colonie sur une cible d'acier non poli [91]. De nombreuses études ont souligné l'importance des bases de données de spectres de référence dans les performances de l'identification des agents fongiques par Maldi-TOF MS [92-94]. La grande diversité des agents fongiques impliqués en pathologie humaine et animale, et le manque d'exhaustivité des bases de données de spectres proposées par les principaux fournisseurs, en particulier pour les moisissures, ont conduit de nombreuses équipes à compléter les banques de spectres commercialisées par des spectres de référence produits localement, améliorant ainsi leurs performances diagnostiques. Le principal problème posé par les banques de spectres « maison » est qu'elles ne sont pas accessibles pour les autres utilisateurs potentiels. Il existe cependant des solutions passant soit par la mise à disposition des spectres de référence à la demande comme le propose le *National institutes of health* aux Etats-Unis [95], soit par la construction d'une application permettant l'identification des spectres en ligne [96]. Plusieurs

études ont été menées très récemment comparant les performances des différentes banques, montrant toutes l'intérêt de l'utilisation des banques en ligne dans la pratique médicale [92-94] et vétérinaire [97]. Malgré tout, il reste encore des progrès à faire pour diagnostiquer avec précision certaines espèces cryptiques [98], intégrer de nouvelles espèces au fur et à mesure qu'elles sont diagnostiquées chez l'homme [99], ou mieux prendre en compte le polymorphisme des spectres liés, par exemple, à l'âge de la culture.

En épidémiologie, la technique Maldi-TOF MS a parfois été utilisée pour typer certaines souches de levures [100], mais pour le moment, le polymorphisme des spectres ne permet pas à cette approche de concurrencer les techniques basées sur l'analyse d'ADN (séquençage, microsatellites). D'autres équipes ont cherché à utiliser la technique Maldi-TOF MS pour tester la sensibilité de levures et/ou de moisissures aux antifongiques, obtenant parfois des résultats intéressants. Deux approches ont été développées, basées soit sur la concentration d'antifongique minimale capable de modifier les spectres de masse Maldi-TOF d'une souche donnée [101], soit sur l'intensité des pics obtenus après incubation avec un antifongique [102]. Cependant, pour être optimaux, les deux outils doivent encore être développés afin de détecter la résistance à plusieurs médicaments antifongiques pour un plus grand nombre d'espèces de levure et ce, dans des conditions de routine [103].

### *Caractérisation de la résistance aux antifongiques*

L'émergence de la résistance aux antifongiques est une problématique majeure qui concerne aussi bien les infections à levures qu'à moisissures.

### **Détermination des CMI**

Pour les levures, la détermination de la sensibilité *in vitro* aux antifongiques est devenue importante du fait d'une part, de l'augmentation du nombre d'infections, survenant sur des terrains complexes (matériels implantables, greffes d'organes et autres patients immunodéprimés) et, d'autre part, d'un plus grand nombre d'antifongiques disponibles appartenant à des classes pharmacologiques différentes. De plus, on assiste actuellement à l'apparition de résistances aux nouvelles classes d'antifongiques comme les échinocandines [104] et à l'émergence d'espèces multi-résistantes comme *Candida auris* [105]. Les tests sont généralement réalisés par la technique E-test® et les valeurs de CMI sont interprétées suivants les seuils de sensibilités définis par le CLSI (*Clinical & laboratory standards institute*) ou l'EUCAST (*European committee on antimicrobial susceptibility testing*). La technique de référence en microdilution liquide de l'EUCAST peut être utilisée en confirmation. Pour les moisissures, la réalisation d'un antifongogramme est généralement pratiquée par méthode E-test®

(cf Catalogue des analyses rares de mycologie). Elle est recommandée en cas d'infection à *A. fumigatus* chez des patients qui doivent être traités par antifongiques. En effet, l'émergence de la résistance aux azolés d'*A. fumigatus*, liée à l'utilisation de fongicides azolés en agriculture, a été observée depuis la fin des années 1990. Les souches résistantes peuvent être isolées chez des patients atteints de mucoviscidose sous traitement chronique par azolés pour une aspergillose broncho-pulmonaire allergique (prévalence de 6,5-8 % en France [106]), mais également dans le cadre d'infections invasives ou semi-invasives chez des patients à risque (maladie hémato-logique, réanimation, pathologies respiratoires chroniques sous corticothérapie...), qui sont le plus souvent fatales [107].

