



HAL
open science

Prévention, contrôle et maîtrise du risque d'aspergillose invasive au Groupement Hospitalier Edouard Herriot lors de travaux : apport de la surveillance et de l'alerte environnementale et épidémiologique

Sophie Loeffert

► To cite this version:

Sophie Loeffert. Prévention, contrôle et maîtrise du risque d'aspergillose invasive au Groupement Hospitalier Edouard Herriot lors de travaux : apport de la surveillance et de l'alerte environnementale et épidémiologique. *Ecologie, Environnement*. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1246 . tel-01782407v2

HAL Id: tel-01782407

<https://theses.hal.science/tel-01782407v2>

Submitted on 2 May 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre NNT : xxx

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° ED341
Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation

Spécialité de doctorat :
Discipline : (Ecologie Microbienne-Santé Publique)

Soutenue publiquement/ le 20/11/2017, par :
(Sophie LOEFFERT)

**Prévention, contrôle et maîtrise du risque d'aspergillose
invasive au Groupement Hospitalier Edouard Herriot lors
de travaux : apport de la surveillance et de l'alerte
environnementale et épidémiologique**

Devant le jury composé de :

Mme Wallon Martine, Professeur, Université Claude Bernard, Lyon	Examinatrice
Mme Rogues Anne-Marie, Professeur, Université Victor Ségalen, Bordeaux	Rapporteur
M Lepelletier Didier, Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
Mme Botterel Françoise, Professeur, Université Paris-Est Créteil Val de Marne	Examinatrice
M Rauwel Gaétan, Ph.D, Laboratoires Anios	Examineur

M Vanhems Philippe, Professeur, UCBL1	Directeur de thèse
Mme Gustin Marie-Paule, Maître de Conférences, UCBL 1,	Co-encadrante

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. le Professeur Frédéric FLEURY

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Intitulé et adresse du laboratoire :

Equipe Epidémiologie et Santé Internationale, Laboratoire des Pathogènes
Emergents Fondation Mérieux, Centre International de Recherche en Infectiologie,
INSERM U1111, CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France

Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Edouard Herriot
Service d'Hygiène, Epidémiologie et Prévention
Unité Epidémiologie et Biomarqueurs de l'Infection
5 place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03

Financements

Cette thèse a bénéficié d'une bourse CIFRE (ANRT) : Les Laboratoires ANIOS
Tuteur scientifique de l'entreprise : Dr RAUWEL Gaétan, Directeur R&D.



RESUME

Lors de travaux, la mise en suspension des spores d'*Aspergillus* constitue un facteur de risque reconnu dans le développement d'une aspergillose invasive. Durant l'année 2015, un pavillon de 6000 m² (60 lits) de notre établissement a été entièrement déconstruit. L'objectif principal de cette étude a été d'évaluer l'association entre la concentration des spores d'*Aspergillus fumigatus* (AF) dans l'environnement extérieur et intérieur des pavillons, mais également avec la coexistence de cas cliniques, afin de proposer des recommandations d'amélioration (pratiques & techniques). Pour cela, durant 11 mois, une surveillance prospective de la contamination à *Aspergillus fumigatus* (AF) de l'air extérieur et intérieur par impaction sur gélose, mais aussi une investigation épidémiologique des patients à risque ont été mis en place. Au total, 3885 prélèvements d'air ont été réalisés (1744 extérieurs et 2141 intérieurs) permettant, par calcul des ratios de contamination (extérieurs vs intérieurs), de confirmer une efficacité des mesures de précautions pour réduire l'aérocontamination. Des prélèvements extérieurs continus des spores d'*Aspergillacées* (spore/m³/jour) ont également été réalisés par un capteur Hirst. Ce capteur, mais aussi le suivi des conditions météorologiques se sont révélés être des systèmes d'alerte utiles pour prévenir les pics de contamination. Enfin, 394 (383 environnementaux, 11 cliniques) isolats d'AF sensibles aux antifongiques ont été génotypés (MLVA). L'analyse des génotypes a montré 7 génotypes similaires entre des isolats d'AF cliniques et environnementaux confirmant un rôle de l'environnement hospitalier dans l'infection ou la colonisation des patients

Mots clefs : *A. fumigatus*, surveillance environnementale, risque infectieux, aspergillose, génotypage, antifongiques, *Aspergillus* spp.

ABSTRACT

Invasive aspergillosis (IA) due to *Aspergillus* has been associated with building construction, which may increase spores emission nearby immunocompromised patients. In 2015, one blocks of 6,000 m² (60 beds) from our hospital has been entirely demolished. The aim of this study was to evaluate possible association between concentration of *A. fumigatus* (AF) spores in the outdoor and indoor environment and also with the clinical cases in order to propose some improvements in actuals methods and practices. A daily surveillance of fungal contamination was implemented during 11-months. Environmental survey was realized by air samplings, outdoor and indoor, with an automatic agar sampler. In parallel, surveillance of IA infection cases was conducted by epidemiological investigation. A total of 3885 air samples (1744 outdoor samples and 2141 indoor samples) were collected, allowing calculation of ratios (outdoor vs indoor) to confirm efficacy of preventives measures applied to reduce indoor aerocontamination. Outdoor continuous sampling of *Aspergillaceae* spores (spore/m³/day) was also realized by a Hirst collector. This collector was useful as alarm system to detect contamination peaks. Similarly, monitoring of meteorological parameters seems to be an interesting tool, to prevent *Aspergillus* peaks. Finally, 394 isolates of AF, susceptible to antifungals (383 environmental and 11 clinical isolates) were genotyped using MLVA. Analysis of genotypes showed 7 similar genotypes shared by environmental and clinical isolates, suggesting that clinical colonization and/or infection may originate from the hospital environment.

Key words: *A. fumigatus*, environmental survey, infectious risk, aspergillosis, genotyping, antifungals, *Aspergillus* spp.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont aidée et soutenue durant ces trois années mais également les rapporteurs et membres du jury qui ont acceptés de juger ce travail. Je tiens également à remercier les membres de mon comité de pilotage de thèse pour m'avoir accompagnée tout au long de ce projet (Pr Xavier Bertrand, Dr Serge Aho Glélé, Benoît Cournoyer (PhD)).

- Je tiens à remercier chaleureusement le Pr Philippe Vanhems, mon directeur de thèse, pour m'avoir accordé sa confiance et laissé l'opportunité de réaliser ce projet. Merci pour votre disponibilité et vos nombreux conseils et encouragements sans lesquels ce projet n'aurait pu voir le jour.

- Un immense merci au Professeur Marie-Paule Gustin, co-encadrante de cette thèse pour sa motivation pour la recherche et son expertise scientifique. Merci de m'avoir épaulée et soutenue dans l'apprentissage des bio-statistiques. Merci aussi pour son enthousiasme envers mes travaux et de m'avoir consacré autant de temps.

- J'adresse maintenant un énorme merci aux Laboratoires ANIOS et tout particulièrement à Gaétan Rauwel et Jacques Criquelion sans qui ce projet n'aurait pu être réalisé. Merci pour votre spontanéité, votre réactivité et confiance. Merci également d'avoir permis la valorisation de ces travaux de thèse.

- Merci à toute l'unité d'hygiène et sa great team d'internes (Sergent Capelle, Laurie, Capucine, Laetitia, Nesma...). Merci pour la bonne ambiance des pauses café et autres moments conviviaux qu'on a partagés.

- J'arrive maintenant au Laboratoire d'environnement ! Pascale, Céline, Pierre mais aussi Nadia et Marie et Mr Perraud...que dire à part merci d'avoir toujours était là pour m'épauler et me conseiller dans les moments difficiles. Une mention spéciale à Pascale qui au cours de nos pauses midi a enrichi mon carnet de recettes ! Merci !

- Un grand merci au Professeur Martine Wallon mais aussi à Damien Dupont, Bruno Simon et toute l'équipe de Parasito-Mycologie qui m'ont accueillie, conseillée et permis de mener à bien ce projet !

- Merci à l'équipe Dynamyc de Créteil qui a rendu possible l'étude des liens entre patients et environnement. Merci pour votre spontanéité, votre gentillesse, vos conseils scientifiques et votre efficacité ! Je remercie plus particulièrement Dr Melloul Elise et Chloé Guillot qui ont mené les manipulations de génotypage comme des chefs !

- Je tiens également à remercier Estelle Tissot et Michel Thibaudon de chez Analyzair pour leur efficacité et leurs conseils en aérobiologie.

- Merci à l'ex gripette Corinne pour ton soutien et ta bonne humeur ! Merci à la nouvelle gripette Laetitia pour ton aide précieuse lors des 3885 prélèvements d'air, mais aussi des 400 PCR et des 1200 bandelettes Etests déposées... Tu as su m'aider dans les moments difficiles,

merci pour ton soutien ! Ton expérience technique mais aussi ta bonne humeur ont été d'une grande aide tout au long de ce projet.

- Un grand merci pour toutes les stagiaires qui ont réalisé leur stage au laboratoire : Alizée, Margot, Marine et Zehra qui ont chacune participées à une partie du projet. Je vous remercie pour les dizaines, centaines....de colonies d'*Aspergillus* que vous avez pré-identifiées au microscope. Merci d'avoir apporté votre pierre à l'édifice !

- Je tiens également à remercier tous les chefs de service et personnel des unités ayant accepté de participer au projet. Merci pour votre intérêt et sérieux dans ce projet.

- Une mention spéciale pour le Dr Nagham Khanafer sans qui ce projet n'aurait pas abouti. Merci pour tes conseils et remarques (même celles dites « sans pincettes »). Je n'oublierai pas les séances de « brainstorming » dans ton bureau, ni les pauses midi à refaire le monde « que faire si on gagnait au loto ». Tu es devenue bien plus qu'une collègue, merci pour ton soutien; notre amitié m'est chère.

- A ma co-bureau, Hélène Favier, merci pour ta bonne humeur et spontanéité. Je n'oublierai pas nos papotages durant les pauses café !

- Mes pensées vont maintenant à mes amies de facs, la « team Bidiboules »....Que dire, à part merci pour votre soutien et pour tous ces fous rires que l'on a partagés ! NYC ou Stras city, aucune distance n'a eu raison de notre amitié !!!

- Merci à mon fiancé pour avoir cru en mes capacités. Ton soutien de tous les jours a été une force sans laquelle je n'aurais réussi à mener à bien cette thèse. Merci de m'avoir encouragée et supportée durant ces années et ceci malgré les sacrifices que cela a occasionné. Je te dédie cette thèse à toi, ma force, mon amour.

- A mes parents, qui depuis toujours, m'ont soutenue et accompagnée ! Je ne vous remercierai jamais assez de croire en moi. Merci tout simplement d'être vous. Jean, tu as su me conseiller à des moments difficiles durant cette aventure de thèse, merci ! Merci également à la team Frémot qui n'a cessé de m'encourager dans la réalisation de ce projet ! Merci à Aude (alias O2) qui malgré la distance et les épreuves a partagé mes joies et mes difficultés tout au long de ces années de thèse.

- J'ai également une pensée pour mes anciens collègues de l'équipe opérationnelle d'hygiène hospitalière de l'hôpital Brabois pour avoir cru en mes capacités et m'avoir toujours soutenue dans mes projets. Je n'oublie pas votre accueil chaleureux que vous m'aviez réservé. Je pense particulièrement à Sylvia, Marielle, Jocelyne, Jérôme, Arnaud et Decebal ! C'est toujours un plaisir de vous revoir lors des congrès scientifiques.

- Merci à mon chien, Falcon, qui a su me maintenir en forme physique avec de longues promenades quotidiennes, sous le climat glacial et tropical lyonnais. Enfin je tiens à remercier la sncf qui, grâce à ses nombreux retards, m'a permis de travailler de nombreuses heures sur ma thèse aux quatre coins de la France...A tous ceux que j'ai oubliés, n'hésitez pas à vous manifester !

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	13
TABLE DES FIGURES.....	14
TABLE DES TABLEAUX.....	15
TABLE DES ANNEXES.....	16
VALORISATION SCIENTIFIQUE.....	18
I) Publications à comité de lecture.....	18
1) -Publications présentant les travaux de thèse.....	18
2) -Publications liées à la thèse.....	19
II) Communiqués.....	19
1) -Communications internationales.....	19
2) -Communications nationales.....	20
CONTEXTE DU PROJET.....	22
INTRODUCTION.....	30
INFECTION NOSOCOMIALE.....	31
I) Définition infection nosocomiale.....	31
II) Prévalence des infections nosocomiales en France.....	31
III) Le risque infectieux environnemental fongique.....	31
ASPERGILLUS - A.FUMIGATUS.....	33
I) Champignons du genre <i>Aspergillus - A.fumigatus</i>.....	33
1) -Historique.....	33
2) -Ecologie.....	33
3) -Cycle de développement.....	33
4) -Morphologie:.....	35
5) -Structure du champignon.....	36
II) Facteurs de virulence d'<i>A. fumigatus</i>.....	37
ASPERGILLOSE INVASIVE.....	40
I) Pathologie.....	40
1) -Epidémiologie.....	40
2) -Symptômes et manifestations cliniques.....	41
II) Diagnostic.....	41
1) -Diagnostic –Classification des AI.....	44
2) -Critères cliniques.....	44
3) -Critères mycologiques.....	45
4) -Critères histologiques.....	47
III) Apport des techniques de génotypage.....	47

TRAITEMENT DE L'ASPERGILLOSE INVASIVE	50
I) Les antifongiques.....	50
1) -Historique	50
2) -Les polyènes	50
3) -Les pyrimidines	51
4) -Les antifongiques azolés	52
5) -Echinocandines	52
PHENOMENES DE RESISTANCE AUX ANTIFONGIQUES AZOLES	53
I) Historique	53
II) Les mécanismes de résistance.....	54
1) -Les mutations de la protéine Cyp51A	54
2) -Les autres mécanismes de résistance:.....	56
3) -La prévalence de la résistance d' <i>A. fumigatus</i> aux azolés	56
III) Test de la susceptibilité aux antifongiques	57
GESTION DU RISQUE INFECTIEUX ENVIRONNEMENTAL	59
I) Généralités	59
1) -Contexte	59
2) -Présentation des guides existants.....	59
II) Caractérisation du risque infectieux.....	60
1) -Evaluation du risque infectieux en ES.....	60
III) Gestion du risque infectieux fongique en ES	65
1) -Mise en place d'une cellule travaux	65
2) -Mise en place d'une étude d'impact.....	66
3) -Mise en place de mesure de prévention:.....	68
4) -Surveillance des mesures mises en place et actions correctives	74
SURVEILLANCE DU RESPECT DES MESURES PRECONISEES	75
CONDUITE A TENIR EN CAS D'ALERTE	75
APPRECIATION QUANTITATIVE DU RISQUE ASPERGILLAIRE	77
I) Surveillance environnementale	77
1) Différentes techniques de prélèvements	77
2) -Détermination de la fréquence des contrôles et interprétation	78
II) Surveillance épidémiologique.....	79
1) -Contexte général.....	79
2) -Expérience à l'hôpital Edouard Herriot.....	82
OBJECTIFS.....	85
MATERIEL ET METHODE.....	88
I) Protocole de l'étude (article protocole).....	89

RESULTATS	118
ARTICLE EN COURS	119
I) Article 1	119
ARTICLE PUBLIE	147
I) Article 2	147
ARTICLES SOUMIS	153
I) Article 3	153
II) Article 4	175
III) Article 5	202
DISCUSSION.....	215
CONCLUSION & PERSPECTIVES	228
REFERENCES	232
ANNEXES	248

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC : ATP-Binding cassette
ADN : Acide Désoxyribonucléique
A fumigatus : *Aspergillus fumigatus*
AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism
AI : Aspergillose Invasive
AMB : Amphotéricine B
API : Aspergillose Pulmonaire Invasive
CCLIN : Centre inter-régional de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales
CLIN : Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales
CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CSPT : Cell surface protein typing
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
EORTC : European Organization for research and Treatment of Cancer
ES : Etablissements de Santé
EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GM : Galactomannane
HCL : Hospices Civils de Lyon
HEH : Hôpital Edoard Herriot
HEPA : High Efficiency Particulate Air Filtration
IAS : Infection Associée aux Soins
IN : Infection Nosocomiale
ITZ : Itraconazole
LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire
LCR : Lavage Céphalo-Rachidien
MLST : Multilocus Sequence Typing
MLVA : Multiple Locus Variable-Number Tandem-Repeats
MSF : Major Facilitator Superfamily
MSG : National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses
PCR : Polymerase Chain Reaction
RAPD : Random amplified polymorphic DNA
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
STR : Short Tandem repeat
TDM : Tomodensitométrie
TRESP: Tandem Repeats located within Exons of Surface Protein
UHE : Unité d'Hygiène et d'Epidémiologie
VNTR : Variable Number Tandem Repeat
VCZ : Voriconazole

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Plan de la première étape de modernisation du GHEH.....	24
Figure 2. Calendrier prévisionnel des travaux de déconstruction du pavillon H (1/2).....	25
Figure 3. Calendrier prévisionnel des travaux de déconstruction du pavillon H (2/2).....	26
Figure 4. Photos représentative des 3 périodes de déconstruction réalisées durant l'année 2015 à l'hôpital Edouard Herriot.	28
Figure 5. Processus de reproduction et stratégies d'adaptation d' <i>A. fumigatus</i>	34
Figure 6. Aspect d'une colonie d' <i>Aspergillus fumigatus</i> sur milieu de Sabouraud dextrose chloramphenicol	35
Figure 7. Aspect microscopique des conidiophores et conidies d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	36
Figure 8. Structure de la paroi fongique d' <i>A. fumigatus</i>	36
Figure 9. Gènes de virulence chez <i>A. fumigatus</i>	37
Figure 10. Diagramme représentant la sévérité des principales pathologies aspergillaires en fonction du statut immunitaire de l'hôte.....	41
Figure 11. Schéma des principales méthodes de génotypages décrites pour l'investigation de la diversité génétique d' <i>A. fumigatus</i>	49
Figure 12. Représentation schématique des cibles des antifongiques	51
Figure 13. Mécanismes de résistance généraux ainsi que leur correspondance pour la résistance aux azolés chez <i>A. fumigatus</i>	54
Figure 14. Voies d'acquisition de la résistance aux azolés chez <i>A. fumigatus</i>	55
Figure 15. Distribution mondiale des mutations d' <i>A. fumigatus</i> responsables de la résistance aux azolés.....	57
Figure 16. Localisation des secteurs d'hospitalisation identifiés comme à risque fongique à l'hôpital Edouard Herriot.....	64
Figure 17. Etapes nécessaires à l'élaboration d'une étude d'impact en secteur hospitalier	66
Figure 18. Représentation des différentes missions de la Cellule travaux	67
Figure 19. Affiche d'information sur le risque aspergillaire affichée dans les services à risque	72
Figure 20. Affiche représentant les circuits piétons recommandés pour les patients.....	73
Figure 21. Schéma de la conduite à tenir en cas d'alerte	76
Figure 22. Organisation du recueil, de la saisie et de l'analyse des données de surveillances d'aspergilloses invasives réalisée par l'UHE.	84
Figure 23. Schéma global représentant les principales connexions existantes entre l'aérocontamination fongique environnemental et le patient lors de travaux à l'hôpital	87
Figure 24. Localisation des capteurs Hirst de l'étude préliminaire réalisée en automne à l'hôpital Edouard Herriot 2013	154
Figure 25. Liste d'études françaises non exhaustive, ayant évaluées la susceptibilité aux azolés d'isolats cliniques et environnementaux d' <i>A. fumigatus</i>	203

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Liste non exhaustive d'études portant sur la surveillance environnementale et clinique lors de travaux, réalisées cette dernière décennie autour de Lyon	29
Tableau 2. Liste non exhaustive des processus biologiques d' <i>A. fumigatus</i> impliqués dans les mécanismes de virulence.....	38
Tableau 3. Classification du risque aspergillaire pour chaque catégorie de patient et facteurs prédisposants à une AI	43
Tableau 4. Résumé des principaux avantages et inconvénients des techniques diagnostics de l'AI utilisées en laboratoire.....	46
Tableau 5. Classification des travaux en fonction de leur émission de poussière.....	61
Tableau 6. Regroupement des secteurs d'hospitalisation en fonction du risque infectieux qu'ils représentent	63
Tableau 7. Secteurs d'hospitalisation identifiés à risque fongique à l'hôpital Edouard Herriot	64
Tableau 8. Mesures à mettre en œuvre dans les services à risque, si l'hospitalisation dure 48 heures ou plus	73
Tableau 9. Mesures à mettre en œuvre dans les services à risque, si hospitalisation dure moins de 48 heures comme par exemple l'hospitalisation de jour	73
Tableau 10. Proposition de valeurs cibles et leur interprétation.....	74
Tableau 11. Liste non exhaustive de quelques études portant sur l'étude de la relation entre incidence des cas d'AI et la présence de travaux à l'hôpital	81

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1. EVALUATION DU NIVEAU DE RISQUE ASPERGILLAIRE	249
ANNEXE 2. PROCEDURE P-4 Prévention des risques liés à l'empoussièremment.....	251
ANNEXE 3. DEMARCHE GLOBALE D'ETUDE D'IMPACT	252
ANNEXE 4. GROUPE DE PATIENS A RISQUE INFECTIEUX FONGIQUE.....	255
ANNEXE 5. PLAQUETTE D'INFORMATION	257
ANNEXE 6. AUDIT n : 1	260
ANNEXE 7. AUDIT n : 2.....	262
ANNEXE 8. AUDIT n : 3	264

VALORISATION SCIENTIFIQUE

VALORISATION SCIENTIFIQUE

I) Publications à comité de lecture

1) -Publications présentant les travaux de thèse

- Loeffert ST, Gustin MP, Cassier P, Bouché P, Lion C, Filoni M, Perraud M, Vanhems P. Efficacy of different airborne disinfection products in reducing the risk of *Aspergillus fumigatus* infection from hospital false ceiling exposure during renovation work. *Canadian Journal of Infection control* 2017.
- Loeffert ST, Melloul E, Dananché C, Hénaff L, Bénét T, Cassier P, Dupont D, Guillot J, Botterel F, Wallon M, Gustin MP, Vanhems P. Monitoring of clinical strains and environmental fungal aerocontamination to prevent invasive Aspergillosis infections in hospital during large deconstruction work: a protocol study. Soumis, *BMJ Open*. Juin 2017. Accepté avec révisions mineures (Septembre 2017).
- Loeffert ST, Vanhems P, Tissot E, Dananché C, Cassier P, Bénét T, Perraud M, Thibaudon M, Gustin MP. Evaluation of Hirst- type spore traps in outdoor *Aspergillaceae* monitoring during large demolition work in hospital. Soumis, *PlosOne*. Juin 2017. Accepté avec révisions (Septembre 2017)
- Loeffert ST, Hénaff L, Dupont D, Bienvenu AL, Dananché C, Cassier P, Bénét T, Wallon M, Gustin MP, Vanhems P. Prospective survey of azole drug resistance among environmental and clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* in a French university hospital during major deconstruction. Soumis, *Medical Mycology*, Juin 2017.
- Loeffert ST, Melloul E, Gustin MP, Hénaff L, Guillot C, Dupont D, Wallon M, Cassier P, Dananché C, Bénét T, Botterel F, Guillot J, Vanhems P. Investigation of the relationships between clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* by multi-locus, variable-number, tandem-repeat analysis during major demolition work in a French university hospital. Soumis à *Journal of New England Medecine*, septembre 2017.

- Loeffert ST, Gustin MP, Hénaff L, Vanhems P. Evaluation of preventive measures efficacy and meteorological parameters impacts on *Aspergillus* aerocontamination in hospital environment during major deconstruction works. En cours de rédaction.

2) -Publications liées à la thèse

- Dananché C, Gustin M.P, Cassier P, Loeffert S.T, Thibaudon M, Bénet T, Vanhems P. Evaluation of Hirst-type spore trap to monitor environmental fungal load in hospital. Plos One 2017;12(5)

II) **Communications**

1) -Communications internationales

Présentations orales

- Test of Hirst-spore traps performance for outdoor fungal monitoring during large demolition work at hospital. 6th European Symposium on Aerobiology (ESA). Juillet 2016, Lyon. Award de la meilleure communication jeune aérobiologiste.
- Multi-locus variable number tandem repeat analysis of clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* during a major deconstruction work period in a hospital in Lyon, France. 27th European congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Avril 2017, Vienne, Autriche.

Présentations posters

- Efficiency of different airborne disinfection products for reducing the risk of *Aspergillus fumigatus* infection from hospital false ceiling exposure. 3rd International Conference on Prevention & Infection Control (ICPIC). Juin 2015, Genève, Suisse.
- Evaluation of *A. fumigatus* aerocontamination dispersion indoor and outdoor hospital blocks during large demolition works at hospital. 7th Trends in Medical Mycology (TIMM). Octobre 2015, Lisbonne, Portugal.
- Influence of meteorological parameters on *Aspergillus spp.* dispersion outdoor and indoor during a large demolition work at hospital. 7th Advances Against Aspergillosis (AAA) Mars 2016 –Manchester, Grande Bretagne.

- Evaluation of *A. fumigatus* aerocontamination during large demolition works at hospital. Ongoing Environmental monitoring at Edouard Herriot university hospital. 7th Advances Against Aspergillosis (AAA) Mars 2016 –Manchester, Grande Bretagne
- Evaluation of the impact of air handling system on fungal colonization of three medical wards during large demolition works at hospital. 7th Advances Against Aspergillosis (AAA) Mars 2016 –Manchester, Grande Bretagne
- Surveillance of antifungal drug resistance among environmental and clinical isolates of *A. fumigatus* in a French University hospital during major deconstruction works. 27th European congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Avril 2017, Vienne, Autriche

2) -Communications nationales

Présentations orales

- Risque d'Aspergillose invasive liés aux travaux dans un établissement de santé. Séminaire «Promotion de la Recherche en Hygiène Hospitalière» (SF2H) Novembre 2015, Paris
- Impact des paramètres météorologiques sur la dispersion d'*Aspergillus spp.* à l'extérieur et l'intérieur des unités de soins lors de travaux majeurs à l'hôpital. Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H) Juin 2016, Nantes
- Travaux hospitaliers et risque infectieux. 36ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Décembre Paris 2016
- Evaluation de la sensibilité aux antifongiques azolés des isolats d'*A. fumigatus* environnementaux et cliniques prélevés à l'hôpital Edouard Herriot, dans un contexte de travaux majeurs. Société Française de Mycologie Médicale (SFMM), Mars 2017 Toulouse
- Epidémiologie moléculaire des souches d'*A. fumigatus* isolées dans l'environnement et chez des patients infectés et/ou colonisés lors de travaux majeurs à l'hôpital. Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H) Juin 2017, Nice
- Prévention, contrôle et maîtrise du risque d'aspergillose invasive au groupement hospitalier Edouard Herriot lors des travaux : apport de la surveillance et de l'alerte

environnementale et épidémiologique, Société Française de Microbiologie (SFM), 11 Octobre 2017, Paris

Présentations posters

- Revue de littérature des systèmes de désinfection par voie aérienne en milieu hospitalier. Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H) Juin 2015, Tours
- Evaluation de l'aérocontamination à *A. fumigatus* pendant des travaux de large ampleur à l'hôpital: Suivi de la surveillance environnementale mise en place. Société Française de Mycologie Médicale (SFMM) Mars 2016, Grenoble
- Impact des paramètres météorologiques sur la dispersion d'*Aspergillus* spp. à l'extérieur et l'intérieur des unités de soins lors de travaux majeurs à l'hôpital. Société Française de Mycologie Médicale (SFMM) Mars 2016, Grenoble
- Evaluation de la dispersion d'*A. fumigatus* à l'extérieur et à l'intérieur des unités de soins lors de travaux majeurs à l'hôpital. Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H) Juin 2016, Nantes

CONTEXTE DU PROJET

CONTEXTE DU PROJET

Contexte

Ce projet a été réalisé au sein du groupement hospitalier Centre (GHC), situé à Lyon, à l'Est de la ville sur un terrain de 15,5 ha formant un îlot urbain. L'hôpital Edouard Herriot (HEH) a été inauguré le 12 mars 1933. Sa conception sous forme pavillonnaire a été soutenue dès les années 1909 par le maire de Lyon de l'époque, Edouard Herriot. Cette tendance architecturale est fondée sur les découvertes de Pasteur concernant l'origine microbienne des infections et sur les principes hygiénistes recommandant la construction de pavillons séparés, ensoleillés et bien aérés. C'est l'architecte Tony Garnier qui a réalisé cet hôpital qui représente son œuvre la plus aboutie où partie architecturale et partie urbanistique se complètent pour former la « cité-jardin » des malades.

L'hôpital se compose de 32 pavillons couvrant 5 ha. Au total, 22 pavillons accueillent des activités médicales faisant de ce centre le premier pôle d'hospitalisation des HCL (Hospices Civils de Lyon) et de prise en charge des urgences de la région Rhône-Alpes. C'est dans ce cadre, que dans les années 2000, un plan de restructuration générale des HCL a été établi afin de permettre la modernisation de HEH. Le projet s'étale sur 10 ans et se compose de deux parties.

La première partie est en cours de réalisation et consiste à rassembler les services d'urgences, de réanimations et soins continus, les blocs opératoires et les services techniques tels que l'imagerie interventionnelle dans un seul et même bâtiment (Figure 1 A & B). Cette réorganisation du plateau technique est prévue dans le bâtiment en cours de construction, dont la livraison est prévue fin de l'année 2017 selon le calendrier prévisionnel (Figure 2, Figure 3). Ce bâtiment est construit à l'emplacement de l'ancien pavillon H qui a été entièrement déconstruit durant l'année 2015. La surveillance des travaux de déconstruction de ce pavillon d'une surface totale de 0,6 ha soit environ 12% de la surface couverte par les pavillons hospitalier a fait l'objet de cette thèse.

La deuxième partie des travaux de modernisations, prévus après 2019 consistera à la construction d'autres nouveaux bâtiments.

A

AVANT TRAVAUX DE MODERNISATION

Des blocs opératoires, des lits de soins critiques et les urgences dispersés dans 12 pavillons



B

APRES TRAVAUX DE MODERNISATION – nouveau bâtiment à la place du pavillon H

1ère tranche - Plateau technique et urgences : ensemble fonctionnel et cohérent



Figure 1. Plan de la première étape de modernisation du GHEH

A) Etat des lieux avant travaux et déconstruction du pavillon H, B) après travaux et reconstruction du nouveau pavillon.

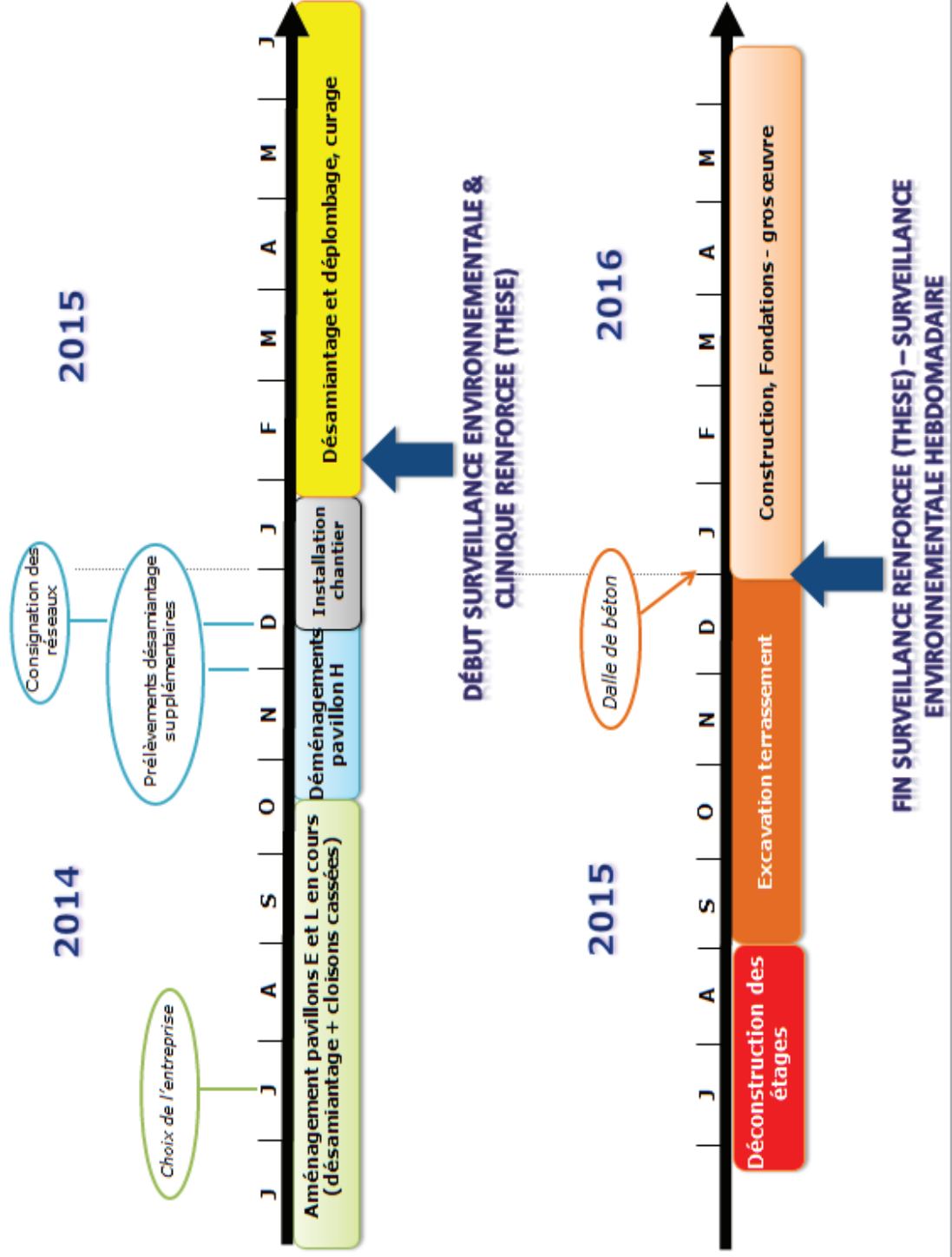


Figure 2. Calendrier prévisionnel des travaux de déconstruction du pavillon H (1/2)

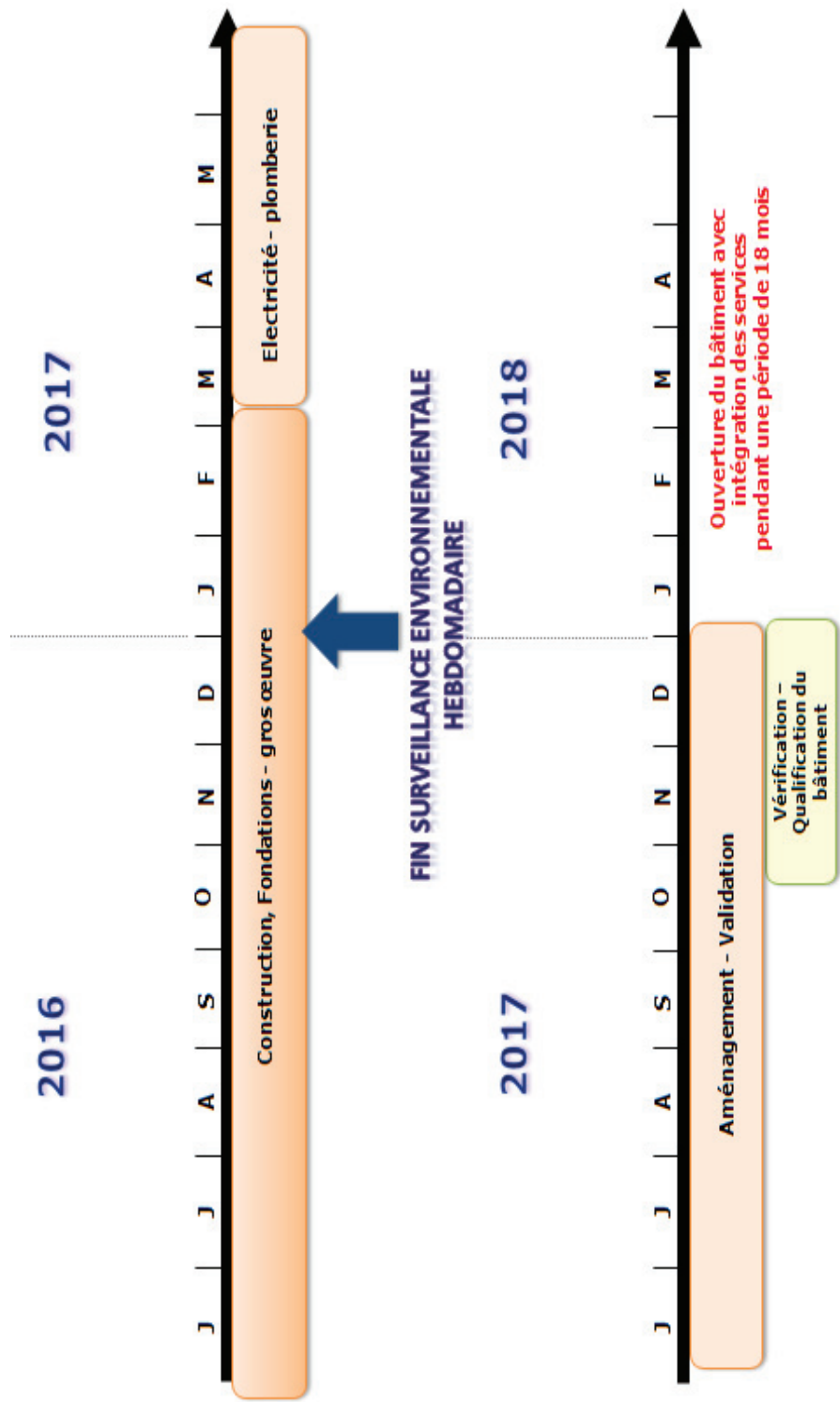


Figure 3. Calendrier prévisionnel des travaux de déconstruction du pavillon H (2/2)

Les travaux de déconstruction du pavillon H se sont étendus entre janvier 2015 et décembre 2015 et peuvent être répartis en 3 périodes:

- La période de travaux (A), entre janvier et fin juin 2015, correspond au curage, désamiantage et déplombage du pavillon.
- La période de travaux (B), de déconstruction des étages du pavillon en juillet et août 2015.
- La période de travaux (C), d'excavation et terrassement réalisé entre septembre et décembre 2015.

Fin décembre 2015, la dalle de béton a été coulée afin de laisser place à la construction du nouveau bâtiment. La Figure 4 illustre chacune des phases de travaux décrites ci-dessus.

Dans ce contexte, la prévision de la démolition d'un pavillon à l'hôpital a entraîné la mise en place de mesures de surveillance environnementale et épidémiologique des patients à risques de développer une aspergillose invasive (AI). Lors de l'établissement de ces surveillances, une attention particulière a été portée aux différentes études réalisées autour de Lyon, lors de travaux à l'hôpital. Les données de 4 études françaises réalisées cette dernière décennie autour de Lyon sont présentées dans le Tableau 1. Ces études montrent une certaine hétérogénéité au niveau de la méthodologie des prélèvements environnementaux et de leur analyse microbiologique (Méheust *et al.*, 2014).

De plus, dans les années 80, une étude rétrospective épidémiologique de 30 mois conduite à l'hôpital Edouard Herriot dans un contexte de travaux de rénovation, du service d'hématologie a répertoriée 22 cas d'AI dont 18 décès pour lesquels le lien direct entre décès et AI pouvait être évoqué mais aucune conclusion définitive n'a pu être établie (Perraud *et al.*, 1987). De même, une étude quasi-expérimentale réalisée entre 2005 et 2006 a évaluée l'incidence des AI suite à la relocalisation d'un service de soins intensifs d'hématologie (Bénet *et al.*, 2007). Ces études ont mis l'accent sur l'importance de la surveillance des facteurs environnementaux dans la prévention des AI.

Ainsi, lors de la mise en place de cette étude, un protocole de surveillance environnementale et clinique, basé sur les recommandations actuelles a été développé pour fournir de nouvelles données sur la dispersion d'*A. fumigatus* et possiblement trouver des pistes d'amélioration des recommandations françaises existantes.

