

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.

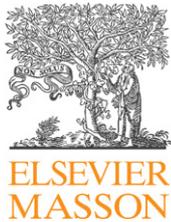


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Disponible en ligne sur  
**SciVerse ScienceDirect**  
[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
[www.em-consulte.com](http://www.em-consulte.com)



ARTICLE ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

# Validation d'une méthode Elisa pour la recherche de l'antigène aspergillaire galactomannane en vue de l'accréditation

*Detection of Aspergillus antigen galactomannan using ELISA method: Validation of the performances of the method for accreditation*

C. Kauffmann-Lacroix <sup>a,\*</sup>, M. Arvier <sup>b</sup>, M. Charron <sup>a</sup>, M.-H. Rodier <sup>a</sup>,  
 A. Vassault <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Service de parasitologie et mycologie médicale, CHU de Poitiers, 2, rue de la Milétrie, 86021 Poitiers cedex, France

<sup>b</sup> Direction technique des laboratoires, CHU de Poitiers, 2, rue de la Milétrie, 86021 Poitiers cedex, France

<sup>c</sup> Laboratoire du pôle de biologie, hôpital universitaire Necker–Enfants-Malades, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris cedex 15, France

Reçu le 13 mars 2012 ; reçu sous la forme révisée le 13 décembre 2012 ; accepté le 17 décembre 2012  
 Disponible sur Internet le 29 janvier 2013

## MOTS CLÉS

Validation de méthode ;  
 Antigène *Aspergillus* ;  
 Galactomannane ;  
 Norme NF EN ISO 15189 ;  
 COFRAC

**Résumé** Le diagnostic d'aspergillose invasive repose sur la surveillance de l'antigénémie aspergillaire, évaluée par la mise en évidence dans le sérum du galactomannane circulant par une méthode Elisa (Biorad<sup>®</sup>). Ce travail rapporte comment la méthode a été validée pour répondre aux exigences de l'accréditation en suivant les recommandations du guide COFRAC SH GTA 04. La maîtrise de la qualité est assurée par un système de contrôle de qualité interne exploitant les résultats obtenus pour deux échantillons de contrôle (pools de sérums négatifs et positifs). L'évaluation de la répétabilité estimée par les coefficients de variation (CV) obtenus par deux techniciens a été de 9 et 13,7 % pour le positif. Le CV du négatif pour lequel le fournisseur indique qu'il n'est pas applicable au processus analytique a été de 7 et 30 %. Selon notre expérience, il pourrait constituer un indicateur de veille de la contamination environnementale. L'évaluation de la reproductibilité ou fidélité intermédiaire a été de 15,7 % pour le pool positif et 22,5 % pour le pool négatif. En l'absence de matériel de référence (étalon international) et de recommandation de la Société française de mycologie, les performances observées seront évaluées au regard des spécifications de la fiche technique du fournisseur et ceux obtenus par les 39 laboratoires participants au seul programme d'évaluation externe existant en France organisé par ProBioQual<sup>®</sup> pour lesquels les CV de la reproductibilité sont de 18 % pour l'EEQ positif (moyenne index = 1,089) et de 44,7 % d'unité (moyenne index = 0,131) pour le négatif en 2011.

© 2013 Publié par Elsevier Masson SAS.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [c.lacroix@chu-poitiers.fr](mailto:c.lacroix@chu-poitiers.fr) (C. Kauffmann-Lacroix).