La détermination des CMI est fortement recommandée en cas d'infections liées à d'autres *Aspergillus* ou à d'autres champignons filamenteux (ex : *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Scedosporium*, mucorales (*Mucor*, *Rhizopus*, *Lichtheimia*)), en particulier si des traitements par azolés sont utilisés [108, 109].

### Détection et caractérisation moléculaire des mécanismes de résistance

Pour les levures, et en particulier les *Candida* spp. les mécanismes de résistance aux azolés peuvent être variables, par mutations du gène codant pour la 14- $\alpha$ -déméthylase, par surexpression de la 14- $\alpha$ -déméthylase, ou par surexpression de pompes à efflux [110]. Ces mécanismes sont parfois associés entre eux. De ce fait la recherche de ces mécanismes de résistance est rarement réalisée. Pour la résistance aux échinocandines, le mécanisme est lié à des mutations ponctuelles dans le gène cible codant pour la  $\beta$ -1-3-glucane synthase [111]. La recherche de ces mutations nécessite le séquençage du gène et peut être réalisée à visée épidémiologique. Il n'existe actuellement pas de kit commercialisé permettant la détection des mécanismes de résistance aux antifongiques chez les levures.

Pour *A. fumigatus*, le principal mécanisme de résistance est lié à la présence de mutations du gène codant pour la 14- $\alpha$ -déméthylase, ou CYP51A, enzyme cible des azolés impliquée dans la synthèse de l'ergostérol. La mutation la plus fréquente, appelée TR<sub>34</sub>/L98H, associe une duplication de 34 pb du promoteur, à une mutation ponctuelle en position 98. Des kits commerciaux de PCR en temps réel ont été développés pour la détection directe de cette mutation à partir d'échantillons biologiques, mais leurs performances restent limitées à la fois par la faible sensibilité de la détection, liée à la présence d'une seule copie du gène *cyp51A*, et par le nombre restreint de mutations ciblées, généralement uniquement TR<sub>34</sub>/L98H [112]. Le séquençage du gène *cyp51A* à partir d'une souche, qui est réalisé par quelques laboratoires (cf Catalogue des ana-

lyses rares de mycologie), permet la caractérisation de l'ensemble des mutations [106, 113]. Il présente un intérêt épidémiologique.

## Conclusion

Le développement et la mise en place en routine des méthodes moléculaires ont permis d'améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic de nombreuses infections parasitaires (ex : cryptosporidiose, amébooses, paludisme) et fongiques (ex : pneumocystose, aspergilloses, mucormycoses). L'identification des agents parasitaires et fongiques par spectrométrie de masse, rapide et peu coûteuse, présente un intérêt à la fois épidémiologique et pour la prise en charge thérapeutique, lorsque celle-ci doit être adaptée en fonction de l'espèce identifiée (ex : candidoses, leishmanioses).

En parallèle de ces évolutions techniques, une évolution des pratiques est nécessaire face à l'émergence de la résistance aux antifongiques, qui doit être suspectée et recherchée plus systématiquement pour les patients qui doivent être traités, aussi bien pour les infections à levures qu'à moisissures.

Ces évolutions prennent en compte les actualisations récentes des actes de biologie médicale publiées par la HAS en 2017-2018 pour la toxoplasmose, les infections parasitaires (anguillulose, bilharziose, échinococcoses, toxocarose, distomatose, trichinellose, filariose, cysticercose), les aspergilloses et la pneumocystose. Elles s'appuient par ailleurs sur l'expertise développée *via* la participation des laboratoires de parasitologie-mycologie aux 6 Centres nationaux de référence en parasitologie-mycologie (Cryptosporidioses, Echinococcoses, Leishmaniose, Mycoses invasives et antifongiques, Paludisme, Toxoplasmose ; <https://www.santepubliquefrance.fr/a-propos/nos-principes-fondateurs/centres-nationaux-de-referance-pour-la-lutte-contre-les-maladies-transmissibles>).

**Liens d'intérêts :** E. Fréalle : financements de recherche (Gilead, MSD, Pfizer), invitations en congrès (Gilead). J. Menotti : financement de recherche (MSD), frais d'hospitalité/invitations en congrès (Pfizer, Gilead, MSD, Roche Diagnostics). E. Dannaoui : financements de recherche (MSD, Gilead), invitations en congrès (Gilead, MSD, Pfizer, Astellas), rétributions pour des conférences (Gilead, MSD, Astellas). F. Morio : financements de recherche (Diagenode Diagnostics, AdemTech, Coris Bioconcept), frais d'hospitalité/invitations en congrès (Basilea, Gilead, MSD, Pfizer) ; rétributions pour des conférences (Basilea, Gilead, MSD). F. Persat : expert bénévole auprès de Probioqual pour les EEQ antigènes aspergillaires et *Cryptococcus*, et anticorps aspergillaires.