**Période (A):
Curage et désamiantage**



**Période (B):
Démolition des étages**



**Période (C):
Excavation et terrassement**

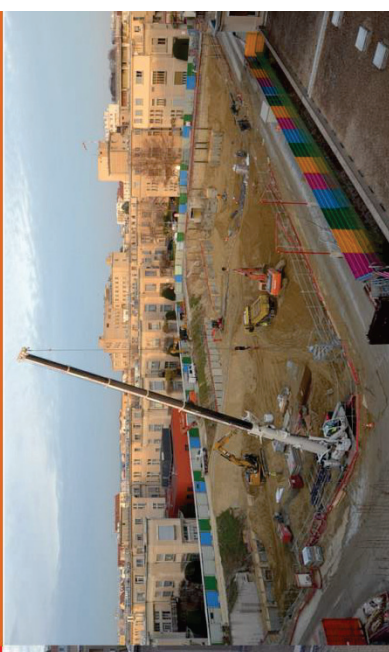


Figure 4. Photos représentative des 3 périodes de déconstruction réalisées durant l'année 2015 à l'hôpital Edouard Herriot.

Tableau 1. Liste non exhaustive d'études portant sur la surveillance environnementale et clinique lors de travaux, réalisées cette dernière décennie autour de Lyon

Références	Objectifs	Surveillance	Observations	Conclusions
Berthelot et al., 2006	Etude prospective de surveillance des cas d'infection pulmonaire invasive (IPA) entre 1993-2001 dans 2 services d'hématologies pendant des travaux de rénovation	Entre 1995 et 2001, 3653 prélèvements environnementaux (air et surface) ont été réalisés. 1 aux d' <i>Aspergillus</i> retrouvé dans l'environnement globalement stable	Malgré l'augmentation croissante du nombre de projets de travaux et de la gravité du risque lié à ces travaux, le nombre de cas d'AI a diminué entre 1993 et 2001	Aucune corrélation retrouvée entre le nombre d' <i>Aspergillus</i> ou <i>A. fumigatus</i> et le nombre de travaux réalisés. La mise en place de mesures de protection adaptées a permis de diminuer le taux d'AI en réduisant l'exposition des patients à <i>Aspergillus</i>
Sautour et al., 2007	Déterminer les taux de contamination fongique retrouvés en hématologie durant les travaux, mais aussi identifier la flore fongique prévalente dans ce service et évaluer l'impact des unités mobiles de filtration d'air	Durant les 18 mois d'étude, 377 prélèvements environnementaux air & surface couplés ont été réalisés	Un seuil inférieur à 5 CFU/m ³ de spores fongiques a été maintenu à l'intérieur du service pendant les travaux. <i>Aspergillus spp.</i> , après <i>Penicillium</i> est le plus retrouvé dans les prélèvements environnementaux (25%). Les systèmes de traitement d'air diminuent la contamination fongique	Pas de détermination de seuil d'alerte de charge fongique pouvant représenter un risque d'AI important. Cependant, l'importance de la mise en place des mesures de protection et l'efficacité des systèmes mobiles de filtration d'air a été montrée.
Fournel et al., 2011	Evaluer l'impact des travaux à l'hôpital sur la colonisation à <i>Aspergillus</i> de l'air à proximité immédiate des patients à risque, en présence de mesures de protection	Entre 2004 et 2007, 1301 prélèvements environnementaux (air et surface) ont été réalisés dans les chambres de 3 unités considérées à risque, avant et pendant les travaux. Un prélèvement nasal a été réalisé à l'admission et 1 fois par semaine jusqu'à la sortie pour les patients hospitalisés $\geq 72h$	L'aérocontamination à <i>Aspergillus</i> a été observée plus élevée quand les surfaces étaient contaminées à <i>Aspergillus</i> ou à un autre champignon filamentueux et plus faible quand les chambres possédaient un traitement d'air. 1,5% des patients testés étaient colonisés à <i>Aspergillus</i> (la plupart dès leur admission)	Le modèle multivarié utilisé n'a pas identifié de corrélation entre contamination à <i>Aspergillus</i> et travaux. L'accent est mis sur l'importance de la mise en place de mesures de protection adaptées et du renforcement du bio-nettoyage pour réduire le risque d'AI lors de travaux
Reboux et al., 2014	Étude rétrospective de l'impact de la surveillance fongique dans le couloir principal de l'hôpital et du service d'hématologie sur le risque d'AI	Sur les 2706 prélèvements d'air réalisés, 12 pics d' <i>A. fumigatus</i> > 40 UFC/m ³ ont été détectés dans le couloir principal et <i>A. fumigatus</i> a été observé 6 fois par an dans le couloir d'hématologie. 58 cas d'AI ont été reportés.	Un seuil d'alerte fixé de 40 CFU/m ³ , utilisé pendant 10 ans a montré son efficacité en aidant à diminuer le risque (mise en place des mesures correctives). Malgré la présence constante de travaux, l'aérocontamination fongique à l'hôpital n'a pas augmenté sensiblement.	La surveillance environnementale n'a pas permis de prévenir tous les cas d'AI mais son absence pourrait réduire la vigilance du personnel soignant

Liste non exhaustive d'études portant sur la surveillance environnementale et clinique lors de travaux, réalisées cette dernière décennie autour de Lyon

INTRODUCTION

INFECTION NOSOCOMIALE

I) Définition infection nosocomiale

En France, la définition consensuelle et générale adoptée par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) d'une infection nosocomiale (IN) est une infection associée aux soins (IAS) contractée dans un établissement de santé (ES) (Alfandari *et al.*, 2012). Cette infection est dite nosocomiale si elle est acquise à l'hôpital, au cours ou au décours d'une hospitalisation. Cette infection est donc absente lors de l'admission à l'hôpital et un délai de 48 heures minimum après l'admission est communément accepté pour distinguer une infection nosocomiale d'une infection acquise en dehors de l'hôpital. Ce délai varie en fonction du site de l'infection et de la durée d'incubation.

II) Prévalence des infections nosocomiales en France

Suite à l'initiative institutionnelle mise en place par la circulaire ministérielle de 1973, le décret de 1988 (décret n° 88 – 657 du 6 mai 1988), a permis la création des Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN) dans les établissements de santé (ES) publics ou privé. Le CLIN est chargé de la surveillance et de l'organisation de la lutte contre les IN. Il est coordonné par le Centre inter-régional de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales et associées aux soins (CCLIN) et s'articule avec différents réseaux de surveillance inter-établissements comme le réseau Raisin. L'un des outils de surveillance des IN est l'enquête de prévalence qui permet de mesurer la fréquence des IN dans une population à un moment donné. La dernière enquête de prévalence (dont les données sont publiques) réalisée en 2012 a montré une prévalence de 5,10% de patients. Parmi les 12 581 micro-organismes isolés d'IN, les entérobactéries étaient les plus fréquemment retrouvées (45,4%) avec une prévalence de patients infectés de 1,9%. De manière générale, la prévalence des IN associée à une bactériémie était de 0,5%. Les champignons-levures (3,7%) et les virus (0,4%) comptaient quant à eux pour une prévalence de patients infectés de respectivement 0,1% et <0,1%.

III) Le risque infectieux environnemental fongique

En ES le risque infectieux fongique peut être défini par la probabilité d'acquérir une infection fongique à l'issue de l'exposition de l'hôte à un champignon. Ce risque dépend du micro-organisme et de sa virulence, de l'inoculum, de l'environnement mais également de

l'état de santé de l'hôte. Lors de l'enquête de prévalence de 2012, les champignons et levures représentaient une prévalence des IN associées de 0,2%. Elles sont la cause directe d'environ 4 000 décès chaque année et entraînent un surcoût financier, essentiellement dû à l'accroissement de la durée des séjours due au vieillissement de la population et des traitements (Menzin *et al.*, 2009). Les champignons du type *Aspergillus* peuvent être responsables d'infections fongiques invasives (AI).

ASPERGILLUS - A.FUMIGATUS

I) Champignons du genre *Aspergillus* - *A.fumigatus*

1) -Historique

Les moisissures du genre *Aspergillus* ont été décrites pour la première fois par Pier Antonio Micheli en 1729 (Micheli, 1729). Le premier cas d'infection à *Aspergillus spp.* chez l'homme a été diagnostiqué en 1791 par le médecin Plaignaud (Baker *et al.*, 2007). C'est en 1926 que Thom et Church ont décrit pour la première fois la diversité des espèces du genre *Aspergillus*. Depuis, plus de 182 espèces ont pu être décrites (Pitt, 1994). Parmi celles-ci, *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) est l'espèce pathogène majoritairement responsable des infections fongiques aspergillaires chez l'Homme et l'animal et a été décrite pour la première fois en 1863 par Fresenius (Smith, 1989) (Fresenius, 1850).

2) -Ecologie

L'espèce *A. fumigatus* appartient à la section *Fumigati* du genre *Aspergillus*, du règne *Fungi*. *A. fumigatus* est un champignon filamenteux saprophyte, ubiquitaire capable de se développer au niveau du sol, des matières organiques en décomposition mais également au niveau de multiples substrats comme les aliments, la poussière, les systèmes d'aération etc (Barrs *et al.*, 2013). Du fait de la petite taille de ses conidies (2 à 3 μm), ses spores diffusent facilement dans l'environnement et peut ainsi être retrouvés dans des endroits très divers tels que l'eau, l'air et différentes surfaces. Ce pathogène possède une grande capacité à sporuler (concentration de 1/100 conidies/m³) dans l'atmosphère (Lacey, 1996) et peut donc être facilement remis en suspension par divers facteurs tels que certains paramètres météorologiques ou la présence de travaux du bâtiment (O'Gorman, 2011).

3) -Cycle de développement

La reproduction d'*A. fumigatus* est complexe reflétant ainsi le caractère hétérogène de ce pathogène. La reproduction peut ainsi être asexuée, sexuée et parasexuée (Figure 5). Ce dernier processus parasexué représenté en violet sur la figure est cependant plus considéré comme une stratégie afin de générer de la diversité génétique qu'un mode de reproduction propre (Verweij *et al.*, 2016). La reproduction asexuée commence par la germination d'une conidie qui va se développer en filament mycélien. Après extension et ramification les filaments mycéliens forment des conidiophores à leurs extrémités donnant ainsi des «têtes aspergillaires» qui produisent et libèrent des milliers de conidies. Le mode para-sexué, très

peu développé chez *A. fumigatus*, commence certainement dans un tas de substrat adéquat comme par exemple de la matière organique en décomposition.

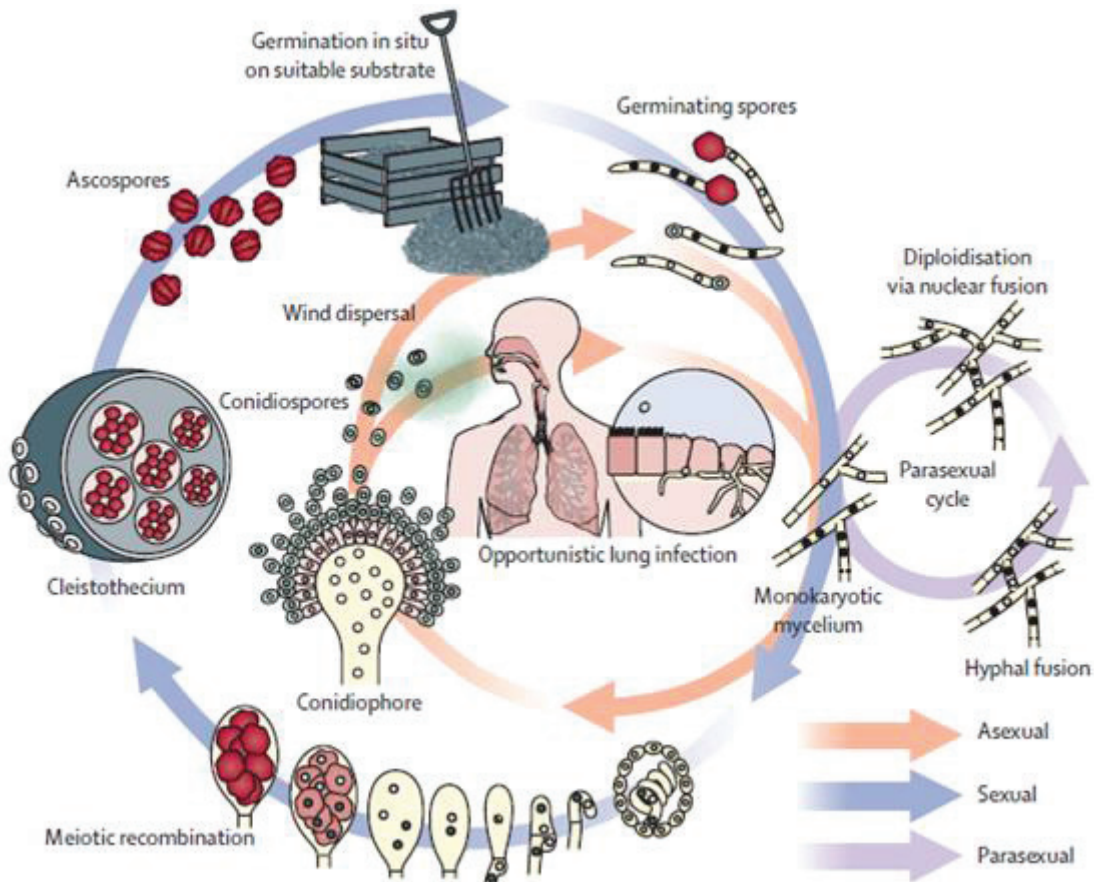


Figure 5. Processus de reproduction et stratégies d'adaptation d'*A. fumigatus*
 Processus parasexuée, (bleu) : reproduction sexuée, (orange) : reproduction asexuée. (Adaptée de: Verweij *et al.*, 2016.)

La reproduction sexuée (bleu Figure 5) d'*A. fumigatus* est dite hétérothallique et requiert 2 souches parentales avec des gènes de type «conjuguant» opposés. Ces derniers déterminent l'identité sexuelle. La reproduction sexuée commence par la germination d'une spore qui génère un mycélium hétérothallique. La fécondation, immédiatement suivie de la méiose se produit entre les gamètes mâles et femelles du mycélium permettant le développement de la structure de fructification appelée cléistothèce. Cet organe reproducteur permet le développement d'asques contenant généralement 8 ascospores. Une fois arrivée à maturité les ascospores sont libérées (O'Gorman *CM*, 2009).

4) -Morphologie:

- **Macroscopique**

Afin d'identifier une colonie d'*A. fumigatus* il faut observer ses caractères phénotypiques tels que la taille, la texture et la couleur. Les colonies d'*A. fumigatus* sont extensives, à croissance rapide sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques (Chloramphenicol) (Figure 6). Après 24 à 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates de 2 à 4 cm, d'aspect gazonné avec une couleur variable au recto (blanc, vert, brun sombre) et une couleur sombre au verso (Schmidt *et al.*, 1997). Les colonies d'*A. fumigatus* ont une croissance optimale à 37°C mais sont capables de survivre à des températures allant de 12°C et 65°C (Jensen, 1931; Boff *et al.*, 2012).

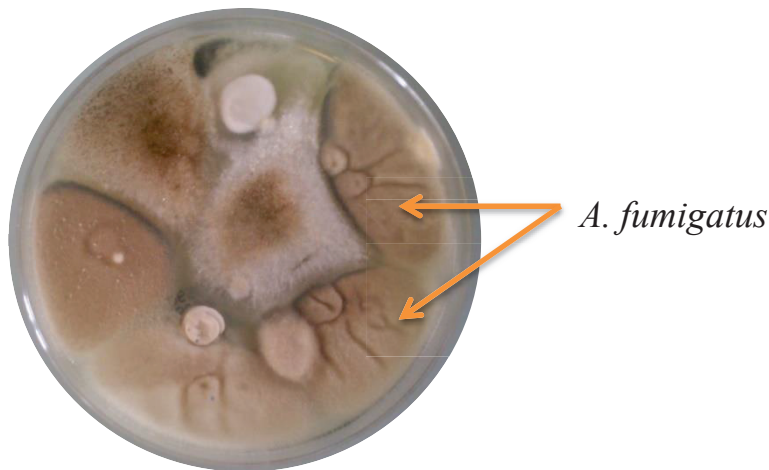


Figure 6. Aspect d'une colonie d'*Aspergillus fumigatus* sur milieu de Sabouraud dextrose chloramphenicol (Photos du laboratoire HEH)

- **Microscopique**

Au microscope, *A. fumigatus* se caractérise par la morphologie de ses conidiophores et conidies. Il possède un conidiophore d'une taille variable (20-30 μm de diamètre), court et lisse en forme de massue (Figure 7). Les phialides sont disposées en colonnes parallèles sur la partie supérieure du conidiophore. Les conidies, souvent produites en chaîne (de 6 à 8) ont un diamètre allant de 2 à 3 μm et une forme globuleuse, échinulée avec une pigmentation gris-vert (Latgé, 1999).

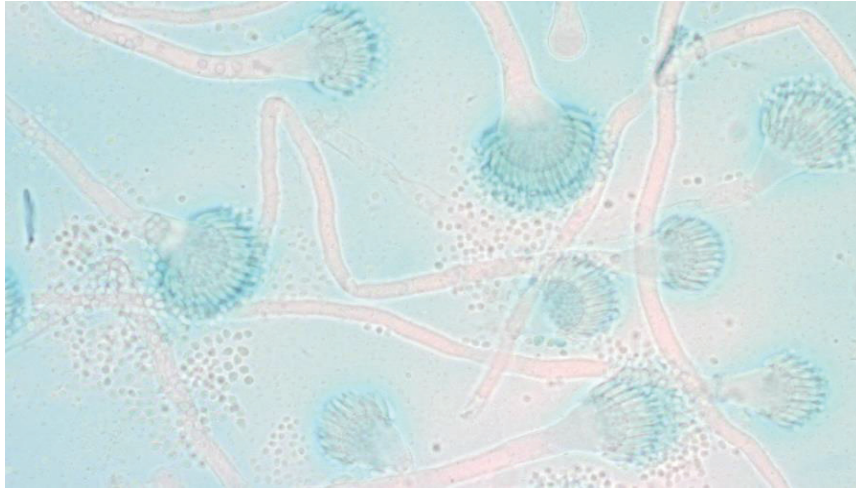


Figure 7. Aspect microscopique des conidiophores et conidies d'*Aspergillus fumigatus*. (Photos du laboratoire, HEH)

5) -Structure du champignon

Aspergillus fumigatus est un champignon filamenteux opportunistique et ubiquitaire. Les conidies d'*A. fumigatus* sont inhalées et entre en interaction avec les cellules épithéliales du tractus respiratoire de l'hôte. Pour coloniser et/ou infecter l'hôte, les conidies doivent être capables d'adhérer à ces cellules épithéliales et d'y pénétrer. La paroi fongique permet d'interagir avec l'hôte et de conserver l'intégrité de la cellule fongique en la protégeant contre les menaces de son environnement. La paroi fongique est majoritairement composée d'un squelette de polysaccharides avec des protéines qui y transitent. Ce squelette polysaccharidique est une structure fibrillaire faite de galactomannanes, de β -1,3-glucanes ramifiés avec des chitines, de β -1,6-glucanes et α -1,3-glucanes mélangés avec des polymères de galactoses et de galactosaminoglycannes (Figure 8).

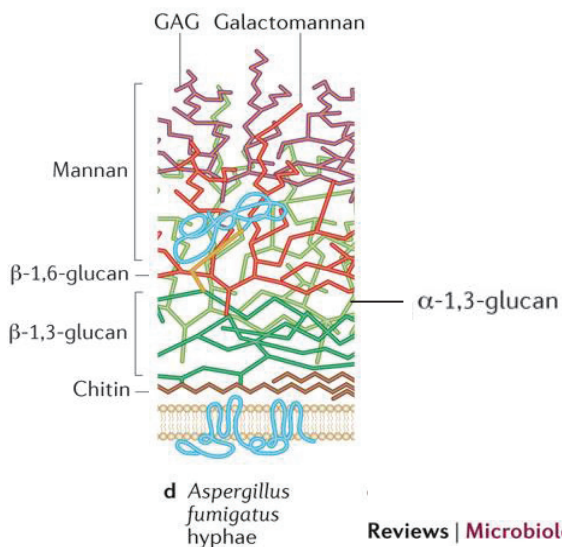


Figure 8. Structure de la paroi fongique d'*A. fumigatus*. (D'après: Erwig, *et al.*, 2016). galactosaminoglycan (GAG)

II) Facteurs de virulence d'*A. fumigatus*

La virulence désigne la capacité d'*A. fumigatus* à se développer dans un organisme et d'y provoquer un état pathologique. De nombreuses études ont ainsi reporté le caractère multifactoriel et complexe de la virulence d'*A. fumigatus* (Abad *et al.*, 2010; Rhodes *et al.*, 2006). Les gènes et molécules associés dans la virulence peuvent être classifiés en fonction de leur implication dans différents processus biologiques comme la biosynthèse de la paroi fongique, la capacité de défense contre le système immunitaire de l'hôte, la croissance et l'adaptation en cas de situation de stress (thermo tolérance, assimilation des nutriments, production de toxines...) (Figure 9 Sugui *et al.*, 2014). Le Tableau 2 présente des exemples non exhaustifs de ces mécanismes de virulence.

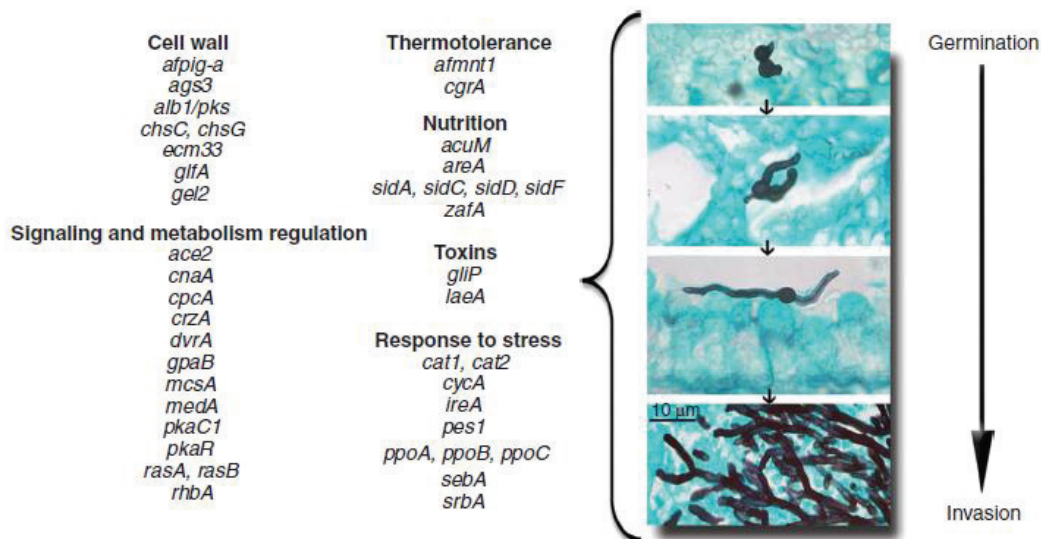


Figure 9. Gènes de virulence chez *A. fumigatus*.
(D'après: Sugui *et al.*, 2014)

Tableau 2. Liste non exhaustive des processus biologiques d'*A. fumigatus* impliqués dans les mécanismes de virulence

PROCESSUS BIOLOGIQUE	MECANISME DE VIRULENCE	EXEMPLES	REFERENCES
Biosynthèse de la paroi fongique la structure polysaccharidique	De nombreux gènes codant pour la biosynthèse de cette paroi fongique empêchent la phase de germination et diminuent la virulence des conidies	Les 3 gènes <i>AGS</i> (<i>AGS1</i> , <i>AGS2</i> et <i>AGS3</i>).	Latgé, 2017 Beauvais <i>et al.</i> , 2013
Les protéines	Rôle de certains composants de la matrice extracellulaire de l'hôte telle que les fibronectines, les laminines, le collagène et les protéoglycane pour permettre l'adhésion avec les conidies. De même, certaines adhésines et hydrophobines des conidies d' <i>A. fumigatus</i> jouent un rôle essentiel dans l'étape d'adhésion avec les cellules de l'hôte empêchant la reconnaissance des conidies par le système immunitaire	L'adhésine AfCalAp est impliquée dans l'adhésion des conidies aux laminines de l'hôte. L'hydrophobine RodA permet l'adhérence des conidies aux collagènes ou laminines de l'hôte. La protéine MedA a montré son rôle dans l'adhérence d' <i>A. fumigatus</i> aux substrats inorganiques ou aux cellules épithéliales du poumon	Upadhyay <i>et al.</i> , 2009 ; Mendes-Giannini <i>et al.</i> , 2006; Croft, 2016 ; Thau, 1994 Gravelat, 2010
Adaptation en situation de stress	<i>A. fumigatus</i> est capable de se développer entre 12-50°C et de survivre au-delà de 60°C. Cette capacité à croître dans des conditions extrêmes lui permet aisément de se développer chez l'Homme à 37°C	Le gène <i>cgrA</i> codant pour la protéine CgrA et le gène <i>afmt1</i> codant pour l'enzyme α -1,2-mannosyltransferases	Dagenais, 2009 ; Bhabhra <i>et al.</i> , 2004 ; Wagener <i>et al.</i> , 2008.
Thermotolérance	Lors de la présence d'un micro-organisme pathogène, l'hôte tente de limiter sa croissance <i>in vivo</i> par réduction de la disponibilité de fer. Ainsi, <i>A. fumigatus</i> est capable de survivre en synthétisant des sidérophores (Figure). Le zinc est également un micronutriment essentiel pour la croissance d' <i>A. fumigatus</i> qui doit lors de l'invasion d'un hôte, le capter dans les tissus envahis	Le gène <i>sidA</i> qui code pour la L-ornithine N ⁵ -oxygénase est associé aux étapes de biosynthèse de sidérophore. Les transporteurs de zinc (ZrfA, ZrfB et ZrfC) lui permettent de capter du zinc des tissus de l'hôte dans des conditions extrêmes	Hissen <i>et al.</i> , 2005; Amich <i>et al.</i> , 2014
Nutrition			
Réponse en situation de stress et adaptation métabolique	<i>A. fumigatus</i> est capable de s'adapter à des conditions extrêmes, des changements d'environnement mais également des situations de stress comme l'hypoxie localisée au niveau site de l'infection déclenché par le système immunitaire	Protéine SrbA associée à la survie d' <i>A. fumigatus</i> en condition d'hypoxie par la régulation de la biosynthèse d'ergosterol, l'assimilation du fer et des nitrates. L'induction du gène <i>rhbA</i> permet la survie lors de la privation de nitrogène	Willger <i>et al.</i> , 2008 ; Chung <i>et al.</i> , 2014; Abad <i>et al.</i> , 2010

PROCESSUS BIOLOGIQUE	MECANISME DE VIRULENCE	EXEMPLES	REFERENCES
<p>Défense contre le système immunitaire</p>	<p>Les conidies d'<i>A. fumigatus</i> sont capables d'inhiber l'apoptose induite par les cellules respiratoires de l'hôte et peuvent également résister aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) de l'hôte par le biais de certaines hydrophobines présentes à leur surface</p>	<p>La pigmentation verte des conidies d'<i>A. fumigatus</i> adhère à la paroi de la conidie et permet lors du contact avec le système immunitaire de l'hôte de protéger les conidies contre les ROS</p>	<p>Berkova <i>et al.</i>, 2006 ; Heinekamp <i>et al.</i>, 2013; Latgé, 1999</p>
<p>Toxines libérées</p>	<p><i>A. fumigatus</i> est capable, lors de la croissance des hyphes de sécréter diverses mycotoxines tel que la gliotoxine (molécule immunosuppressive et cytotoxique), l'acide helvolic ou la fumagilline (facteur anti tumoral).</p>	<p>La gliotoxine joue plusieurs rôles dont les principaux sont l'inhibition de la phagocytose par les macrophages et induit l'apoptose de ces dernières, l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T mais aussi de la NADPH oxydase altérant ainsi la formation des polynucléaires neutrophiles</p>	<p>Scharf <i>et al.</i>, 2016</p>
		<p>L'acide helvolic et la fumigalline inhibent principalement la stimulation oxydative des macrophages et entraînent la lyse des cellules épithéliales</p>	<p>Rementeria <i>et al.</i>, 2005 ; Mitchell <i>et al.</i>, 1997</p>
		<p>La fumigalline a des propriétés anti-angiogénique qui inhibe la prolifération des cellules endothéliales et empêche la mobilité ciliaire des cellules de l'épithélium respiratoire chez l'Homme</p>	<p>Bunger <i>et al.</i>, 2004</p>

ASPERGILLOSE INVASIVE

I) Pathologie

1) -Epidémiologie

Plusieurs voies d'entrées des spores d'*A. fumigatus* ont été décrites comme responsables d'Aspergillose Invasive (AI): les poumons, le tractus gastro-intestinal et la peau. La voie pulmonaire est la porte d'entrée principale des spores d'*A. fumigatus* responsable ainsi d'aspergilloses de l'appareil respiratoire (Brahm, 2009). Plusieurs pathologies peuvent être causées par *A. fumigatus* en fonction du statut immunitaire et anatomique de l'hôte mais également de l'environnement l'entourant (Figure 10) (Denning *et al.*, 2014). Parmi ces pathologies, l'aspergillose pulmonaire invasive (API) est la forme clinique la plus sévère avec une létalité allant de 50 à 90% (Nicole *et al.*, 2011). Durant les dernières décennies la population à risque de développer une AI a augmentée. *Aspergillus* est responsable d'environ 200 000 AI par an dans le monde (Denning *et al.*, 2011b; Denning *et al.*, 2013). Malgré traitement, le taux de mortalité des AI reste élevé : 28,5% (Bitar *et al.*, 2014).

Les populations à risque de développer une AI sont les patients ayant de longues périodes de neutropénie, qui peut être secondaires à une chimiothérapie, une granulomatose septique chronique, ou encore des patients ayant subi une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ou une transplantation d'organes solides (Balloy *et al.*, 2005) (Tableau 3). Les principaux facteurs de risques de l'AI sont associés au degré et à la durée des périodes de neutropénie (Gregg *et al.*, 2015). Mais la population à risque de développer une AI a évolué, du fait de l'augmentation de l'âge de la population et de sa fragilité au cours du temps (pathologies sous-jacentes) entraînant l'apparition d'AI chez des patients non neutropéniques (Kosmidis *et al.*, 2014; Meersseman *et al.*, 2004). Ainsi, plusieurs études ont mis en avant l'apparition d'AI chez des patients sans facteurs de risques classiques, hospitalisés en unité de soins intensifs traités au long cours par corticothérapie ou ayant des pathologies sous-jacentes telles qu'une maladie pulmonaire chronique obstructive ou une cirrhose hépatique (Vandewoude *et al.*, 2006, Meersseman *et al.*, 2007).

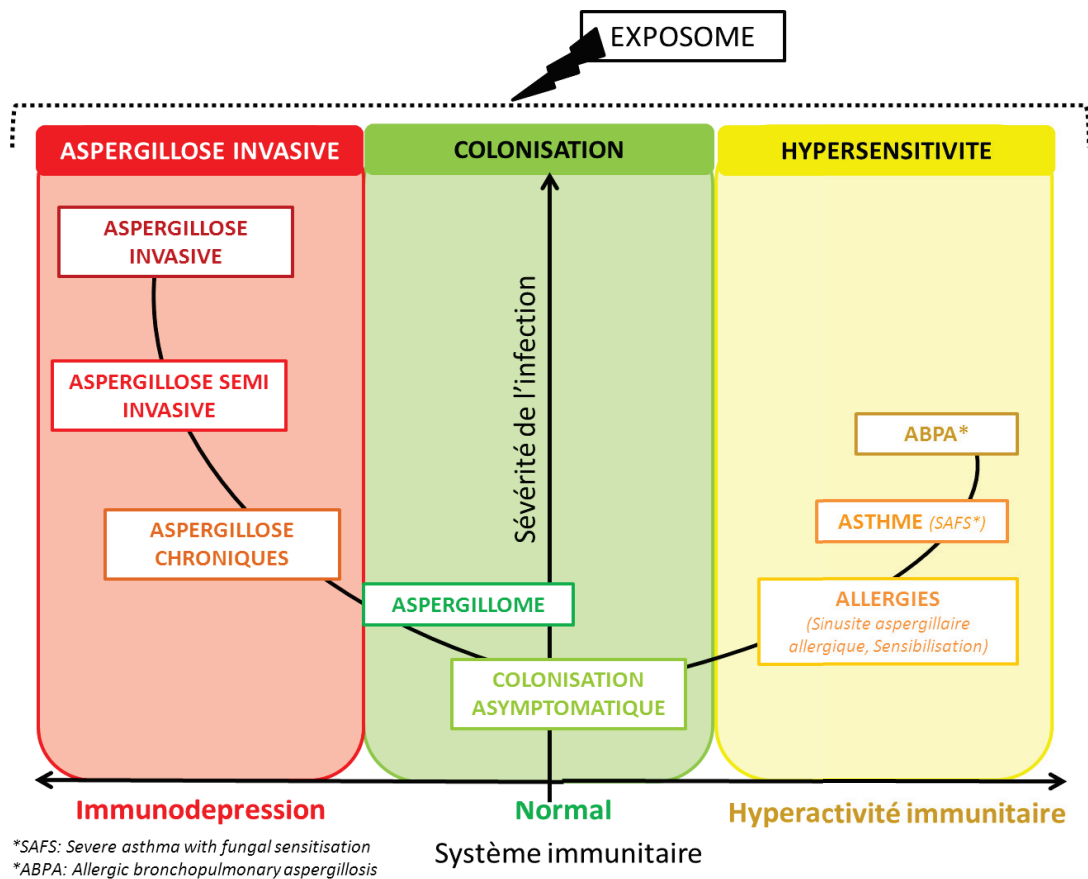


Figure 10. Diagramme représentant la sévérité des principales pathologies aspergillaires en fonction du statut immunitaire de l'hôte.
(Adaptée de Denning *et al.*, 2014 ; Pirofski *et al.*, 2008)

2) -Symptômes et manifestations cliniques

Les manifestations cliniques de l'AI sont larges et peuvent être présentes au niveau de différents scénarios cliniques (Hope *et al.*, 2005, Herbrecht *et al.*, 2002). L'aspergillose pulmonaire invasive réalise un tableau de pneumopathie aiguë infectieuse, souvent bilatérale et résistante aux antibiotiques. Elle est suspectée devant la persistance de la fièvre parfois accompagnée de signes respiratoires tels que les douleurs thoraciques localisées ou diffuses, de toux sèche et d'hémoptysie (Fridkin *et al.*, 1996).

II) Diagnostic

Le diagnostic complet de l'infection aspergillaire repose sur des critères biologiques, cliniques et d'imagerie. Il reste, de nos jours, difficile à établir du fait du caractère ubiquitaire de ce pathogène pouvant ainsi aisément contaminer les prélèvements et rendre leur interprétation compliquée. Mais également, à cause de la faible spécificité des tests et méthodes diagnostiques disponibles.

L'origine et le type de prélèvements testés jouent également un rôle important dans l'établissement de ce diagnostic. En effet, l'isolement d'*A. fumigatus* de produits biologiques collectés au niveau de sites stériles tels que les biopsies d'organes, le liquide céphalo-rachidien ou d'autres sites profonds comme par exemple le liquide de lavage bronchio-alvéolaire permettent une meilleure qualité d'investigation.

Tableau 3. Classification du risque aspergillaire pour chaque catégorie de patient et facteurs prédisposants à une AI
(Adapté de Gianella. *et al.*, 2014 ; Recommandations Hygiènes 2016)

NIVEAU DE RISQUE ASPERGILLAIRE	POPULATION A RISQUE	CARACTERISTIQUES DES PATIENTS	FACTEURS PREDISPOSANT
ELEVE	Patient d'hématologie	Maladie hématologique (<i>LAM-SMD allogreffe de CSH avec GVH</i>)*	
	Patient greffé d'organe solide	Greffé pulmonaire ou cardiaque	
	Patient d'oncologie	Neutropénie	
	Autre patients	Déficit immunitaire*	
INTERMEDIAIRE	Patient d'hématologie	Maladie hématologique (<i>LAM-SMD allogreffe de CSH avec GVH</i>)** Consolidation de LAM ou SMD Allogreffe de CSH (<i>sans GVH ou sans corticothérapie forte dose</i>)	-Neutropénie prolongée (>10 jours) -Neutropénie <500PNN -Lymphopénie absolue (<100/ μ l) -Lymphopénie fonctionnelle -Corticothérapie ($\geq 0.3\text{mg/kg/j}$) au long cours (>3 semaines)
	Patient greffé d'organe solide	Greffé foie, rein, pancréas, intestin (<i>si complication postopératoire ou séjour prolongé en réanimation</i>)	<u>Nouvelle épidémiologie de l'API:</u> -Stéroïdes -Antibiothérapie à large spectre -Insuffisance rénale ou hépatique -Malnutrition -Comorbidités oncologiques (<i>autres qu'hématologiques</i>) -Diabète
	Autre patients	Déficit immunitaire**	
	Patient d'hématologie	Autogreffes de CSH	
FAIBLE	Patient greffé d'organe solide	Greffé foie, rein, pancréas, intestin (<i>sans complication postopératoire ou séjour prolongé en réanimation</i>)	
	Patient de réanimation	Dépend/ se référer au risque de la pathologie sous-jacente	
	Autre patients	Pathologies pulmonaires chroniques Infection VIH (CD4<200mm ³) Anticorps monoclonaux, biothérapies Corticothérapie à durée prolongée	

GVH: Greffon contre l'hôte

LAM: Leucémie aiguë myéloïde

PNN: Polynucléaires neutrophiles

SMD: Syndrome myélodysplasique

CSH: cellules souches hématopoïétiques

* en l'absence de prophylaxie antifongique

** en présence d'une prophylaxie antifongique

D'autres prélèvements collectés au niveau de sites anatomiques exposés à la contamination tel que la peau ou la partie respiratoire supérieure (sinus...) nécessitent une grande prudence dans leur interprétation. C'est pourquoi, le diagnostic précis des infections aspergillaires nécessite la combinaison de plusieurs examens et techniques actuellement disponibles en laboratoire afin d'éliminer toute contamination ou portage sans signification pathologique. Ces techniques présentent chacune des avantages et inconvénients en fonction du type d'échantillon collecté et de la population étudiée (Tableau 4).

1) -Diagnostic –Classification des AI

Le diagnostic des AI est basé sur des critères standardisés cliniques et épidémiologiques élaborés par un groupe de travail international composé de membres de l'EORTC (European Organization for research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infections Cooperative Group) et du MSG (National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses). Ces critères ont été publiés pour la première fois en 2002 puis réévalués en 2009 (Ascioglu *et al.*, 2002, De PauW *et al.*, 2008). Les AI sont ainsi classées en 3 groupes : prouvée, probable et possible. Une AI prouvée se manifeste par la présence d'élément fongique dans un prélèvement histologique d'une lésion tissulaire ou une culture positive issue d'un site stérile associée avec des anomalies cliniques et radiologiques évoquant une infection. Une AI probable se caractérise par la présence d'un facteur de risque lié à l'hôte accompagné de critères cliniques évocateurs d'une infection fongique ainsi que d'un critère mycologique. L'AI possible est caractérisée quant à elle par la présence d'au moins un facteur de risque lié à l'hôte et d'un critère microbiologique ou un critère clinique évocateur. Cette classification prend ainsi en compte des critères d'hôtes, cliniques, radiologiques et des critères biologiques.