**KEYWORDS**

Validation of method;  
*Aspergillus* antigen;  
 Galactomannan;  
 EN ISO 15189 standard;  
 COFRAC

**Summary** Diagnosis of invasive aspergillosis for patients with high risk of infection is based on the monitoring of *Aspergillus* antigenemia assessed by the detection of galactomannan in serum by a sandwich-type ELISA (Biorad<sup>®</sup>). The validation of the method was displayed according to the guide COFRAC SH GTA 04. The internal quality control system settled, involves two quality control samples made of pools of sera (negative and positive). The repeatability of the measurements, as estimated by the coefficients of variation (CV), obtained by two different technicians was found from 9 to 13.7% for the positive control. The CV of the negative control, for which the provider indicates it is not useful in the analytical process, was found from 7.1 to 30%. In our experience it could be an indicator of environmental contamination. The evaluation of the intermediary fidelity was 15.7% for the positive control and 22.5% for the negative one. In the lack of reference material (International Standard) and recommendation from scientific societies, performances obtained will be discussed according to the results reported in the technical form of the supplier and those obtained by 39 laboratories participating in the only available external quality assessment program organized in France by ProBioQual<sup>®</sup> where the CV of reproducibility are 44.7% of unit (mean index 0.131) for the negative control and 18% (mean index 1.089) for the positive one in 2011.

© 2013 Published by Elsevier Masson SAS.

**Introduction**

Le diagnostic de l'aspergillose bronchopulmonaire invasive (API) associe des signes cliniques locaux et généraux, des signes radiologiques et des arguments biologiques : examens mycologiques et sérologiques : recherche d'antigène et d'anticorps en pratique courante. Parmi les infections fongiques invasives (IFI) en hématologie dont la mortalité globale à 12 mois est supérieure à 60 %, l'aspergillose invasive est la plus fréquente. Ce diagnostic reste difficile et classé comme possible, probable ou certain, en fonction des arguments disponibles [6]. Seule la détection du champignon sur une biopsie prouve l'aspergillose et depuis peu, la réalisation d'un prélèvement guidé sous scanner est plus performant. *Aspergillus fumigatus* ayant un tropisme vasculaire prononcé, cette infection peut nécessiter un diagnostic en urgence si la localisation présente un risque d'hémorragie interne. La qualité de la recherche de l'antigène aspergillaire galactomannane, technique délicate, doit être maîtrisée car elle concourt à un diagnostic vital.

Au cours d'une aspergillose, l'imagerie n'est pas spécifique et le champignon difficilement isolé à partir des échantillons confiés au laboratoire. La détection de certains constituants du champignon comme le galactomannane, libéré dans la circulation du patient au cours de l'infection, permet un diagnostic sérique précoce autorisant une prise en charge thérapeutique adaptée rapide [1,4,5,7,8,18,21,24]. Néanmoins, les résultats microbiologiques peuvent présenter des risques de faux positifs et de faux négatifs reconnus devant être maîtrisés [6]. Parfois, l'isolement d'une colonie peut correspondre à la colonisation des voies aériennes ou à une contamination de l'échantillon par des spores présentes dans l'air. *Aspergillus* sp. présent dans l'environnement peut occasionner de faux positif en culture et en recherche d'antigène [3,8,22]. Le galactomannane quant à lui est présent dans l'alimentation, en particulier dans tous les produits lactés, dans diverses préparations médicamenteuses (tazocilline, antibiotiques et nutrition parentérale) [3,9,22], et dans la paroi d'autres champignons comme *Histoplasma* sp., *Lichtheimia* sp. (*Absidia*). Enfin, le galactomannane interfère avec certains plastiques auxquels il se fixe ce qui oblige l'utilisation de tubes « galactomannane free ».

L'objectif de ce travail est de valider la méthode de recherche de l'antigène aspergillaire galactomannane en suivant les recommandations du Comité français d'accréditation COFRAC : SH GTA 04 validation de méthode (portée A et B). Ce travail s'intègre dans la démarche qualité du laboratoire pour l'accréditation par le COFRAC [11–16] selon le référentiel de la norme NF EN ISO 15189 [23].