Les autres auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

## Références

1. HAS. *Diagnostic biologique de la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent (dont la femme enceinte), la toxoplasmose congénitale (diagnostic pré- et postnatal) et la toxoplasmose oculaire*. HAS, 2017.
2. Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, *et al.* Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 84: 22-33. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.09.009.
3. Van Gool T, Vetter H, Vervoort T, Doenhoff MJ, Wetsteyn J, Overbosch D. Serodiagnosis of imported schistosomiasis by a combination of a commercial indirect hemagglutination test with *Schistosoma mansoni* adult worm antigens and an enzyme-linked immunosorbent assay with *S. mansoni* egg antigens. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3432-7. doi: 10.1128/jcm.40.9.3432-3437.2002.
4. Flores MS, Carrillo P, Tamez E, Rangel R, Rodríguez EG, Maldonado MG, *et al.* Diagnostic parameters of serological ELISA for invasive amoebiasis, using antigens preserved without enzymatic inhibitors. *Exp Parasitol* 2016; 161: 48-53. doi: 10.1016/j.exppara.2015.12.006.
5. Kramme S, Marti H, Genton B, Hatz C. Comment la sérologie peut-elle aider à l'établissement du diagnostic des parasites ? *Rev Med Suisse* 2011; 7: 995-9.
6. HAS. *Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic de la strongyloïdose (anguillulose)*. HAS, 2017.
7. Levenhagen MA, Costa-Cruz JM. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Acta Trop* 2014; 135: 33-43. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.03.015.
8. HAS. *Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic de la schistosomose (bilharziose)*. HAS, 2017.
9. HAS. *Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic des échinococcoses larvaires*. HAS, 2017.
10. HAS. *Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic sérologique de la toxocarose (Larva migrans viscérale)*. HAS, 2017.
11. HAS. *Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic de la distomatose à Fasciola hepatica*. HAS, 2018.
12. HAS. *Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic de la trichinellose*. HAS, 2018.
13. HAS. *Actualisation de la nomenclature des actes de biologie médicale pour le diagnostic et le suivi des filarioses*. HAS, 2018.
14. HAS. *Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic de la cysticercose*. HAS, 2018.
15. Afonso AM, Ebell MH, Tarleton RL. A systematic review of high quality diagnostic tests for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1881. doi: 10.1371/journal.pntd.0001881.
16. Sterkers Y, Varlet-Marie E, Cassaing S, Brenier-Pinchart M-P, Brun S, Dalle F, *et al.* Multicentric comparative analytical performance study for molecular detection of low amounts of *Toxoplasma gondii* from simulated specimens. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3216-22. doi: 10.1128/JCM.02500-09.
17. HAS. *Surveillance sérologique et prévention de la toxoplasmose et de la rubéole au cours de la grossesse*. HAS, 2009.
18. Yera H, Paris L, Bastien P, Candolfi E. Diagnostic biologique de la toxoplasmose congénitale. *Rev Fr Lab* 2015; 470: 65-72.
19. Sterkers Y, Pratlong F, Albaba S, Loubersac J, Picot M-C, Pretet V, *et al.* Novel interpretation of molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis according to gestational age at the time of maternal infection. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3944-51. doi: 10.1128/JCM.00918-12.
20. HAS. *Avis n°2017.0012/AC/SEAP du 1er février 2017 du collège de la Haute Autorité de santé relatif à la modification de la liste des actes et prestations mentionnée à l'article L. 162-1-7 du code de la sécurité sociale portant sur l'actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic biologique de la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent (dont la femme enceinte), de la toxoplasmose congénitale (diagnostic pré- et postnatal) et de la toxoplasmose oculaire*. HAS, 2017.
21. Filisetti D, Yera H, Villard O, Escande B, Wafo E, Houfflin-Debarge V, *et al.* Contribution of neonatal amniotic fluid testing to diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 1719-21. doi: 10.1128/JCM.02358-14.
22. Sterkers Y, Ribot J, Albaba S, Issert E, Bastien P, Pratlong F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction on neonatal peripheral blood. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71: 174-6. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.06.006.
23. Robert-Gangneux F, Sterkers Y, Yera H, Accoceberry I, Menotti J, Cassaing S, *et al.* Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients: a 3-year multicenter retrospective study. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 1677-84. doi: 10.1128/JCM.03282-14.
24. HAS. *Diagnostic biologique de la toxoplasmose chez les patients immunodéprimés. Patients infectés par le VIH, greffés de cellules souches hématopoïétiques et transplantés d'organe*. HAS, 2017.
25. Nogui FLN, Mattas S, Turcato Júnior G, Lewi DS. Neurotoxoplasmosis diagnosis for HIV-1 patients by real-time PCR of cerebrospinal fluid. *Braz J Infect Dis* 2009; 13: 18-23.
26. Talabani H, Asseraf M, Yera H, Delair E, Ancelle T, Thulliez P, *et al.* Contributions of immunoblotting, real-time PCR, and the Goldmann-Witmer coefficient to diagnosis of atypical toxoplasmic retinochoroiditis. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2131-5. doi: 10.1128/JCM.00128-09.
27. Ammar NA, Yera H, Bigot J, Botterel F, Hennequin C, Guillard J. Multicentric evaluation of the Bio-Evolution Toxoplasma gondii assay for the detection of *Toxoplasma* DNA in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 2020; 58: e01231-19. doi: 10.1128/JCM.01231-19.
28. Filisetti D, Sterkers Y, Brenier-Pinchart M-P, Cassaing S, Dalle F, Delhaes L, *et al.* Multicentric comparative assessment of the bio-evolution *Toxoplasma gondii* detection kit with eight laboratory-developed PCR assays for molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 29-34. doi: 10.1128/JCM.01913-14.
29. Coupe S, Sarfati C, Hamane S, Derouin F. Detection of *cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1017-23. doi: 10.1128/JCM.43.3.1017-1023.2005.
30. Mary C, Chapey E, Dutoit E, Guyot K, Hasseine L, Jeddi F, *et al.* Multicentric evaluation of a new real-time PCR assay for quantification of *Cryptosporidium* spp. and identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 2556-63. doi: 10.1128/JCM.03458-12.
31. Haque R, Roy S, Siddique A, Mondal U, Rahman SMM, Mondal D, *et al.* Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76: 713-7.