2) -Critères cliniques

Lors d'une suspicion d'AI (le plus fréquemment API) chez un patient, l'imagerie permet de mettre en évidence certains aspects évocateurs de la maladie. La radiographie standard n'a aucun caractère discriminant hormis le développement d'une cavitation/condensation pulmonaire mais qui reste non systématisée. La tomодensitométrie thoracique (TDM) aussi appelée scanner thoracique est plus sensible et permet d'identifier des aspects évocateurs tels que le « signe du halo » et le « signe du croissant gazeux » (Sherif *et al.*, 2010 ; Nucci *et al.*, 2013). Ces derniers sont des signes évocateurs mais non spécifiques. Le « signe du halo » est une manifestation radiologique précoce (0-5 jours) transitoire, correspondant à un macronodule entouré d'une aire en verre dépoli due à une zone

hémorragique périphérique (Marchiori, *et al.*, 2012). L'autre signe, plus tardif (10-20 jours), dû à la rétraction du poumon nécrotique correspond à une image de densité aérique en forme de croissant en périphérie d'une condensation ou d'un nodule (Caillot, *et al.*, 2001).

3) -Critères mycologiques

Le diagnostic de l'AI est également évalué par des méthodes d'examen directes et indirectes de l'échantillon biologique approprié (Tableau 4).

-Examen direct

L'examen direct est réalisé par observation microscopique entre lame et lamelle du prélèvement. Les prélèvements peuvent être d'origine respiratoire comme le LBA, les crachats mais aussi provenir d'autres sites comme des prélèvements cutanés etc. Cet examen permet de détecter *A. fumigatus* directement au niveau des échantillons. L'aspect phénotypique/macrosopique du champignon (mise en culture) est également important pour mettre en évidence la contamination de sites stériles. L'identification est réalisée, après culture sur milieu spécifique, par examination des critères morphologiques des colonies (couleur, aspect, taille...). La culture et la microscopie restent des méthodes diagnostic d'API peu spécifiques avec une sensibilité d'approximativement 50% (Desoubeaux *et al.*, 2014).

-Examen indirect

Cette sensibilité d'identification est augmentée (~80-90%) avec les méthodes de diagnostic indirectes correspondant à la recherche d'antigènes spécifiques.

Le galactomannane (GM) est un polysaccharide de la paroi aspergillaire libéré dans la circulation sanguine de l'hôte au cours de la croissance du champignon, après passage de la barrière endothéliale correspondant à l'étape d'invasion du compartiment vasculaire par le champignon. Le GM est dosé dans le sérum, le LBA et le LCR à l'aide d'un test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). L'antigénémie GM fait partie des critères diagnostics EORTC (De Pauw *et al.*, 2008). Cependant, la sensibilité et sensibilité de ce test varie selon les études, en fonction du seuil de positivité choisi (Pfeiffer *et al.*, 2006 ; Zou *et al.*, 2012). De même, les performances diagnostiques dépendent d'une part du type de prélèvement testé et d'autre part, de la population étudiée.

Tableau 4. Résumé des principaux avantages et inconvénients des techniques diagnostics de l'AI utilisées en laboratoire

CRITERE DIAGNOSTIC	METHODE	AVANTAGE	INCONVENIENT
CRITERE CLINIQUE	Radiographie	Technique peu coûteuse	Peu spécifique
	Tomodensitométrie thoracique	Aspects évocateurs Permet de suivre l'évolution des lésions	Spécificité variable en fonction des facteurs hôtes
CRITERE MYCOLOGIQUE	EXAMEN DIRECT	Permet l'identification de l'espèce	Peu sensible
		Technique peu coûteuse Permet de réaliser d'autres tests (antifongogramme) à partir de la culture	Incubation longue-délai long Contaminations possibles-difficulté d'interprétation
	Antigènes GM	Technique rapide Apport pronostic	Problème de sensibilité (population étudiée / type échantillons..) Faux positifs
	EXAMEN INDIRECT	Sérologie β -D-glucane	Technique rapide Longtemps détectable dans le sérum
PCR		Spécifique d' <i>Aspergillus</i> ADN <i>Aspergillus</i> est stable dans le sérum Possibilité d'utiliser le même échantillon pour différentes méthodes indirectes (GM)	Hétérogénéité dans les techniques de PCR et cibles Pas apport pronostic Faux positifs (contamination laboratoire)
CRITERE HISTOLOGIQUE	EXAMEN HISTOLOGIQUE	Met en évidence une infection d'échantillons provenant d'un site stérile Technique peu coûteuse et rapide	Pas spécifique <i>Aspergillus</i> (pas identification genre et espèce) Difficulté d'obtenir certaines biopsies

D'autres tests, non inclus dans les critères diagnostics de l'API existent tels que la détection de β -D-glucane ou la PCR. Le β -D-glucane est également un polysaccharide de la paroi fongique mais n'est pas spécifique des *Aspergillus*. Ainsi, ce test sérologique permet de détecter une infection fongique invasive sans différencier si l'infection est causée par une levure, *Pneumocystis* ou un champignon filamenteux.

La détection d'ADN fongique dans le LBA et sérum est aussi réalisée par PCR spécifiques. L'ADN d'*Aspergillus* est libéré dans le sérum durant la phase de croissance ou durant une période de lyse fongique (Morton CO, et al 2010). Plusieurs études ont évalué les performances diagnostiques d'AI (Mengoli *et al.*, 2009 ; Million *et al.*, 2005). L'apport de la PCR dans le diagnostic de l'AI n'est pas standardisé et de ce fait, reste très hétérogène au niveau des résultats, variant également selon le type d'échantillon analysé (Tableau 4).

4) -Critères histologiques

L'examen histologique consiste en l'analyse microscopique d'une biopsie tissulaire. Il fait partie des critères diagnostics (EORTC) pour l'AI en permettant l'identification de filaments aspergillaires et la mise en évidence d'une infection si l'échantillon analysé provient d'un site stérile. Cependant, ce test reste non spécifique car il ne permet pas d'identification précise du genre et de l'espèce (Tableau 4).

III) **Apport des techniques de génotypage**

Plusieurs techniques de génotypage d'*A. fumigatus* existent. Les principales méthodes décrites pour étudier la diversité génétique d'*A. fumigatus* sont représentées sur la Figure 11 :

- Random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Guarro *et al.*, 2005; Raclasky, *et al.*, 2006)
- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Denning *et al.*, 1990; Lasker, 2002 ; Semighini *et al.*, 2001)
- Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Warris. *et al.*, 2003)
- Microsatellites ou Short Tandem Repeats (STR's) (de Valk *et al.*, 2005; Balajee *et al.*, 2008)
- Multilocus Sequence Typing (MLST) (Guinea *et al.*, 2011; Bain *et al.*, 2007)

Depuis l'accès à la séquence entière du génome d'*A. fumigatus* de nombreuses techniques basées sur de nouvelles cibles comme par exemple les protéines de surfaces sont à l'épreuve afin d'essayer de combiner tous les aspects: une forte reproductibilité, un fort

pouvoir discriminant et surtout une technique peu chère et facile à mettre en place (Nierman, *et al.*, 2005 ; Garcia-Rubio *et al.*, 2016). Récemment des méthodes de génotypage étudiant le nombre de répétitions après amplification par PCR de séquences d'ADN de gènes codant pour des protéines de surfaces se sont également développées. On retrouve ainsi la méthode Cell surface protein typing (CSPT) qui étudie la protéine de surface Afu3g08990 (Gao *et al.*, 2013; Balajee *et al.*, 2007) et la méthode Tandem Repeats located within Exons of Surface Protein (TRESP) basée sur les exons de protéines de surface: protéine A, protéine antigène galactomannane MP-2 et une protéine hypothétique comportant un domaine CFEM (domaine comprenant 8 cystéines) (Garcia-Rubio *et al.*, 2016). Ces techniques sont à ce jour, toujours en développement.

Plusieurs études ont déjà comparé les différentes méthodes de génotypage entres elles (de Valk *et al.*, 2007, Vanhee *et al.*, 2009). Les résultats montrent que les méthodes RAPD, AFL et RFLP ont une mauvaise reproductibilité et portabilité inter-laboratoires. La MLST montre une meilleure reproductibilité mais est quant a elle peu discriminante. Au final, actuellement les méthodes utilisant des Short Tandem repeat (ST) semblent être les méthodes de référence. La technique Multiple Locus Variable-Number Tandem-Repeats (MLVA) est basée sur l'étude de séquences répétées (6 à 100 pb) en tandem et dénommées VNTR (Variable Number Tandem Repeat). Cette méthode a montré un fort pouvoir discriminant et une bonne reproductibilité (Thierry *et al.*, 2010).

Le typage des isolats d'*A. fumigatus* est également un outil épidémiologique essentiel pour l'investigation des épidémies d'AI en milieu hospitalier. Il permet de prouver un lien entre des isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus* (Guinea *et al.*, 2011).

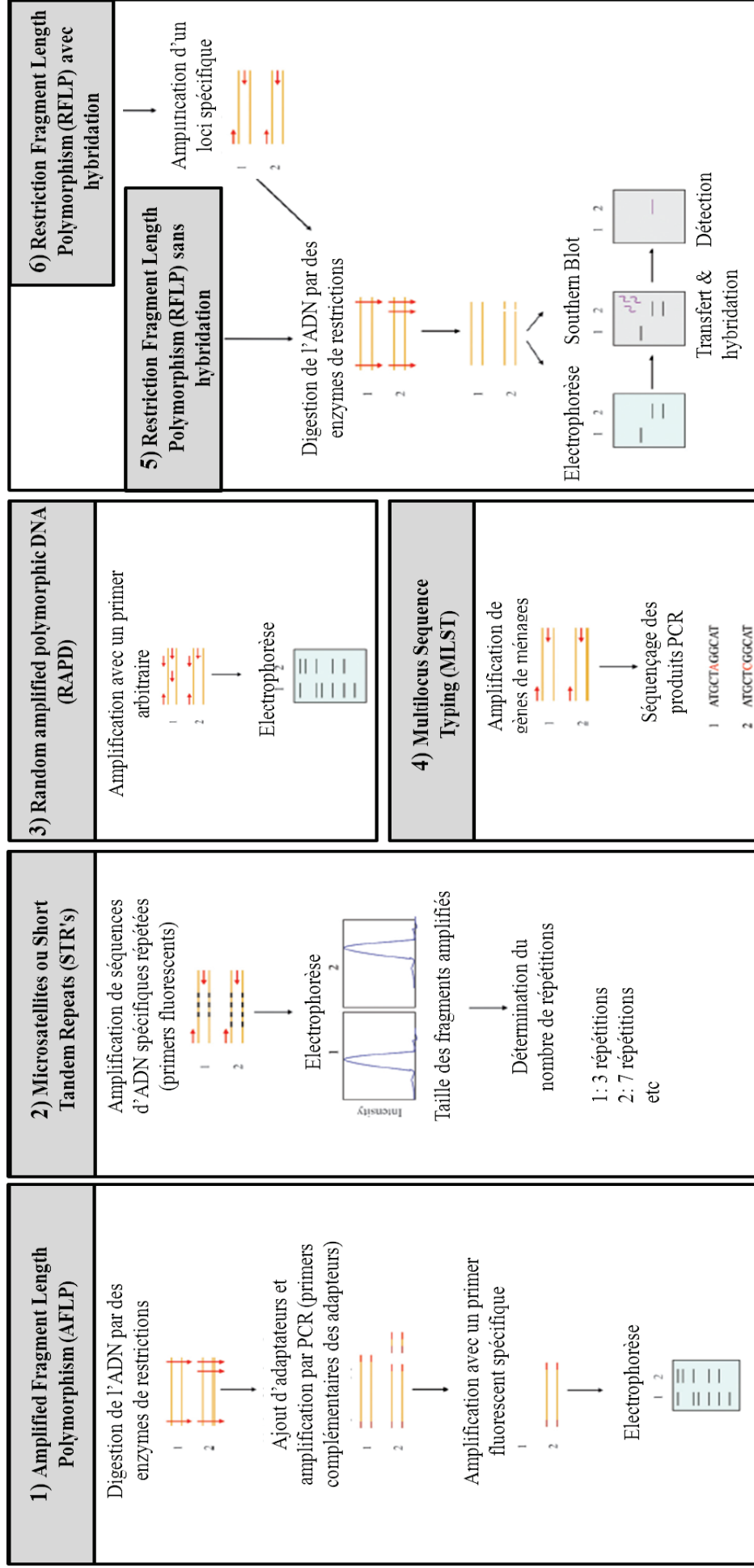


Figure 11. Schéma des principales méthodes de génotypages décrites pour l'investigation de la diversité génétique d'*A. fumigatus* (liste non exhaustive) (Adaptée de Vanhee *et al.*, 2010)

TRAITEMENT DE L'ASPERGILLOSE INVASIVE

I) Les antifongiques

1) -Historique

Les antifongiques sont des agents responsables de la destruction ou de l'inhibition des champignons (Jampilek, 2016). Introduit dans les années 1950, l'amphotéricine B (AMB) a longtemps été considérée comme un traitement de référence contre les infections fongiques invasives. Puis dans les années 1970, la fluocytosine a été introduite, mais son émergence a été rapidement limitée par sa toxicité, son spectre d'activité limité et le développement fréquent de résistance lors de son utilisation en monothérapie. Il a laissé place aux premières générations d'antifongiques azolés dans les années 1990. La seconde génération d'antifongique azolés est apparue dans les années 2000 (Nett *et al.*, 2015). Durant cette même période, les antifongiques de type échinocandines, présentant peu d'interactions médicamenteuses et un bon profil de tolérance trouvent alors une place dans l'arsenal thérapeutique (Pilmis *et al.*, 2013). Dès les années 1990, les antifongiques triazolés par voie systémique sont devenus le premier choix de traitement dans le management et la prophylaxie des infections fongiques invasives.

L'arsenal thérapeutique actuel du traitement systémique d'AI comporte les polyènes, les azolés, les échinocandines et les pyrimidines.

2) -Les polyènes

L'AMB est un antifongique de la famille des polyènes macrocycliques extrait de *Streptomyces nodosus*. Ce sont des molécules organiques amphotères qui possèdent une grande affinité pour les stérols. Ils se fixent sur des stérols de la membrane cellulaire fongique, la rendant perméable et provoquant ainsi sa lyse par déplétion en potassium et entrée de sodium (Valiante *et al.*, 2015) (Figure 12 A). Bien que son spectre d'action soit large, son administration s'accompagne d'effets indésirables et de toxicité parfois importants.

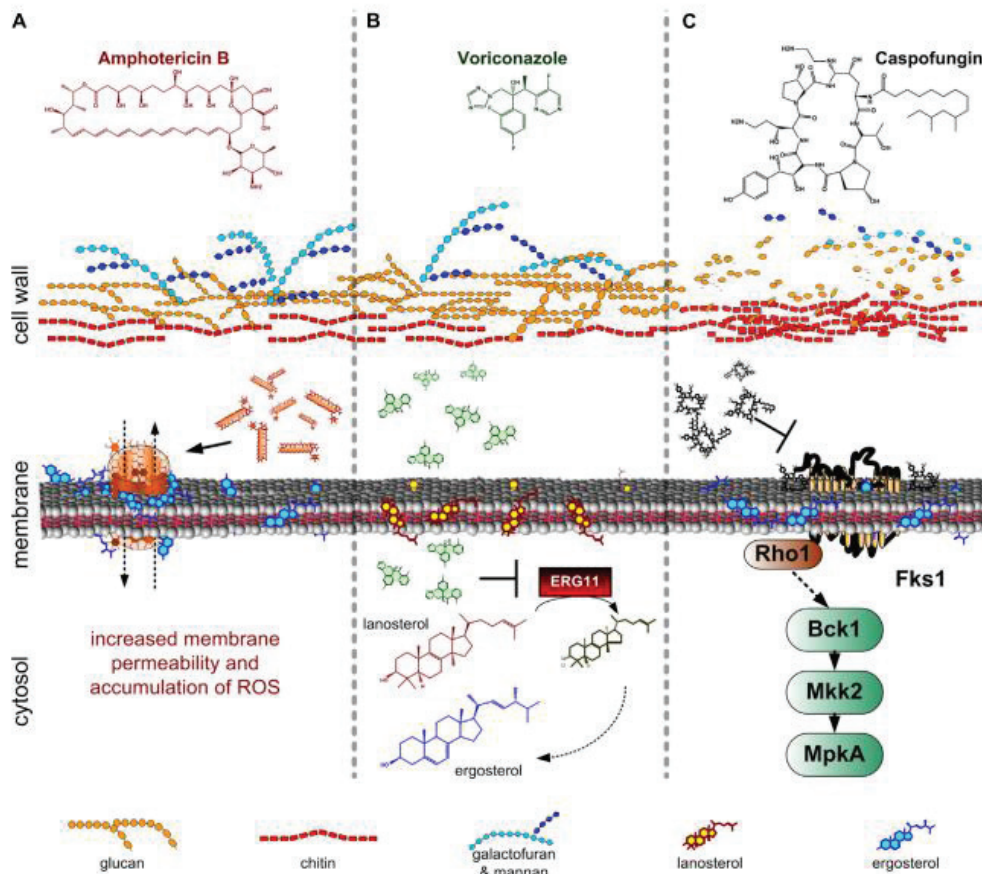


Figure 12. Représentation schématique des cibles des antifongiques (A) AMB, (B) voriconazole (VCZ) et (C) caspofungine. (Adaptée de : Valiante *et al.*, 2015)

3) -Les pyrimidines

La Fluocytosine ou 5-fluorocytosine est une base analogue de la cytosine, une base nucléique pyrimidine dont l'activité repose sur ses métabolites. Cet antifongique synthétique pénètre dans la cellule fongique par l'intermédiaire de transporteurs transmembranaires (cytosines perméases ou des transporteurs pyrimidines...) puis est métabolisé et permet soit d'inhiber la synthèse cellulaire d'ADN par son action sur la thymidilate synthétase, soit le blocage de la synthèse protéique par son intégration à l'ARN (Vermes *et al.*, 2000). La résistance intrinsèque à la fluocytosine existe chez certains champignons (surtout *Candida* et *Cryptococcus*) mais reste faible chez *Aspergillus*. Cependant, la résistance acquise secondairement à un traitement par la fluocytosine se développe de manière très rapide forçant les cliniciens à utiliser cet antifongique en combinaison avec d'autres antifongiques, en particulier avec l'AMB (Hospenthal *et al.*, 1998; Kanafani *et al.*, 2008).

4) -Les antifongiques azolés

Depuis des années 1990, les antifongiques azolés sont de loin les plus utilisés en clinique. Il existe deux catégories d'antifongiques azolés les imidazolés et les triazolés. Ces antifongiques ont pour cible un constituant de la membrane cellulaire fongique : l'ergostérol synthétisé par le lanostérol par le biais de l'enzyme 14-alpha déméthylase (ERG11). Cette enzyme est codée par le gène *CYP51A*. L'accumulation de lanostérol et le manque d'ergostérol dans la cellule aboutit à une forte toxicité et conduit à la lyse de la cellule (Figure 12 B).

Les antifongiques imidazolés sont peu utilisés en thérapeutique pour le traitement des infections invasives du fait de leur spectre d'activité large mais aussi du fait de leur toxicité et interactions médicamenteuses consécutives importantes. Les premiers triazolés qui ont fait leur apparition sont des azolés de première génération : le Fluconazole et l'Itraconazole (ITZ) ; ce dernier a été le premier antifongique par voie orale administré dans le traitement des AI et reste encore aujourd'hui communément utilisé pour le traitement des aspergilloses chroniques et non-invasives (Denning *et al.*, 1989 ; Walsh *et al.*, 2008). Puis, les azolés de seconde génération présentant un spectre d'activité plus étendu et une activité accrue ont été introduit : le Voriconazole (VCZ) et le Posaconazole. Le VCZ constitue la première ligne de traitement des AI (Siopi M *et al.*, 2015). Le posaconazole est quant à lui utilisé en association avec d'autres antifongiques comme les échinocandines ou comme traitement prophylactique chez des patients à risque. Des triazolés sont en voie de développement, dont l'utilisation en thérapeutique émerge comme l'isavuconazole.

5) -Echinocandines

Les échinocandines constitués par l'Anidulafungine, la Caspofungine et la Micafungine. Ceux sont des antifongiques lipopeptidiques cycliques semi-synthétiques produits par la fermentation de champignons (Pilmis *et al.*, 2013). La cible de ces antifongiques est le système enzymatique (appelé β -(1,3)-D-glucane synthase) impliqué dans la synthèse de la paroi fongique. Elle agit sur l'intégralité de la paroi cellulaire et provoque par inhibition non compétitive un déséquilibre osmotique conduisant à la lyse de la cellule (Lacroix *et al.*, 2003) (Figure 12 C). Les échinocandines sont bien tolérés en thérapeutique et présentent peu d'interférence avec d'autres médicaments permettant ainsi leur association avec d'autres antifongiques (Walsh *et al.*, 2008). Ainsi, plusieurs études ont montré l'effet synergique dans le traitement des infections fongiques invasives des échinocandines en association avec l'AMB ou des azolés (Aliff *et al.*, 2003), (Siopi *et al.*, 2016).

PHENOMENES DE RESISTANCE AUX ANTIFONGIQUES AZOLES

I) Historique

Les premiers isolats d'*A.fumigatus* résistants aux azolés ont été trouvés dans les années 1980 aux Etats Unis (Denning *et al.*, 1997). Dès la publication de ces résultats en 1997, d'autres études dans le monde ont détecté des isolats résistants et ce nombre ne cesse d'augmenter encore à l'heure actuelle. Il a été montré que la résistance aux azolés des isolats d'*A. fumigatus* peut se développer secondairement, chez des patients atteints d'aspergillose, (le plus souvent aspergillose chronique) traités au long cours par des azolés (Hagiwara *et al.*, 2014 ; Howard *et al.*, 2009). Cependant, certains champignons *Aspergillus* de la section *Fumigati* présentent des résistances primaires, intrinsèques aux azolés (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008). Depuis quelques années, plusieurs mécanismes de résistance aux azolés ont pu être décrits, (Chowdhary *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2016) dont le mécanisme le plus fréquemment retrouvé qui implique des mutations sur le gène *CYP51A* codant pour l'enzyme 14- α -déméthylase, cible des azolés. Ces mutations ont également été retrouvées au niveau de souches d'*A. fumigatus* de patients n'ayant jamais subi de traitement antifongiques. Or, de nombreux fongicides utilisés en agriculture sont portés responsables d'une possible acquisition de la résistance par la pression exercée par ces derniers dans l'environnement (Snelders *et al.*, 2012). Globalement, plusieurs mécanismes de résistances aux antifongiques ont été décrit : la réduction de l'affinité de la protéine cible avec l'antifongique, la surexpression de la protéine cible, la diminution de la concentration de l'antifongique par activité accrue des pompes d'efflux ou encore la dégradation de l'antifongique par des voies de détournements ou dégradation non connues (Figure 13).

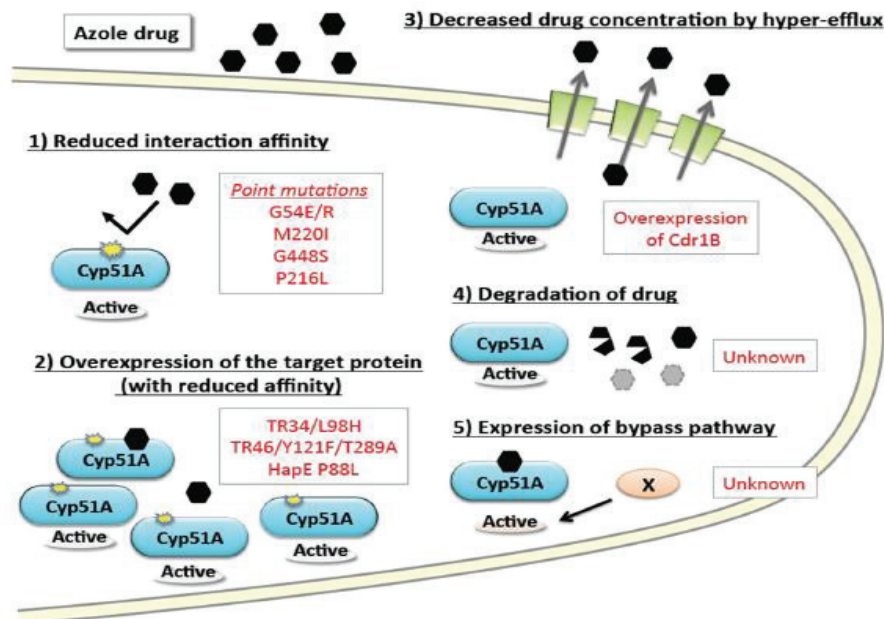


Figure 13. Mécanismes de résistance généraux ainsi que leur correspondance pour la résistance aux azolés chez *A. fumigatus*. (Adaptée de : Hagiwara *et al.*, 2016)

II) Les mécanismes de résistance

1) -Les mutations de la protéine Cyp51A

Le principal mécanisme responsable de la résistance aux azolés est lié à une variété de mutations du gène *CYP51A*. Plusieurs substitutions d'un seul acide aminé au niveau de la séquence de la protéine Cyp51A ont été rapportées (Figure 14) (Camps *et al.*, 2012 ; Hagiwara *et al.*, 2016 ; Rivero-Menendez *et al.*, 2016). Le lien entre résistance aux antifongiques et la localisation de la mutation a pu être établi principalement pour 3 mutations: G54, M220, G138 et G448 (Figure 14). Les mutations associées à la glycine en position 54 sont liées à une résistance croisée à l'ITZ et au posaconazole (Diaz-Guerra, *et al.*, 2003). Des profils variables de réduction de la sensibilité aux triazolés ont été reportés pour la méthionine en position 220 (Mellado *et al.*, 2004) (Krishnan-Natesan *et al.*, 2012). Une résistance simultanée à l'ITZ et au VCZ ainsi qu'une résistance au VCZ associée à une diminution de la sensibilité à l'ITZ et au posaconazole ont été observés pour les mutations, respectivement aux niveaux de la glycine 138 et la glycine en position 448 (Howard *et al.*, 2006 ; Pelaez *et al.*, 2012). D'autres mutations au niveau des codons de la protéine Cyp51A, moins fréquentes, ont été isolées chez des souches d'*Aspergillus* résistantes dont voici les principales : Y121, Y431, P216, F219, A284, G432, G434 (Lescar *et al.*, 2014 ; Albarrag *et al.*, 2011, Cowen *et al.*, 2015). Afin d'identifier le rôle précis de chacun de ces acides aminés dans la résistance aux azolés, différentes études sont encore nécessaires. L'ensemble de ces

mutations décrites au niveau de la protéine Cyp51A ont été principalement identifiées chez des isolats de patients sous thérapie au long cours aux azolés.

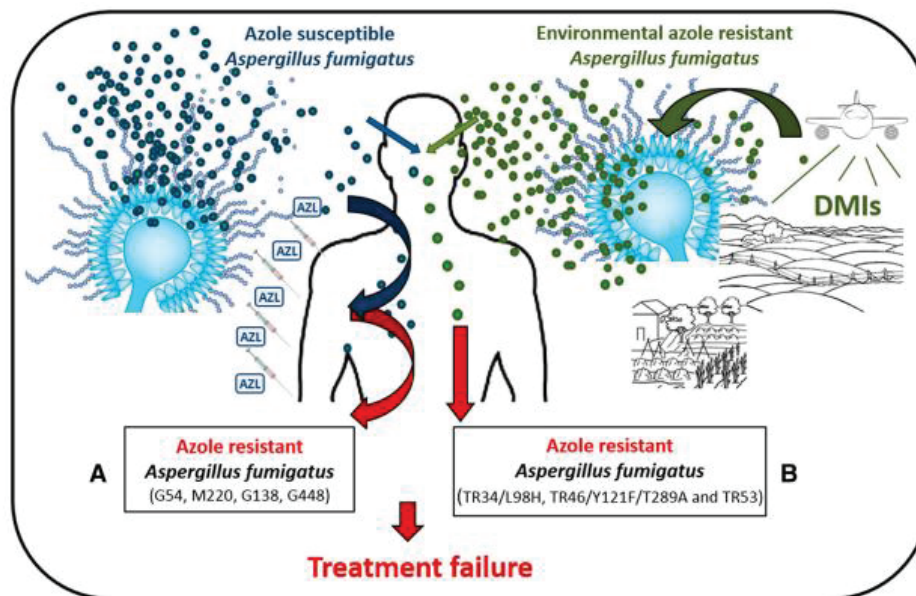


Figure 14. Voies d'acquisition de la résistance aux azolés chez *A. fumigatus*.

A : L'acquisition par traitement au long cours aux azolés d'une résistance d'*A. fumigatus* à ces derniers alors qu'il était initialement sensible, B : Acquisition d'*A. fumigatus* résistant aux azolés (avant traitement) provenant de l'environnement. (Adaptée de : Garcia-Rubio *et al.*, 2017)

D'autres mutations du gène *CYP51A* dites « d'origine environnementale », c'est-à-dire acquise dans l'environnement, sous la pression exercée par les fongicides agricoles ont été mises en évidence chez des souches multi-résistantes aux azolés (Figure 14) (Rocchi *et al.*, 2015). Cette résistance est générée par la présence concomitante de plusieurs mutations : TR₃₄/L98H, TR₄₆/Y121F/T289A (van der Linden, *et al* 2013 ; Vermeulen, *et al.*, 2013). La mutation TR₃₄/L98H a été isolée pour la première fois en 1998 et constitue actuellement, la mutation la plus fréquemment retrouvée (Snelders *et al.*, 2012 ; Vermeulen *et al.*, 2013). Elle se compose d'une augmentation de l'expression du gène par la répétition de 34 paires de bases dans la région promotrice, associée avec une substitution en position 98 d'une leucine par une histidine, diminuant ainsi l'affinité des azolés pour la protéine (Snelders *et al.*, 2011). L'autre TR₄₆/Y121F/T289A se distingue de la première par sa résistance plus importante au voriconazole et des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) variables à l'ITZ et au posaconazole (van Ingen *et al.*, 2015). Elle se compose également d'une répétition dans la région promotrice du gène *CYP51A* de 46 pb, associée avec deux mutations Y121F et T289A (van den Linden *et al.*, 2013).

2) -Les autres mécanismes de résistance

Récemment plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes de résistance aux azolés n'impliquant pas *CYP51A* (Hagiwara *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2017). La surexpression de pompes d'efflux a été associée à une augmentation de la résistance aux azolés. Deux types de pompes ont été principalement documentés : les transporteurs de la famille ABC (ATP-Binding cassette) et les transporteurs « Major Facilitator Superfamily » (MSF) (Lelièvre *et al.*, 2013). Respectivement 49 et 278 gènes codant pour les transporteurs ABC et MSF ont été documentés. Parmi les gènes codant pour des transporteurs ABC, les gènes : *cdr1B*, *atrF*, *atrI*, *AfuMDR1*, *AfuMDR2*, *AfuMDR3*, *AfuMDR4* ont été associés avec une résistance accrue aux azolés (Fraczek *et al.*, 2013, Hagiwara *et al.*, 2016 ; Slaven *et al.*, 2002). Concernant les transporteurs MSF, une étude menée par Meneau L *et al* (2016) a observé que la délétion du gène *mdrA* entraîne une récupération de la sensibilité aux azolés. D'autres études récentes, ont permis d'identifier un autre mécanisme de résistance aux azolés impliquant la protéine *algA*, intervenant dans la cascade de la voie de signalisation du calcium et dont la délétion a montré une augmentation de la résistance aux azolés (Wei *et al.*, 2017).

3) -La prévalence de la résistance d'*A. fumigatus* aux azolés

Il reste actuellement difficile d'obtenir une estimation réelle du taux d'isolats d'*A. fumigatus* résistants aux azolés car la susceptibilité aux antifongiques n'est pas pratiquée en routine dans tous les établissements de santé. La mutation TR₃₄/I98H, d'origine environnementale est depuis sa première description en 1988 chez des isolats cliniques, de loin la plus retrouvée au niveau clinique et environnementale (Mellado *et al.*, 2007). La mutation TR₄₆/Y121F/T289A, identifiée en 2009 au niveau d'isolats cliniques et en 2013 dans l'environnement a été décrite dans de nombreux pays européens (van der Linden *et al.*, 2013) (Figure 15). Ces mutations sont les deux principaux mécanismes retrouvés actuellement chez les isolats d'*A. fumigatus* environnementaux et leur émergence a pu être associée avec l'autorisation de mise sur le marché agricole de fongicides (inhibiteurs de la déméthylation) constitués par des molécules triazolés (propiconazole, bromuconazole...) (Rocchi *et al.*, 2015). Récemment Bader *et al* (2015) ont ainsi détecté la présence de ces mutations au niveau de leur collection de 455 souches environnementales avec 45 isolats d'*A. fumigatus* porteur de la mutation TR₃₄/I98H et 6 isolats avec la mutation TR₄₆/Y121F/T289A.

En France, la mutation TR₃₄/I98H été retrouvée au niveau d'isolats cliniques dans plusieurs études et au niveau d'un prélèvement de sol dans l'environnement (Rocchi *et al.*, 2014; Choukri *et al.*, 2015). Les autres mutations du gène *CYP51A*, retrouvées chez des patients

traités au long cours par des azolés ont été occasionnellement retrouvés en Europe depuis leur description (Howard *et al.*, 2009) (Figure).

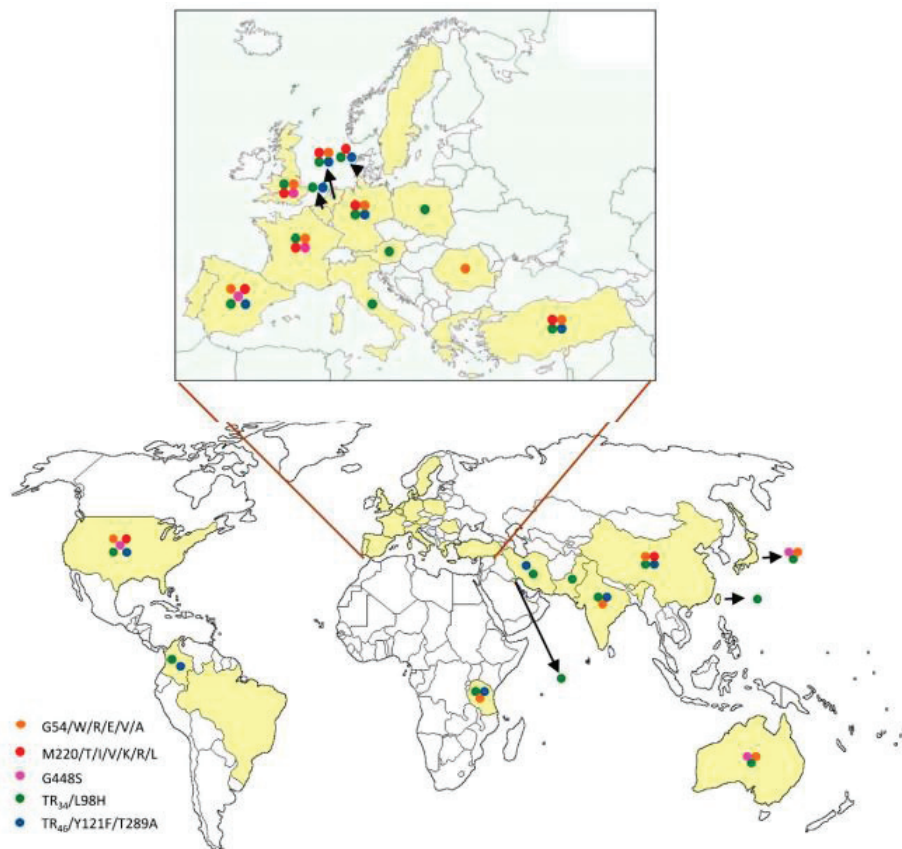


Figure 15. Distribution mondiale des mutations d'*A. fumigatus* responsables de la résistance aux azolés. (Adaptée de : Rivero-Menendez *et al.*, 2016.)

III) Test de la susceptibilité aux antifongiques

La création des premiers tests de susceptibilité a été initiée par Fleming pour l'évaluation du potentiel thérapeutique de la Pénicilline. Ces tests ont ensuite évolué par le biais du développement des antibiotiques (Sherris, 1989). L'émergence des infections fongiques des dernières décennies a entraîné le développement de tests standardisés, en premier par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) puis par l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Il existe ainsi deux catégories de tests standardisés : ceux réalisés en milieu liquides (méthode de microdilution du CLSI et EUCAST) et ceux en milieu solide (CLSI disk diffusion). De plus de nombreuses techniques commerciales comme la technique des disques et des bandelettes existent (Etest[®], Vitek[®]2 etc) (Alcazar-Fuoli L *et al.*, 2014 ; Espinel-Ingroff, 2008). Dans les dernières études européennes la méthode des bandelettes Etest[®] a été largement utilisée. Elle combine facilité d'exécution pratique avec précision de l'information quantitative apportée par les méthodes

en milieu liquide. Plusieurs études ont ainsi comparées les résultats obtenus entre ces deux méthodes (Pfaller *et al.*, 2003 ; Guinea *et al.*, 2007). De manière générale, ces études semblent montrer une plus forte concordance des résultats entre les 2 méthodes pour l'évaluation des CMI des azolés, proche de 100%, que pour l'AMB où Guinea *et al* ont montré une discordance pour 23% des isolats.

GESTION DU RISQUE INFECTIEUX ENVIRONNEMENTAL LORS DE TRAVAUX EN ETABLISSEMENT DE SANTE

D) Généralités

1) -Contexte

Les établissements de santé (ES) sont régulièrement confrontés, dans le cadre de maintien aux normes, à la réorganisation d'unités ou d'extension ou à des travaux d'infrastructures qu'ils soient de simple entretien ou de gros œuvre. Ces travaux contribuent à la re-suspension et à la dispersion des spores fongiques. Ainsi, il a été observé lors de travaux à l'hôpital une augmentation de 10^5 des champignons thermotolérant à l'extérieur par rapport à avant démolition, et également une augmentation notable du taux de champignons filamenteux à l'intérieur des unités après démolition (Bouza *et al.*, 2002 ; Streifel *et al.*, 1983). Les travaux d'infrastructures constituent donc un risque nosocomial important pour les individus à l'hôpital. En France, *A. fumigatus* est responsable de la grande majorité des infections fongiques invasives qui ont un taux de mortalité, dues aux aspergilloses proche de 50% (Lortholary *et al.*, 2011; Garcia-Vidal *et al.*, 2008; Thornton, 2010). C'est pourquoi, afin de prévenir au mieux ce risque, des guides ont été mis en places pour identifier le risque environnemental lié aux travaux à l'hôpital et initier des mesures de prévention.

2) -Présentation des guides existants

En France, les ES sont responsables de l'air qu'ils distribuent à leurs patients. Dans le but de prévenir les IN liées à l'air lors de la présence de travaux d'infrastructure à l'hôpital, une politique de prévention du risque aspergillaire se doit d'être mise en place (Anaes 1999; Gangneux *et al.*, 2006). Cette dernière fait intervenir des acteurs pluridisciplinaires et se caractérise principalement par l'élaboration d'une stratégie d'action, de son évaluation ainsi que la définition de mesures correctives. En 2011, deux sociétés savantes, la Société française de mycologie médicale (SFMM) et la Société française d'hygiène hospitalière (SF2H), entourés d'experts de différents domaines scientifiques ont compilé et analysé les procédures et mesures déjà existantes (Health Canada, 2011) et dont l'efficacité avait été prouvée. Ils ont ainsi élaboré, avec l'appui de la Haute Autorité de Santé (HAS), le premier guide national technique sur le risque aspergillaire en condition de travaux (Hygiènes 2011). Ce référentiel national recommande la réalisation d'une étude d'impact d'un chantier prévu, sur le risque aspergillaire associé, en se basant sur des outils qualitatifs mais également quantitatifs. La gestion du risque est proposée par l'élaboration d'indicateurs de suivi.

II) Caractérisation du risque infectieux

1) -Evaluation du risque infectieux en ES

Le risque infectieux fongique en ES est défini comme la probabilité d'occurrence d'une infection nosocomiale (IN) à l'issue de l'exposition de l'hôte (ici le patient) au pathogène (*A. fumigatus*) et pouvant être due à l'environnement du patient. Le risque infectieux nosocomial d'AI dans les ES subissant des travaux d'infrastructure prend en compte majoritairement trois facteurs :

- a) Le type de travaux réalisés
- b) Le type de patients hospitalisés dans cet ES
- c) Le type d'unités d'hospitalisation à proximité du chantier

a) **Le type de travaux réalisés :**

Recommandations

Les travaux constituent des émetteurs de particules et poussières. Cependant, cette émission est variable en fonction du type de travaux réalisés (Haiduven *et al.*, 2009). En effet, des degrés de contamination à *Aspergillus* différents ont pu être observé entre des travaux de construction et de démolition (Streifel *et al.*, 1983; Hansen *et al.*, 2008). C'est pourquoi le guide national (Hygiènes 2011) a établi une classification des travaux en fonction du niveau de production de poussière (Tableau 5).