**Matériel et méthodes**

La trousse Biorad<sup>®</sup> (ref. 62796) permet d'effectuer des séries de dosages en microplaque dans lesquelles le mesurande correspond à la réactivité d'un anticorps monoclonal vis-à-vis du galactomannane d'*Aspergillus* par immunocapture. Les anticorps (Ac) monoclonaux de rat EBA-2, dirigés contre le galactomannane, sont utilisés pour sensibiliser les puits de la microplaque et se lier à l'antigène (Ag). Les sérums traités et le conjugué anticorps monoclonaux marqués à la peroxydase sont ajoutés dans les puits sensibilisés, et incubés. Un complexe Ac monoclonal – galactomannane – Ac monoclonal/ peroxydase se forme en présence de l'Ag. Les barrettes sont lavées, la solution de révélation TMB tétraméthylbenzidine est ajoutée, et réagira avec tous les complexes fixés au puits pour former un composé de couleur bleue. La réaction enzymatique est arrêtée par l'addition d'acide, qui provoque le virage de la couleur bleue au jaune. L'absorbance mesurée pour les échantillons biologiques et les échantillons de contrôle est déterminée par un spectrophotomètre à 450/620 nm. L'étalonnage est assuré par une gamme à trois niveaux : R3 Sérum de contrôle négatif ne contenant pas de galactomannane (Index = DO contrôle négatif/DO valeur seuil < 0,4), R4 Sérum seuil contenant du galactomannane (Moyenne des DO supérieure ou égale à 0,3 et inférieure ou égale 0,8) et R5 Sérum de contrôle positif : contenant du galactomannane (Index = DO contrôle positif/DO valeur seuil > 2). Un index est calculé pour chaque sérum testé : I = DO de l'échantillon/DO Valeur seuil (concentration de 1 ng de galactomannane). Le seuil de positivité est un index supérieur ou égal à 0,5. La technique est quantitative à cause du suivi continu de l'index. C'est un dispositif médical de diagnostic in vitro (DMDIV) marqué CE, utilisé sans modification, pour effectuer une recherche dans

le sérum. Dans le cadre de l'accréditation, les performances de la méthode doivent être vérifiées dans chaque laboratoire (vérification portée A).

La mise en place de contrôles internes de qualité (CIQ) n'est pas généralisée en sérologie fongique car il existe peu de préparations de contrôle commercialisées. Des échantillons de contrôle ont donc été préparés au laboratoire : pools de sérums négatifs et positifs.

L'analyse des risques effectuée en suivant le schéma décrit par Ishikawa (5M) a été adoptée et constitue une étape essentielle de l'évaluation pratiquée.

### Matières (prélèvement, échantillon...)

Les sérums sont traités par la chaleur en utilisant un bloc chauffant à 120 °C dans des tubes « galactomannane free », en présence d'EDTA pour dissocier les complexes immuns et précipiter les protéines sériques pouvant éventuellement interférer avec la réaction immuno-enzymatique.

### Matériel (équipement, réactifs, matériel informatique)

Les maintenances des matériels sont assurées et enregistrées, en portant une attention particulière à la métrologie.

Le processus analytique selon une méthode Elisa est organisé et les contrôles de qualité positifs et négatifs sont disposés en début et en fin de série.

### Main d'œuvre

L'habilitation des personnels est assurée par une formation insistant sur les risques de contamination (faux positifs) et à l'organisation mise en place pour les éviter. Elle est vérifiée par le suivi des résultats des CIQ. Lors de la validation deux opérateurs assuraient les analyses du secteur ; les résultats ont été étudiés grâce aux courbes de Levey-Jennings.

### Milieu, environnement

Pour éviter les contaminations aériennes par les spores d'*Aspergillus*, un nettoyage annuel de la pièce (murs et paillasses ainsi que les bouches d'aération) est organisé et le dépôt des sérums se fait sous une hotte poste de sécurité microbiologique (PSM) à flux laminaire.