32. ten Hove R, Schuurman T, Kooistra M, Möller L, van Lieshout L, Verweij JJ. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13 : 1001-7. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01788.x.
33. Laude A, Valot S, Desoubreux G, Argy N, Nourrisson C, Pomares C, *et al.* Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*/*Cryptosporidium hominis* and *Entamoeba histolytica* from stool samples? Evaluation of a new commercial multiplex PCR assay and literature review. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22 : 190.e1-8. doi: 10.1016/j.cmi.2015.10.019.
34. McHardy IH, Wu M, Shimizu-Cohen R, Couturier MR, Humphries RM. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2014; 52 : 712-20. doi: 10.1128/JCM.02877-13.
35. Menotti J, Cassinat B, Sarfati C, Liguory O, Derouin F, Molina J-M. Development of a real-time PCR assay for quantitative detection of *Encephalitozoon intestinalis* DNA. *J Clin Microbiol* 2003; 41 : 1410-3. doi: 10.1128/jcm.41.4.1410-1413.2003.
36. Menotti J, Cassinat B, Porcher R, Sarfati C, Derouin F, Molina J-M. Development of a real-time polymerase-chain-reaction assay for quantitative detection of *Enterocytozoon bieneusi* DNA in stool specimens from immunocompromised patients with intestinal microsporidiosis. *J Infect Dis* 2003; 187 : 1469-74. doi: 10.1086/374620.
37. ANOFEL Cryptosporidium National Network. Laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006-2009. *Euro Surveill* 2010; 15 : 19642.
38. Bruijnesteijn van Coppenraet LES, Wallinga JA, Ruijs GJHM, Bruins MJ, Verweij JJ. Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15 : 869-74. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02894.x.
39. Dormond L, Jatou-Ogay K, de Vallière S, Genton B, Bille J, Greub G. Multiplex real-time PCR for the diagnosis of malaria: correlation with microscopy. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17 : 469-75. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03218.x.
40. de Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K, Picot S. Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97 : 387-90. doi: 10.1016/s0035-9203(03)90065-4.
41. Oddoux O, Debourgogne A, Kantele A, Kocken CH, Jokiranta TS, Vedy S, *et al.* Identification of the five human *Plasmodium* species including *P. knowlesi* by real-time polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30 : 597-601. doi: 10.1007/s10096-010-1126-5.
42. SPILF. *Prise en charge et prévention du paludisme d'importation. Recommandation pour la pratique clinique.* SPILF, 2017.
43. Ponce C, Kaczorowski F, Perpoint T, Mialhes P, Sigal A, Javouhey E, *et al.* Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for screening patients with imported malaria in a non-endemic setting. *Parasite* 2017; 24 : 53. doi: 10.1051/parasite/2017054.
44. Tegegne B, Getie S, Lemma W, Mohon AN, Pillai DR. Performance of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of malaria among malaria suspected pregnant women in Northwest Ethiopia. *Malar J* 2017; 16 : 34. doi: 10.1186/s12936-017-1692-4.