Tableau 5. Classification des travaux en fonction de leur émission de poussière (Hygiènes 2011)

Typologie des travaux	
Type A	<p>Travaux de contrôle sans caractère invasif/ Travaux internes avec production minimale de poussières <i>Liste non exhaustive</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dépose de plaques de faux plafonds pour inspection, limitée à 1 plaque/m², • peinture sans sablage, • pose de papiers peints, • petits travaux électriques, • travaux mineurs de plomberie avec coupure d'eau d'une pièce et < 15 minutes, • autres travaux d'inspection qui ne requièrent ni saignées dans les murs, ni intervention plus large sur les faux plafonds.
Type B	<p>Petits travaux de durée brève qui produisent un taux faible de poussières <i>Liste non exhaustive</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Saignées dans les murs ou les plafonds avec production contrôlée de poussières pour installation ou réparation de petits travaux d'électricité, sur composants de la ventilation, câblages téléphone ou informatique, • dépose de revêtement de sol (surface limitée), • petits travaux sur faux plafonds, • sablage/ponçage des murs pour peinture ou pose de papier peint dans le but de réparer une petite surface, • travaux de plomberie avec coupure d'eau ≥ 2 chambres moins de 30 minutes, • tous travaux pouvant être réalisés par un seul corps de métier.
Type C	<p>Tous travaux générant un niveau moyen à élevé de poussières ou qui demandent la démolition ou la dépose de tout composant fixe (ex. : éviers, tableaux...) <i>Liste non exhaustive</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Sablage/ponçage des murs pour peinture ou pose de papier peint ; tous travaux sur éléments en plâtre, • démolitions mineures, • dépose de revêtement de sol ou de faux plafonds, • construction de nouveaux murs ; pose de nouvelles cloisons, • constructions mineures, • travaux mineurs sur conduits ou câblages électriques dans les plafonds, • excavations mineures, • activités majeures de câblage, • toute activité qui demande plusieurs corps de métiers, • tous travaux de plomberie avec coupure d'eau > 2 pièces > 30 minutes mais < 1 heure.
Type D	<p>Travaux majeurs de démolition, rénovation, construction /Travaux externes majeurs avec importante production de poussières <i>Liste non exhaustive</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Démolition ou réfection de tout un système de câblage, • nouvelle construction faisant intervenir plusieurs corps de métiers, • travaux de plomberie avec coupure d'eau > 2 pièces et > 1 heure, • excavations majeures.

Expérience à HEH

L'hôpital Edouard Herriot (HEH) des HCL fait l'objet d'un important programme de rénovation. Ces travaux de grande ampleur peuvent être divisés en deux grandes étapes. La première étape a consisté en la déconstruction entière d'un pavillon situé au centre de l'hôpital (hôpital pavillonnaire : 32 pavillons indépendants) durant l'année 2015. La deuxième étape qui a fait suite dès Janvier 2016 est la construction d'un nouveau pavillon plus moderne, qui sera le plateau technique, hébergeant blocs opératoires, hélistation et services de réanimation.

La première étape de déconstruction du pavillon fait l'objet de cette thèse. Elle peut être scindée en trois périodes bien identifiées de travaux : période de curage et désamiantage du bâtiment, puis la déconstruction des étages et enfin une période d'excavation et terrassement. Selon le Tableau 5, l'ensemble de ces travaux correspondent au type D.

b) Le type de patients hospitalisés dans cet ES

Recommandations

Les patients à risque d'infection fongique, notamment aspergillaire, d'origine environnementale, peuvent être divisés en 3 catégories : Population à risque aspergillaire élevé, intermédiaire ou faible (Hygiènes 2016). Le choix de catégorie pour classer un patient dépend de la pathologie infectieuse et de la typologie de cette dernière. Ces 3 catégories font suite aux catégories préalablement définies (Hygiènes 2011): populations à très haut risque, à haut risque, à risque moindre et autre population en se basant sur la pathologie sous-jacente, le niveau d'immunodépression et les traitements associés. Ainsi, les nouvelles recommandations préconisant la classification en 3 catégories, permettent une meilleure prise en compte de la typologie de la pathologie sous-jacente et de son évolution.

Expérience à HEH

Lors de notre étude à l'hôpital Edouard Herriot, ces dernières recommandations à 3 niveaux n'étaient pas encore publiées. C'est pourquoi lors de cette étude, les patients ont été catégorisés selon les 4 niveaux décrits dans l'[ANNEXE 1](#).

c) Le type d'unité d'hospitalisation à proximité du chantier

Recommandations

Les patients à risque infectieux fongique important peuvent être hospitalisés dans de nombreux services en fonction de leur pathologie sous-jacente. C'est pourquoi, il est nécessaire d'identifier et quantifier les unités d'hospitalisation présente dans l'établissement. En effet, le système du traitement d'air du secteur d'hospitalisation peut avoir un impact sur l'aérocontamination intérieure à *Aspergillus* (Cornet *et al.*, 1999; Özen *et al.*, 2016). Le (Tableau 6) ci-dessous tiré du guide Hygiènes (2011), décrit les groupes de services dans chacune des 4 catégories définies : zone à risque très élevé, élevé, moyen, faible. Cependant, une analyse interne et spécifique à chaque établissement est nécessaire.

Tableau 6. Regroupement des secteurs d'hospitalisation en fonction du risque infectieux qu'ils représentent (Hygiènes 2011)

Groupe de services	Secteurs ou services concernés	
	[Anonyme Canada 2001, ministère de la Santé 2004b]	[APIC 2005, HAIDUVEN 2009]
Zone 1 RIF faible	<ul style="list-style-type: none"> • Bureaux • Salles inoccupées • Aires publiques 	
Zone 2 RIF moyen	<ul style="list-style-type: none"> • Tous les autres services de soins (sauf s'ils figurent dans les groupes 3 ou 4) • Cliniques externes (sauf oncologie et chirurgie) • Unités d'admission 	<ul style="list-style-type: none"> • Cardiologie • Échocardiologie • Médecine nucléaire • Endoscopie • Radiologie/RMN • Pneumologie • Rééducation fonctionnelle
Zone 3 RIF élevé	<ul style="list-style-type: none"> • Salles d'urgence • Radiologie conventionnelle • Salles de réveil (SSPI) • Salles de travail et d'accouchement (sauf salle d'opération) • Nurseries • Chirurgie ambulatoire • Médecine nucléaire • Salles des bassins de balnéothérapie ou physiothérapie • Échocardiologie • Laboratoires • Salles de médecine et de chirurgie générales (sauf si ils figurent dans le groupe 4) • Pédiatrie • Gériatrie • Soins prolongés ou de longue durée 	<ul style="list-style-type: none"> • Salle d'urgence • Salles de travail et d'accouchement (sauf salle d'opération) • Nurseries • Laboratoires • Chirurgie ambulatoire • Pédiatrie • Pharmacie • Salles de réveil (SSPI) • Services de chirurgie
Zone 4 RIF très élevé	<ul style="list-style-type: none"> • Unités de soins intensifs • Salles d'opération • Salles d'anesthésie • Unités d'oncologie et consultations externes pour cancéreux • Unités de transplantation et consultations externes pour patients ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques ou d'organe solide • Salles et consultations externes pour patients atteints de sida ou d'un autre déficit immunitaire • Unités de dialyse • Néonatalogie • Toutes les salles de cathétérisme cardiaque et d'angiographie • Services cardio-vasculaires/cardiologie • Salles d'endoscopie • Salles de préparation des médicaments • Salles de préparation stérile • Traitement central (stérilisation, endoscopes) 	<ul style="list-style-type: none"> • Unités de soins intensifs • Salles d'opération • chambres d'isolement à pression positive • Services de médecine • Unités d'oncologie et consultations externes pour cancéreux • Unités de transplantation et consultations externes pour patients ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques ou d'organe solide • Unité des brûlés • Stérilisation centrale

Expérience à HEH

Dans notre établissement des HCL, nous avons ainsi pu identifier 10 pavillons à risque. Le détail des secteurs est listé dans le Tableau 7 et représenté sur la Figure 16. Les services à risque identifiés sont situés dans les pavillons adjacents au chantier.

Tableau 7. Secteurs d'hospitalisation identifiés à risque fongique à l'hôpital Edouard Herriot

Pavillon	Spécialisation	Secteurs concernés
D	Chirurgie digestive	Bloc D
E	Hépatho-gastro-entérologie et Gériatrie	Ensemble du pavillon
F	Rhumatologie	Services F1 & F2
I	Réanimation brûlés et chirurgie	Services I4 et I5
N	Urgences médicales, unités de soins continus, réanimation	Ensemble du pavillon
M	Chirurgie vasculaire	Bloc M
G	Urgences chirurgicales (réanimation chirurgicale)	Services G1, G3 et G5
P	Néphrologie, Réanimation	Services P2, P réa
O	Médecine Interne	Services O2, O3
R	Néphrologie-Dialyse	R Clima



Figure 16. Localisation des secteurs d'hospitalisation identifiés comme à risque fongique à l'hôpital Edouard Herriot

L'ensemble des critères décrits dans cette partie caractérisation du risque infectieux sont notamment à combiner entre eux lors de l'étude d'impact recommandée par le guide Hygiènes (2011). Certaines études ont également mis en avant des critères à prendre en compte lors de la réalisation de travaux dans un ES comme l'impact des facteurs météorologiques sur l'aérocontamination d'*Aspergillus* (Pilmis *et al.*, 2017 ; Garcia-Vidal *et al.*, 2014). L'étude de Cavallo *et al* a décrit l'influence des paramètres météorologiques intérieurs et extérieurs sur l'aérocontamination fongique d'un service d'hématologie. Ces études ont montré la saisonnalité d'*A. fumigatus* à l'hôpital et mis en avant ce lien entre les différents facteurs météorologiques et l'aérocontamination. D'autres études nécessitent cependant de confirmer ces résultats et préciser le rôle des facteurs météorologiques sur la dispersion d'*A. fumigatus*.

III) Gestion du risque infectieux fongique en ES

1) -Mise en place d'une cellule travaux

Recommandations

Afin d'optimiser les démarches d'évaluation et de gestion du risque infectieux fongique, il est recommandé de favoriser les collaborations entre professionnels (Hygiènes 2011) incluant l'équipe d'hygiène, biologistes, ingénieurs hospitaliers, affaires techniques etc. La formation d'un groupe pluri-disciplinaire qui se rencontre régulièrement pour partager les informations et réfléchir aux points à mettre en place ou à améliorer est indispensable (Etancelin *et al.*, 2009). De plus, ce groupe permet de faire le lien entre les besoins identifiés par la direction de l'hôpital, les professionnels hospitaliers et les entreprises prestataires réalisant les travaux.

Expérience à HEH

Dans ce contexte, une démarche a été effectuée dans notre établissement, dans le cadre du Comité Air local, avec la création d'une « Cellule travaux ». Les missions de la Cellule travaux sont décrites en 5 étapes dans la Figure 18. La cellule travaux est composée de membres permanents : 5 personnes de l'équipe d'hygiène, 5 personnes de la direction des affaires techniques, 2 personnes de la direction et une personne de la Sécurité incendie de l'hôpital. Régulièrement et en fonction des thématiques de discussion des membres peuvent être invités (représentant du CLIN, Médecine du travail etc).

2) -Mise en place d'une étude d'impact

Recommandations

En amont du début des travaux, il est important de pouvoir évaluer l'impact des travaux planifiés sur l'environnement hospitalier et par conséquent sur la santé des patients hospitalisés. Dans le guide de référence (Hygiènes 2011), il est ainsi recommandé la réalisation d'une étude d'impact des travaux (Figure 17) par une équipe collaborative impliquant des personnels de l'équipe d'hygiène de la cellule travaux, mais également des personnes ayant en charge la réalisation des travaux. Cette démarche collective doit permettre de caractériser et évaluer les impacts des différents types de travaux réalisés à toutes les phases de la réalisation du projet.

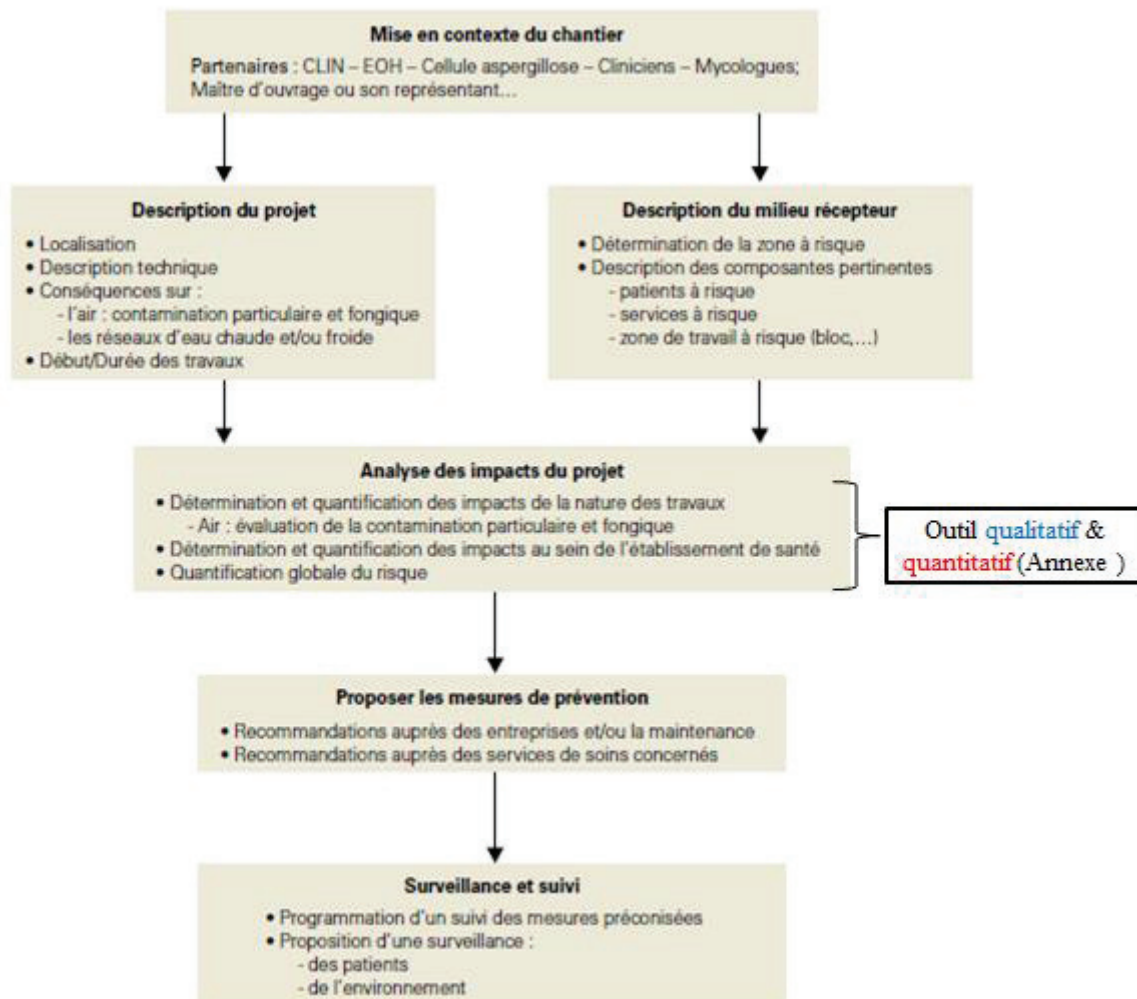


Figure 17. Etapes nécessaires à l'élaboration d'une étude d'impact en secteur hospitalier (Adaptée du guide Hygiènes 2011)

*EOH : Equipe Opérationnelle d'Hygiène. *CLIN : Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales

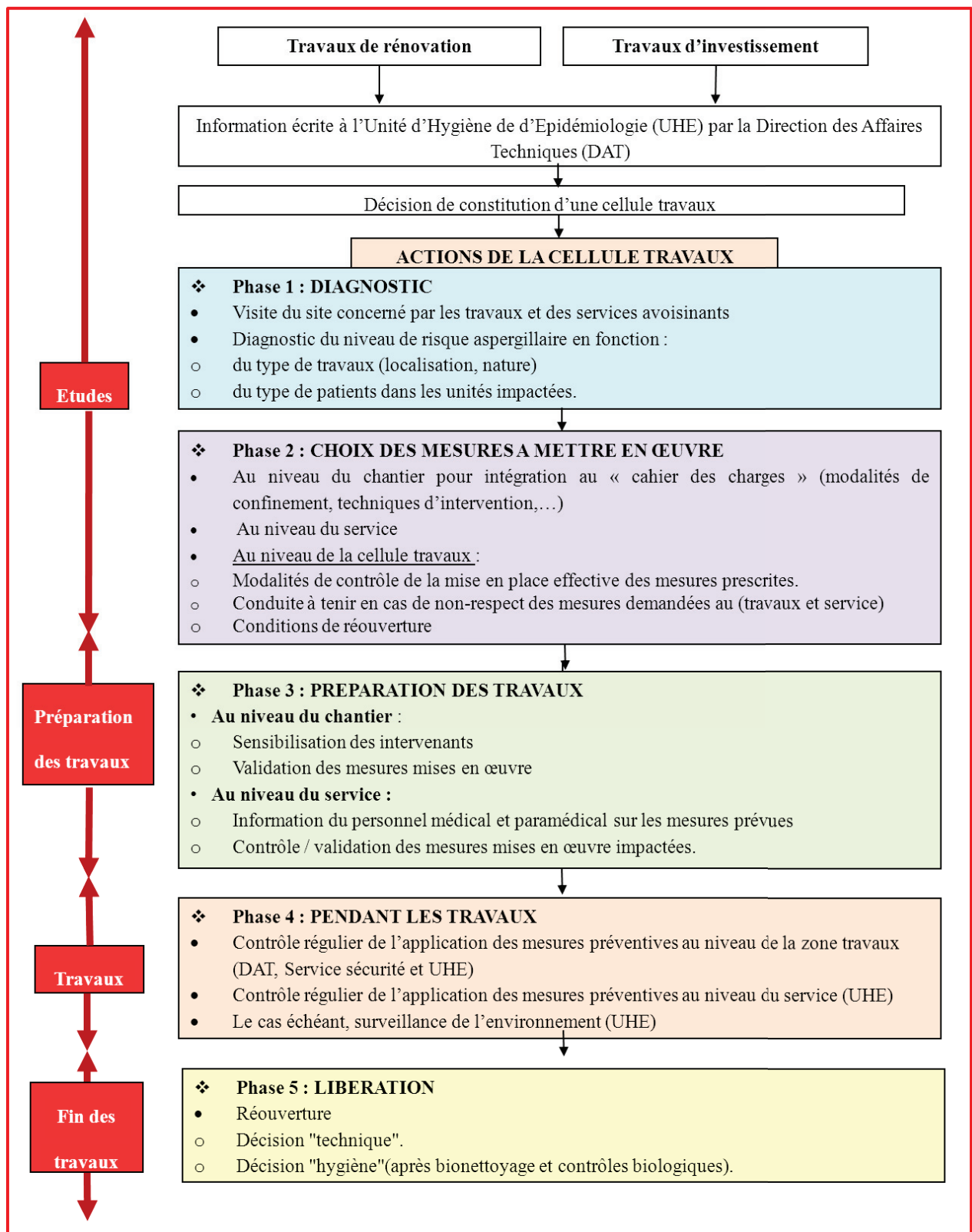


Figure 18. Représentation des différentes missions de la Cellule travaux
(Adaptée de la procédure HCL - Annexe 2)

Cet outil va ainsi mettre en avant les éléments et périodes les plus à risque permettant de planifier et intégrer des choix de construction ou des mesures de prévention les plus adaptées. Cette démarche globale d'étude d'impact se base sur des méthodes qualitatives et quantitatives d'évaluation du risque en fonction de la nature des travaux et de leur proximité par rapport aux patients hospitalisés Figure 17 (ANNEXE 3). Les deux outils permettent de déterminer et classer le risque fongique global en 3 catégories : Elevé, Moyen et faible (Tableau 6, le Tableau 7 et l'ANNEXE 3). L'outil qualitatif (Tableau 2, le Tableau 6 et l'ANNEXE 3), basé l'appréciation de la contamination (Forte, Modéré ou Limitée) et du risque patient (+++, ++ ou +) n'est pas très précis mais a pour avantage d'être accessible à un large public. Au contraire, l'outil quantitatif nécessite l'avis d'expert pour attribuer au mieux les notes à chaque type de travaux et relatif au risque patient (Tableau 4, le Tableau 5 et l'ANNEXE 3).

Expérience à HEH

A l'hôpital Edouard Herriot, lors de la prévision des travaux de déconstruction du pavillon H, une étude d'impact a été réalisée par l'équipe d'hygiène en collaboration avec les ingénieurs travaux. Au vu de la localisation centrale du site et de la nature des travaux, l'évaluation globale du risque fongique a été principalement réalisée de manière qualitative. Elle a permis d'identifier un risque fongique global élevé pour tous les pavillons se trouvant à proximité directe du chantier et hébergeant des patients considérés à risque (voir chapitre AI).

3) -Mise en place de mesure de prévention

Recommandations

Les résultats obtenus lors de l'étude d'impact permettent ainsi de mettre en place des mesures de gestion du risque infectieux fongique. Le guide de référence (Hygiènes 2011) préconise l'établissement de mesures préventives selon 3 grands axes

- La zone de chantier : limiter l'émission et la dispersion de poussière (Bocquet *et al.*, 1993 ; Haiduven *et al.*, 2009)
- Les patients : réduire leurs expositions aux bio-aérosols (Gangneux *et al.*, 2004 ; Brenier-Pinchart *et al.*, 2009)
- Individuelle : Informer, sensibiliser, accompagner et aider tous les corps de métiers intervenant sur le chantier (ingénieurs, ouvriers, conducteurs de travaux etc) et le personnel soignant (Berthelot *et al.*, 2006)

Chaque établissement de santé possède des spécificités au niveau architectural et organisationnel. Ainsi, une même opération d'infrastructure peut faire varier le niveau de risque fongique global d'un établissement de santé à un autre. C'est pourquoi, il est recommandé de mettre en place des mesures de prévention adaptées au site en estimant la faisabilité de chacune, sa validité (études ou expériences précédentes...) et leur importance vis-à-vis des services présents dans l'établissement. Enfin, avant la fin des travaux dans un bâtiment il est recommandé de programmer, un contrôle des systèmes de traitements d'air et la réalisation du bio-nettoyage.

Expérience à HEH

Au sein de notre hôpital, la procédure HCL (P-4 Prévention des risques liés à l'empoussièrement lors de travaux hospitaliers aux HCL, version 2015 – l'ANNEXE 2) a été appliquée. Cette procédure établie selon les recommandations des guides (Hygiènes 2011) et et Health Canada) et de la littérature préconise la mise en place de mesures basiques et renforcées au niveau des 3 axes :

- **Axe 1- Zone de chantier :**

- Sensibiliser les équipes de chantiers, mise en place d'une formation sur le risque aspergillaire
- Déconstruire en milieu humide par arrosage régulier du bâtiment, des gravats et des abords du chantier (ex : système de brumisation orientable, tuyau d'arrosage...)
- Bâcher les terres et gravats et les bennes des camions les évacuant
- Etablir et afficher un plan de circulation des déchets (gravats et terres) pour les camions et engins de chantier
- Nettoyer les voiries et roues des camions (ex : balayage humide des voiries).

Certaines mesures recommandées comme isoler les ouvrants du bâtiment en travaux par des panneaux ou bâches afin de créer un écran protecteur ne peuvent être appliquées dans notre établissement du fait de sa localisation centrale dans l'hôpital (difficulté d'accès) et de son envergure.

- **Axe 2- Mesures au niveau des unités à proximité du chantier :**

Mesures basiques au niveau de l'unité:

- Sensibiliser le service, les patients, les visiteurs par la présence d’affiche sur le risque aspergillaire (Figure 19)
- Maintenir fermées les fenêtres et la porte d’entrée du service
- Limiter les déplacements extérieurs au service pour les patients
- Limiter le stationnement à proximité du chantier pour les patients et les professionnels;
- Contrôler régulièrement le système de traitement d’air du service : vérification renforcée des pertes de charge des filtres, nettoyage renforcé des aérocondenseurs des groupes froids.

Mesures renforcées au niveau de l’unité:

- Etablir un **plan de circulation (circuits personnel, patients, visiteurs)** :
 - Condamnant les ouvertures face aux travaux : portes, fenêtres.
 - Signalant des circuits réservés.
- Confiner le service (collaboration avec le service incendie) :
 - Calfeutrement des ouvrants exposés au chantier (fenêtres, portes, issues de secours) des services identifiés comme à risque infectieux fongique élevé. Mise en place d’une pancarte explicative sur chaque ouvrant calfeutré.
 - Si pas de rafraîchissement dans le service ou présence d’ouvrants avec une étanchéité correcte, autoriser l’ouverture des fenêtres de l’unité seulement en dehors des heures de chantier (entre 19h et 07h) ou installer des climatiseurs ou ventilateurs individuels.
- Installer un tapis de décontamination et/ou un linge humidifié aux accès de l’unité.
- Surveiller les diagnostics de mycoses invasives et des niveaux de charge fongique dans l’environnement.

Au vu de l’ampleur des mesures renforcées à mettre en œuvre au niveau des unités définies comme à risque infectieux fongique élevé, certaines de ces mesures n’ont été appliquées qu’à certains groupes de patients Les mesures basiques n’ont par ailleurs pas été appliquées au reste de l’établissement, car trop contraignantes et nombre trop important de services.

- **Axe 3 - Mesures individuelles : patients à risque infectieux fongique**

Deux **groupes de patients à risque infectieux fongique important ont été** définis au sein de notre établissement (ANNEXE 4).

- Des mesures spécifiques à chacun de ces deux groupes ont été déterminées selon si l'hospitalisation dure plus de 48 heures (Tableau 8) ou moins de 48 heures (Tableau 9)
- Différentes formes de communication écrites et orales ont été réalisées pour informer et sensibiliser les personnels soignants, visiteurs et intervenants du chantier :

Communication orales :

- 2 interventions sur Radio'ED : 28/11/2014 et 17/03/2015 (M. Perraud, P.Vanhems)
- 1 intervention de sensibilisation des professionnels de chantier : 20/03/2015 (21 participants).
- 3 interventions à destination des professionnels de : le 08/04/2015 à 14h30 (9 participants), le 09/04/2015 à 19h, le 14/04/2015 à 14h30 (21 participants).
- Rédaction d'une plaquette d'informations à destination des patients immunodéprimés (validée en cellule travaux) (Annexe 5)

Communication écrites :

- Note diffusée aux chefs de services et cadres de santé le 18/03/2015.
 - Affichage sur les issues de secours et sur les fenêtres calfeutrées. Affichage sur les fenêtres non calfeutrées à ne pas ouvrir en journée. Poster affiché dans les salles de soins et bureaux médicaux (Figure 19).
 - Lettre à communiquer à l'ensemble du personnel de HEH (validée en cellule travaux).
- Affichage de circuit piétons patients et visiteurs (Figure 20). Lors de transfert pour examens des patients, les galeries ont été privilégiées.



CONSIGNES ET MESURES DE PROTECTION CONTRE LE RISQUE ASPERGILLAIRE PENDANT LE CHANTIER DU PAVILLON H





Lors de travaux de déconstruction et de terrassement, des poussières contenant des spores fongiques (notamment d'Aspergillus) sont émises en grande quantité entraînant un risque d'aspergillose pulmonaire invasive, infection grave chez les patients immunodéprimés

MESURES GÉNÉRALES À RESPECTER

Fenêtres non calfeutrées :

- Ne pas les ouvrir entre 07h et 19h
- Ouverture autorisée en dehors de ces horaires



Fenêtres calfeutrées :

- Interdiction de les ouvrir
- En cas de décollement des adhésifs, contacter les services techniques au 12.69.3



Ne pas rester près du chantier en tenue professionnelle, ne pas s'asseoir par terre, ni sur les murets




N'utiliser qu'en cas d'urgence les issues de secours



Signaler au cadre de l'unité et/ou au chef de service toutes les anomalies que vous pourriez remarquer (ex. présence visible de poussières)



Être particulièrement méticuleux lors du nettoyage désinfectant (sols et surfaces)



MESURES SPÉCIFIQUES À APPLIQUER AUX PATIENTS À RISQUE

Patients à risque

- Corticothérapie haute dose
- Neutropénie avec PNN < 500/mm³ <14 jours
- Transplantation d'organe solide
- Maladies pulmonaires chroniques traitées par corticoïdes ou autre immunosuppresseur
- Séropositifs VIH au stade SIDA
- Ventilation mécanique
- Dialyse
- Chimiothérapie anticancéreuse
- Maladie systémique

Patients à haut risque

- Allogreffe ou autogreffe de cellules souches
- Déficits immunitaires combinés sévères
- Neutropénie avec PNN < 500/mm³ >14 jours
- Neutropénie avec PNN < 100/mm³
- Aplasie médullaire sévère

- Chambre calfeutrée (sans visibilité directe sur le chantier, si possible)
- Limitation au maximum des déplacements du patient
- En cas de déplacement à l'extérieur : masque FFP2

- Prévenir l'Unité d'Hygiène au 31.07.19
- Chambre calfeutrée et sans visibilité directe sur le chantier
- Mise en place d'une armoire mobile de traitement d'air dans la chambre
- Isolement protecteur (porte fermée, mesures spécifiques pour le personnel)
- Limitation au maximum des déplacements du patient
- En cas de déplacement à l'extérieur : masque FFP2 a minima



Signaler à l'Unité d'Hygiène et d'Épidémiologie tout cas suspect d'aspergillose pulmonaire invasive (31.07.19)

Unité d'Hygiène et d'Épidémiologie et Services Techniques, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Mars 2015, Tél 31.07.19

Figure 19. Affiche d'information sur le risque aspergillaire affichée dans les services à risque

72

Tableau 8. Mesures à mettre en œuvre dans les services à risque, si l'hospitalisation dure 48 heures ou plus

Groupe 1	Groupe 2
Limitation au maximum des déplacements	
En cas de déplacement à l'extérieur : masque FFP2	
Chambre calfeutrée et non exposée au chantier	Chambre calfeutrée
Isolement protecteur (porte fermée, mesures spécifiques pour le personnel)	/
Mise en place d'une armoire mobile de traitement d'air	/
Identification des patients par l'UHE, audit des mesures	/

Tableau 9. Mesures à mettre en œuvre dans les services à risque, si hospitalisation dure moins de 48 heures comme par exemple l'hospitalisation de jour

Groupe 1	Groupe 2
Limitation au maximum des déplacements	
Respecter les circuits définis lors des déplacements dans l'enceinte de l'établissement	
En cas de déplacement à l'extérieur : masque FFP2 (lors d'hospitalisation répétée dans le temps)	
Ne pas stationner près du chantier	

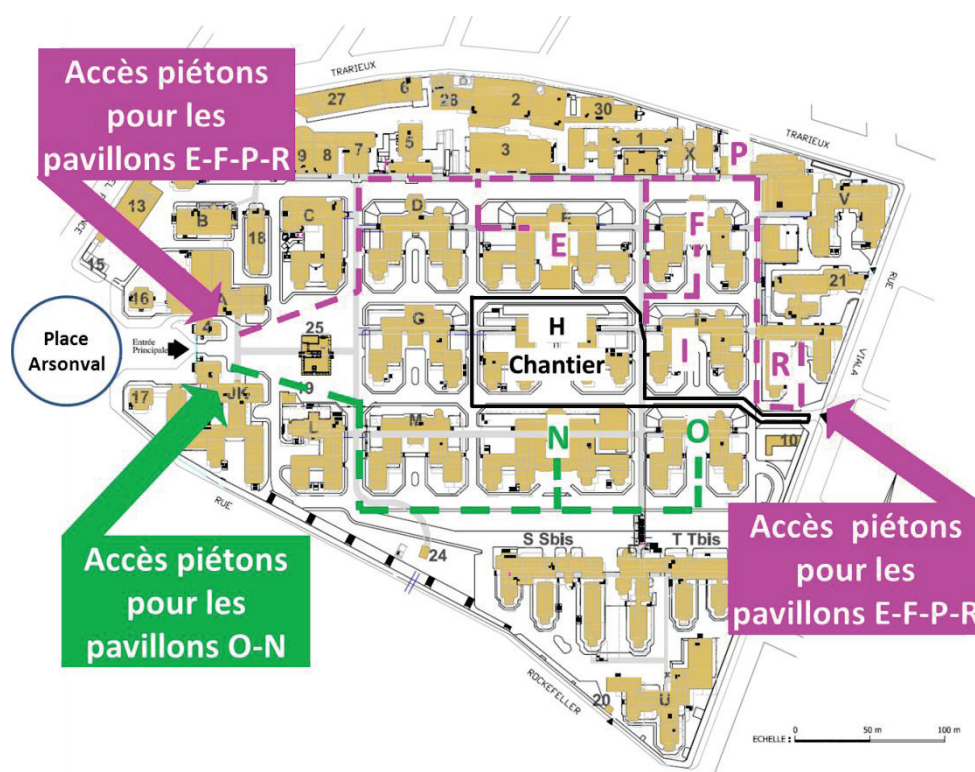


Figure 20. Affiche représentant les circuits piétons recommandés pour les patients (Adaptée de la procédure HCL P-4)

4) -Surveillance des mesures mises en place et actions correctives

Recommandations

En raison de l'extrême gravité de l'AI et de l'émergence des résistances aux traitements actuels, il est important de surveiller et évaluer les mesures de prévention suivies (Gangneux *et al.*, 2006). En cas de contamination environnementale dépassant les valeurs cibles fixées (guide Hygiène 2011) ou de cas d'AI nosocomiale, il est nécessaire de déterminer la cause par une enquête environnementale et de mettre en place des mesures correctives telles que le renforcement des mesures de prévention, du bio-nettoyage, la mise en place d'un purificateur d'air si nécessaire etc. (Tableau 10).

Tableau 10. Proposition de valeurs cibles et leur interprétation

Secteur	Local	Prélèvement d'air	Prélèvement de surface
Protégé (avec traitement de l'air)	Chambre de patient	Absence de spores fongiques	<ul style="list-style-type: none"> • Sous flux laminaire : absence de spores fongiques • Autres zones : tolérance de très rares unités formant colonies (UFC) de spores fongiques/ prélèvement avec absence d'<i>Aspergillus</i> *
	Parties communes	Tolérance de très rares UFC/prélèvement avec absence d' <i>Aspergillus</i> **	Tolérance de très rares UFC/prélèvement avec absence d' <i>Aspergillus</i> ***
Autres secteurs	Chambre du patient et parties communes	Résultats attendus difficiles à définir dans un environnement non protégé. Seules seront interprétées d'éventuelles modifications de la biocontamination dans le temps, pendant les travaux, ou en comparaison à des niveaux de bases mesurés avant le début des travaux	Résultats attendus difficiles à définir de façon uniforme et univoque. Seules seront interprétées d'éventuelles modifications de la biocontamination dans le temps par rapport à un niveau habituel considéré comme associé à la maîtrise du risque

A titre indicatif, en situation normale hors travaux,

*une tolérance de 2 UFC/prélèvement est acceptée pour un prélèvement de 25 cm² de surface,

**une tolérance de 2 UFC/prélèvement est acceptée pour un prélèvement d'air d'un m³,

***une tolérance de 5 UFC/prélèvement est acceptée pour un prélèvement de 25 cm² de surface.

Tout cas d'aspergillose invasive nosocomiale doit être signalé en interne dans les établissements de santé au CLIN et remet en cause la responsabilité des différentes entités intervenant dans la gestion du risque infectieux fongique en période de travaux. En cas d'infection confirmée comme étant liée aux travaux, il est également obligatoire de réaliser un signalement externe auprès de la direction territoriale de l'agence régionale de santé et du centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales de l'inter-région (décret n°2001-671 du 26 juillet 2001).

Il est donc nécessaire de créer des outils de monitoring et gestion du risque infectieux fongique adapté à la situation de travaux afin de se prémunir au mieux des dangers liés aux opérations d'infrastructures.

Expérience à HEH

Surveillance du respect des mesures préconisées

- 3 types d'audits rapides ont été mis en place
 - Audit n°1 : Respect des mesures au niveau de la zone de travaux (ANNEXE 6), réalisé 1 fois/semaine.
 - Audit n°2 : Respect des mesures au niveau des pavillons à risque (ANNEXE 7), réalisé 1 fois/semaine dans un pavillon surveillé.
 - Audit n°3 : Respect des mesures en cas d'hébergement du patient du Groupe 1 (ANNEXE 8), réalisé pour chaque patient du groupe 1 hébergé, une fois tous les 15 jours.

Conduite à tenir en cas d'alerte

Une alerte est définie par l'augmentation significative de la charge fongique environnementale en comparaison de la période antérieure (dépassement d'un seuil glissant défini à partir du « bruit de fond » repéré par des mesures préalables) et/ou 1 cas d'aspergillose pulmonaire invasive nosocomiale et/ou poussières visibles au niveau des couloirs des pavillons à risque et/ou mauvais résultats des audits rapides. En cas d'alerte, une conduite à suivre a été définie (Figure 21) en fonction de la situation (cas d'aspergillose invasive ou augmentation charge fongique environnementale). En cas d'épidémie d'AI, des mesures complémentaires ont été prévues, pouvant aller jusqu'à l'interruption temporaire du chantier.

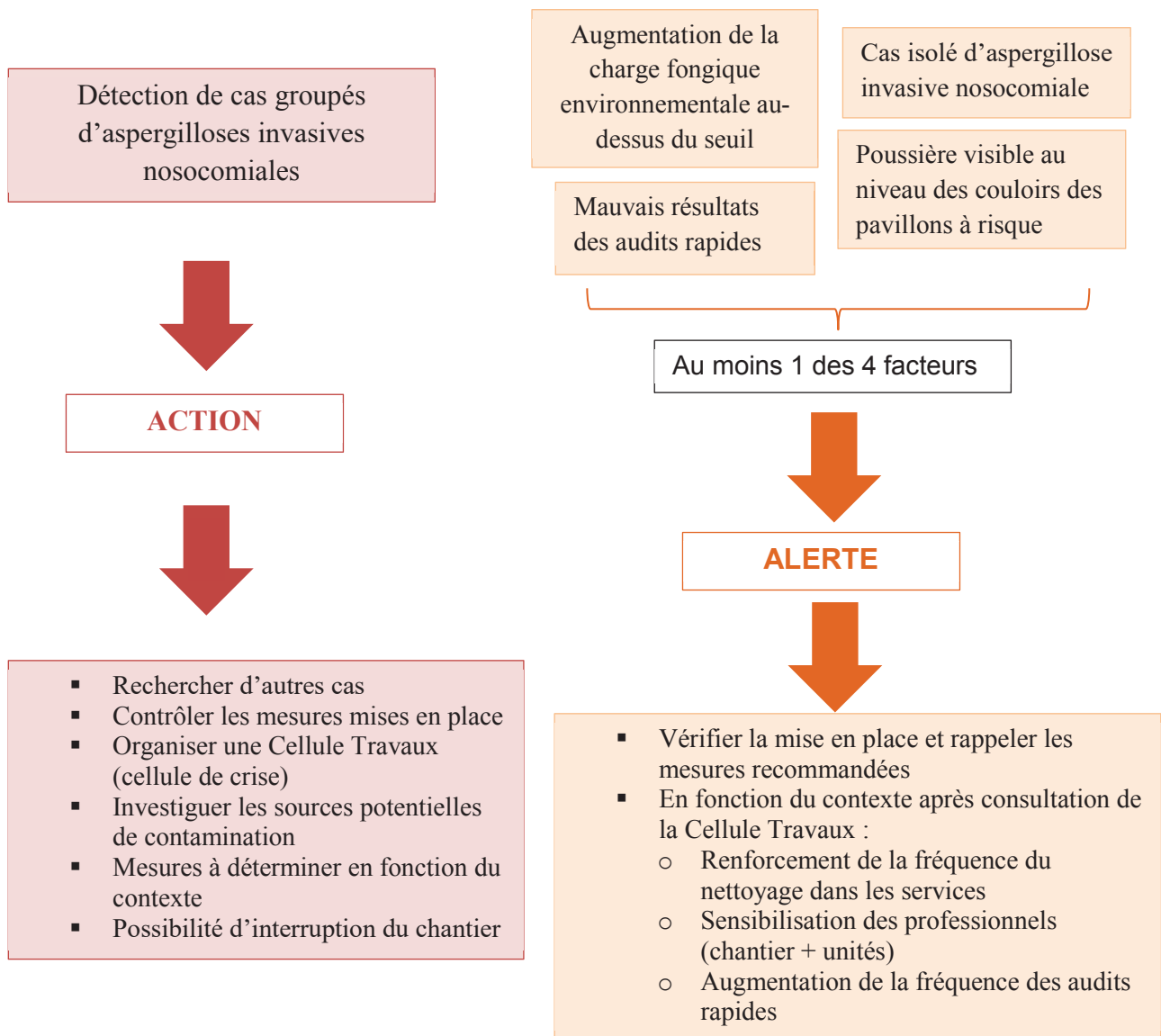


Figure 21. Schéma de la conduite à tenir en cas d'alerte
(Adaptée de la procédure HCL P-4)

APPRECIATION QUANTITATIVE DU RISQUE ASPERGILLAIRE

I) Surveillance environnementale

Lors de travaux à l'hôpital, il est recommandé de réaliser des contrôles de la biocontamination fongique de l'air et des surfaces de manière hebdomadaire dans les secteurs dits « protégés », c'est-à-dire avec une filtration de type HEPA (High Efficiency Particulate Air Filtration) et régulière dans les autres secteurs (bimensuelle ou mensuelle) (Hygiènes 2011). Cette mesure de l'exposition fongique en milieu hospitalier permet le contrôle de l'efficacité des mesures de prévention appliquées pour la maîtrise du risque fongique infectieux. Pour réaliser ces mesures, il existe de nombreux outils quantitatifs et différentes stratégies d'identification (Gangneux *et al.*, 2002 ; Méheust *et al.*, 2014).