Les contrôles de qualité internes sont constitués par un pool de sérum négatif et un pool de sérums positifs CIQ ajusté à un index compris entre 1 et 2 en diluant avec des sérums négatifs. Ces échantillons CIQ ont été stérilisés par filtration (à 0,22 µm), divisés en aliquotes dans les tubes « galactomannane free » et conservés à -20 °C. Ils sont tous les deux placés en début et en fin de série.

## Résultats

### Étape préliminaire : l'étude bibliographique

Les facteurs de risques de contracter une infection fongique invasive sont encore mal connus ; chez les patients

neutropéniques ce risque a été évalué à 59 % et chez les non neutropéniques à 41 % [5]. Chez les patients immunodéprimés en hématologie, l'incidence est évaluée chez les patients atteints de LAM à 12 %, ceux atteints de LAL à 6,5 %, de LMC à 2,5 % et à 5,4 % chez les greffés de moelle osseuse [24]. De plus, l'incidence varie au cours de l'évolution de la greffe de cellules souches hématopoïétiques. L'aspergillose invasive est redoutable en transplantation d'organe solide, principalement de poumon et de foie [1,2,4,17,18]. Elle peut aussi s'observer chez les patients immunodéprimés atteints de maladies systémiques ou encore chez des patients sans neutropénie traités par des corticoïdes comme les patients insuffisants respiratoires chroniques. La mortalité de l'API est estimée entre 38 et 80 % des cas selon les centres [17,18,20].

En se basant sur un taux de prévalence de 16 % d'API prouvées et probables, rapportée dans la fiche technique (03/2009), le fournisseur a indiqué, les valeurs prédictives positive et négative (VPP, VPN) relatives aux résultats obtenus. En considérant un échantillon dont l'index est supérieur ou égal à 0,5, les performances ont été calculées à partir des résultats combinés de plusieurs laboratoires. La sensibilité est de 97,4 %, la spécificité de 90,5 %, la VPP 66,1 % et la VPN 99,4 %. Si l'on conclut à la présence de l'antigène si deux résultats consécutifs sont trouvés positifs, l'analyse montre alors les performances suivantes : sensibilité à 92,1 %, spécificité à 97,5 %, VPP à 87,5 % et VPN à 98,5 %. La fiche nous indique aussi les coefficients de variation avec lesquels chaque laboratoire doit se comparer. Pour les CIQ positifs le CV devrait être compris entre 10 et 29,2 %, quant au CIQ négatif, il est noté non applicable. La sensibilité, la spécificité, VPP et VPN ne sont pas vérifiées dans le cadre d'une vérification de méthode en portée A. En cas de modification des recommandations du fournisseur, la validation doit être en portée B. La recherche sur le liquide bronchoalvéolaire (LBA) peut être conseillée dans la surveillance mais elle n'est actuellement pas validée par le fournisseur, la commercialisation prochaine d'une nouvelle trousse validée pour sérum et LBA simplifiera la validation/vérification en portée A [17,20,25].

Une étude en hématologie publiée en 2002 rapporte les performances similaires en considérant deux échantillons dont l'index est supérieur ou égal à 0,5, sensibilité à 72 %, spécificité à 99,7 %, VPP à 92 % et VPN à 98,7 % [7]. Désormais, un résultat d'index supérieur à 0,7 chez un patient à risque doit être pris en compte pour le traiter et il est recommandé de contrôler sur un deuxième sérum, les deux étant analysés systématiquement dans la même série. Entre 2005 et 2007, le réseau de surveillance de l'aspergillose en France (SAIF) a étudié 393 patients ayant présenté une aspergillose invasive (prouvées et probables). L'antigénémie était plus souvent positive (plus de 69 %) en hématologie chez les patients atteints de leucémie aiguë ou ayant reçu une allogreffe de moelle osseuse qu'en cas de transplantation d'organe solide (moins de 42 %) [19]. On constate donc une certaine hétérogénéité des résultats dans les publications pouvant s'expliquer par différentes raisons : des groupes de patients à des degrés d'immunodépression divers et de chimiothérapie différentes, certains présentant un rejet de greffe, des traitements antifongiques

ou antibiotiques différents ; ces patients ayant été étudiés ensemble dans les premières études.