45. Vásquez AM, Zuluaga L, Tobón A, Posada M, Vélez G, González JJ, *et al.* Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for screening malaria in peripheral and placental blood samples from pregnant women in Colombia. *Malar J* 2018; 17 : 262. doi: 10.1186/s12936-018-2403-5.
46. Mary C, Faraut F, Drogoul M-P, Xeridat B, Schleinitz N, Cuise-nier B, *et al.* Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75 : 858-63.
47. Maubon D, Dubosson M, Chiquet C, Yera H, Brenier-Pinchart M-P, Cornet M, *et al.* A one-step multiplex PCR for *Acanthamoeba* keratitis diagnosis and quality samples control. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53 : 2866-72. doi: 10.1167/iovs.11-8587.
48. Yera H, Zamfir O, Bourcier T, Ancelle T, Batellier L, Dupouy-Camet J, *et al.* Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of *Acanthamoeba* isolates from ocular infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26 : 221-4. doi: 10.1007/s10096-007-0268-6.
49. Del Prete R, Ronga L, Lestingi M, Addati G, Angelotti UF, Di Carlo D, *et al.* Simultaneous detection and identification of STI pathogens by multiplex Real-Time PCR in genital tract specimens in a selected area of Apulia, a region of Southern Italy. *Infection* 2017; 45 : 469-77. doi: 10.1007/s15010-017-1002-7.
50. Cassagne C, Pralong F, Jeddi F, Benikhlef R, Aoun K, Normand A-C, *et al.* Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20 : 551-7. doi: 10.1111/1469-0691.12387.
51. Lachaud L, Fernández-Arévalo A, Normand A-C, Lami P, Nabet C, Donnadieu JL, *et al.* Identification of *Leishmania* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Using a Free Web-Based Application and a Dedicated Mass-Spectral Library. *J Clin Microbiol* 2017; 55 : 2924-33. doi: 10.1128/JCM.00845-17.
52. Mouri O, Morizot G, Van der Auwera G, Ravel C, Passet M, Chartrel N, *et al.* Easy identification of *Leishmania* species by mass spectrometry. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8 : e2841. doi: 10.1371/journal.pntd.0002841.
53. Lafri I, Almeras L, Bitam I, Caputo A, Yssouf A, Forestier C-L, *et al.* Identification of Algerian Field-Caught Phlebotomine Sand Fly Vectors by MALDI-TOF MS. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10 : e0004351. doi: 10.1371/journal.pntd.0004351.
54. Tandina F, Almeras L, Koné AK, Doumbo OK, Raoult D, Parola P. Use of MALDI-TOF MS and culturomics to identify mosquitoes and their midgut microbiota. *Parasit Vectors* 2016; 9 : 495. doi: 10.1186/s13071-016-1776-y.
55. Yssouf A, Socolovschi C, Leulmi H, Kernif T, Bitam I, Audoly G, *et al.* Identification of flea species using MALDI-TOF/MS. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2014; 37 : 153-7. doi: 10.1016/j.cimid.2014.05.002.
56. Yssouf A, Almeras L, Berenger J-M, Laroche M, Raoult D, Parola P. Identification of tick species and disseminate pathogen using hemolymph by MALDI-TOF MS. *Ticks Tick Borne Dis* 2015; 6 : 579-86. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.04.013.
57. El Hamzaoui B, Laroche M, Parola P. Detection of *Bartonella* spp. in *Cimex lectularius* by MALDI-TOF MS. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2019; 64 : 130-7. doi: 10.1016/j.cimid.2019.03.001.