1) Différentes techniques de prélèvements

Deux grandes méthodologies de prélèvements donnant des informations différentes sont utilisées à l'hôpital : les prélèvements d'air et de surface. Les prélèvements d'air permettent d'estimer l'aérocontamination (présence de spores) dans l'air environnant le site de prélèvement. Les prélèvements de surface témoignent quant à eux de la sédimentation de ces spores fongiques sur les surfaces. Différentes techniques de prélèvements de surface ont été évaluées et standardisées afin d'optimiser leur efficacité (Gangneux *et al.*, 2002). Pour des raisons principalement budgétaires, aucun prélèvement de surface n'a été réalisé dans le cadre de notre étude sur la biocontamination fongique. De plus, les prélèvements de surface sont le reflet de la présence de spores dans l'air ; c'est pourquoi nous avons privilégié la réalisation de prélèvements d'air.

Les deux principales méthodes de prélèvement d'air couramment utilisées sont : la méthode par impaction (sur bande ou milieu de culture) et la méthode cyclonique.

La méthode par impaction sur milieu de culture reste à l'heure actuelle la méthode traditionnellement la plus utilisée. Elle permet l'impaction des spores fongiques sur un milieu de culture à un débit choisi (souvent de 100L/min). Cependant, la qualité d'impaction dépend de plusieurs paramètres comme le type d'impacteur et le milieu de culture utilisé (Méheust *et al.*, 2013). De plus, le temps d'incubation des milieux de culture influence les résultats (Boff *et al.*, 2012). L'autre technique par impaction, non cultivable, permet l'adhésion en continu de spores fongiques sur une bande enduite à un débit similaire à celui de la respiration humaine (10L/min). Ces collecteurs volumétriques nécessitent une détection par microscopie optique.

Au contraire des méthodes cultivables, l'identification des spores est limitée au genre et non pas à l'espèce. Ces collecteurs sont en cours d'évaluation pour une utilisation en établissement de santé (Dananché *et al.*, 2017).

L'essor des techniques microbiologiques de ces dernières décennies est marqué par le développement des méthodes utilisant la biologie moléculaire comme la méthode cyclonique qui collecte les spores dans un liquide autorisant une identification par PCR (Bellanger AP *et al.*, 2012). Des techniques utilisant la PCR quantitative en temps réel (qPCR) mais aussi mesurant la présence de certains composants de la paroi fongique tels que les β -1,3-glucanes ou l'ergostérol sont également en développement depuis quelques années (Lang-Yona *et al.*, 2012). Enfin, les techniques de spectrométrie de masse (MALDI-TOF) et de séquençage haut débit (NGS, Next-Generation Sequencing) sont en pleine expansion, pour l'identification des champignons filamenteux. Il existe également des appareils (à utilisation militaire) en développement, basée sur une méthode de détection en temps réelle. Le principe de ces appareils repose sur l'analyse de faisceaux laser et sur la mesure de l'auto-fluorescence émise par le NADH, indicateur de présence d'un organisme vivant. Cette méthode est toujours à l'étude pour la détection des moisissures.

Ces dernières techniques citées n'ont pas été utilisées dans notre étude ; seule la méthode d'impaction a été évaluée. En effet, la méthode de prélèvement d'air par impaction sur culture reste pour le moment le gold standard pour l'évaluation du risque infectieux fongique à l'hôpital. Cependant, le délai de culture et d'analyse nécessaire entre le prélèvement et le rendu des résultats est un inconvénient certain de cette technique.

2) -Détermination de la fréquence des contrôles et interprétation

Des propositions de méthodes standardisées pour les prélèvements d'air en secteur hospitalier ont été réalisées (Gangneux *et al.*, 2002 ; guide Hygiène 2011). La périodicité des prélèvements d'air à réaliser, dans les secteurs à risque fongique élevé, lors de travaux reste à définir par les établissements. De nombreuses études ont réalisé une surveillance de l'aérocontamination fongique et l'incidence des cas d'aspergillose invasive lors de travaux dans leur établissement de santé (Kanamori *et al.*, 2015 ; Reboux *et al.*, 2014 ; Fournel *et al.*, 2010 ; Bouza *et al.*, 2002). Ces études montrent une certaine hétérogénéité au niveau de la méthodologie des prélèvements environnementaux, de leur analyse microbiologique et des résultats des taux de concentration en *Aspergillus spp.* Retrouvés (Méheust *et al.*, 2014). Ces études sont difficilement comparables entre elles du fait de la différence de méthodologie

appliquée, elles mettent l'accent sur la nécessité d'améliorer la démarche de collection de données environnementales et cliniques. En effet, les variabilités inter-études observées et l'absence d'études prospectives, statistiquement significatives dans la littérature rendent difficile l'analyse de la relation contamination environnementale et incidence de l'aspergillose.

Les principales difficultés identifiées à ce jour sont l'absence d'un seuil d'alerte ou d'indicateur (valeurs cibles) standardisés selon les secteurs. Reboux *et al* a étudié pendant 10 ans l'aérocontamination fongique du couloir principal de l'hôpital (secteur non protégé) et du service d'hématologie (secteur protégé). Les auteurs ont fixé comme indicateur d'alerte un seuil de contamination à *A. fumigatus* dans le couloir non protégé > 40 UFC/m³. En 10 ans, 12 pics > 40 UFC/m³ ont pu être détectés. La présence d'indicateur permet une meilleure mobilisation des équipes responsables et de maintenir une bonne politique de prévention du risque aspergillaire. De même, l'absence d'études prospectives, prenant en compte tous les facteurs tels que les travaux, l'influence facteurs météorologiques sur l'aérocontamination extérieure et intérieure mais également les mesures de préventions sont des facteurs limitant l'amélioration de nos systèmes de surveillance. Enfin, la difficulté du diagnostic d'aspergillose invasive et de son caractère nosocomial (acquisition environnementale au sein de l'hôpital) complique la démarche d'investigation et son analyse.

II) Surveillance épidémiologique

1) -Contexte général

De nombreuses études descriptives ont étudié l'association entre la réalisation de travaux dans l'environnement hospitalier et l'augmentation d'incidence d'AI ou la présence d'une épidémie d'AI (Tableau 11). La revue de littérature de Vonberg *et al* montre que les travaux de construction/démolition ont été considérés comme possible source responsable d'épidémie d'AI dans 49,1% des études (Vonberg *et al.*, 2006). D'autres études, réalisées hors travaux à l'hôpital ont permis de montrer une corrélation entre l'augmentation de l'aérocontamination fongique environnante et l'apparition de cas d'AI (Alberti *et al.*, 2001 ; Pelàez *et al.*, 2012).

Plus récemment, l'étude de Kanamori *et al* a également permis de recenser les études réalisées dans le monde ses 4 dernières décennies portant sur l'étude des épidémies d'infection fongique durant une période de travaux à l'hôpital. Il a été rapporté que depuis la première épidémie d'AI recensée en 1976, on a pu observer une augmentation graduelle du nombre de

publications jusqu'en 2010. Entre 2010 et 2014, seulement trois études ont été publiées sur la thématique. Toutes ces observations coïncident avec l'amélioration des pratiques et recommandations concernant les mesures de protection à mettre en place et également l'apparition des premières prophylaxies antifongiques.

Tableau 11. Liste non exhaustive de quelques études portant sur l'étude de la relation entre incidence des cas d'AI et la présence de travaux à l'hôpital

Auteurs	Lieu de l'étude	Durée de suivi	Mesure de la contamination fongique aérienne	Nombre présumés de cas d'AI	Relation entre contamination fongique et AI	Commentaires
Bouza et al., 2002	3 bâtiments de l'hôpital (général, clinique et oncologie)	5 semaines	Oui (externe et interne)	Aucun	Non Pas de relation observée environnement-AI	Les travaux de démolition ont pu être associés avec une forte augmentation de l'aérocontamination fongique
Cooper et al., 2003	Hôpital (18 sites intérieurs différents répartis sur 4 étages)	En 2001 (16 semaines)	Oui (interne)	4	Non Pas de relation observée environnement-AI	Efficacité des mesures protectives appliquées permettant malgré augmentation de l'aérocontamination fongique de réduire risque AI
Berthelot et al., 2006	Hématologie	Etude rétrospective entre 1993-2001 (8 ans)	Oui (interne)	15	Non Augmentation du nombre de travaux et de leur niveau de risque au cours du temps mais taux d'AI qui diminue	Aucune corrélation retrouvée entre le nombre d' <i>A. fumigatus</i> et le nombre de travaux réalisés
Pini et al., 2007	Hématologie (2 services)	Novembre 2003 à janvier 2005 (14 mois dont 7 de travaux)	Oui (externe et interne)	7	Oui 3 cas AI coïncident avec la période de travaux ayant eu un fort taux d'aérocontamination fongique	Importance de la surveillance environnementale pour prévenir les cas d'AI
Hansen et al., 2008	Hôpital (7 sites extérieurs à différentes hauteurs)	Novembre 2005 à mars 2006 (5 mois)	Oui (externe)	1,6/mois (8)	Non Aucune corrélation retrouvée entre le nombre aérocontamination fongique et le nombre d'AI	Pas d'augmentation de l'aérocontamination fongique observée durant la période de démolition
Chang et al., 2008	Hématologie	Début 2006 à juillet 2007 (19 mois, travaux en 2006)	Non	7	Oui Corrélation supposée entre l'apparition des cas d'AI et la présence de travaux majeurs	Efficacité de la chimio prophylaxie antifongique (voriconazole) des patients à risque et importance des mesures de protection pour prévenir les cas d'AI
Reboux et al., 2014	Hématologie	Etude rétrospective entre 2002-2012 (10 ans)	Oui (interne)	58	Non Malgré, La présence constante de travaux, l'aérocontamination fongique à l'hôpital n'a pas augmenté sensiblement et aucun lien avec le nombre d'AI n'a pu être établi	La surveillance environnementale n'a pas permis de prévenir tous les cas d'AI mais son absence pourrait réduire la vigilance du personnel soignant

L'étude des données de la surveillance clinique et environnementale permet la recherche d'association entre l'aérocontamination fongique environnante et l'apparition de cas d'AI. Mais cela permet également d'évaluer l'efficacité des mesures de protection mises en place lors des travaux.

2) -Expérience à l'hôpital Edouard Herriot

Une surveillance épidémiologique a été mise au point à l'hôpital Edouard Herriot pour prévenir, les AI chez les patients à haut risque. Cette surveillance prospective des cas d'aspergillose invasive a été réalisée, dès le début des travaux, pour tous les patients hospitalisés, quel que soit le service, pour qui une suspicion ou un diagnostic d'aspergillose invasive nécessitant un traitement antifongique est porté. Ce monitoring permet de créer une alerte précoce et d'estimer l'incidence des cas.

Le diagnostic d'AI est basé sur les critères de 2008 du groupe consensus EORTC/MSG (Pauw *et al.*, 2008). Les cas seront également catégorisés selon le délai entre l'admission à l'hôpital et le début des signes. Si le diagnostic a été porté avant l'admission, le cas est exclu d'emblée. Il n'existe pas de définition consensuelle de la durée d'incubation des AI, celle-ci étant dépendante du niveau d'immunosuppression des patients et de la charge aspergillaire dans l'air (Hope *et al.*, 2005; Nicolle *et al.*, 2011 ; Bénet *et al.*, 2013). Une AI sera considérée nosocomiale si le délai entre l'admission et le diagnostic est >10 jours, d'origine indéterminée si ce délai était compris entre 1 et 10 jours et communautaire si le patient était symptomatique à l'admission.

L'identification des cas d'infection à *Aspergillus spp.* est basée sur plusieurs facteurs tels que les données de pharmacie, les base médico-administratives, les données microbiologiques et les signalements par les cliniciens (Figure 22). Les données de la consommation d'antifongiques (VCZ, posaconazole, ITZ, caspofungine et AMB liposomale) sont recueillies auprès de la pharmacie de l'hôpital. Les résultats positifs des prélèvements mycologiques réalisés dans le cadre d'une suspicion d'infection fongique invasive sont screenés. Enfin, les praticiens hygiénistes en charge de cette surveillance restent vigilants au signalement des cas suspects d'aspergillose invasive par les cliniciens des services.

Le recueil des données est réalisé via une fiche de recueil standardisée renseignant un certain nombre de données dont la plupart sont déjà collectées dans le cadre de la surveillance nationale des aspergilloses invasives par le Centre National de Référence Mycoses et Antifongiques (CNRMA) :

- Données démographiques (sexe, date de naissance, service, chambre, IPP et n° de séjour)
- Histoire de la maladie : date et motif d'hospitalisation, antécédents (notamment immunosuppression, hémopathie, pathologie respiratoire chronique, greffe, cancer évolutif...);
- Traitement(s) immunosuppresseur(s) et/ou corticothérapie en cours : molécule, dates, doses ;
- Présentation clinique de l'AI : signes infectieux et délais de ces signes par rapport à l'entrée, traitements mis en place... ;
- Données mycologiques : date et type du premier prélèvement positif, résultat de l'examen direct et de la culture, espèce d'*Aspergillus spp.*
- Données biologiques : si antigénémie positive, date du prélèvement, autres liquides testés et positivité ;
- Données d'imagerie (TDM thoracique ou sinusienne) : date et aspect de l'imagerie ;
- Traitement antifongique ;
- Evolution : statut vital, date et cause du décès le cas échéant.

Une saisie informatique des fiches est réalisée sur un serveur informatique commun permettant la réalisation de recherche rétrospective afin d'objectiver une colonisation ancienne.

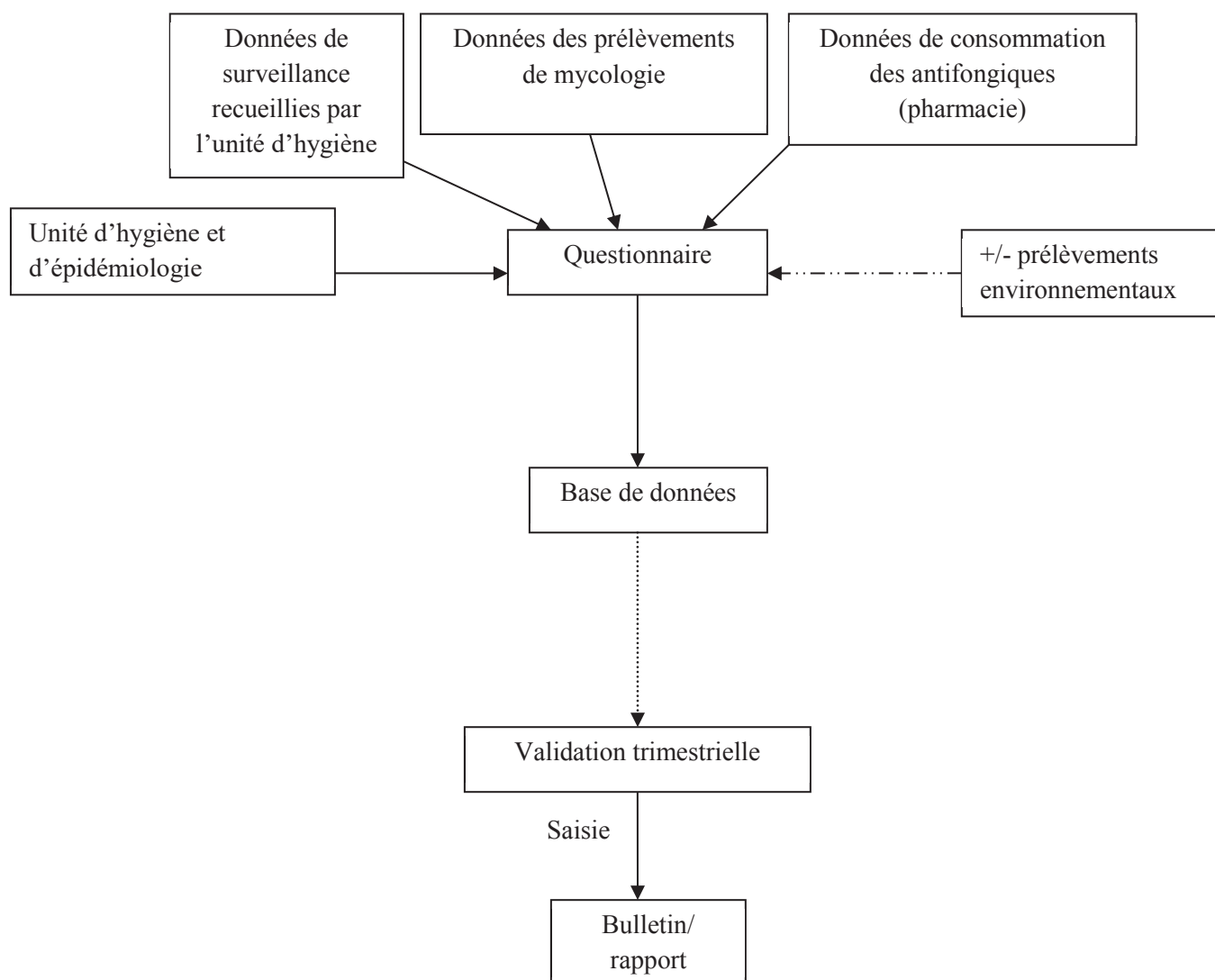


Figure 22. Organisation du recueil, de la saisie et de l'analyse des données de surveillances d'aspergilloses invasives réalisée par l'UHE. (Adaptée du protocole de surveillance des aspergilloses invasive au groupement hospitalier Edouard Herriot)

OBJECTIFS

OBJECTIFS

L'objectif principal de cette étude est de corrélérer et d'évaluer l'association entre la concentration des spores d'*Aspergillus fumigatus* dans l'environnement extérieur et intérieur des pavillons hospitaliers, mais également avec la coexistence de cas cliniques, lors de travaux majeurs de déconstruction au GHC-HEH afin de proposer des recommandations d'amélioration (pratiques & techniques). Pour cela, une surveillance prospective de la contamination fongique à *Aspergillus fumigatus* de l'air extérieur et intérieur, mais aussi des investigations épidémiologiques des patients à risque ont été mis en place au sein de l'hôpital. Un certain nombre d'objectifs secondaires spécifiques ont été évalués :

- Evaluer l'influence des conditions météorologiques sur la colonisation extérieure et intérieure à *A. fumigatus*
- Déterminer la diversité génétique et évaluer les liens pouvant exister entre les souches d'*A. fumigatus* cliniques et environnementales collectées
- Evaluer la susceptibilité aux azolés et à l'amphotéricine B d'isolats d'*A. fumigatus* retrouvés chez des patients et dans l'air de notre hôpital durant la période d'étude

Au final, ces résultats devraient permettre de créer un modèle complet permettant une connaissance améliorée de la nature et de la variabilité génétique spatio-temporelle de la contamination à *Aspergillus fumigatus* de l'air et de l'impact des conditions météorologiques sur leur répartition (Figure 23). Ces prérequis sont nécessaires à l'amélioration des pratiques professionnelles (procédure entretien, mise en place des dispositifs de prévention) et des méthodes de surveillance pertinente pour l'évaluation du risque.

Plus globalement, cette étude s'inscrit en santé publique dans la recherche sur l'exposome, correspondant à la totalité des expositions à des facteurs environnementaux que subit un organisme humain. Ainsi le renforcement des connaissances sur les liens entre exposition fongique et la santé des patients, ceci dans l'environnement hospitalier, apparaît nécessaire afin de capitaliser ces connaissances globales, dans la thématique de l'exposologie (Escher *et al.*, 2017) (Figure 23).

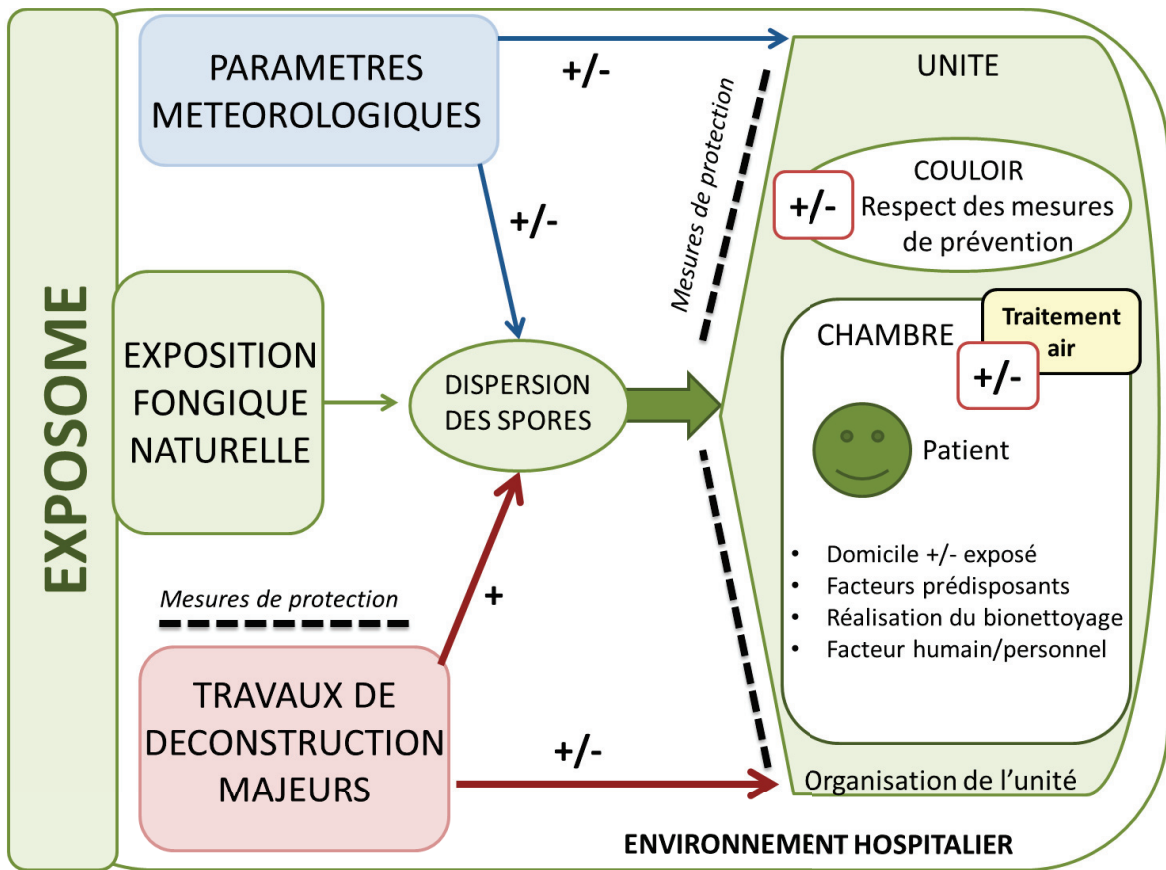


Figure 23. Schéma global représentant les principales connexions existantes entre l'aérocontamination fongique environnementale et le patient lors de travaux à l'hôpital

MATERIEL ET METHODE

MATERIEL ET METHODES

I) Protocole de l'étude (article protocole)

Il s'agit d'une étude prospective à Groupement Hospitalier Centre (GHC)- HEH. Une surveillance environnementale et clinique a été mise en place entre février et décembre 2015, durant les travaux de déconstruction du pavillon H.

La surveillance environnementale a consisté à réaliser un monitoring de l'air à l'intérieur et à l'extérieur des unités à risque à l'aide de deux méthodes de prélèvement d'air : cultivable et non cultivable. Une surveillance clinique a également été réalisée tout au long de l'étude par les médecins hygiénistes de l'unité d'hygiène, épidémiologie et prévention, GHC. Une collection d'isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus* a été réalisée tout au long de ces surveillances et congelée à -20°C.

En 2016, l'identification microbiologique des colonies d'*A. fumigatus* conservées a été réalisée par séquençage du gène de la β -tubuline. Fin 2016 - début 2017 la collection d'isolats cliniques et environnementaux ont été génotypés par la méthode multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) et leur susceptibilité aux antifongiques (amphotéricine B, itraconazole, voriconazole) a été évaluée par la méthode Etest.

L'ensemble du protocole environnementale, clinique mais également la réalisation de la surveillance météorologique a été rédigé sous forme d'un article intitulé: «Monitoring of clinical strains and environmental fungal aerocontamination to prevent invasive Aspergillosis infections in hospital during large deconstruction work: a protocol study». Cet article a été soumis à *BMJ Open* le 06 Juin 2017 en tant que protocole d'étude. Il a été accepté avec révisions mineurs (septembre 2017).

1
2
3 **Monitoring of clinical strains and environmental fungal aerocontamination to prevent**
4 **invasive Aspergillus infections in hospital during large deconstruction work: a protocol**
5 **study**
6
7

8 **Sophie Tiphaine Loeffert¹, Elise Melloul², Cédric Dananché^{1,3}, Laetitia Hénaff¹, Thomas**
9 **Bénet^{1,3}, Pierre Cassier⁴, Damien Dupont⁵, Jacques Guillot², Françoise Botterel²,**
10 **Martine Wallon⁵, Marie-Paule Gustin^{1,6}, Philippe Vanhems^{1,3}**
11
12

13
14 Corresponding author: Sophie T. Loeffert, Emergent Pathogens Laboratory – Fondation
15 Mérieux, Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, CNRS
16 UMR5308, ENS de Lyon, Université Claude Bernard, 21, avenue Tony Garnier, Lyon 69007,
17 France. Email: sophie.loeffert01@chu-lyon.fr. Telephone: +33.(0)4.72.11.07.20
18
19

20
21 ¹Laboratoire des Pathogènes Emergents-Fondation Mérieux, Centre International de Recherche en
22 Infectiologie (CIRI), Inserm U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, France, Université de Lyon 1.
23

24
25 ²EA 7380 Dynamyc, EnvA, UPEC, Université Paris Est, Créteil, France
26

27 ³Unité d'hygiène, épidémiologie et prévention, Groupement Hospitalier Centre, Hospices Civils de
28 Lyon, France.
29

30 ⁴Laboratoire de Biologie Sécurité Environnement, Groupement Hospitalier Centre, Hospices
31 Civils de Lyon, France.
32

33 ⁵Institut de Parasitologie et de Mycologie Médical, Hôpital de la Croix Rousse, Lyon, France.
34

35 ⁶Département de santé publique, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
36 (ISPB)-Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon 1, France.
37
38

39
40 **Word count:**

- 41
42 ➤ Abstract: 232 words
43
44 ➤ Text body: 3012 words
45
46
47

48
49 **Keywords:**

50 Invasive aspergillosis
51 Clinical monitoring
52 Environmental monitoring
53 Azole resistance
54 *Aspergillus fumigatus*
55 Genetic patterns
56
57

58 1
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Introduction: Monitoring fungal aerocontamination is an essential measure to prevent severe invasive aspergillosis (IA) infections in hospitals. One central block among 32 blocks of Edouard Herriot Hospital was entirely demolished in 2015, while care activities continued in surrounding blocks. The main objective was to undertake broad environmental monitoring and clinical surveillance of IA cases to document fungal dispersion during major deconstruction work and to assess clinical risk.

Methods and analysis: A daily environmental survey of fungal loads was conducted in 8 wards located near the demolition site. Air was collected inside and outside selected wards by agar impact samplers. Daily spore concentrations were monitored continuously by volumetric samplers at a flow rate of 10 L.min⁻¹. Daily temperature, wind direction and speed as well as relative humidity were recorded by the French meteorological station Meteociel. *Aspergillus fumigatus* strains stored will be genotyped by multiple-locus, variable-number, tandem-repeat analysis. Antifungal susceptibility will be assessed by E-test[®] strips on Roswell Park Memorial Institute medium supplemented with agar. Ascertaining the adequacy of current environmental monitoring techniques in hospital is of growing importance, considering the rising impact of fungal infections and of curative antifungal costs. The present study could improve the daily management of IA risk during major deconstruction work and generate new data to ameliorate and redefine current guidelines.

Ethics and dissemination: This study was approved by the clinical research and ethics committees of Edouard Herriot Hospital.

2

Strengths and limitations of this study

- This study is one of the largest ongoing prospective studies to evaluate combined approach of environmental and clinical monitoring in hospital during major deconstruction works.
- The high frequency and number of samples collected in this study during deconstruction works will allow powerful statistical analysis to evaluate the efficiency of protective measures and reduce fungal contamination.
- Non-cultivable methods monitoring outdoor *Aspergillus* aerocontamination for hospital alerts are evaluated.
- Genetic diversity and their antifungal susceptibility profiles of clinical and environmental collected isolates are determined to give complete information on *Aspergillus spp.* dispersion and hopefully give new insights into improvement of environmental monitoring and of hospital guidelines during major demolition work.
- Microbiological identification will focus only on *Aspergillus spp.* because it is the leading pathogen responsible for IA. Although 2 air sampling collectors were used in the study, no particle counter was tested.

INTRODUCTION

Invasive fungal infections are major threats to immunocompromised patients because of their high incidence and related mortality.¹ They occur through inhalation of airborne conidia with various consequences, such as immune-allergic reactions to invasive aspergillosis (IA), a severe opportunistic disease caused mostly by *Aspergillus fumigatus* (>80%) and, to a lesser extent, by *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, and *A. nidulans*.^{2,3} IA is a very serious condition, with crude lethality ranging from 50 to 90% and greater mortality in

1
2
3 hematological patients.⁴⁻⁶ Its epidemiology has changed in recent years, surfacing in non-
4 hematological units, such as intensive care units (ICUs), and increasing in non-neutropenic
5 hosts treated with corticosteroids or life-long immunosuppressants.^{6,7} The burden of patients
6 at risk of IA is growing every year because of longer survival and improved care.⁸ Azole
7 antifungals are commonly given to combat IA in many countries, with recent studies reporting
8 an emerging, worldwide problem: azole drug resistance of *A. fumigatus* isolates.⁹⁻¹⁴

15
16
17 *Aspergillus* species are opportunistic pathogens widely distributed in the environment
18 and easily transported by air because of their conidia size.¹⁴ Construction work in healthcare
19 settings in past decades has been associated with major IA outbreaks.⁴ Construction involving
20 periods of renovation or deconstruction increases spore release, creating high-risk situations
21 in hospitals.^{1,15,16} In the 1980s, 22 IA cases arose over a 30-month period during building
22 renovations at Edouard Herriot Hospital (EHH) (Lyon, France).¹⁷ A quasi-experimental study,
23 conducted in an adult hematology unit of this hospital, underlined the need for monitoring
24 environmental factors to prevent nosocomial IA.¹⁸ A sampling strategy for fungal monitoring
25 in hospital was based on study results.^{15,19}

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Recently, an entire block in EHH underwent deconstruction without suspension of
care activities in direct proximity to it. The situation prompted the infection control team to
monitor fungal dispersion and look for cases of *Aspergillus* disease. Only a few studies have
been performed in this context and under similar conditions so that sampling strategies and
analyses differ, indicating varying fungal loads.¹⁶⁻²² All these investigations have highlighted
the common need for innovative approaches and tools to improve research in the field.¹⁹ Real-
time methods may provide warning systems by monitoring outdoor fungal loads.²²

1
2
3 The purpose of the present work was to carry out broad environmental monitoring and
4 clinical surveillance of IA cases to better understand fungal dispersion during major
5 deconstruction work.
6
7
8
9

10 11 12 13 **METHODS**

14 15 **Study objectives**

16
17 The objective of this study is to provide new data for future guidelines on adequate
18 management of invasive fungal infection risk in hospital during major deconstruction work.
19 Its intermediate objectives are to: 1) evaluate non-cultivable methods monitoring outdoor
20 *Aspergillus* aerocontamination for hospital alerts, 2) assess the impact of meteorological
21 parameters (MP) on *Aspergillus* aerocontamination, and 3) compare the genetic diversity of
22 clinical and environmental *A. fumigatus* isolates and ascertain their antifungal susceptibility
23 profiles.
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 34 **Study site**

35 Built in the 1930s in Lyon, Rhône-Alpes, France, on a 15.5-hectare site, EHH is a
36 university-affiliated hospital composed of 32 independent blocks divided by tree-planted
37 walkways and grassy areas. This 850-adult bed tertiary institution provides care to a large
38 panel of immunocompromised patients (solid organ transplantation, hematopoietic stem cell
39 transplantation, immunosuppressive treatment, ICU: intensive care unit). The central block
40 that was demolished measured 0.6 hectares, representing approximately 12.2% of the area
41 covered by hospital blocks (Figure 1). Three deconstruction periods at EHH were scheduled
42 between February and December 2015. The first period, between February and June 2015,
43 consisted of gutting the building and removing asbestos from it. The floors were removed in
44 July and August 2015. Excavation and earthwork took place between September and
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

5

1
2
3 December 2015. Finally, concrete was poured at the end of December 2015 to allow
4 construction of the new building comprising fully-equipped areas (operating rooms, ICUs and
5 heliport) on 2.5 hectares.
6
7

8 9 **Study design**

10
11 The study was conducted in 8 medical wards located around the demolition site: 4
12 ICUs, 1 kidney and pancreas transplantation unit, and 3 medical wards (Figure 2). All of them
13 were possibly occupied by at-risk patients. It should be noted that EHH does not have a
14 hematological ward any longer. In a 10-month period, about 8 inside and 4 outside air
15 samples were collected from each unit per week (Table I). Approximately 64 indoor and 48
16 outdoor air samples were obtained per week, for a total of 3,885 air samples. Weekly clinical
17 monitoring of high-risk, hospitalized patients, by infectious control practitioners, was
18 scheduled.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29 **Environmental survey**

30
31 The environmental survey consisted of monitoring air samples inside and outside
32 selected wards (2 blocks were monitored per day).
33
34
35

36 ***Sampling by the non-cultivable method***

37
38 Outdoor airborne fungal spore concentrations were monitored continuously with 7-day
39 Hirst-type spore traps (VPPS 2000, Lanzoni, Bologna, Italy) at a flow rate of 10 L.min⁻¹. Air
40 drawn in by suction port was directly impacted on adhesive tape cut daily into segments.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	Sampling	Morning	Afternoon	Morning	Afternoon	Morning	Afternoon	Morning	Afternoon	Morning	Afternoon	Morning	Afternoon	Morning	Afternoon	ICU
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11	Outdoor	Building porch	Building porch	Building porch	Building porch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12																
13																
14	Monday															
15	Indoor	Room + Corridor	Room + Corridor	Corridor + treatment room	Corridor + treatment room	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16																
17																
18	Tuesday															
19	Outdoor	-	-	Building porch	Building porch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20																
21	Indoor	-	-	2 Corridors	2 Corridors	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22																
23	Wednesday															
24	Outdoor	-	-	Building porch	Building porch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25																
26	Indoor	-	-	2 Corridors	2 Corridors	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27																
28	Thursday															
29	Outdoor	Building porch	Building porch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30																
31	Indoor	Room + Corridor	Room + Corridor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	Friday															
33	Outdoor															
34	Indoor															
35																
36																
37																
38																
39																
40																
41																
42																
43																
44																
45																
46																
47																
48																
49																

Table 1: Description of manual air sampling sites monitored at Edouard Herriot Hospital

For peer review only - <http://bmjopen.bmj.com/site/about/guidelines.xhtml>

1
2
3 Mean daily fungal spore concentrations were assessed for each segment by optical
4 microscopy (Axiostar[®], Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Spore counts were expressed as
5 spores/m³/day. The Hirst-type spore trap was placed on the rooftop of a block extension
6 consisting of a prefabricated floor located on the north side, just in front of the deconstruction
7 site. It allowed daily monitoring of spore concentrations as total fungal load and
8 Aspergillaceae fungal load (i.e., *Aspergillus* spp. + *Penicillium* spp.). A similar Hirst-type
9 spore trap was placed throughout the study in the Gerland area (Lyon, France), located a few
10 km south-west of EHH, and served as negative control.
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20 ***Sampling by the cultivable method***

21
22 Air samples were collected twice a day outside and inside wards during 11 months,
23 according to a standardized protocol (Table I). Each sample was gathered by agar impact
24 sampler (Air Ideal[®], bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) in 90-mm diameter Petri dishes
25 containing Sabouraud Chloramphenicol agar. Air intake velocity of this agar impact sampler
26 was 100 L/min. Two plates were seeded at each sample site. Each outdoor plate was seeded
27 for 1 min. Indoor plates were seeded for 2½ min, resulting in air volume of 250 L. One of
28 these plates was incubated for 48 h at 37°C to grow thermotolerant *A. fumigatus* species.²³
29 The other plate was incubated for 5 days at 30°C to allow growth of all fungi. Colonies were
30 then counted and identified at the genus level on the basis of macroscopic and microscopic
31 characteristics (lactophenol blue-stained preparations). The data are expressed as colony-
32 forming units per cubic meter.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 **Prospective clinical survey**

48 ***Patient inclusion***

49
50 All hospitalized patients were surveyed prospectively at the hospital level and were
51 eligible for inclusion. IA was classified as proven, probable, and possible or excluded
52 according to European Organization for research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal
53
54
55
56
57
58
59
60

8

1
2
3 Infections Cooperative Group (EORTC) and the National Institute of Allergy and Infectious
4 Diseases Mycoses Study Group (MSG) criteria.²⁴ Only cases diagnosed after hospital
5 admission were included. Cases were categorized into 3 groups, according to the time
6
7 between hospital admission and diagnosis: community-acquired, undetermined and
8
9 nosocomial. Community-acquired cases were defined as incident cases imported from outside
10
11 the hospital. Undetermined cases were defined as incident cases with lag time ranging from 1
12
13 to 9 days between admission and the first IA signs. Probable nosocomial cases were defined
14
15 as incident IA with lag time between admission and symptoms onset of at least 10 days.
16
17 Clinical manifestations of IA vary widely and may develop in different clinical scenarios.²⁵⁻²⁷
18
19
20
21
22

23 **Case detection**

24
25 Case detection was based on prospective surveillance of:

- 26
27 • antifungal therapies (e.g., voriconazole, posaconazole, itraconazole,
28
29 caspofungin and amphotericin B distributed by the hospital pharmacy)
30
31 administered to patients by pharmacy informatics software
32
33
- 34 • mycological results positive for *Aspergillus spp.*, and reporting of suspected
35
36 cases by hospital clinicians and infection control practitioners.
37

38
39 All suspected cases were investigated by 2 infection control practitioners (1 resident
40
41 and 1 physician). External validation was requested in case of uncertain diagnosis by
42
43 standardized chart, allowing the collection of demographic characteristics, disease history,
44
45 clinical features, mycological, biological and radiological data, antifungal therapy, and
46
47 disease outcome.
48

49 ***A. fumigatus* collection**

50
51 During the study, a maximum of 4 *A. fumigatus* colonies per day among all *A.*
52
53 *fumigatus* environmental cultures incubated at 37°C were arbitrarily isolated and frozen. All
54
55 *A. fumigatus* clinical isolates of interest also were frozen at -20°C. In total, 400 *A. fumigatus*
56
57
58
59
60

9

1
2
3 isolates, corresponding to maximal laboratory capacity and budget, were constituted
4
5 arbitrarily.