### Critères d'acceptation

D'après les recommandations *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration [10]*, « de nombreux paramètres de validation en bioanalyse sont applicables à la microbiologie et à l'EIA. Néanmoins chaque méthode est unique et ses caractéristiques doivent être prises en compte pour sa validation. Critères d'acceptation : au moins 67 % (4/6) des échantillons de CIQ devraient se situer dans un intervalle de plus ou moins 15% de la valeur cible. Dans certaines situations des critères d'acceptabilité plus large pourraient être justifiées ».

La méthode Elisa présente donc des inconvénients qui s'ajoutent aux difficultés précédemment exposées et elles peuvent justifier un CV relativement large tant que nous n'auront pas plus de références techniques concernant la recherche de l'antigène galactomannane.

### La maîtrise des risques d'erreurs

Les prélèvements effectués à différents stades de l'infection conduisent parfois à des résultats faussement négatifs. Les causes concernent principalement les difficiles conditions d'un bon prélèvement. Par ailleurs, la présence de galactomannane ou encore du champignon dans l'environnement est responsable d'interférences conduisant parfois à des résultats faussement positifs. Ainsi, parmi les 3049 sérologies pratiquées durant les 12 derniers mois, 152 sérums ont été positifs et 62 ont bénéficié d'un prélèvement de contrôle sur un nouveau prélèvement qui s'est avéré négatif. La maîtrise de l'environnement est donc une priorité avant de débiter la validation de la méthode (Tableau 1).

### Évaluation des performances de la méthode

#### Répétabilité et reproductibilité

La surveillance du processus analytique est assurée par un système de contrôle interne de qualité en utilisant des pools de sérums (négatif et positif). La valeur cible des

**Tableau 1** Maîtrise des risques d'erreur sur les résultats de l'examen.  
*Risk assessment: errors of the results of the analysis.*

Maîtrise des risques		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire	Prélèvements Identification Tube sans anticoagulant	Service de soins
Prétraitement de l'échantillon	Centrifugation Travailler sur une paillasse propre loin de toute source de contamination fongique	Nettoyage régulier de la pièce, et les grilles des bouches d'aération Ne pas décanter près de la centrifugeuse
Main d'œuvre	Technique délicate Fidélité dépend des opérateurs et des conditions environnementales	Surveillance des CIQ négatif et positif < 3 écart-type
Conditions ambiantes	Contamination par des spores d' <i>Aspergillus</i> en provenance de l'air et de l'eau Réactifs sensibles à l'éclairage Variabilité des résultats dus à des faux positifs par contamination de l'environnement ou des réactifs	Hotte PSM pour dépôt sérums dans la plaque Tubes stérilisés conditionnés par pochettes Embouts stériles pour les pipetages Eau pour préparation injectable Nettoyage régulier particulier : murs et grilles des bouches d'aération du laboratoire Préparation de 2 aliquotes et reprise systématique du sérum antérieur stocké au congélateur dans un tube « galactomannane free »
Référence du réactif	Technique manuelle quantitative Elisa Platelia <i>Aspergillus</i> EIA Biorad® ref. 62796	CIQ Pools de sérums négatif et positif
Matériau de référence	Proficiency panel Biorad®	NA
Équipements	Centrifugeuse 10 000 g Pipettes contrôlées tous les ans sur une balance raccordée au système international Programme sur l'ordinateur couplé au Multiscan Identification des échantillons sur une feuille de travail identique au schéma de la microplaque	Autre lecteur de microplaque en cas de panne

CIQ : contrôles internes de qualité ; PSM : poste de sécurité microbiologique ; NA : non applicable.