58. Rajasingham R, Wake RM, Beyene T, Katende A, Letang E, Boulware DR. Cryptococcal Meningitis Diagnostics and Screening in the Era of Point-of-Care Laboratory Testing. *J Clin Microbiol* 2019; 57: e01238-1318. doi: 10.1128/JCM.01238-18.
59. HAS. *Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic des infections à Aspergillus*. HAS, 2017.
60. Lass-Flörl C. How to make a fast diagnosis in invasive aspergillosis. *Med Mycol* 2019; 57: S155-60. doi: 10.1093/mmy/myy103.
61. Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing Invasive Candidiasis. *J Clin Microbiol* 2018; 56: e01909-1917. doi: 10.1128/JCM.01909-17.
62. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C, Third European Conference on Infections in Leukemia Group. 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* 2010; 14: R222. doi: 10.1186/cc9365.
63. HAS. *Évaluation des actes de diagnostic biologique de la pneumocystose (Pneumocystis jirovecii)*. HAS, 2017.
64. Marchetti O, Lamoth F, Mikulska M, Viscoli C, Verweij P, Bretagne S, et al. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant* 2012; 47: 846-54. doi: 10.1038/bmt.2011.178.
65. Persat F. Sérologie aspergillaire, d'hier à aujourd'hui pour demain. *J Mycol Med* 2012; 22: 72-82. doi: 10.1016/j.mycmed.2012.01.004.
66. Persat F, Hennequin C, Gangneux JP, Société Française de Mycologie Médicale – SFMM Study group. *Aspergillus* antibody detection: diagnostic strategy and technical considerations from the Société Française de Mycologie Médicale (French Society for Medical Mycology) expert committee. *Med Mycol* 2017; 55: 302-7. doi: 10.1093/mmy/myw078.
67. Gits-Muselli M, White PL, Mengoli C, Chen S, Crowley B, Dingemans G, et al. The Fungal PCR Initiative's evaluation of in-house and commercial *Pneumocystis jirovecii* qPCR assays: Toward a standard for a diagnostics assay. *Med Mycol* 2019. doi: 10.1093/mmy/myz115, Sous presse.
68. Alanio A, Hauser PM, Lagrou K, Melchers WJG, Helweg-Larsen J, Matos O, et al. ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 2386-96. doi: 10.1093/jac/dkw156.
69. Damiani C, Le Gal S, Da Costa C, Virmaux M, Nevez G, Totet A. Combined quantification of pulmonary *Pneumocystis jirovecii* DNA and serum (1->3)- $\beta$ -D-glucan for differential diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia and *Pneumocystis* colonization. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 3380-8. doi: 10.1128/JCM.01554-13.
70. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikian-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24(Suppl 1): e1-38. doi: 10.1016/j.cmi.2018.01.002.
71. Rath P-M, Steinmann J. Overview of Commercially Available PCR Assays for the Detection of *Aspergillus* spp. DNA in Patient Samples. *Front Microbiol* 2018; 9: 740. doi: 10.3389/fmicb.2018.00740.
72. Millon L, Larosa F, Lepiller Q, Legrand F, Rocchi S, Daguindau E, et al. Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2013; 56: e95-101. doi: 10.1093/cid/cit094.
73. Bellanger A-P, Berceau A, Rocchi S, Valot B, Fontan J, Chauchet A, et al. Development of a quantitative PCR detecting *Cunninghamella bertholletiae* to help in diagnosing this rare and aggressive mucormycosis. *Bone Marrow Transplant* 2018; 53: 1180-3. doi: 10.1038/s41409-018-0194-5.
74. Scherer E, Iriart X, Bellanger AP, Dupont D, Guitard J, Gabriel F, et al. Quantitative PCR (qPCR) Detection of Mucorales DNA in Bronchoalveolar Lavage Fluid To Diagnose Pulmonary Mucormycosis. *J Clin Microbiol* 2018; 56: e00289-318. doi: 10.1128/JCM.00289-18.
75. Millon L, Herbrecht R, Grenouillet F, Morio F, Alanio A, Letscher-Bru V, et al. Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF). *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 810e1-8. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.006.
76. Irinyi L, Serena C, Garcia-Hermoso D, Arabatzis M, Desnos-Ollivier M, Vu D, et al. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database—the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med Mycol* 2015; 53: 313-37. doi: 10.1093/mmy/myv008.
77. Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA, Meyer W, Irinyi L, Smits D, et al. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia* 2015; 35: 242-63. doi: 10.3767/003158515X689135.
78. Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong S-B, Yaghuchi T, Varga J, et al. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Stud Mycol* 2007; 59: 39-46. doi: 10.3114/sim.2007.59.05.
79. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3482-6. doi: 10.1128/JCM.00687-09.
80. van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 900-7. doi: 10.1128/JCM.02071-09.
81. Alanio A, Beretti J-L, Dauphin B, Mellado E, Quesne G, Lacroix C, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 750-5. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03323.x.
82. Cassagne C, Ranque S, Normand A-C, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 2011; 6: e28425. doi: 10.1371/journal.pone.0028425.
83. Jeddi F, Yapou-Kouadio GC, Normand A-C, Cassagne C, Marty P, Piarroux R. Performance assessment of two lysis methods for direct identification of yeasts from clinical blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Mycol* 2017; 55: 185-92. doi: 10.1093/mmy/myw038.
84. Vecchione A, Florio W, Celandroni F, Barnini S, Lupetti A, Ghelardi E. A Rapid Procedure for Identification and Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts From Positive Blood Cultures. *Front Microbiol* 2018; 9: 2400. doi: 10.3389/fmicb.2018.02400.
85. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'homme G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1549-54. doi: 10.1128/JCM.01794-09.