6 7 ***Molecular identification of Aspergillus isolates***

8
9 All *A. fumigatus* isolates stored will be identified retrospectively at the species level by
10 sequencing β -tubulin gene (*benA*, using Bt2a/BT2b primers). Isolates will be subcultured on
11 Sabouraud Dextrose Chloramphenicol agar for 48 h at 37°C. A piece of approximately 1 cm²
12 of culture will be cut and transferred to microtubes for DNA extraction with QIAamp DNA
13 blood mini kits (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions.
14 All isolates will be identified by partial sequencing of β -tubulin gene (*benA*, using Bt2a/BT2b
15 primers). Sequence alignments will be analyzed by Chromas Lite, v2.01
16 (<http://technelysium.com.au>) and compared with genome sequences in GenBank and
17 MycoBank. The results will be considered acceptable if homologies with other entries in the
18 databases used for comparison are >99%.

19 20 21 ***Genotyping of A. fumigatus isolates***

22
23 Isolates will be genotyped by multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis
24 (MLVA) based on selected variable-number tandem-repeat (VNTR) polymorphism. The
25 MLVA protocol for *A. fumigatus* genotyping targeting 10 markers will be adapted from
26 Thierry *et al.* for multiplexing and capillary electrophoresis (CE).²⁸ One primer couple will be
27 modified to provide shorter amplicons while ensuring the absence of overlaps across VNTR
28 loci. Primers targeting new VNTR flanking regions have been designed by Primer3Plus
29 software. MLVA primers for 10 loci and the fluorescent dyes in CE are enumerated in Table
30 II. MLVA polymerase chain reactions (PCRs) were performed in 2 multiplexes in a final
31 volume of 50 μ l containing: 1-5 ng of DNA, 1X Multiplex PCR Master Mix (Qiagen,
32 Courtaboeuf, France) and 0.2 μ M of each flanking primer. The initial denaturation step at
33 95°C for 10 min was followed by 35 cycles, consisting of denaturation at 95°C for 30 s,

10

1
2
3 primer annealing at 58°C for 40 s, and elongation at 72°C for 10 min. The final extension step
4 was set at 60°C for 10 min. PCR products were diluted 1:50 in deionized water, and 1 µL of
5 the diluted sample was added to 18.5 µL formamide and 0.1 µL of GeneScan™ 500 LIZ™
6 dye size standard (ThermoFisher, Life Technologies, Courtaboeuf, France). All samples were
7 denatured for 5 min at 95°C, then cooled to 4°C before being subjected to capillary
8 electrophoresis in a 3130 XL DNA analyzer (Applied-Biosystems, Courtaboeuf, France) with
9 3130 POP7 polymer (Applied-Biosystems). Each VNTR locus was identified by color and
10 size in electropherograms by GeneScan® analysis (Applied-Biosystems, Courtaboeuf,
11 France). Fragment sizes were converted to repeat numbers based on the formula: number of
12 repeats (bp) = fragment size (bp) – flanking regions (bp) / repeat size (bp). Absent PCR
13 products were designated an allele number, e.g., ‘-1’. Phylogenetic relationships between
14 isolates will be studied, generating a minimum spanning tree with PHYLOViZ 2.0.²⁹

30 ***Antifungal susceptibility testing***

31 Briefly, the antifungal susceptibility of stored *A. fumigatus* isolates to itraconazole,
32 voriconazole and amphotericin B will be analyzed by Etest® on RPMI medium supplemented
33 with 2% glucose, according to the manufacturer’s instructions. A conidial suspension adjusted
34 at 0.5 McFarland will be inoculated on RPMI 1640 agar plates (bioMérieux). Etest® strips
35 (bioMérieux) will then be applied, and the plates incubated for 48 h at 37°C. Minimal
36 inhibitory concentrations (MICs) of amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole
37 and will be tested after 24-h and 48-h incubation, respectively, depending on growth rate.³⁰
38 They will be estimated visually as no-growth endpoints, where the edge of the inhibition
39 ellipse intersects the side of the Etest® strips.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

VNTR	Fluorochromes	Primer sequences (5' to 3')	Allele size range (bp)
Asp 167	F: ATTO565- R: CGTCCCACCGTTACCAAC	TGAGATGGTAACTTACGTAGCGC	374-422
Asp 330	F: ATTO550- R: TCITCGGCCTTTTCATCCC	AICTGGTCGCGAAATCCTCT	152-218
Multiplex 1 CE 1	F: Yakima Yellow- R: GCCGGAAGAGCATGAAGACA	TCTCCAACCTTCGGACG	191-246
	F: ATTO565- R: GCACGTGTACGGTGTCTCTG	AAGCTTCGTGCGGAAGAG	154-280
Asp 443	F: 6-FAM- R: CCGACAGCATCGACAATA	CGATCAITGTTIGCCITGAGGA	197-260
Asp 446	F: 6-FAM- R: CGCAGTGGCAGTTTGAAT	GGGAAGAGAGGAAACCGATCC	182-222
Asp 20	F: Yakima Yellow- R: GCACCTGCTTGTGCAATTCGT	TGATGGCCCGCAGTCCG	154-214
Asp 165	F: ATTO565- R: CCGAAATCCGCGGGA	AGGATCACTGCCCTCAACCC	200-296
Multiplex 2 CE 2	F: ATTO565- R: GTCCCTCACTTTTGGCCTTGGT	ATTGGGAAGAGACGGGGTAT	134-178
	F: ATTO550- R: ACCACGGATTGCCAAGGA	CAGATTGGAGACACGAAAGCG	176-224

CE: capillary electrophoresis F: forward R: reverse

Table II: *MLVA primers and fluorescence dyes used in each multiplex reaction*

Meteorological surveillance

Meteorological conditions monitored were temperature (°C), relative humidity (%), wind direction and speed (km/h). They were recorded every 2 h by Meteociel, the French regional meteorological station at Bron, 5 km from EHH (Figure 1).

Data analysis

Data quality control

Location of and information on sampling sites were recorded on paper and electronic database. To avoid typing errors, a computer model was created to clean up the electronic database. Every detected error was discussed by the infection control team and screened to assess its reliability. *A. fumigatus* isolates stored for data collection were correctly identified in a strain bank. Antifungal treatments, delivered by the hospital pharmacy, and microbiological data were extracted every week from infection control practitioners. Deconstruction work meetings involving clinicians, infection control practitioners and engineers, held every month, to ensure conformity with and respect of French deconstruction work guidelines.

Statistical analysis

Descriptive statistics, such as means, standard deviations (or medians and quartiles), numbers and percentages, have been obtained for indoor and outdoor fungal loads. Incidence rates will be calculated as the ratio of detected IA cases over the population at risk during the study period. Generalized linear models (appropriate for outcomes) will examine correlations between meteorological parameters and fungal contamination. To compare results obtained with cultivable and non-cultivable methods, Pearson correlation coefficients or Spearman's rank correlation coefficients (r) will be applied according to data normality. Time series, by the non-cultivable method, autocorrelation and cross-correlation across sites (EHH and Gerland), including meteorological factors at different time scales and time lag, will be studied. $P < 0.05$ values will be considered to be statistically significant. Statistical analyses will be performed with R language (V 3.0.2).

DISCUSSION

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Clinical and environmental monitoring was reinforced during deconstruction work, according to standard French recommendations.³¹ Outdoor and indoor environmental monitoring of contamination was implemented at EHH to prevent high-risk airborne fungal situations.

The present study addresses several questions. Its main objective is to detect clinical cases as soon as possible to adequately manage invasive fungal infection risk in hospital during major deconstruction work and report new findings for future guidelines. Are national recommendations on protective measures in high-risk units efficient in shielding patients from *A. fumigatus* aerocontamination? Totally, 3,885 air samples were collected between February 23, 2015 and December 17, 2015. Air specimens, assessed by the cultivable method, were grouped into 2,141 indoor and 1,744 outdoor samples. A total of 296 days of recording were undertaken with the non-cultivable method. The high frequency and number of samples collected in this study during the 3 deconstruction periods will allow powerful statistical analysis to evaluate the efficiency of protective measures and reduce fungal contamination.

One of its objectives is to scrutinize the performance of non-cultivable methods of outdoor *Aspergillus* aerocontamination monitoring, such as Hirst-type spore traps, and to ascertain the impact of MP on *Aspergillus* aerocontamination. One preliminary study demonstrated potential interest in monitoring outdoor contamination.²² Complete data on airborne fungal concentration will be analyzed by cultivable and non-cultivable sampling methods.^{32,33} Cultivable and non-cultivable methods will be compared, which results could improve current prevention guidelines by providing early warning systems to hospitals.

Part of the study analysis evaluated the impact of MP on airborne fungal contamination. The relationship between meteorological parameters and fungal spore concentrations has already been scrutinized.^{34,35} However, no study has investigated the role of meteorological factors in outdoor and indoor air contamination during construction works. A better understanding of MP impact on airborne fungi is needed to see if it could help to assess high-risk situations during construction work in hospital.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

In addition, the present study compares the genetic diversity of clinical and environmental *A. fumigatus* isolates and profiles their antifungal susceptibility patterns. The aim is to describe *A. fumigatus* diversity over deconstruction periods along with genetic correlations between environmental and clinical strains collected. Only a few authors have demonstrated links between clinical and environmental genotypes, and only a small number of environmental strains were included in the analysis, limiting the possibility of finding matches.^{36,37} The present work provides considerable data on potential IA outbreaks and determines genetic patterns among *A. fumigatus* isolates (Figure 3). Comparison of several *A. fumigatus* typing techniques has suggested that methods based on short tandem repeats combine high discriminatory power, unambiguous interpretation and significant interlaboratory reproducibility.³⁷⁻³⁹ MLVA based on 10 VNTR markers will be tested in this study: it has already permitted to evaluate *A. fumigatus* dispersion and diversity in the environment.²⁸ The MLVA-10 protocol normally employs singleplex PCRs and agarose gel electrophoresis (AE).²⁸ While traditional AE is relatively cheap, it is also time-consuming. In this study, a multiplex PCR system with multicolor CE for the MLVA-10 panel was designed and provided 97% typeability of isolates, good reproducibility and high discriminatory power. The main advantage of this new MLVA is the high throughput that is facilitated by multiplex PCR and capillary electrophoresis.

The present study evaluates the antifungal susceptibility pattern of environmental and clinical isolates collected. The past decade has seen worldwide reports of azole drug resistance, with prevalence depending on country.^{12,40-42} Recently, Choukri *et al.*¹³ observed that the overall prevalence of azole resistance in France was about 1.8% in unselected clinical *A. fumigatus* isolates. Resistance has also been encountered in the environment, but possible linkage between clinical resistance and environmental usage of azole fungicides is still unclear.^{43,44} Environmental acquisition and dispersion of resistance have been reinforced by IA attributed to azole-resistant *A. fumigatus* isolates in patients who have never ever been subjected to azole therapy.⁴⁵ Determination of the prevalence of azole resistance may contribute to better management of IA cases.

1 Azole resistance and genetic patterns can provide experimental data to evaluate correlations between
2 clinical and environmental isolates and clearly understand *A. fumigatus* dispersion during large demolition
3 programs.
4
5

6
7 This work had some limitations. Adjustment of MP could change the data analysis and conclusions.
8
9 As IA incubation time is unknown or variable, ranging from a few days to 3 months, its diagnosis may
10 involve some bias.⁴⁶⁻⁵⁰ Precise definition by EORTC/MSG was respected to identify IA cases and reduce
11 misclassification.²⁴ This protocol could not be implemented during a baseline period before construction
12 work began. Microbiological identification will focus only on *Aspergillus spp.* because it is the leading
13 pathogen responsible for IA.³ To improve study outcomes, data on airborne fungal colonization in hospital
14 need to be analyzed in association with indoor air-handling systems. Although 2 air sampling collectors
15 were used in the study, no particle counter was tested.
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 A combined approach could deliver meaningful conclusions on *Aspergillus spp.* dispersion and
26 hopefully give new insights into improvement of environmental monitoring and of hospital guidelines
27 during major demolition work. This study fits in with larger, ongoing exposome research based on increased
28 knowledge of connections between environmental exposure and health.⁵¹
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

DECLARATIONS

Contributors: STL, EM, CD, LH, and TB acquired the original data for this study. STL, EM, CD, TB, JG, FB, MPG, and PV formulated study methodology. STL, EM, MPG and PV designed the protocol. CD, TB, PC, DD and MW helped with manuscript writing and language review. All authors contributed to revisions and approved the final manuscript version.

Funding: This study was supported by Laboratoires ANIOS and the Department of Environment & Public Health, Faculty of Medicine, Université Lyon, Lyon, France and Edouard Herriot Hospital, Lyon, France.

Competing interests

None declared.

Acknowledgements: The authors thank all hospital department chiefs for study participation. They also thank the EA 7380 Dynamyc Team from Université Paris Est, France, the Mycology and Parasitology Institute of Lyon and Analyzair[®] Society, Lyon, France, for providing invaluable advice.

REFERENCES

- 1
2
3 [1] Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998;26:781-805.
4
5
6 [2] Marr KA, Patterson T, Denning D. Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations and therapy.
7
8 *Infect Dis Clin North Am* 2002;16:875-94.
9
10
11 [3] Garcia-Vidal C, Upton A, Kirby KA, *et al.* Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem
12
13 cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clin*
14
15 *Infect Dis* 2008;47:1041-50.
16
17
18 [4] Nicolle MC, Bénét T, Thiebaut A, *et al.* Invasive aspergillosis in patients with hematologic
19
20 malignancies: incidence and description of 127 cases enrolled in a single institution prospective survey from
21
22 2004 to 2009. *Haematologica* 2011;96:1685-91.
23
24
25
26 [5] Hadrich I, Makni F, Sellami H, *et al.* Invasive aspergillosis: epidemiology and environmental study in
27
28 haematology patients (Sfax, Tunisia). *Mycoses* 2010;53:443-7.
29
30
31 [6] Gangneux JP, Camus C, Philippe B. Epidemiology of and risk factors for invasive aspergillosis in
32
33 nonneutropenic patients. *Rev Mal Respir* 2008;25(2):139-53.
34
35
36 [7] L6pez-Medrano F, Silva JT, Fern6ndez-Ruiz M, *et al.* Risk factors associated with early invasive
37
38 pulmonary aspergillosis in kidney transplant recipients. Results from a multinational matched case-control
39
40 study. *Am J Transplant* 2016;16(7):2148-57.
41
42
43 [8] Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K, *et al.* Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France:
44
45 the SAIF network (2005-2007). *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1882-9.
46
47
48 [9] Fuhren J, Voskuil WS, Boel CH, *et al.* High prevalence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*
49
50 isolates from high-risk patients. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:2894-8.
51
52
53 [10] Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, *et al.* Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due
54
55 to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. *PLoS Pathog* 2013;9(10):e1003633.
56
57
58
59
60

- 1 [11] Vermeulen E, Lagrou K, Verweij PE. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a growing public
2 health concern. *Curr Opin Infect Dis* 2013;26:493-500.
- 3
4 [12] Lavergne RA, Morio F, Favennec L, *et al*. First description of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due
5 to TR46/Y121F/T289A mutation in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(7):4331-5.
- 6
7
8
9 [13] Choukri F, Botterel F, Sitterlé E, *et al*. Prospective evaluation of azole resistance in *Aspergillus*
10 *fumigatus* clinical isolates in France. *Med Mycol* 2015;53:593-6.
- 11
12
13 [14] O’Gorman CM. Airborne *Aspergillus fumigatus* conidia: a risk factor for aspergillosis. *Fung Biol Rev*
14 2011;25:151-7.
- 15
16
17
18 [15] Gangneux JP, Adjidé CC, Bernard L, *et al*. Quantitative assessment of fungal risk in the case of
19 construction works in healthcare establishments: proposed indicators for the determination of the impact of
20 management precautions on the risk of fungal infection. *J Mycol Med* 2012;22:64-71.
- 21
22
23
24
25 [16] Kanamori H, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE, *et al*. Review of fungal outbreaks and infection
26 prevention in healthcare settings during construction and renovation. *Clin Infect Dis* 2015;61:433-4.
- 27
28
29
30 [17] Perraud P, Piens MA, Nicoloyannis N, *et al*. Invasive nosocomial pulmonary aspergillosis: risk factors
31 and hospital building works. *Epidemiol Infect* 1987;99:407-12.
- 32
33
34
35
36 [18] Bénet T, Nicolle MC, Thiebaut A, *et al*. Reduction of invasive aspergillosis incidence among
37 immunocompromised patients after control of environmental exposure. *Clin Infect Dis* 2007;15;45(6):682-6.
- 38
39
40
41
42 [19] Méheust D, Le Cann P, Reboux G, *et al*. Indoor fungal contamination: health risks and measurement
43 methods in hospitals, homes and workplaces. *Crit Rev Microbiol* 2014;40:248-60.
- 44
45
46
47 [20] Reboux G, Gbaguidi-Haore H, Bellanger AP, *et al*. A 10-year survey of fungal aerocontamination in
48 hospital corridors: a reliable sentinel to predict fungal exposure risk? *J Hosp Infect* 2014;87:34-40.
- 49
50
51
52 [21] Fournel I, Sautour M, Lafon I, *et al*. Airborne *Aspergillus* contamination during hospital construction
53 works: efficacy of protective measures. *Am J Infect Control* 2010;38(3):189-94.
- 54
55
56
57
58
59
60

- 1 [22] Dananché C, Gustin MP, Cassier P, *et al.* Evaluation of hirst-type spore trap to monitor environmental
2 fungal load in hospital. *Plos One* 2017;12(5):e0177263.
3
4
5 [23] Boff C, Brun CP, Miron D, *et al.* Technical note: The effect of different incubation temperatures on the
6 recovery of *Aspergillus* species from hospital air. *Am J Infect Control* 2012;40:1016-7.
7
8
9 [24] Pauwa BD, Walsha TJ, Donnellya JP, *et al.* Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the
10 European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative
11 Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG)
12 Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG)
13 Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008;46(12):1813-21.
14
15
16 [25] Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis*
17 2005;5(10):609-22.
18
19
20 [26] Nicolle MC, Bénét T, Vanhems P. Nosocomial or community-acquired? *Med Mycol* 2011;49:24-9.
21
22
23 [27] Bénét T, Voirin N, Nicolle MC, *et al.* Estimation of the incubation period of invasive aspergillosis by
24 survival models in acute myeloid leukemia patients. *Med Mycol* 2013;51:214-8.
25
26
27 [28] Thierry S, Wang D, Arné P, *et al.* Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for molecular
28 typing of *Aspergillus fumigatus*. *BMC Microbiol* 2010;10:315.
29
30
31 [29] Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, *et al.* PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization
32 for sequence based typing methods. *BMC Bioinformatics* 2012;13:87.
33
34
35 [30] Espinel-Ingroff A, Arendrup M, Cantón E, *et al.* Multicenter Study of Method-Dependent
36 Epidemiological Cutoff Values for Detection of Resistance in *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. to
37 Amphotericin B and Echinocandins for the Etest Agar Diffusion Method. *Antimicrob Agents Chemother*
38 2016;61(1). pii: e01792-16.
39
40
41 [31] Risque infectieux fongique et travaux en établissements de santé. Identification du risque et mise en
42 place de mesures de gestion. *Hygiène* 2009;19(1):1-53.
43
44
45 [32] Fernández-Rodríguez S, Tormo-Molina R, Maya-Manzano JM, *et al.* Outdoor airborne fungi captured
46 by viable and non-viable methods. *Fungal Ecology* 2014;7:16-26.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- [33] Grinn-Gofron A. Airborne *Aspergillus* and *Penicillium* in the atmosphere of Szczecin (Poland) (2004-2009). *Aerobiologia* 2011;27:67-76.
- [34] Cavallo M, Andreoni S, Martinotti MG, Rinaldi M, Fracchia L. Monitoring environmental *Aspergillus* spp. contamination and meteorological factors in a haematological unit. *Mycopathologia* 2013;176:387-94.
- [35] Mahieu LM, De Dooy JJ, Van Laer FA, Jansens H, Ieven MM. A prospective study on factors influencing aspergillus spore load in the air during renovation works in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2000;45(3):191-7.
- [36] Guinea J, García de Viedma D, Peláez T, *et al.* Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus*: an in-depth genotypic analysis of isolates involved in an outbreak of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2011;49(10):3498-503.
- [37] Peláez T, Muñoz P, Guinea J, *et al.* Outbreak of invasive Aspergillosis after major heart surgery caused by spores in the air of the intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2012;54(3):e24-31.
- [38] de Valk HA, Meis JF, Klaassen CH. Microsatellite based typing of *Aspergillus fumigatus*: strengths, pitfalls and solutions. *J Microbiol Methods* 2007;69:268-72.
- [39] de Valk HA, Meis JF, Bretagne S, *et al.* Interlaboratory reproducibility of a microsatellite-based typing assay for *Aspergillus fumigatus* through the use of allelic ladders: proof of concept. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:180-7.
- [40] van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA, *et al.* Clinical implications of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1846-54.
- [41] Lelièvre L, Groh M, Angebault C, *et al.* Azole resistant *Aspergillus fumigatus*: an emerging problem. *Med Mal Infect* 2013;43(4):139-45.
- [42] Vermeulen E, Maertens J, Schoemans H, Lagrou K. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation emerging in Belgium, July 2012. *Euro Surveill* 2012;17(48). pii: 20326.
- [43] Snelders E, Huis In 't Veld RA, Rijs AJ, *et al.* Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol* 2009;75(12):4053-7.

- 1 [44] Kano R, Sobukawa H, Murayama YS, *et al.* *In vitro* resistance of *Aspergillus fumigatus* to azole farm
2 fungicide. *J Infect Chemother* 2016;22:133-6.
3
4 [45] van der Linden JW, Camps SM, Kampinga GA, *et al.* Aspergillosis due to voriconazole highly resistant
5 *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin Infect Dis*
6 2013;57:513-20.
7
8 [46] Balloy V, Huerre M, Latgé JP, *et al.* Differences in patterns of infection and inflammation for
9 corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun*
10 2005;73(1):494-503.
11
12 [47] Gregg KS, Kauffman CA. Invasive Aspergillosis: Epidemiology, Clinical Aspects, and Treatment.
13 *Semin Respir Crit Care Med* 2015;36(5):662-72.
14
15 [48] Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax* 2015;70:270-7.
16
17 [49] Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, *et al.* Invasive aspergillosis in critically ill patients
18 without malignancy. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:621-5.
19
20 [50] American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases. Red Book, 28th edition. Elk
21 Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics, 2009.
22
23 [51] Escher BI, Hackermüller J, Polte T, *et al.* From the exposome to mechanistic understanding of
24 chemical-induced adverse effects. *Environ Int* 2017;99:97-106.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE LEGENDS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

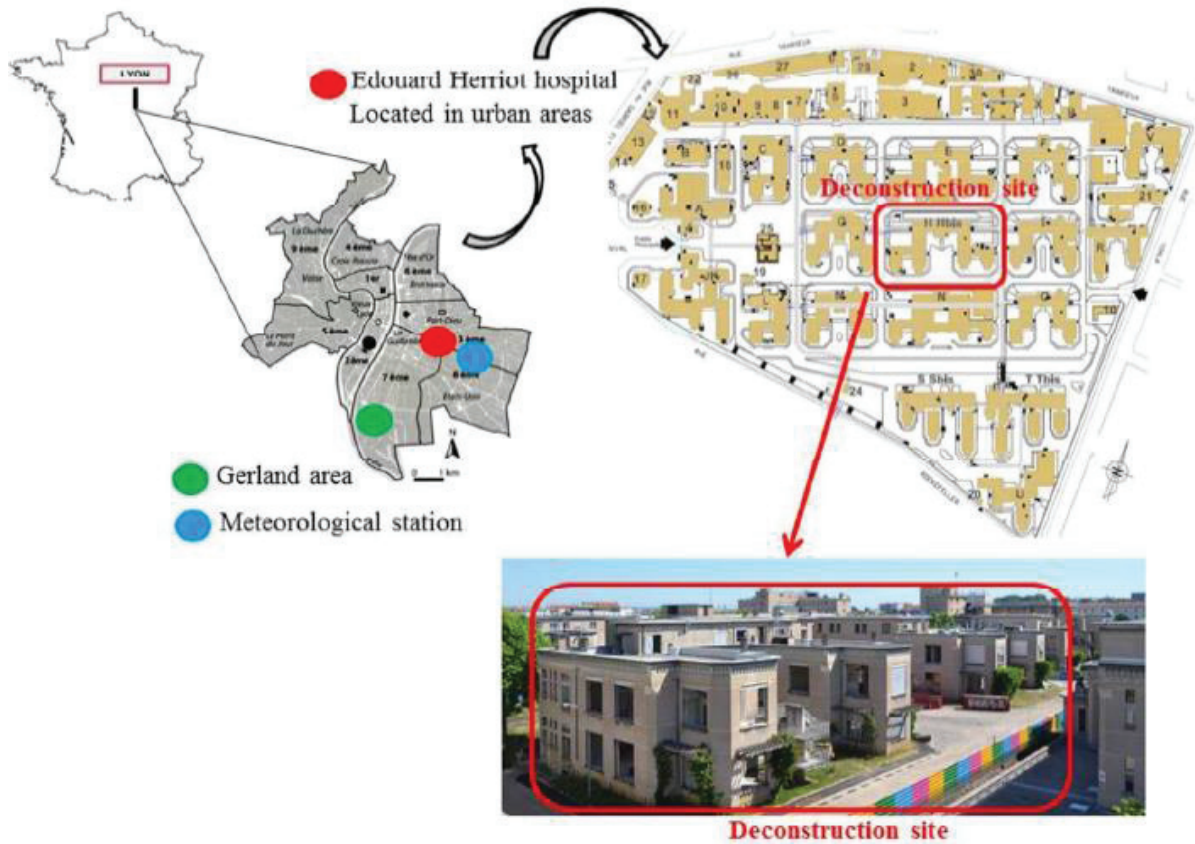
Figure 1: *Location of Edouard Herriot Hospital, Lyon (France)*

Figure 2: *Detailed map of Edouard Herriot Hospital and environmental monitoring sampling sites*

Figure 3: *Flow chart of protocol study*

For peer review only

Figure 1: Location of Edouard Herriot Hospital, Lyon (France)



254x190mm (96 x 96 DPI)

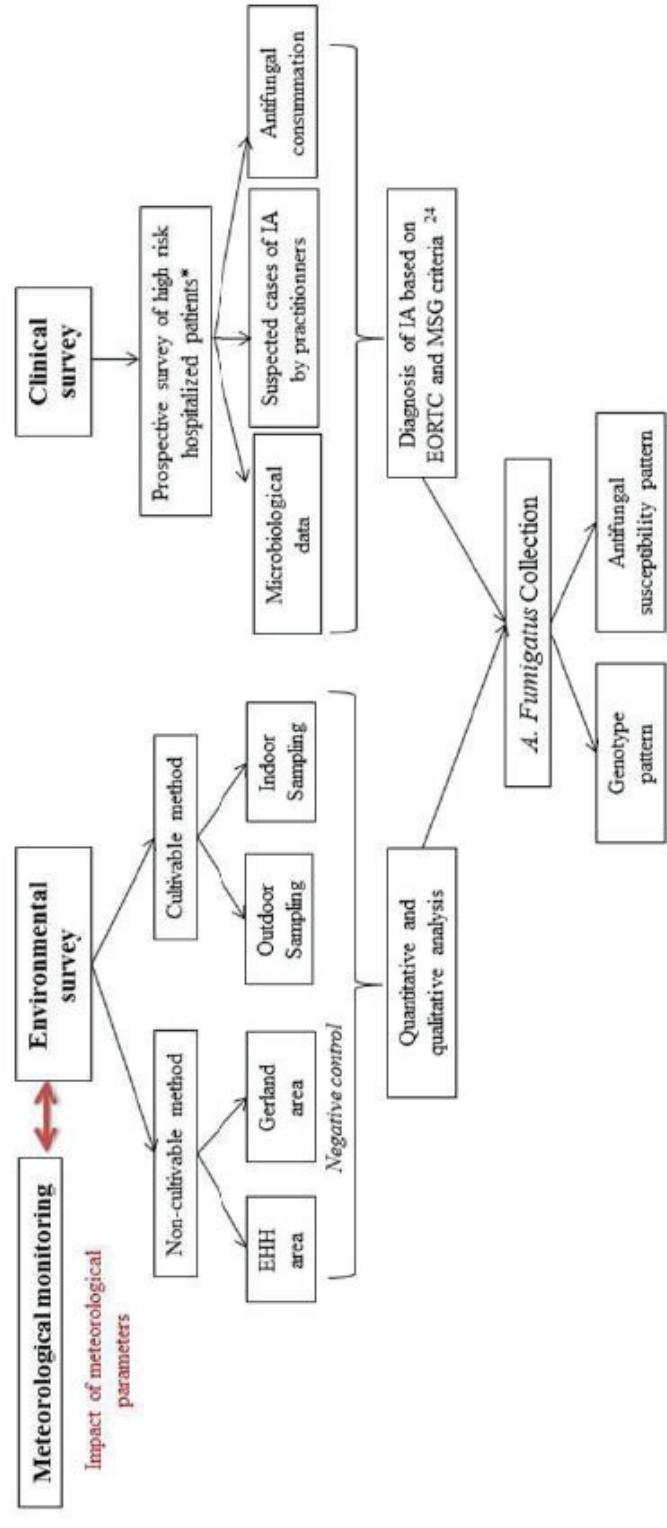
1
2 **Figure 2: Detailed map of Edouard Herriot Hospital and sampling sites of environmental monitoring**
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31



32 Detailed map of Edouard Herriot Hospital and environmental monitoring sampling sites

33
34 254x190mm (96 x 96 DPI)

Figure 3: Flow chart of protocol study



*Patients at high risk of IA are neutropenic

Flow chart of protocol study

350x190mm (96 x 96 DPI)

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48

RESULTATS

ARTICLE EN COURS

Pour répondre aux objectifs de cette thèse, les résultats des travaux effectués sont présentés sous leur format d'article publié, soumis ou en cours.

I) Article 1

Evaluation of preventive measures efficacy and meteorological parameters impacts on *Aspergillus* aerocontamination in hospital environment during major deconstruction works

*Evaluation de l'efficacité des mesures de prévention et de l'impact des paramètres météorologiques sur l'aérocontamination environnementale à *Aspergillus* à l'hôpital durant une période de travaux majeurs.*

En France, lors de travaux en établissement de santé, des mesures de prévention sont mises en œuvre afin de réduire l'exposition des patients au risque fongique dégagé par le chantier. Le diagnostic du risque aspergillaire potentiel pour chacun des services de l'établissement prend principalement en compte la nature des travaux, la situation du service par rapport au chantier et la spécialité du service concerné.

En effet, la présence d'un chantier de démolition peut augmenter la charge fongique de l'air d'un taux de 10^5 (Streifel *et al.*, 1983). De même, les facteurs météorologiques semblent influencer la concentration de spores fongiques dans l'air (Cavallo *et al.*, 2013 ; Pilmis *et al.*, 2017).

Récemment, l'étude de Brenier Pinchart *et al.*, a permis de mettre en avant l'importance du respect des mesures de protection pour diminuer l'exposition des patients aux spores fongiques. Cependant, cette étude reste limitée à un service très protégé (hématologie) or l'épidémiologie des infections fongiques invasives changent depuis quelques années, apparaissant chez des patients non-neutropéniques, traités aux long cours par corticostéroïdes ou des traitements immunosuppresseurs (Gangneux *et al.*, 2008). Ainsi, lors de travaux, des mesures de prévention du risque aspergillaire sont également à implémenter et contrôler dans certains services de médecine conventionnels exposés au chantier. Afin de détecter les variations de concentrations fongiques dans l'air, il est suggéré de réaliser des prélèvements environnementaux extérieurs et intérieurs (Cheng *et al.*, 2001).

Dans cette étude, plusieurs services considérés à risque, incluant des réanimations et des services de médecine conventionnels ont été surveillés par le biais de prélèvements environnementaux extérieurs (porche du bâtiment) et intérieurs (chambre et couloir) permettant la réalisation de ratios de contamination environnemental à *Aspergillus* spp. « Extérieur versus Intérieur ». De même l'impact des de la variation des paramètres météorologiques sur la contamination à *Aspergillus* intérieure et extérieure ont été étudiés.

Ainsi, l'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'efficacité des mesures de prévention mise en place dans les différents services pour réduire la contamination environnementale intérieure à *Aspergillus* spp. L'impact de la variation des paramètres météorologiques sur la contamination à *Aspergillus* intérieure et extérieure a également été étudiée.

Ce travail a été réalisé pour la partie prélèvement durant la première année de ma thèse et pour la partie analyse, les deux dernières années. Mon implication personnelle a été de designer le protocole de l'étude, de réaliser la campagne de prélèvements environnementaux mais aussi d'analyser et interpréter les résultats microbiologiques obtenus. J'ai également participé à l'analyse et l'interprétation des résultats statistiques et participé à la rédaction de l'article

Evaluation of preventive measures efficacy and meteorological parameters impacts on *Aspergillus* aerocontamination in hospital environment during major demolition works

Loeffert S¹, Gustin MP², Hénaff L¹, Cassier P³, Dananché C^{1,4}, Bénet T¹, Vanhems P^{1,4}

¹Equipe Epidémiologie et Santé Internationale, Laboratoire des Pathogènes Emergents –
Fondation Mérieux, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm U1111, CNRS
UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France

²Département de Santé Publique, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques –
Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon 1, France

³Laboratoire de Biologie Sécurité Environnement, Groupement Hospitalier Centre, Hospices
Civils de Lyon, France

⁴Unité d'Hygiène, Epidémiologie et Prévention, Groupement Hospitalier Centre, Hospices
Civils de Lyon, France

Text body: words (Introduction to Discussion)

Introduction

Invasive fungal infections is a major threat in immunocompromised patients due to the substantial economic cost of patient care and to their high incidence and related mortality.^{1,2} Its epidemiology has changed in recent years, surfacing in non-neutropenic hosts treated with corticosteroids or life-long immunosuppressants.^{3,4} Fungal infection occurs through inhalation of airborne conidia spores with various consequences such as immune-allergic reactions or invasive aspergillosis (IA) caused by filamentous fungi such as opportunistic fungi *Aspergillus*.^{5,6} Spores may be suspended during demolition and exposed immunocompromised patients to severe invasive aspergillosis (IA).^{7,8} Specific guidelines of protective measures against fungal contamination must be applied during all construction activity in healthcare establishment.⁹⁻¹¹ In the 80's an epidemiological retrospective study, conducted at our hospital (Edouard Herriot hospital, France,) which was undergoing renovations, highlighted the importance of protective measures for clinical units in order to limit fungal dispersion.¹² Similarly, a quasi-experimental study was realized at our hospital between 2005 and 2006 and permitted to emphasize the importance of environmental factors monitoring in case of IA prevention.¹³

Since now, only few studies have evaluated the impact of outdoors parameters like meteorological factors or indoor factors such as preventive measures taken, on fungal contamination.¹⁴⁻¹⁶ However to our knowledge no study has evaluated the efficacy of protective measures implemented during construction works on reducing *Aspergillus* contamination, by testing the relation between *Aspergillus* aerocontamination outdoor and indoor units.

So, in this context, the demolition of the central block (6 ha) of our hospital while care activities continued in the near blocks has let place to the implementation of outdoor and indoor monitoring strategies to limit fungal exposure. The aim of this study was to evaluate

the efficacy of protective measures in reducing *Aspergillus* contamination in the indoor environment of hospital units during demolition works. Its secondary objectives were to determine whether internal factors or outdoor factors could influence the indoor contamination at *Aspergillus*.

METHOD

Site and time of surveillance

Edouard Herriot hospital is a 800 beds (9,000 hospital stays per year) University affiliated hospital built in the 1930s in Lyon, France. The hospital is composed of 32 independent blocks on a 15.5 ha site and is involved in a major renovation program (video in the supplementary Appendix). A block of 0,6 ha located at the center of the hospital has been entirely demolished in 2015 to let place to the construction of 2.5 ha new building composed of technical equipment (operating rooms, intensive care units (ICUs), heliport). Three periods of demolition were realized in 2015: Gutting and asbestos removing between January and June (Period A), the demolition of the floors in July and August (Period B) and finally the excavation and earthmoving from September to December (Period C).

Environmental surveillance

A prospective environmental monitoring outdoor and indoor units was implemented in Edouard Herriot hospital out for a 11-months period from February 8th 2015 to December 17th 2015 (Figure 1). This study included 8 medical wards for environmental sampling located around the deconstruction site of our hospital. Environmental survey was realized twice a day in 2 groups depending on their air handling system. A group of wards with fine particular filters composed of four (ICU-1 to ICU-4), one unit of kidney and pancreas transplantation (KPT) and a group of conventional wards with coarse filters composed of three different

medical wards (MU-1 to MU-3) (Figure 1). Each sample was gathered by agar impact sampler (Air Ideal[®], bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) with an air intake velocity of 100L/min, in 90-mm diameter Petri dishes containing Sabouraud Chloramphenicol agar. Two plates were seeded at each sample site. Each outdoor plate was seeded for 1 min. Indoor plates were seeded for 2½ min, resulting in air volume of 250 L. One of these plates was incubated for 48 h at 37°C to grow thermotolerant *A. fumigatus* species.¹⁷ The other plate was incubated for 5 days at 30°C to allow growth of all fungi. Colonies were then counted and identified at the genus level on the basis of macroscopic and microscopic characteristics (lactophenol blue-stained preparations). The data are expressed as colony-forming units per cubic meter. The study protocol has been described in detail elsewhere (*BMJ Open*) and this study described surveillance results.

Preventive hygiene measures during building work

Several preventive measures were taken in units. Doors and windows just in front of demolition site were maintained closed on days and allowed for opening at night. Patient and medical staff movements were limited and special traffic patterns were designed. Furthermore, masks were mandatory outside wards to limit fungal exposure. Adhesive decontamination carpets were installed at the entry of wards. Finally, visitor, patient and medical staff were alerted about fungal exposure due to the demolition site. In case of high fungal exposure, intensive cleaning was realized. Then at each sampling time, two parameters of behavioral practices were recorded, the presence of unit or room doors left open and the presence of open windows.

Preventive measures were also implemented outdoor, at the demolition site to limit fungal dispersion. Construction site team received information about IA risks. Works were mandatory in humid environment by regular humidification. Furthermore, ruined buildings

rubbles were humidified and covered for evacuation. Circulation pattern for rubbles evacuation was also designed. Damp cleaning of demolition site roads were frequently realized with, in addition, cleaning of trucks wheels.

Statistical analysis

Fungal load were reported as mean \pm SD (n; min-max). The mean and SD were retained because the median often equaled 0 due to the skewed distribution. The ratios of indoor *Aspergillus* spp contamination on outdoor contamination were computed for each type of ward: with or without fine air filtration. The percentage of negative and positive sample for different fungal strains (*Aspergillus* Fumigatus/other *Aspergillus* spp/ other filamentous fungi) were computed.