**Tableau 2** Évaluation des performances du laboratoire : reproductibilité.  
*Evaluation of the performances in the laboratory: reproductibility.*

Échantillons	Nombre	Moyenne index	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	Conclusion
Négatif	48	0,131	0,029	22,54	NA	Indicateur d'alerte
Positif	50	1,08	0,167	15,66	10 à 29,2	Conforme

CV : coefficients de variation.

**Tableau 3** Comparaison externe de la qualité [26].  
*External quality control comparison or EQAS: External Quality Assessment Scheme [26].*

Échantillons	Valeur labo	Cible groupe de pairs	Moyenne générale	CV % reproductibilité	Biais %
Négatif	0,13	0,104–0,158	0,131	44,7	–0,76
Positif	1,21	0,871–1,307	1,089	18,3	+11,11

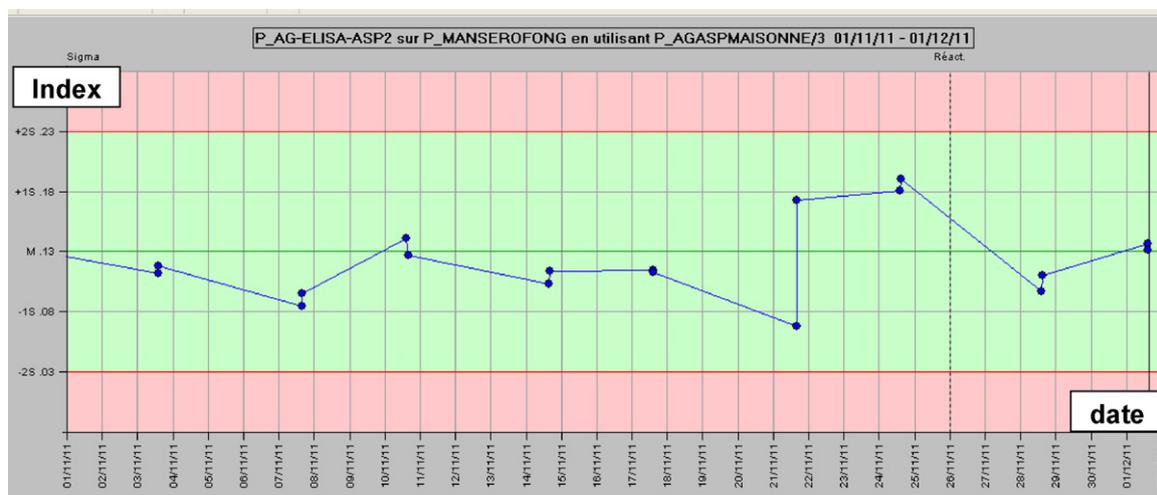
CV : coefficients de variation.

CIQ correspond à la moyenne et l'écart-type des 30 premiers dosages [15]. L'évaluation de la répétabilité estimée par les coefficients de variation (CV) obtenus par deux opérateurs différents pour les pools de sérums sont variables d'un manipulateur à l'autre : 9 et 13,7 % pour le pool positif. Le CV du pool négatif pour lequel le fournisseur indique qu'il n'est pas applicable pour le processus analytique a été de 7 et 30 % pour chaque technicien. L'évaluation de la reproductibilité ou fidélité intermédiaire (séries différentes) est de 22,5 % pour le pool négatif ( $n = 48$ ) et de 15,7 % pour le pool positif ( $n = 50$ ). Les manipulations sont effectuées indifféremment par l'une ou l'autre technicienne (Tableau 2). Compte tenu de notre expérience, il nous semble que la surveillance du CV du pool négatif pourrait constituer un bon indicateur de veille de la contamination environnementale dont la maîtrise doit être démontrée notamment grâce au graphe de Levey-Jennings établis par le logiciel de traitement des résultats des contrôle de qualité (Fig. 1).