- 86.** Pinto A, Halliday C, Zahra M, van Hal S, Olma T, Maszewska K, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS One* 2011; 6: e25712. doi: 10.1371/journal.pone.0025712.
- 87.** Fraser M, Brown Z, Houldsworth M, Borman AM, Johnson EM. Rapid identification of 6328 isolates of pathogenic yeasts using MALDI-ToF MS and a simplified, rapid extraction procedure that is compatible with the Bruker Biotyper platform and database. *Med Mycol* 2016; 54: 80-8. doi: 10.1093/mmy/myv085.
- 88.** Pence MA, McElvania TeKippe E, Wallace MA, Burnham CA. Comparison and optimization of two MALDI-TOF MS platforms for the identification of medically relevant yeast species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33: 1703-12. doi: 10.1007/s10096-014-2115-x.
- 89.** Westblade LF, Jennemann R, Branda JA, Bythrow M, Ferraro MJ, Garner OB, *et al.* Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 2267-72. doi: 10.1128/JCM.00680-13.
- 90.** Normand A-C, Gabriel F, Riat A, Cassagne C, Bourgeois N, Huguénin A, *et al.* Optimization of MALDI-ToF mass spectrometry for yeast identification: a multicenter study. *Med Mycol* 2019. doi: 10.1093/mmy/myz098, Sous presse.
- 91.** da Cunha KC, Riat A, Normand A-C, Bosshard PP, de Almeida MTG, Piarroux R, *et al.* Fast identification of dermatophytes by MALDI-TOF/MS using direct transfer of fungal cells on ground steel target plates. *Mycoses* 2018; 61: 691-7. doi: 10.1111/myc.12793.
- 92.** Dupont D, Normand A-C, Persat F, Hendrickx M, Piarroux R, Wallon M. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of moulds in the routine microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2019; 25: 892-7. doi: 10.1016/j.cmi.2018.10.013.
- 93.** Normand A-C, Cassagne C, Ranque S, L'ollivier C, Fourquet P, Roeseams S, *et al.* Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiol* 2013; 13: 76. doi: 10.1186/1471-2180-13-76.
- 94.** Stein M, Tran V, Nichol KA, Lagacé-Wiens P, Pieroni P, Adam HJ, *et al.* Evaluation of three MALDI-TOF mass spectrometry libraries for the identification of filamentous fungi in three clinical microbiology laboratories in Manitoba, Canada. *Mycoses* 2018; 61: 743-53. doi: 10.1111/myc.12800.
- 95.** Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 828-34. doi: 10.1128/JCM.02852-12.
- 96.** Normand AC, Becker P, Gabriel F, Cassagne C, Accoceberry I, Gari-Toussaint M, *et al.* Validation of a New Web Application for Identification of Fungi by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2017; 55: 2661-70. doi: 10.1128/JCM.00263-17.
- 97.** Becker P, Normand A-C, Vanantwerpen G, Vanrobaeys M, Haesendonck R, Vercammen F, *et al.* Identification of fungal isolates by MALDI-TOF mass spectrometry in veterinary practice: validation of a web application. *J Vet Diagn Invest* 2019; 31: 471-4. doi: 10.1177/1040638719835577.
- 98.** Imbert S, Normand AC, Gabriel F, Cassaing S, Bonnal C, Costa D, *et al.* Multi-centric evaluation of the online MSI platform for the identification of cryptic and rare species of *Aspergillus* by MALDI-TOF. *Med Mycol* 2019; 57: 962-8. doi: 10.1093/mmy/myz004.
- 99.** Schelenz S, Hagen F, Rhodes JL, Abdolrasouli A, Chowdhary A, Hall A, *et al.* First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob Resist Infect Control* 2016; 5: 35. doi: 10.1186/s13756-016-0132-5.