Association between *Aspergillus* spp contamination and covariates (construction works, behavioral practices, sample location) were performed using binomial regression with presence of *Aspergillus* spp as response (Y) and with log link to expressed results in terms of relative risk (RR). Interactions of covariates on *Aspergillus* spp presence were tested in the full model before fitting additive model. Results in terms of RR were reported for the final simplified model. Firstly periods and sample location (outdoor, indoor with or without air filtration) were taken as covariate to study the effect of demolition work and samples location on *Aspergillus* spp presence. Secondly the behavioral practices were taken into account in the regression by defining a new covariate with 5 levels: outdoor samples, the combination of the variable indoor location (with or without air filtration) and the variable behavior (doors and windows closed / doors or window opened). The full binomial regression was fitted with covariates period and group to study the effect of behavioral practices on *Aspergillus* spp

presence adjusted for period. Logistic regression was used to study the effect of meteorological conditions on *Aspergillus spp.* contamination. P-values <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Environmental filamentous fungal flora sampled

A total of 3709 air samples were realized between February 23th, 2015 to December 17th, 2015. During this 11-months study, the numbers of air samples collected were of 1744 outdoor, 1156 indoor (conventional) units with coarse air filtration and of 809 indoor (protected) units with fine air filtration systems. Fungal floras were found in 2308 of 3709 samples. *Aspergillus spp.* was identified in 41.1% of the air samples with *A. fumigatus* being the most common species retrieved (66.7%) (Figure 2).

Aspergillus spp. concentrations during the 3 demolition periods

Aspergillus spp. were found in 1,089 of 1,899 samples dedicated to its analysis. 880 samples were collected outdoor, 594 indoor units with coarse air filtration and of 425 indoor units with fine air filtration systems. The presence of *A. fumigatus* was specifically studied and showed the same trend than *Aspergillus spp.* among groups of units, during the demolition periods (Figure). However, during the period of building floors demolition and the beginning of the excavation, *A. fumigatus* was not the species of *Aspergillus* the most retrieved.

Mean values and ranges of *Aspergillus spp.* loads of air samples collected outdoor and indoor units during the 3 different demolition periods are presented in table I. The mean load of *Aspergillus spp.* collected in outdoor samples varied during gutting and asbestos from 8.6 to 15.5 CFU/m³, between 20.1 and 22.3 CFU/m³ in building floors demolition and from 44.1 to 117.5 CFU/m³ in excavation and earthmoving period.

The presence of *Aspergillus* spp was significantly associated with the demolition periods ($p < 10^{-24}$, additive model) and the sample location ($p < 10^{-73}$, additive model) without significant interaction ($p = 0.59$, full model) i.e. the period effect on *Aspergillus* spp presence was similar for each location. Whatever the location *Aspergillus* spp had 1.25 (95% IC 1.08-1.44) times more chances to be present in period B than period A. Similarly, *Aspergillus* spp had 1.77 (95% IC 1.58-1.97) times more chances to be present during the excavation and earthmoving (period C) than period A.

Analyze of location effect on *Aspergillus* spp presence whatever the risk period permitted to observe that group of wards with fine air filtration was significantly less contaminated than the group of conventional wards with only coarse filtration system. The risk of *Aspergillus* spp presence was 3.14 (95% IC 2.51-3.93) higher indoor without than with fine air filtration system. Similarly, the risk of *Aspergillus* spp presence was 1.33 (95% IC 1.19-1.49) times higher outdoor than indoor without particular air filtration.

Influence of preventive measures in reducing environmental *Aspergillus* aerocontamination

During all the study, ratios Outdoor vs Indoor (O/I) of *Aspergillus* spp. loads were calculated for the two groups of units (Table II). Ratios (> 1) of both groups displayed a decrease of *Aspergillus* spp. loads inside except for two cases (ratios of 0.83 and 0.85), demonstrating the efficacy of fine air filtration applied to indoor units. The lowest O/I ratios (0.83 and 0.85) were found for the group of units with and without fine air filtration during March and May respectively where indoor peaks of *Aspergillus* spp. (March: 581 CFU/m³ and May: 514 CFU/m³) were found in one unit belonging to the group. The largest differences for the O/I ratios were found in October (83.24) and November (75.31) only in wards with fine air filtration in autumn during the excavation and earthmoving. The preventive measures

recommended indoor units, (in particular maintaining unit entrance door and all windows closed) to prevent dust and spores from entering were implemented in our hospital between March and April 2015.

The presence of doors or open windows in units was associated with an increase in the risk of *Aspergillus* spp presence adjusted for period even when units had fine filtration air. Interaction of period and group was not significant ($p=0.27$). When door or windows were open the risk of *Aspergillus* spp presence was multiplied by 1.80 (95% IC 1.05-3.09, $p = 0.03$) for units with fin air filtration and by 1.34 (95% IC 1.08-1.65, $p = 0.007$) for units without fine air filtration. In these two types of units the risk of *Aspergillus* spp presence increased outdoor compared to indoor: by 4.73 (95% IC 3.58-5.59, $p<10^{-39}$) and by 1.44 (95% IC 1.26-1.65, $p<10^{-6}$) respectively. The contamination mean confirmed these results except for the units with fine air filtration during the demolition of floor period because of the hot weather in summer and the weak *Aspergillus* spp contamination whatever the opening status (1.58 and 1.33) (Table 3).

Meteorological factors variations during the study periods

Demolition periods highly correspond with season: End of winter-Spring: Gutting and asbestos removing (Period A), summer: floors deconstruction (Period B) and Autumn – beginning of winter (cold season): excavation and earthmoving (Period C). Consequently, we evaluate the impact of meteorological factors on *Aspergillus* spp. contamination according to each demolition period. Meteorological parameters and variations in outdoor according to the period of demolition work are shown in Supplementary Appendix (Table SI). The outdoor relative humidity was variable during the study period with the higher mean value of 70.1% (SD 15.8) during the excavation and earthmoving step (period C). The lowest mean of 43.4% (SD 13.8) was found during the major heatwave in period B. Wind speed mean was during

the 3 periods of demolition steps over 10 km.h^{-1} and ranged between 10.9 and 15.7 km.h^{-1} . The two more frequent wind directions were North and South.

Impact of meteorological parameters on *Aspergillus* aerocontamination

We found that some outdoors factors influenced significantly the probability of indoor *Aspergillus spp.* level (Table IV). For outdoor contamination ($n=880$), relative humidity ($p=0.04$), rainfall ($p=0$) and temperature ($p=0.05$) have a significant effect on *Aspergillus spp.* contamination Table IV (A)). Similar results were obtained for *Aspergillus spp.* indoor contamination ($n=1111$) in the 8 wards around demolition site (Table IV (B)). In multiple analysis, relative humidity was significant during the 2 periods: Gutting and asbestos removing (February to June, $p=0.003$) and excavation and earthmoving period in autumn ($p=0.001$). During demolition of building floors, wind direction coming from South (vs North) highly influenced indoor *Aspergillus spp.* contamination (RR=1.7 IC95% (1.1-2.8), $p=0.01$). In excavation period, corresponding to Autumn and beginning of colder season, relative humidity was associated with a decreased of indoor contamination (RR=1.2, IC95 % (1.1-1.3), $p=0.001$). Univariate analysis also highlighted the importance of relative humidity on relative risk presence of *Aspergillus spp.* (Fig. S2 in the supplementary appendix). Outdoor, relative humidity seem associated with temperature (Fig. S2 (A)) resulting in high relative risk of *Aspergillus spp.* presence when temperature are low ($<15^{\circ}\text{C}$) and relative humidity is high (between 70-100%). Interestingly, low relative risk of *Aspergillus spp.* presence could also be associated with high temperature ($20-37^{\circ}\text{C}$) and high relative humidity (between 70-100%). So, high temperatures seems to decrease relative humidity influence on *Aspergillus spp.* presence. Indoor relative risk of *Aspergillus spp.* presence could be associated with intermediate relative humidity (between 20-60 and high relative humidity ($>70\%$) inside building seems to decrease *Aspergillus spp.* contamination (Fig. S2 (B)).

DISCUSSION

During a 11-month period, environmental fungal contamination indoor and outdoor high risk units was prospectively monitored to evaluate whether preventive measures taken during demolition works were effective enough to reduce environmental contamination indoor. Some outdoors factors as the type of demolition works and the variations of meteorological parameters, but also internal factors by evaluation of preventive measures compliance were recorded.

As found by several recent studies, non-*Aspergillus* fungi were the most frequently recovered fungi.¹⁸⁻¹⁹ Indeed, positive samples with *Aspergillus* were monthly recovered from 28 to 64.3% of samples. From those samples, *A. fumigatus* was globally the most frequently fungi recovered with percentage ranging from 11.5 to 41.6%. Higher values *Aspergillus* with low *A. fumigatus* percentages during excavation corresponding to autumn season confirming previous studies.¹⁸

Only few studies have monitored *Aspergillus* spp. level indoor and outdoor units of hospital. A 12-months surveillance in Dijon hospital showed an outdoor mean of *Aspergillus* of 10.7 CFU/m³ (range: 4-20).¹⁸ Another study in Europe (Italy) have recorded *Aspergillus* loads from outside hospital environment ranging from 0 to 18.1 CFU/m³.¹⁶ To our knowledge, no study were realised in a demolition work background. In our study, monthly loads of *Aspergillus* spp. recovered outside varied from 8.6 to 117 CFU/m³ with a global mean of 33.3 CFU/m³. These results showed higher values, which could be, in part, explain by the major demolition works background happening during all the study.

Monthly indoor *Aspergillus* loads found in group of units with fine particle air filtration varied from 0.3 to 9.4 CFU/m³ (due to a peak of 581 CFU/m³), with a global mean of 2.2 CFU/m³. Higher values were found in group of conventional units, equipped of only

coarse filtration, with monthly means varying from 0.7 to 19.9 CFU/m³ and a global mean of 6.9 CFU/m³. Those data are in agreement with other studies showing differences in contamination between conventional and protected units.^{15,20}

However, for both group of units, indoor air was always found less contaminated than outdoor. Our study showed this relationship between outdoor and indoor (O/I) levels of *Aspergillus* spp. by weekly and monthly establishment of (O/I) ratios. Thus, ratios are hardly helpful to evaluate indoor factors contribution to limit environmental contamination, like preventive measures, which principally consisted in maintaining door entrance and windows closed.^{15,21} Ratios (O/I) of both groups confirmed the efficacy of preventives measures applied inside units to reduce the indoor environmental contamination coming from outside. Group of protected units, including 4 ICUs and one transplantation unit, were more protected than conventional units from outdoor contamination, except during end of February and March. In fact, global protective measures were only applied in end of March in all units, which could explain the differences obtained in (O/I) ratios of February and March. A higher differences in (O/I) ratios were observed between both group of units in June, corresponding to the beginning of monthly surveillance reports diffusion of those ratios by the infection control units of our hospital. These practises clearly help infection control practitioners to manage the conformity of preventive measures inside units.

Some outdoor and indoor factors could also influence those (O/I) ratios. In our study, variations in outdoor *Aspergillus* loads seem to be influences by the type of demolition works and seasons, parameters that are highly associated. Higher outdoor loads were found in August, which also correspond to the beginning of excavation and earthmoving period (period C).²² During period B of building floors demolition, a high heatwave happened in Lyon, which seems to have limited emission of spores. Or maybe, this could be related with the position of the sampler with respect to the position of the active demolition works.²³

The relation between meteorological factors and outdoor variations in *Aspergillus* spp. Concentration in the environment has been described in many studies. An increase of contamination have been correlated with an increase of humidity and/ or temperature outside but also sometimes with an increase of wind speed.^{16,24-25} Most frequently, highest loads of outdoor *Aspergillus* spores have been associated with autumn and summer.^{15,22}

In our survey, Temperature and relative humidity influenced outdoor *Aspergillus* contamination. Surprisingly, we observe an increase of indoor *Aspergillus* contamination in association with high relative humidity only for 2 periods of deconstruction works corresponding to spring season. Autumn, where excavation and earthmoving were realised showed a decrease of indoor *Aspergillus* contamination inside units when it is raining or when outdoor relative humidity increase outside. This could be explained by the already high relative humidity conditions present in autumn, but also by the opening of heating systems inside units which seem to influence indoor environmental situation and may be help to respect obligation of closing of windows. During the demolition of building floors period in July and August, wind direction from South highly impacted *Aspergillus* presence indoor unit. South and North direction are the two main wind directions recovered in our study. These directions make spores crosses all through hospital. So it seems important to identify major wind direction crossing hospital in order to help implementation of prevention measures inside units. Interestingly, as found by Brenier Pinchart *et al*, the outdoor meteorological factors permitted to explain some variations in indoor *Aspergillus* contamination, even if some other internal factors have to be computed for a precise analysis. In general, those observations are in agreement with previous works^{15,16}

Some behavioural practises were also monitored (each time an air samples was realized inside unit, opening of unit windows and door were recorded) in order to observed the influence on *Aspergillus* spp. contamination. Our results confirmed previous study of

Brenier Pinchart *et al*, showing a statistical influence of leaving open windows and door of the unit on *Aspergillus* spp. contamination level.

This study has some limits, as no sampling could be realized before beginning of demolition works. Moreover, the presence of movable objects or the number of people during the sampling inside units could not be monitored.

In conclusion, the large number of outdoor and indoor air samples collected allows us to assess efficacy of protective measures taken inside units for reducing environmental contamination. In protected and conventional units, protective measures implemented were efficient in reducing *Aspergillus* spp. loads. This study draws attention to the utility of maintaining doors entrance and windows of units closed to significantly reduce indoor contamination. Outdoors levels of *Aspergillus* are largely influenced by meteorological parameters and by the type of demolition works. According to our data, we recommended to realized demolition works, in particular excavation during winter and cold seasons. Our study also showed the utility of using (O/I) ratios and outdoor meteorological parameters, as prevention tools to assess *Aspergillus* environmental contamination indoor units.

Acknowledgments

The authors thank ANIOS Laboratories, France, for participating in this study by providing PhD support to Sophie Loeffert (by CIFRE: Convention Industrielle de la Formation par la Recherche). ANIOS Laboratories was not involved in the study design, analysis, results interpretation and discussion.

REFERENCES

- [1] Chang C.C, Ananda-Rajah M, Belcastro A, *et al.* Consensus guidelines for implementation of quality processes to prevent invasive fungal disease and enhanced surveillance measures during hospital building works. *Internal Medicine Journal.* 2014;44.
- [2] Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Inf Dis.* 1998; 26:781-805
- [3] Gangneux JP, Camus C, Philippe B. Epidemiology of and risk factors for invasive aspergillosis in nonneutropenic patients. *Rev Mal Respir* 2008;25(2):139-53.
- [4] López-Medrano F, Silva JT, Fernández-Ruiz M, *et al.* Risk factors associated with early invasive pulmonary aspergillosis in kidney transplant recipients. Results from a multinational matched case-control study. *Am J Transplant* 2016;16(7):2148-57.
- [5] Marr KA¹, Patterson T, Denning D. (2002). Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations and therapy *Infect Dis Clin.* 16:875-94.
- [6] Garcia-Vidal C, Upton A, Kirby KA, Marr Ka. Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clin Inf Dis.* 2008; 47:1041-50.
- [7] Kanamori H, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE, Weber DJ. Review of Fungal Outbreaks and Infection Prevention in Healthcare Settings During Construction and Renovation. *Healthcare epidemiology.* 2015;61(3):433–44.
- [8] Vonberg R.P, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect.* 2006;63:246-254.
- [9] Consensus conference. preventing the risk of *Aspergillus* infection in immunocompromised patients. *Bull Cancer* 2001;88:589-600.

- [10] Gangneux JP, Adjide' CC, Bernard L, *et al.* Quantitative assessment of fungal risk in the case of construction works in healthcare establishments: proposed indicators for the determination of the impact of management precautions on the risk of fungal infection. *J Mycol Med* 2012;22:64e71
- [11] Risque infectieux fongique et travaux en établissements santé: Identification du risque et mise en place de mesures de gestion. *Hygiène*. 2011; 19.
- [12] Perraud P, Piens MA, Nicoloyannis N, Girard P, Sepetjan M, Garin JP. Invasive nosocomial pulmonary aspergillosis: risk factors and hospital building works. *Epidem. Infec.* 1987; 99:407-412.
- [13] Nicolle M-C, Bénét T, Thiebaut A, Bienvenu A-L, Voirin N, Duclos A, Sobh M, Cannas G, Thomas X, Nicolini F-E, De Monbrison F, Piens M-A, Picot S, Michallet M, Vanhems P. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: incidence and description of 127 cases enrolled in a single institution prospective survey from 2004 to 2009. *Haematologica*. 2011; 96:1685-169.
- [14] Fournel I., Sautour M., Lafon I., Sixt N., L'Ollivier C, Dalle F., Chavanet P., Couillaud, G., Caillot D., Astruc K., Bonnin A., Aho-Glélé S.L. Airborne *Aspergillus* contamination during hospital construction works: Efficacy of protective measures. *Am J Infect Control*. 2010; 38(3):189-194.
- [15] Marie-Pierre Brenier-Pinchart, Bernadette Lebeau, Jean-Louis Quesada, Marie Reine Mallaret, Jean-Luc Borel, Annie Mollard, Frédéric Garban, Jean-Paul Brion, Lysiane Molina, Jean-Luc Bosson, Jean-Yves Cahn, Renée Grillot, Hervé Pelloux. Influence of internal and outdoor factors on filamentous fungal flora in hematology wards. *Am J Infect Control* 2009;37:631-7

- [16] Cavallo M, Andreoni S, Martinotti MG, Rinaldi M, Fracchia L. Monitoring environmental *Aspergillus* spp. contamination and meteorological factors in a haematological unit. *Mycopathologia*. 2013;176(5-6):387-94.
- [17] Boff C, Brun CP, Miron D, *et al*. Technical note: The effect of different incubation temperatures on the recovery of *Aspergillus* species from hospital air. *Am J Infect Control* 2012;40:1016-7.
- [18] Marc Sautour, Nathalie Sixt, Frédéric Dalle, Coralie L'Ollivier, Vitalie Fourquenot, Céline Calinon, Kusum Paul, Stéphanie Valvin, Alix Maurel, Serge Aho, Gérard Couillault, Claire Cachi, Odile Vagner, Bernadette Cuisenier, Denis Caillot, Alain Bonnin. Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. *Science of the Total Environment* 407 (2009) 3766–3771.
- [19] Pilmis B, Thepot-Seegers V, Angebault C, Weiss E, Alaabouche I, Bougnoux ME, Zahar JR. Could we predict airborne *Aspergillus* contamination during construction work? *Am J Infect Control*. 2017;45(1):39-41. doi: 0.1016/j.ajic.2016.08.003.
- [20] Reboux G., Gbaguidi-Haore H., Bellanger A.P., Demonmerot F., Houdrouge K., Deconinck E., Bertrand X., Millon L. A 10-year survey of fungal aerocontamination in hospital corridors: a reliable sentinel to predict fungal exposure risk? *Journal of Hospital infection*. 2014; 87:34-40.
- [21] Berthelot P, Loulergue P, Raberin H, *et al*. Efficacy of environmental measures to decrease the risk of hospital-acquired aspergillosis in patients hospitalised in haematology wards. *Clin microbiol Infect*. 2006;12 : 738-44.
- [22] Guinea J, Pela'ez T, Alcalá' L, Bouza E. Outdoor environmental levels of *Aspergillus* spp. conidia over a wide geographical area. *Med Mycol*. 2006;44:349–56.

- [23] Tormo Molina R, Maya Manzano JM, Fernández-Rodríguez S, Gonzalo Garijo A, Silva Palacios I. Influence of environmental factors on measurements with Hirst spore traps. *Grana* 2013;52(1):59-70
- [24] Li DW, Kendrick B. A year-round study on functional relationships of airborne fungi with meteorological factors. *Int J Biometeorol.* 1995;39:74–80.
- [25] Rüping MJGT, Gerlach S, Fischer G, et al. Environmental and clinical epidemiology of *Aspergillus terreus*: data from a prospective surveillance study. *J Hosp Infect.* 2011;78:226–30.

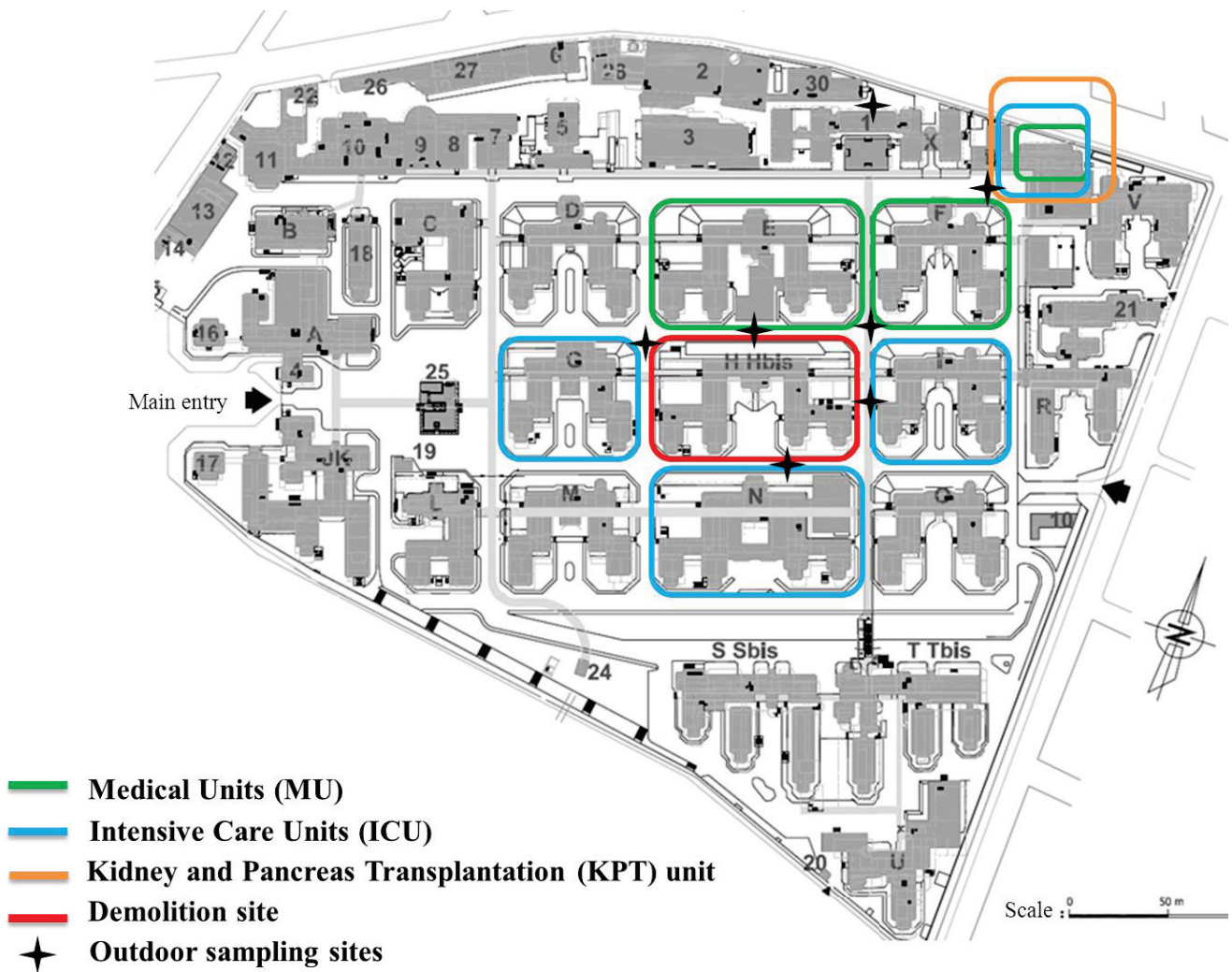


Figure 1: Location of indoor and outdoor sampling site at Edouard Herriot Hospital, Lyon, 2015

Table I: Concentration of *Aspergillus* spp. for the two groups of units (with air filtration or without) for each monitored month (2015).

		<i>Aspergillus</i> spp.		
Demolition period	Months	Outdoor *	Indoor * (with air filtration)	Indoor * (without air filtration)
	February	10.1±17.4(24;0-61)	4.1±10.6(16;0-37)	0.7±1.6(12;0-4)
	March	8.6±14.7(102;0-81)	9.4±70.9(67;0-581)	2.7±4.8(48;0-16)
Gutting and asbestos	April	14.5±33.2(96;0-272)	1±3.2(71;0-20)	6.5±18.2(48;0-96)
	May	11.8±24.8(71;0-133)	0.9±2.2(47;0-8)	17±86.6(35;0-514)
	June	15.5±32(80;0-175)	0.3±1.3(57;0-8)	2.7±5(35;0-20)
demolition of floors	July	22.3±68(95;0-456)	0.9±3(68;0-16)	4.3±8.9(47;0-40)
	August	20.1±26.1(102;0-153)	2.3±8.4(59;0-61)	3.5±5.4(44;0-20)
	September	117.5±148.4(98;0-835)	3.3±9.7(64;0-70)	19.9±40.4(51;0-251)
Excavation and earthmoving	October	50.7±66.3(80;0-360)	0.6±1.6(58;0-8)	5.4±6.5(42;0-20)
	November	48±58(85;0-288)	0.7±2.1(59;0-12)	3.7±5(41;0-20)
	December	44.1±82.5(47;0-398)	0.6±3(28;0-16)	10±18.2(22;0-66)

*Data are expressed as mean±SD(n;min-max)

Figure 2: Percentage of positive samples in air and fungi repartition of environmental sampling, Edouard Herriot hospital, 2015.

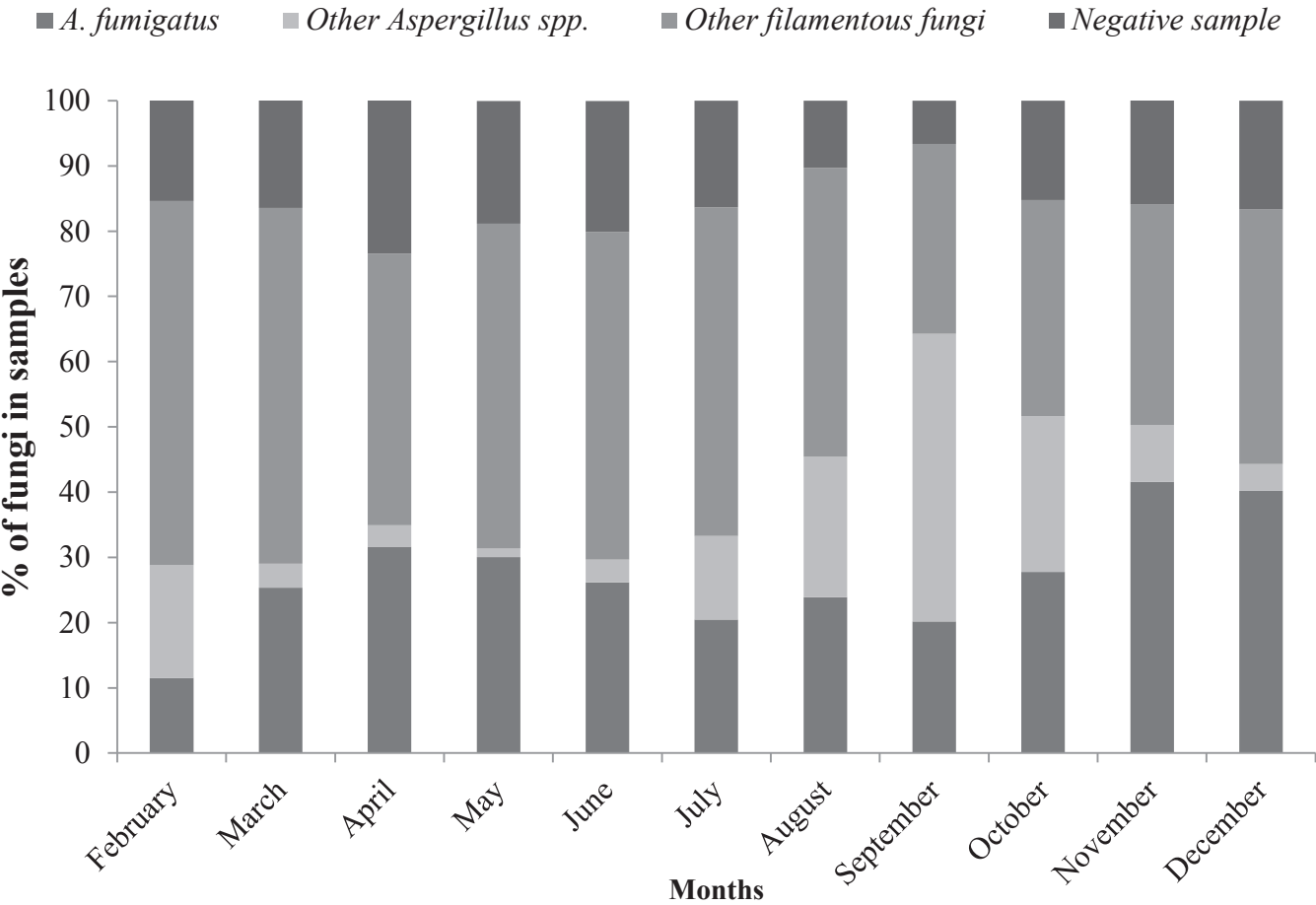


Table II: Ratio of outdoor on indoor mean contamination of *Aspergillus* spp according to months and with or without fine air filtration

Demolition period	Month	Ratio (Outdoor /Indoor)	
		Wards with fine air filtration	Wards without fine air filtration
Gutting and asbestos	February	3.74	15
	March	0.83	2.19
	April	15.68	2.93
	May	12.65	0.85
	June	71.77	2.49
Demolition of floors	July	15.49	12.87
	August	8.69	7.13
Excavation and earthmoving	September	34.27	6.72
	October	83.24	10.07
	November	75.31	11.6
	December	70.64	4.82

Table III: Influence of windows and doors opening/closing on *Aspergillus* spp. contamination inside wards (with or without fine air filtration systems)

Period	OUTDOOR*	INDOOR*			
		With		Without	
		CLOSED	OPEN	CLOSED	OPEN
Gutting and asbestos	12.3 (373;0-272)	3 (243;0-581)	6.2 (15;0-37)	2.5 (102;0-96)	11.6 (76;0-514)
Demolition of floors	21.2 (197;0-456)	1.6 (112;0-61)	1.3 (15;0-12)	3.5 (69;0-32)	5.3 (22;0-40)
Excavation and earthmoving	70.1 (310;0-835)	1.4 (191;0-70)	1.8 (18;0-12)	10.0 (132;0-251)	12.1 (24;0-81)

*Data are expressed as mean (n;min-max)

Table IV: Impact of meteorological parameters on outdoor (A) and indoor (B) contamination of *Aspergillus* spp.

Outdoor <i>Aspergillus</i> spp. contamination						
Meteorological parameter	Period A		Period B		Period C	
	RR (IC 95%)	p-value	RR (IC 95%)	p-value	RR (IC 95%)	p-value
Relative humidity						
<30%	4.39 (0.6-29.4)	0.13				
70-80%	7.36 (1.1-49.4)	0.04				
>80%	5.45 (0.8-38.6)	0.09				
Temperature						
±10°C increase			1.30 (1-1.69)	0.05		
Rainfall					2.4 (1.2-6.5)	0
Indoor <i>Aspergillus</i> spp. contamination						
Meteorological parameter	Period A		Period B		Period C	
	RR (IC 95%)	p-value	RR (IC 95%)	p-value	RR (IC 95%)	p-value
Relative humidity						
±10% increase	1.2 (1.1-1.4)	0.003				
Wind direction						
South (vs North)			1.8 (1.1-2.7)	0.01		
Relative humidity					1.2 (1.1-1.3)	0.001

Supplementary Appendix

-Online video of Edouard Herriot demolition works in 2015:

<https://www.youtube.com/watch?v=Oa7xRufAnhQ>

Legend: This video represents a time lapse of demolition works of Edouard Herriot hospital, Lyon, France. This video represent one year (2015) of demolition works.

Table SI: Meteorological conditions at Edouard Herriot hospital (outdoor) Lyon, during demolition works periods in 2015.

Demolition period	Temperature (°C)		Relative Humidity (%)		Wind speed (Km/h)		Wind direction (n)		
	Mean	(Range)	Mean	(Range)	Mean	(Range)	North	South	Other
Period A: Gutting and asbestos	13.2	(-1.8; 34.3)	52.6	(22.5-87.3)	13.2	(1.5-40.8)	249	91	34
Period B: Demolition of floors	24.6	(11; 38.8)	43.4	(23.5-77.3)	15.7	(4-42.8)	111	64	19
Period C: Excavation and earthmoving	36.7	(-3.6; 27.3)	70.1	(32-100)	10.9	(1.5-62.5)	194	73	47

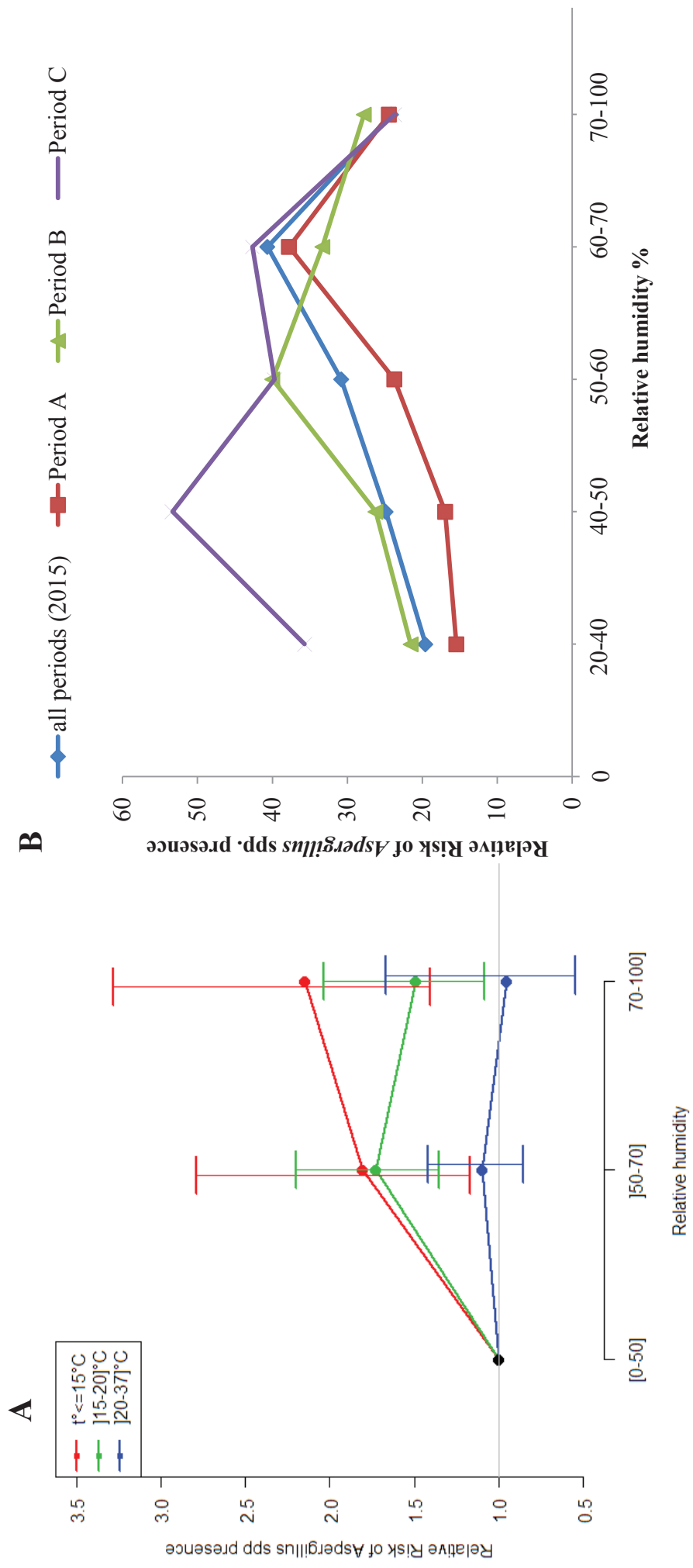


Figure S2: Effect of relative humidity on Relative risk of *Aspergillus* spp. presence (A) Outdoor, (B) Indoor, at Edouard Herriot Hospital (2015).

ARTICLE PUBLIE

I) Article 2

Comparison of the efficacy of two airborne disinfection products in reducing the *Aspergillus fumigatus* contamination from hospital false ceiling reservoirs

Comparaison de l'efficacité de deux produits désinfectants par voie aérienne pour la réduction de la contamination à A. fumigatus des réservoirs environnementaux des faux plafonds à l'hôpital. Article publiés en juin 2017 dans la revue *Canadian Journal of Infection Control*.

A l'hôpital, l'augmentation de l'incidence des AI a pu être associée avec la présence de travaux d'infrastructures qui entraînent la remise en suspension des spores de l'environnement. Les faux plafonds ont pu être identifiés comme réservoir connus d'*Aspergillus fumigatus*.: principale espèce causant l'aspergillose invasive (Garcia-Vidal *et al.*, 2008).

La manipulation de ces faux plafonds lors de travaux de maintenance ou de rénovation augmente l'exposition des patients à proximité aux spores d'*A. fumigatus* et ainsi le risque d'acquérir une AI (Perraud *et al.*, 2007). Afin de réduire le risque d'exposition des patients, Il est recommandé d'éliminer ces réservoirs environnementaux par la réalisation d'une désinfection adaptée. Certaines études ont montré le bénéfice de l'emploi de systèmes de désinfection des surfaces par voie aérienne pour le traitement de l'environnement hospitalier contre certaines bactéries tel que *Clostridium difficile* mais aussi *Pseudomonas aeruginosa* etc (Barbut, 2015; Fu *et al.*, 2012). Ces systèmes permettent d'atteindre quasiment toutes les surfaces d'un volume à traiter mais n'ont pas encore été évalués pour la désinfection des faux plafonds afin de réduire l'exposition des patients, lors de travaux de rénovation ou maintenance amenant à la manipulation des faux plafonds.

Ainsi dans le contexte de prévision de travaux majeurs à l'hôpital universitaire Edouard Herriot à Lyon, une stratégie de mise en place de mesures préventives spécifiques pour réduire le taux de spores d'*Aspergillus* dans l'air a été établie. Un pavillon entier de l'hôpital devait être déconstruit, alors que l'activité des pavillons à proximité, hébergeant des patients à risque a été maintenue. Ainsi, afin de diminuer le risque d'exposition des patients aux

réservoirs environnementaux d'*Aspergillus fumigatus* l'efficacité fongicide de deux produits désinfectants a été comparée. Les deux produits appartenant à la famille des désinfectants par voie aérienne sont constitués pour l'un, anciennement utilisé à l'hôpital, principalement par de l'acide hydroxyacétique (#AD1) et le nouveau produit est composé de peroxyde d'hydrogène et d'acide peracétique (#AD2).

Les deux objectifs de cette étude étaient les suivants :

- Améliorer notre appréciation du risque d'exposition fongique des patients situés à proximité lors des travaux des faux plafonds dans un service en estimant la concentration d'*A. fumigatus* présente sur les dalles de faux plafonds de 4 chambres d'un service médicale.
- Comparer l'efficacité des deux produits désinfectants (#AD1) et (#AD2) pour réduire la contamination à *A. fumigatus* des réservoirs environnementaux que constituent les faux plafonds

Ce travail a été réalisé préalablement à la déconstruction du pavillon H. Mon implication personnelle a été de designer le protocole de l'étude, de réaliser la campagne de prélèvement environnementaux de surface des dalles de faux plafonds mais aussi d'analyser et interpréter les résultats microbiologiques obtenus. J'ai également participé à l'analyse et l'interprétation des résultats statistiques et participé à la rédaction de l'article.