### Exactitude

À noter pour cette technique, l'absence de méthode de référence par immunologie et d'étalon international ainsi que de recommandation des sociétés savantes concernant les coefficients de variation. La conformité des résultats de chaque laboratoire sera évaluée au regard des spécifications de la fiche technique du fournisseur et ceux obtenus par les 39 laboratoires participants au seul programme d'évaluation externe existant en France organisé par ProBioQual<sup>®</sup> pour lesquels les CV de la reproductibilité sont de 44,7 % d'unité (moyenne index = 0,131) pour l'EEQ négatif et 18 % pour le positif (moyenne index = 1,089) en 2011 (Tableau 3).

La méthode décrite dans le Guide COFRAC LAB GTA 14 : Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie utilisant les résultats des CIQ et EEQ a été retenue (chapitre 8.3 [16]). L'incertitude de mesure des résultats, calculée pour la méthode utilisée dans notre laboratoire, pour un sérum négatif est de 45 % et celui d'un sérum positif 34 %.



**Figure 1** Graphe de Levey-Jennings établi par le système informatique pour le CIQ négatif.  
*Graph of Levey-Jennings established by the computer system for the negative quality control.*

### Domaine de mesure

La limite de détection est représentée par trois fois l'écart-type de l'absorbance du blanc soit 0,075 unités d'absorbance et la limite supérieure de linéarité est fixée par la recommandation du fournisseur au dernier point d'étalonnage R4 (Index entre 3–4). Il est à noter que la dilution des sérums n'est pas possible et le résultat est « supérieur au R4 ».

### Discussion – Conclusion

Le travail de validation de méthode selon la norme et tel qu'il est recommandé par le COFRAC pour l'accréditation est nouveau dans le domaine de la parasitologie–mycologie [11]. Il existe peu de recommandations dans ce domaine. Le diagramme des 5M pratiqué pour évaluer les risques encourus a montré les principaux éléments à maîtriser. La mise en place d'un CIQ est aussi un élément déterminant dans cette recherche et a permis la validation de la fidélité de la méthode.

Les résultats de calcul de l'incertitude de la mesure peuvent, quant à eux, sembler élevés mais ils ne sont que le reflet de la réalité et qu'« un outil d'aide à l'interprétation des résultats pour une décision médicale, minorer l'incertitude revient à sous-évaluer le risque et à éventuellement différer un diagnostic ou une modification thérapeutique (ajustement). De même, une surestimation de l'incertitude revient à remettre en cause la pertinence de cette analyse. Le résultat de l'incertitude en lui-même n'est pas évalué par rapport à un critère de conformité et ne peut donc pas être comparé aux indicateurs issus de la littérature tels que Ricos, Valtec, ... » [16].

La validation dans le LBA n'a pas été effectuée en portée B. Sa recherche plus systématique et la mise sur le marché prochaine d'une trousse validée par le fournisseur simplifieront la vérification de la méthode pour les échantillons de sérum et de LBA en portée A. La commercialisation récente du *proficiency panel* a aussi apporté une aide.

La maîtrise des risques donne confiance au manipulateur, au biologiste et par voie de conséquence au clinicien. Cette démarche globale a montré tout son intérêt pour maîtriser une technique délicate et améliorer la qualité des pratiques.

### Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

### Références

[1] Baddley JW, Andes DR, Marr KA, Kontoyiannis DP, Alexander BD, Kauffman CA, et al. Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2010;50:1559–67.

[2] Bergeron A, Belle A, Sulahian A, Lacroix C, Chevret S, Raffoux E, et al. Contribution of galactomannan antigen detection in BAL to the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies. *Chest* 2010;137:410–5.

[3] Boonsarngsuk V, Niyompattama A, Teosirimongkol C, Sriwanichrak K. False-positive serum and bronchoalveolar lavage

*Aspergillus* galactomannan assays caused by different antibiotics. *Scand J Infect Dis* 2010;42:461–8.