- 100.** Dhieb C, Normand AC, Al-Yasiri M, Chaker E, El Euch D, Vranckx K, *et al.* MALDI-TOF typing highlights geographical and fluconazole resistance clusters in *Candida glabrata*. *Med Mycol* 2015; 53: 462-9. doi: 10.1093/mmy/myv013.
- 101.** De Carolis E, Vella A, Florio AR, Posteraro P, Perlin DS, Sanguinetti M, *et al.* Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2479-83. doi: 10.1128/JCM.00224-12.
- 102.** Vatanshenassan M, Boekhout T, Lass-Flörl C, Lackner M, Schubert S, Kostrzewa M, *et al.* Proof of Concept for MBT ASTRA, a Rapid Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)-Based Method To Detect Caspofungin Resistance in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 2018; 56: e00420-518. doi: 10.1128/JCM.00420-18.
- 103.** Delavy M, Dos Santos AR, Heiman CM, Coste AT. Investigating Antifungal Susceptibility in *Candida* Species With MALDI-TOF MS-Based Assays. *Front Cell Infect Microbiol* 2019; 9: 19. doi: 10.3389/fcimb.2019.00019.
- 104.** Perlin DS. Echinocandin Resistance in *Candida*. *Clin Infect Dis* 2015; 61(Suppl 6): S612-617. doi: 10.1093/cid/civ791.
- 105.** Bidaud AL, Chowdhary A, Dannaoui E. *Candida auris*: An emerging drug resistant yeast - A mini-review. *J Mycol Med* 2018; 28: 568-73. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.06.007.
- 106.** Lavergne R-A, Morio F, Danner-Boucher I, Horeau-Langlard D, David V, Hagen F, *et al.* One year prospective survey of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* at a French cystic fibrosis reference centre: prevalence and mechanisms of resistance. *J Antimicrob Chemother* 2019; 74: 1884-9. doi: 10.1093/jac/dkz144.
- 107.** Rocchi S, Daguindau E, Grenouillet F, Deconinck E, Bellanger A-P, Garcia-Hermoso D, *et al.* Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolate with the TR34/L98H mutation in both a fungicide-sprayed field and the lung of a hematopoietic stem cell transplant recipient with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 1724-6. doi: 10.1128/JCM.03182-13.
- 108.** Cornely OA, Cuenca-Estrella M, Meis JF, Ullmann AJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Fungal Infection Study Group (EFISG) and European Confederation of Medical Mycology (ECMM) 2013 joint guidelines on diagnosis and management of rare and emerging fungal diseases. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(Suppl 3): 1-4. doi: 10.1111/1469-0691.12569.
- 109.** Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, van Diepeningen A, Caira M, Munoz P, *et al.* ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(Suppl 3): 27-46. doi: 10.1111/1469-0691.12465.
- 110.** Dannaoui E. Résistance des *Candida* aux antifongiques : détection et mécanismes. *RFL* 2013; 43: 71-7.
- 111.** Perlin DS. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1354: 1-11. doi: 10.1111/nyas.12831.

**112.** Guegan H, Chevrier S, Belleguic C, Deneuve E, Robert-Gangneux F, Gangneux J-P. Performance of Molecular Approaches for *Aspergillus* Detection and Azole Resistance Surveillance in Cystic Fibrosis. *Front Microbiol* 2018;9:531. doi: 10.3389/fmicb.2018.00531.

**113.** Dauchy C, Bautin N, Nseir S, Reboux G, Wintjens R, Le Rouzic O, *et al.* Emergence of *Aspergillus fumigatus* azole resistance in azole-naïve patients with chronic obstructive pulmonary disease and their homes. *Indoor Air* 2018;28:298-306. doi: 10.1111/ina.12436.