[4] Bow EJ. Invasive fungal infection in haematopoietic stem cell transplant recipients: epidemiology from the transplant physician's viewpoint. *Mycopathologia* 2009;168:283–97.

[5] Cornillet A, Camus C, Nimubona S, et al. Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin Infect Dis* 2006;43:577–84.

[6] Cours de l'Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et de mycologie. Aspergilloses université virtuelle francophone <http://umvf.univ-nantes.fr/parasitologie/enseignement/aspergillose/site/html/> (consulté le 15/11/2011).

[7] Doermann F, Accoceberry I, Weill FX, et al. Intérêt du dosage sérique de l'antigène galactomannane par méthode ELISA chez les patients présentant un risque d'aspergillose invasive dans un service d'hématologie. *J Mycol Med* 2002;12:131–5.

[8] Gangneux JP, Lavarde D, Bretagne S, et al. Transient *Aspergillus* antigenaemia: think of milk. *Lancet* 2002;6:359. 1251.

[9] Gangneux JP, Camus C, Philippe B. Epidemiology of invasive aspergillosis and risk factors in non neutropaenic patients. *Rev Mal Respir* 2010;27:e34–46.

[10] Guidance for industry, Bioanalytical method validation: U.S. department of health and human services, food and drug administration center for drug evaluation and research (CDER) center for veterinary medicine (CVM) May 2001-BP.

[11] Guide COFRAC LAB GTA 12. Guide technique d'accréditation en parasitologie et en mycologie [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr). (consulté le 15/11/2011).

[12] Guide COFRAC SH GTA 04. Guide de validation des méthodes en biologie médicale [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr) (consulté le 15/11/2011).

[13] Guide COFRAC SH FORM 43 Fiche type quantitatif – Vérification (portée A)/Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr) (consulté le 15/11/2011).

[14] Guide COFRAC SH FORM 44. Fiche type qualitatif – Vérification (portée A)/Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr) (consulté le 15/11/2011).

[15] Guide COFRAC LAB GTA 06. Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr) (consulté le 15/11/2011).

[16] Guide COFRAC SH GTA 14. Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr) (consulté le 15/12/2011).

[17] Husain S, Clancy CJ, Nguyen MH, Swartzentruber S, Leather H, LeMonte AM, et al. Performance characteristics of the platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay for detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in bronchoalveolar lavage fluid. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1760–3.

[18] Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, et al. 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* 2010;50:1091–100.

[19] Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K, Lebeau B, de Montbrison F, Le Strat Y, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005–2007). *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1882–9.

[20] Luong ML, Filion C, Labbé AC, Roy J, Pépin J, Cadrin-Tourigny J, et al. Clinical utility and prognostic value of bronchoalveolar lavage galactomannan in patients with hematologic malignancies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68:132–9.

[21] Maertens J, Theunissen K, Deeren D, et al. Defining a case of invasive aspergillosis by serum galactomannan. *Med Mycol* 2006;44:5173–8.

- [22] Mori Y, Nagasaki Y, Kamezaki K, et al. High incidence of false-positive *Aspergillus* galactomannan test in multiple myeloma. *Am J Hematol* 2010;85:449–51.
- [23] Norme NF EN ISO 15189 Laboratoires d'analyses de biologie médicale – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. <http://www.afnor.org/>.
- [24] Pagano L, Caira M, Candoni A, et al. Invasive aspergillosis in patients with acute myeloid leukemia: a SEIFEM-2008 registry study. *Haematologica* 2010;95:644–50.
- [25] Paugam A, Baixench MT, Lebuisson A, Dupouy-Camet J. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: value of bronchoalveolar lavage galactomannan for immunocompromised patients. *J Pathol Biol* 2010;58:100–3.
- [26] Persat F, Eynard JC, Picot S, Poggi B. External quality assessment scheme and interlaboratory proficiency testing for *Aspergillus* galactomannan ELISA. *Mycoses* 2012;55:562–272.