EMERGING TECHNOLOGY

Comparison of the efficacy of two airborne disinfection products in reducing the *Aspergillus fumigatus* contamination from hospital false ceiling reservoirs

Loeffert ST,¹ Gustin MP,² Cassier P,³ Bouch P,³ Lion C,³ Filoni M,³ Perraud M,³ Vanhems P^{1,4}

¹ Emergent pathogens Laboratory - Mérieux Fondation, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Inserm U1111, Lyon, France

² Institut of Pharmaceutical Sciences and Biology, Claude Bernard 1 University, Lyon, France

³ Environmental Safety and Biology Laboratory, Edouard Herriot hospital, Lyon, France

⁴ Hospital Hygiene-Epidemiology Unit, Edouard Herriot hospital, Lyon, France

Corresponding author:

Loeffert Sophie Tiphaine

sophie.loeffert01@chu-lyon.fr

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study was to compare, in a blinded design, antifungal efficacy of two airborne disinfectants (AD) for *Aspergillus*-contaminated false ceilings of hospital rooms.

Methods: Two types of ADs containing either hydroxyacetic acid (AD#1) or peracetic acid + H₂O₂ (AD#2) were tested for the disinfection of *A. fumigatus* on false ceiling of four hospital rooms. Airway disinfection involves non-directed spraying of disinfectants reaching all surfaces contained in a given volume.

Results: A total of 11 different false ceiling tiles were sampled before and after disinfection in each of the four rooms tested. Product AD#2 showed a Contamination Rate (CR) of *A. fumigatus* decreasing from 7.2 ± 6.5 colony-forming units (CFU)/m² (mean \pm SD) before to 2.5 ± 3.4 after disinfection (adjusted $p=0.05$). AD#1 had CR fall from 9.4 ± 8.5 CFU/m² to 7.9 ± 7.3 (adjusted $p=0.80$).

Conclusions: AD#2 is significantly more effective at eradicating *A. fumigatus*, thus representing a good alternative to environmental management of this pathogen in hidden reservoirs.

KEY WORDS

Aspergillosis, airborne disinfection, environment reservoir, hospital

INTRODUCTION

Aspergillus fumigatus is a filamentous, ubiquitous saprophyte fungus that causes invasive infections in immunocompromised patients, often with severe outcomes and 50-90% mortality (1,2). Contamination occurs by inhalation of airborne conidia spores, with various consequences, from allergy to invasive aspergillosis (IA) (3,4). The species evoking IA are mostly *A. fumigatus* (>80%), *A. flavus*, *A. terreus* and, rarely, *A. nidulans* (3). Incidence of IA has been associated mainly with fungal exposure due to infrastructure work (5-8). Persistence of fungal spores in hospital environment creates reservoirs which directly impact IA incidence (9-11). For several decades we have known that dust above false ceiling is an environmental niche for *Aspergillus* which can be re-suspended in the air when maintenance or renovation work are carried out (12). The most effective way of decreasing IA occurrence is to eliminate those reservoirs and avoid direct patient exposure to environmental *Aspergillus* conidia by an appropriate disinfection (13-14). Airborne disinfection comprises the non-directed

spraying of disinfectants onto surfaces within a determined volume, and can be ejected in dry or wet vapor forms. A fine particle aerosol is generated with particles settling onto surfaces and decontaminating them. The usual airborne disinfectant (AD) AD#1 used at our hospital include hydroxyacetic acid for false ceiling disinfection. Lately, another product comprised of hydrogen peroxide (H₂O₂) with peracetic acid has become available. In this study we evaluated the antifungal efficacies of two airborne disinfectants (AD) for decontamination of false ceilings from *A. fumigatus*.

METHODS

The study was conducted in one of the 32 blocks of an 800-bed teaching hospital in Lyon (France) in December 2014. The building was recently closed for subsequent demolition. This was an opportunity to evaluate the extent of contamination with *A. fumigatus*, and to test the technical feasibility of airborne disinfection within false ceilings of partly active medical wards.

Acknowledgements

The authors thank ANIOS Laboratories and LCB Food Safety industry, France, for their study participation by providing products free of charge. They were not involved in study design, analysis, results interpretation and discussion. Co-authors have no conflict of interest to declare.

Sampling strategy

Four similar rooms of a 24-bed medical unit were randomly selected for the study. The rooms were comparable in volume, location and exposure. Sampled false ceiling tiles were randomly assigned. Top of chosen tiles were entirely sampled with sterile wipes (Biomerieux®) before and a day after AD application (Figure 1). Tiles selected were measured in square meters (a mean of 1,65 m² of tiles located in center and 1,66 m² of tiles located at rooms corners) in order to report the *A. fumigatus* contamination measured to the surface sampled (CFU/m²).

Application of disinfection product

AD#1 contained 4% hydroxyacetic acid (80 mg/m³), and AD#2 contained 3% peracetic acid (~1,200 ppm) and 0.12% H₂O₂. Each AD was assigned to two different rooms out of the four rooms tested and applied by the same operator, as recommended by the supplier. Rooms were emptied and all openings were sealed during the disinfection period. In order to facilitate AD dispersion in false ceilings in the tested rooms, few tiles were slightly displaced just before AD application. Thus, chemical particles could saturate the room entirely and be active on all surfaces.

Plate incubation and reading

Sterile wipes were transferred into stomacher bags filled with buffered peptone water (200 ml) afterwards. For each sample, 1 ml was inoculated on yeast extract glucose chloramphenicol agar. Negative controls were realized with unused sterile wipes. Plates were incubated five days at 37°C and checked every 48 hours to observe *A. fumigatus* colonies growth. *A. fumigatus* colonies were counted, microscopically identified and expressed in colony-forming units per square meter (CFU/m²). Only *A. fumigatus* colonies were considered in this study.

Statistical analysis

Before this study began, preliminary tests were conducted on false ceiling tiles of another medical unit to ascertain the best sampling technique, between sampling by sterile wipes and agar impaction, for evidencing at least 75% of decontamination with a probability of 90% between the two groups (data not shown). Continuous data were reported as mean ± standard deviation (SD) for each condition (after and before disinfection) and each AD (AD#1 vs AD#2). The similarity of contamination distribution before disinfection among the four rooms was checked by the Kruskal-Wallis test. Then, contamination distribution was compared before or after disinfection vs AD#1 or AD#2, by Wilcoxon rank test leading to four statistical tests: i) before AD#1 vs before AD#2, ii) after AD#1 vs after AD#2, iii) before AD#1 vs after AD#1, and iv) before AD#2 vs after AD#2. We reported *p* values for each single test and *p* values adjusted for multiple (i.e., 4) comparisons with the Holm method (15). For all statistical tests, the two-tailed significance level was *p* ≤ 0.05.

RESULTS

A total of 11 different false ceiling tiles were sampled before and after disinfection in each of floor rooms tested leading to

FIGURE 1: Sampling of false ceiling tiles

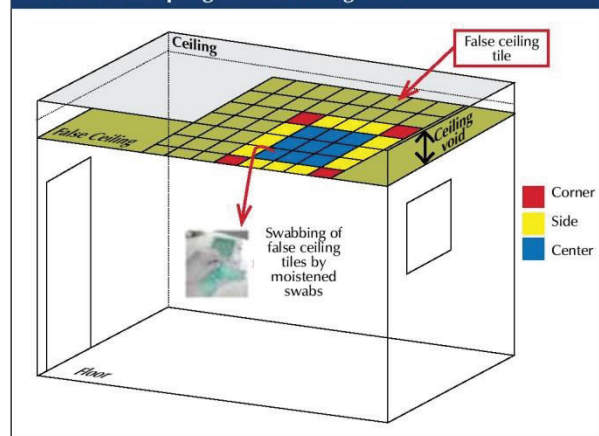
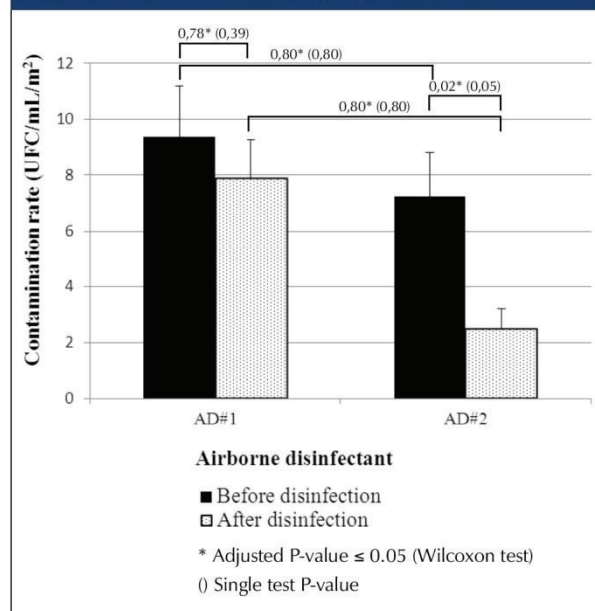


FIGURE 2: Evaluation of false ceiling tile contamination before and after disinfection with AD#1 vs AD#2



22 observations per occasion and product, i.e., a total of 88 observations. All 88 environmental samples were collected and processed for isolation of *A. fumigatus* colony.

Comparison of *A. fumigatus* load before and after disinfection with each AD

No statistically significant difference of *A. fumigatus* contamination was found between corner tiles and center tiles in the four rooms before or after disinfection. Similarly, no difference was found across the four rooms before disinfection (*p* = 0.72). Mean values (CFU/m²) before disinfection were: AD#1 vs AD#2: 9.4 ± 8.5 vs 7.2 ± 6.5 (*p* = 0.39, adjusted *p* = 0.78). The evolution of *A. fumigatus* contamination after AD

application is shown in Figure 2. Significant differences between the two products after disinfection were found. After AD, CFU/m² values were: AD#1 vs AD#2 against *A. fumigatus*: 7.9±7.3 vs 2.5±3.4 ($p=0.02$, adjusted $p=0.05$).

Efficacy of AD products on *A. fumigatus* tiles load

Fungal loads of *A. fumigatus* were compared before and after disinfection with AD#1 or AD#2. In the AD#1 group, the *A. fumigatus* contamination rate was 9.4±8.5 before and 7.9±7.3 CFU/m² after disinfection ($p=0.80$, adjusted $p=0.80$), whereas in the AD#2 group, the *A. fumigatus* contamination rate was 7.2±6.5 before and 2.5±3.4 CFU/m² after disinfection ($p=0.01$, adjusted $p=0.04$) (Figure 2). Reduction rates were 16% for AD#1 and 66% for AD#2 respectively.

DISCUSSION

AD#2, the new tested product, composed of H₂O₂ and peracetic acid vapor was effective against *A. fumigatus* as it delivered 66% reduction of environmental colonization vs. 16% for AD#1. Construction, renovation and maintenance work in healthcare facilities present a challenge to the safety of immunocompromised patients by exposing them to *Aspergillus* conidia re-suspended in the air. This mold is ubiquitous both indoors and outdoors, often growing behind walls and above false ceilings. To ensure safe environment for immunocompromised patients with respect to *Aspergillus*, it is important to reduce the airborne burden of conidia. It has already been demonstrated that IA rates can be decreased by enhancing environmental management around high-risk patients (9). We consider that one of the relevant ways to prevent the spread of these airborne pathogens is to reduce environmental reservoirs by using optimal products to reach this objective. Some have investigated the efficacy of airborne systems for the disinfection of some hospital environments and for infection control, but their antifungal efficacy has not been evaluated on false ceilings which expose high-risk patients to IA during maintenance/renovation work in hospital wards (16-17). Our investigation confirmed the high homogenous presence of *A. fumigatus* on the false ceilings of hospital units. To our knowledge no other study has investigated the contamination rate of *A. fumigatus* on false ceiling of hospital rooms and evaluated disinfection methods to prevent its spread during renovation/maintenance. The antifungal efficacy of both of the tested products complied with the French standards for fungicide activity (NF T 72-281). The main difference between the two technologies is the emission of chemical particles. One of the products, (AD#1), ejects particles in dry vapor form, whereas the other product (AD#2) occurs in wet vapor form. These products are used in different fields of work. AD#1 typically disinfects surfaces in the food industry and canteens, whereas AD#2 is mostly confined to medical device disinfection and sterilization in the pharmaceutical industry. AD#1 appears to be the least expensive product available and more suitable for hospital food service areas rather than ward disinfection. For application of these products, rooms need to be vacated and air vents sealed for several hours, depending

of the product applied and the volume of the room. While some studies have shown the effectiveness of those systems as an environmental disinfectant and infection control measure, this has still some limitations for use in real life settings, where wards are occupied by patients and rooms are rarely empty (16). In this study we tested these products in an empty ward in order to evaluate its efficacy for false ceiling disinfection before renovation work. No leakage of product was observed; so it seems that these products could be used in sealed part of wards undergoing renovation work even if the other parts of the wards remain active.

Our study has some limitations. Neither the kinetics of *Aspergillus* colonization on false ceiling tiles, nor the contribution of this source compared to other sources (surfaces, air, water) were estimated. The study focused only on one empty conventional medical ward and cost effectiveness was not assessed for both products which had different purchase prices.

CONCLUSION

This study highlighted the presence of environmental reservoir of *A. fumigatus* on hospital false ceiling. The new product, AD#2 appears to be the most efficient for *A. fumigatus* eradication from room false ceiling. Our data indicate that airborne disinfection devices can help prevent Aspergillosis risk from hidden environmental reservoirs, such as false ceilings in hospitals by lowering the *A. fumigatus* bioburden present on tiles just before removing it for infrastructure facility. Our findings also showed that this protocol seems possible in a sealed part of an active hospital ward undergoing renovation.

REFERENCES

1. Nicolle MC, B net T, et al. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: incidence and description of 127 cases enrolled in a single institution prospective survey from 2004 to 2009. *Haematologica* 2011;96:1685-91.
2. Gangneux JP, Camus C, Philippe B. Epidemiology of and risk factors for invasive aspergillosis in nonneutropenic patients. *Rev Mal Respir* 2008;25:139-53.
3. Marr KA, Patterson T, Denning, D. Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations and therapy. *Infect Dis Clin North Am* 2012;16:875-94.
4. Badiee P, Hashemzadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *Indian J Med Res* 2014;139:195-204.
5. Pel ez T, Mun z P, Guinea J, Valerio M, Giannella M, Klaassen CHW, Bouza E. Outbreak of Invasive Aspergillosis After Major Heart Surgery Caused by Spores in the Air of the Intensive Care Unit. *Clin Infect Dis* 2012;54:24-31.
6. O'Gorman CM. Airborne *Aspergillus fumigatus* conidia: a risk factor for Aspergillosis. *Fungal Biology Review* 2011;25:151-157.
7. Pini G, Faggi E, Donato R, Sacco C, Fanci R. Invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients and the influence of hospital renovation. *Mycoses* 2008;51:117-22.
8. Kanamori H, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE, Weber DJ. Review of Fungal Outbreaks and Infection Prevention in Healthcare Settings During Construction and Renovation. *Healthcare Epidemiology* 2015;61:433-444.
9. Hao ZF, Ao JH, Hao F, Yang RY, Zhu H, Zhang J. Environment surveillance of filamentous fungi in two tertiary care hospitals in China. *Chin Med J* 2011;124:1970-5.
10. B net T, Nicolle MC, Thiebaut A, et al. Reduction of invasive aspergillosis incidence among immunocompromised patients after control of environmental exposure. *Clin Infect Dis* 2007;45:682-6.

11. Otter JA, Yezli S, Perl TM, Barbut F, French GL. The role of 'no-touch' automated room disinfection systems in infection prevention and control. *J Hosp Infect* 2013; 83:1-13.
12. Perraud P, Piens MA, Nicoloyannis N, Girard P, Sepetjan M, Garin JP. Invasive nosocomial pulmonary aspergillosis: risk factors and hospital building works. *Epidem. Infect* 1987;99:407-412.
13. Dancer SJ, White LF, Lamb J, Girvan EK, Robertson C. Measuring the effect of enhanced cleaning in a UK hospital: a prospective cross-over study. *BMC Medicine* 2009;7:28.
14. Arnow PM, Andersen RL, Mainous PD, Smith EJ. Pulmonary aspergillosis during hospital renovation. *Am Rev Respir Dis* 1978;118:49-53.
15. Holm SA. Simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 1979;6:65-70.
16. Falagas ME, Thomaidis PC, Kotsantis IK, Sgouros K, Samonis G, Karageorgopoulos DE. Airborne hydrogen peroxide for disinfection of the hospital environment and infection control: a systematic review. *J Hosp Infect* 2011;78:171-7.
17. Shapey S, Machin K, Levi K, Boswell T.C. Activity of a dry mist hydrogen peroxide system against environmental *Clostridium difficile* contamination in elderly cares wards. *J Hosp Infect* 2008;70:136-41. 🌸

28
Cadiomed
1/4V

31
Emerald
1/4V

ARTICLES SOUMIS

I) Article 3

Evaluation of Hirst- type spore traps in outdoor *Aspergillaceae* monitoring during large demolition work in hospital

Evaluation du capteur Hirst pour le monitoring des spores d'Aspergillacées à l'extérieur

Durant une période de travaux majeurs à l'hôpital. Article soumis à *PlosOne* en juillet 2017. Accepté avec révisions en cours (septembre 2017).

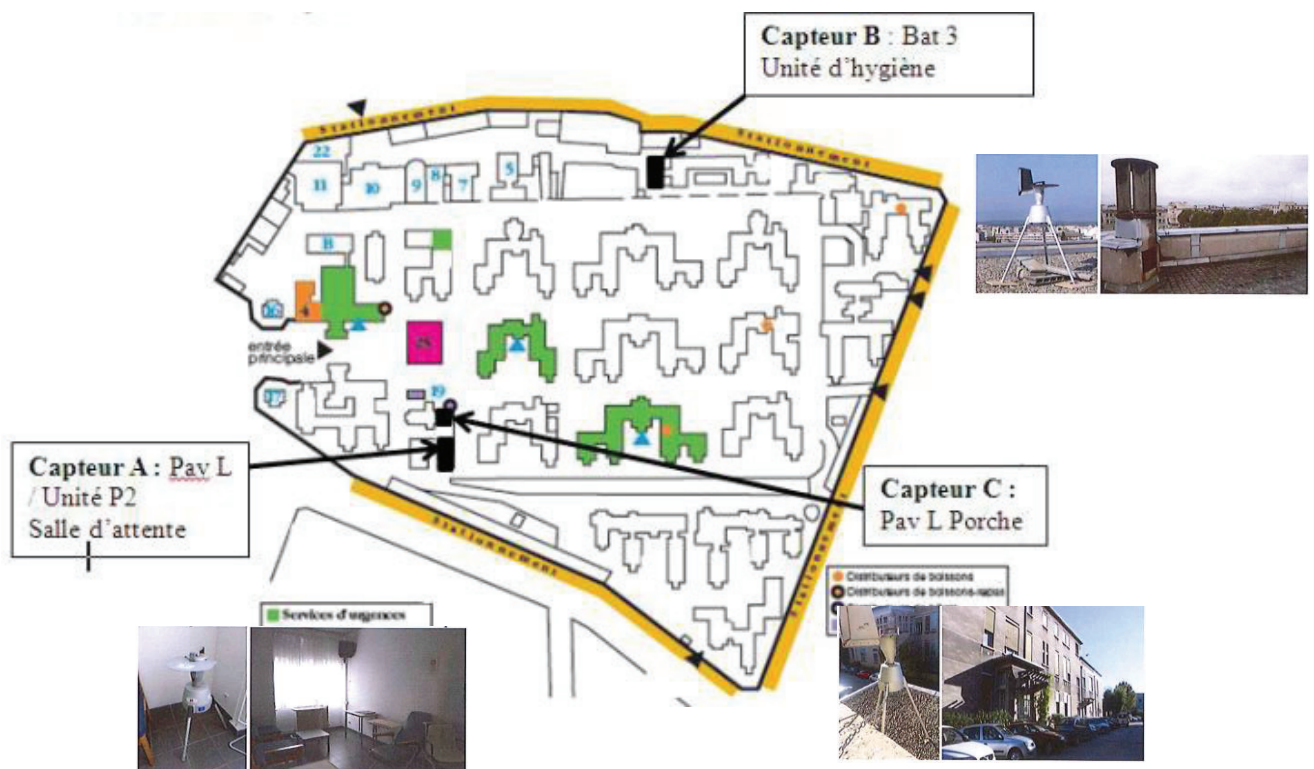
En France, lors de travaux à l'hôpital, des recommandations spécifiques sont à mettre en place; notamment une surveillance environnementale de l'air à l'intérieur des services à risque (guide).

Plusieurs techniques de prélèvement d'air ont pu être évaluées, dont les principales sont la méthode par impaction, cyclonique ou de détection en temps réel. A l'heure actuelle, la méthode par impaction reste le gold standard utilisé à l'hôpital lors des surveillances environnementales en permettant l'identification du genre et de l'espèce des souches observées. La qualité des données obtenues avec cette méthodologie, appelée également méthode cultivable est dépendante du biocollecteur et du milieu de culture, mais également du protocole d'analyse (température et temps d'incubation) utilisé (Méheust *et al.*, 2013; Boff *et al.*, 2012). Cependant, cette méthode reste limitante du fait du temps nécessaire à la réalisation et analyse du prélèvement mais également du coût du personnel dédié.

Dans le domaine de l'aérobiologie, d'autres collecteurs d'air, permettant de monitorer en continue, utilisent également cette méthode par impaction. Ceux sont les collecteurs conçus sur le design original du collecteur Hirst (Hirst, 1952). L'air est aspiré à un débit de 10L/min et impacté sur une bande adhésive de cellophane défilant devant la buse d'aspiration. Les spores ainsi collectés ne peuvent pas être remis en culture, c'est une méthode dite « non-cultivable ». Cette méthode permet d'évaluer les taux d'*Aspergillacées* dans l'air (*Aspergillus spp.* + *Penicillium*), mais ne permet pas de reconnaître les spores au niveau de l'espèce mais uniquement du genre

Plusieurs études d'aérobiologie ont évaluées l'efficacité de ces méthodes de prélèvement par impaction (cultivable et non-cultivable) pour le suivi environnementale extérieur des spores fongiques dans l'environnement (Fernandez-Rodriguez *et al.*, 2014 ;

Tormo Molina *et al.*, 2013). Récemment, une étude préliminaire, précédant les travaux de déconstruction a été conduite dans notre hôpital afin d'évaluer l'efficacité de ces capteurs de type Hirst pour la surveillance des taux d'*Aspergillacées* à l'extérieur et à l'intérieur des unités. Deux capteurs étaient situés à l'extérieur des bâtiments et un était dans un service (service des greffés rénaux) (Figure 24). Cette étude a montré une utilisation limitée de ces collecteurs à l'intérieur des services et n'a pas permis de corréler les résultats des deux collecteurs (méthode cultivable et non-cultivable) utilisés à l'extérieur des pavillons pour la mesure de l'aérocontamination à *Aspergillacées*. Cependant, cette étude a confirmé les résultats de Brenier-Pinchart *et al.*, qui ont observé que l'intérieur des services était fortement influencé par les taux d'aérocontamination extérieurs. Ainsi, la surveillance environnementale extérieure pourrait servir de système d'alerte pour prévenir les pics d'aérocontamination fongique dans les services mais également guider les hygiénistes et infectiologues pour la mise en place et gestion des mesures préventives lors de travaux.



De plus, certains experts ont suggérés que la concentration de spores était plus faible lorsqu'on était en hauteur, pouvant ainsi être associé avec un phénomène de dispersion (Gangneux JP et al 2012; Tormo Molina R et al 2013). Ainsi, il pourrait y avoir une échelle de risque variable selon la hauteur et la localisation des services mais également la hauteur à laquelle sont réalisés les travaux.

L'objectif principal de notre étude était d'évaluer l'utilité d'un capteur Hirst pour la surveillance environnementale extérieure du taux d'*Aspergillacées* à l'hôpital, lors de travaux majeurs de déconstruction. Les données

Les objectifs secondaires étaient i) de corrélérer les résultats obtenus de l'aérocontamination extérieure à *Aspergillacées* par les méthodes cultivable (capteur situé au niveau du sol) et non cultivable (capteur situé à environ 10 m du sol), ii) de déterminer l'impact des facteurs météorologiques sur ces taux retrouvés par les deux méthodes.

Cette étude a été réalisée au cours de la première année de thèse, en parallèle du monitoring environnementale fait avec l'aérobiocollecteur. Mon implication dans ce projet a été le design du protocole, le changement de tambour toutes les semaines, mais aussi l'analyse des données envoyées par la société Analyzair[®]. J'ai participé à l'analyse statistique des données ainsi qu'à l'écriture de l'article.

1 **Evaluation of Hirst- type spore traps in outdoor *Aspergillaceae* monitoring during large**
2 **demolition work in hospital**

3
4

5 Sophie Tiphaine Loeffert^{1*}, Philippe Vanhems^{1,2}, Estelle Tissot³, Cédric Dananché^{1,2}, Pierre
6 Cassier⁴, Thomas Bénet², Michel Perraud⁴, Michel Thibaudon⁵, Marie-Paule Gustin^{1,6}.

7

8 ¹Laboratoire des Pathogènes Emergents-Fondation Mérieux, Centre International de Recherche en
9 Infectiologie (CIRI), Inserm U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, France, Université de Lyon 1

10 ²Unité d'hygiène, épidémiologie et prévention, hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon,
11 France

12 ³Analyzair, Lyon, France

13 ⁴Laboratoire de Biologie Sécurité Environnement, Groupement Hospitalier Centre, Hospices Civils de
14 Lyon, France

15 ⁵Réseau National de Surveillance Aérobiologique, Brussieu, France

16 ⁶Département de santé publique, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISPB)-Faculté
17 de Pharmacie, Université de Lyon 1, France

18 *Corresponding author

19 Email : sophie.loeffert01@chu-lyon.fr.

20

21

22 **Introduction**

23 Healthcare establishments are frequently confronted by infrastructure work.
24 Construction work, particularly demolition, generates 10^5 -fold elevated outdoor levels of
25 thermo-tolerant fungi compared to non-demolition values and, consequently, augments the
26 risk of invasive aspergillosis (IA) in immunocompromised patients, a severe infection with 50-
27 90% lethality caused mostly by *A. fumigatus* (>80%)[1-3]. Specific guidelines have been
28 published to increase indoor hospital air control measures during construction [4]. A pilot
29 study, conducted at EHH in 2013, evaluated the use of Hirst-type spore traps (HTSTs) in
30 environmental fungal load monitoring of indoor and outdoor hospital units [5]. This work
31 showed that indoor HTSTs were not useful but confirmed previous results, suggesting that
32 indoor fungal contamination is highly influenced by outdoor, airborne spores[6]. Large-scale
33 surveillance systems are needed to detect outdoor fungal spores and alert hospitals to quickly
34 implement control measures. Surveys with spore traps are required to develop such warning
35 systems [7].

36 Some studies have evaluated the reliability of different sampling methods (cultivable
37 and non-cultivable) in measuring fungal spore concentrations [8-11]. Non-cultivable
38 methodologies are less efficient than cultivable methods in identifying fungi at the genus level
39 [12]. These latter, including agar samplers, allow recognition at the species level but is time-
40 consuming and depends on the substrate plated and culture conditions applied [13]. Other
41 factors, such as environment and meteorological parameters, may also affect the survivability
42 of fungal spores [11,14] To the best of the authors' knowledge, no standardized method of
43 *Aspergillus-Penicillium* (*Aspergillaceae*) assessment has been developed by comparing
44 results with paired samples [9,11,15].

45 The main objective of the present study was to evaluate the utility of HTSTs for
46 outdoor *Aspergillaceae* monitoring during large demolition work in hospital. The secondary
47 objectives were to correlate the results of HTSTs with an agar impact sampler and to evaluate
48 the impact of meteorological parameters on *Aspergillaceae* aero-contamination measured by
49 both methods.

50

51 **Materials and Methods**

52 *Study sites*

53 This study was conducted at University of Lyon-affiliated Edouard Herriot Hospital
54 (EHH, 850 beds) and at Gerland area located a few km south of the hospital and subject to
55 similar weather conditions (Fig 1A). An entire block, in the centre of EHH, was entirely
56 demolished. The time period was separated into 3 consecutive periods between February and
57 December 2015 (Fig 1B and 1C). No major demolition work was undertaken in proximity to
58 the Gerland area which served as control site.

59 **Fig 1: This is the Fig 1 Title: Study site. This is the Figure 1 legend:** (A) Sampler locations
60 in Lyon, France, (B) Edouard Herriot Hospital, and (C) deconstruction work schedule
61

62 *Aspergillaceae monitoring*

63 Airborne fungal sampling was undertaken simultaneously, by cultivable and non-
64 cultivable methods. Outdoor data were recorded continuously by the non-cultivable method,
65 using HTSTs samplers (Lanzoni VPPS-2000 samplers Analyzair[®], Bologna, Italy), in the
66 Gerland area and EHH. They were placed on the building roof respectively 35 m above
67 ground level in Gerland and 10 m in front of the EHH deconstruction site. *Aspergillaceae*
68 (*Aspergillus* spp. + *Penicillium* spp.) fungal load (AFL), impacted on adhesive tape, placed on

3

69 a drum, were counted by microscopy every 2 h and expressed as spores per cubic meters
70 every 2 h (spores/m³/2 h) or per day (spores/m³/day). The number of *Aspergillaceae* spores
71 counted was multiplied by a conversion factor of 0.19, corresponding to a reading of 36.5% of
72 the surface sampled.³ HTSTs drums were changed weekly over 296 days.

73 With the cultivable method, a daily environmental survey of AFL with agar impact
74 sampler (Air Ideal® 90 mm, bioMérieux) was undertaken outdoor at EHH all around the
75 demolition site (100-L samples). Colonies were cultured on Sabouraud Chloramphenicol agar
76 plates incubated for 48 h at 37°C and expressed as spores and colony-forming units per cubic
77 meter (CFU/m³). Inlet mean flow rate was 10 L.min⁻¹ with the non-cultivable method and 100
78 L.min⁻¹ with the cultivable method.

79 ***Meteorological data***

80 Meteorological parameters were recorded by Meteociel, a meteorological agency,
81 throughout the study period at a station located only a few km from EHH (Fig 1A). Relative
82 humidity (%), temperature (°C), wind direction, rain (mm), atmospheric pressure (hPa) and
83 speed (km.h⁻¹) were monitored every hour throughout 2015.

84 ***Statistical data***

85 Data were expressed as medians and interquartile range (IQR). Continuous non-
86 cultivable *Aspergillaceae* data were cumulated per day (over 24 hours). Differences of daily
87 data between EHH and Gerland were compared between the 3 study periods taken pairwise
88 using Wilcoxon test. Non-cultivable AFL data recorded every 2 h were averaged for each day
89 over day time (7 a.m.-7 p.m) and night time (9 p.m.-5 a.m.) and compared between day/night
90 and EHH/Gerland using paired Wilcoxon tests with adjusted p-values for 4 comparisons.

91 Hourly mean concentrations according to the non-cultivable method in EHH were
92 compared to cultivable method results at daily cultivable sampling times (between 10 a.m.-12
93 noon and 2-4 p.m.), by the Wilcoxon test. Data correlations were analyzed with Spearman
94 correlation coefficients: i) between AFL recorded with the two methods, and ii) between AFL
95 *per day* (over 24 h) from both HTSTs (EHH and Gerland).

96 The impact of meteorological variables on AFL presence estimated in EHH by both
97 methods for the 3 periods was evaluated by fitting logistic regressions with forward selection
98 of variables for each period. In case of significant interaction between 2 meteorological
99 variables, logistic regression was performed in sub-groups, to ease odds ratio (OR)
100 interpretation. Meteorological findings at 11 a.m. and 3 p.m. were paired in the cultivable
101 method with daily samplings in the morning and afternoon. P-values <0.05 were considered to
102 be statistically significant. In case of multiple comparisons, adjusted p-values were computed
103 with the Holm method [16].

104 **Results**

105 All data were collected over a period of 296 days. Table 1 reports medians and IQR of
106 outdoor fungal loads sampled by cultivable and non-cultivable methods during the 3
107 deconstruction periods. Differences were observed with each sampler according to sampling
108 site and deconstruction period.

109

110 **Table 1:** *Aspergillaceae* fungal loads in outdoor air sampled by cultivable (CFU/m³) and non-
 111 cultivable (spores/m³/day) methods in the 3 deconstruction periods

Site	Sampling method	Periods of deconstruction work	IQR	Median	Data: n ^{*/**}	Total: n
EHH	Cultivable	A	20	0	216 [*]	511 samples [*]
		B	21	10	118 [*]	
		C	80	30	177 [*]	
	Non-cultivable	A	13	16	128 ^{**}	296 days ^{**}
		B	25	24	62 ^{**}	
		C	10	12	106 ^{**}	
Gerland	Non-cultivable	A	35	15	128 ^{**}	296 days ^{**}
		B	28	14	62 ^{**}	
		C	10	2	106 ^{**}	

112 **This is the Table 1 legend :** n^{*}:samples, n^{**}: days

113 **Description of Airborne fungi loads with cultivable and non-cultivable methods**

114 With the cultivable method, a total of 511 air samples were collected outdoor at EHH.
 115 The highest median AFL concentrations were observed in Period C (30 CFU/m³, IQR:80)
 116 during excavation and earthwork. AFL concentration median ranged between 0 (IQR:20) and
 117 30 CFU/m³ (IQR:80) in the 3 periods. *Penicillium* median ranged were of 0 CFU/m³ in the 3
 118 periods.

119 Data were collected according to the non-cultivable method for 296 days at EHH and
 120 Gerland. The highest median AFL concentration at EHH was recorded in Period B
 121 (median=23.5 spores/m³/day, IQR:24.75) during deconstruction of the building floors. In
 122 contrast, the highest AFL median at Gerland occurred in Period A (median=15 spores/m³/day,
 123 IQR:35). AFL medians at EHH and Gerland ranged from 12 (IQR:10) to 23.5 (IQR:24.75)
 124 and from 2 (IQR:12) to 15 (IQR:35) spores/m³/day, respectively, in the 3 deconstruction
 125 periods.

126

127 **Comparisons of *Aspergillaceae* loads in EHH and Gerland**

128 ***Comparison of deconstruction time periods***

129 Figure 2 reports apparent time period variations in AFL contamination of the non-
130 cultivable spore traps located at EHH and Gerland. AFL medians were observed qualitatively
131 to be much higher at EHH than at Gerland during all study periods. Daily paired AFL
132 differences between the 2 sites (EHH and Gerland) were significantly different between
133 Period A vs Period B (median (IQR) of EHH-Gerland differences: 1 (24.3) vs 13.5 (31.8),
134 $p < 10^{-4}$), Period A vs Period C (1 (24.3) vs 8 (13.5), $p < 10^{-4}$) and Period B vs Period C (13.5
135 (31.8) vs 8 (13.5), $p = 0.032$).

136 **Fig 2: This is Fig 2 Title:** Median of *Aspergillaceae* levels every 2 h by the non-cultivable
137 method at Gerland and EHH during the 3 deconstruction periods

138 ***Day and night time data per site***

139 At EHH, mean AFL medians were higher during the day (7 a.m.-7 p.m. with every 2-h
140 data) than the night (9 p.m.-5 a.m.) (median (IQR): 1.37 vs 1.09 (1.51 vs 1.42) spores/m³/2 h,
141 $p = 0.007$). A similar trend was observed at Gerland (median (IQR): 0.57 vs 0 (2.14 vs 1.48),
142 $p = 0.007$), attributed to some high AFL (8 peaks > 15 spores/m³/2 h) in the day time.
143 Statistically significant differences in day time data were evident between EHH and Gerland,
144 with a higher median at EHH (median (IQR): 1.37 (EHH) vs 0.57 (1.51 vs 2.14) (Gerland)
145 spores/m³/2 h, $p = 0.010$). AFL data were also higher during the night at EHH than at Gerland
146 (median (IQR): 1.09 (EHH) vs 0 (1.42 vs 1.48) (Gerland) spores/m³/2 h, $p < 10^{-7}$).

147 **Cultivable and non-cultivable sampling methods at EHH**

148 Figure 3 reports the mean daily concentrations of AFL colonies and spores (CFU/m³
149 and spores/m³/24 h) recorded by both methods during the 3 deconstruction periods at EHH. A

150 weak correlation between daily AFL recorded by the two methods was observed during
151 Period C ($r=0.26$, $p=0.0475$, $n=109$ days), corresponding to excavation and earthwork. During
152 this period, higher peaks were recorded by the cultivable than by the non-cultivable method
153 (Figure 3). No correlation between both methods was observed during Periods A and B
154 ($p=0.6$ and $p=0.2$, respectively). In Period A, both methods showed similar orders of peak
155 magnitudes. In Period B, higher peaks were observed with the non-cultivable method. The
156 cultivable method produced no significant peaks.

157 **Fig 3: This is the Fig 3 Title:** Daily average concentrations of *Aspergillaceae* spores and
158 colonies (spores/m³/day and CFU/m³) recorded by cultivable and non-cultivable methods
159 during deconstruction

160 **Evaluation of meteorological impact at EHH**

161 Meteorological variables differed, on average, in the 3 study periods (Table S1) Table
162 2 summarizes the results of final, simplified logistic modeling. With the cultivable method,
163 the effects of relative humidity and wind speed on AFL presence were additive in Period A.
164 When relative humidity increased by 10%, the OR of *Aspergillaceae* presence was multiplied
165 by 1.25 ($p=0.035$). When wind speed decreased by 10 km/h, the OR of *Aspergillaceae*
166 presence increased by a factor of 2.04 (1/0.49) ($p<0.001$). In Period B, meteorological
167 variables had no significant effect on AFL. In Period C, when temperature increased by 10°C,
168 the OR of *Aspergillaceae* presence rose 1.93-fold ($p=0.050$). With the non-cultivable method,
169 in Period A, in the presence of south or southwestern winds, only temperature had a
170 significant effect on AFL. OR decreased by a factor of 1.41 (1/0.71, $p=0.041$) when
171 temperature rose by 10°C. With other wind directions, both temperature and atmospheric
172 pressure had significant, additive effects on *Aspergillaceae* presence whose OR increased
173 1.79-fold when atmospheric pressure rose by 10 hPa ($p<10^{-4}$). The effect of temperature was
174 similar (OR=0.71, $p<10^{-3}$). In Periods B and C, only relative humidity had a significant

175 impact on *Aspergillaceae* whose OR increased by a factor of 1.21 ($p < 10^{-4}$) and decreased by a
176 factor of 1.08 (1/0.92, $p = 0.03$), respectively, when relative humidity rose by 10%.

Table 2: This is the Table 2 Title: Impact of meteorological variables on AFL contamination measured at EHH by cultivable and non-cultivable methods and estimated by final univariate or multivariate logistic regression after forward meteorological variable selection

Sampling method	Deconstruction periods	n	Explicative meteorological variables	Adjusted ¹ OR	95% CI	p-value
Cultivable method	A	216	Relative humidity	1.25	1.02-1.54	0.035
	B	118	Wind speed	0.49	0.34-0.72	<10 ⁻³
	C	177	Temperature	1.93	1.001-3.8	0.050
Non-cultivable method	A	382	Temperature*	0.71	0.50-0.99	0.041
	Analysis of 2 subgroups	1,154	Temperature	0.71	0.58-0.86	<10 ⁻³
			Atmospheric pressure*	1.71	1.34-2.19	<10 ⁻⁴
	B	743	Relative humidity	1.21	1.10-1.34	<10 ⁻⁴
	C	1,271	Relative humidity	0.92	0.86-0.99	0.030

This is the Table 2 legend:

¹Adjusted OR in case of at least 2 explicative variables

*Only univariate regression in the subgroup with south or southwestern winds
OR is given for 10-unit augmentation in case of continuous meteorological variables

Discussion

This study revealed: i) the capacity of HTSTs to detect *Aspergillaceae* aerocontamination of the surrounding environment, ii) weak correlation (trend) between AFL recorded by cultivable and non-cultivable methods, and iii) consistent influence of environmental factors, such as deconstruction work and meteorological variables, on AFL.

HTSTs seem to be able to detect variations of outdoor AFL, as described in previous studies [4,9,11,14]. Higher AFL was detected at EHH which underwent major deconstruction compared to Gerland, the control site. These data highlighted the importance to be careful in protecting immunocompromised patients when they are outside units during deconstruction at hospital. Similarly, higher AFLs were recorded at EHH during days than during nights. Even if AFL at EHH were lower during the night than the day, aerocontamination still stayed higher than at Gerland area. So period of opening windows during nights have to be realised with caution, during limited times.

These samplers were highly influenced by environmental conditions and factors, as proved by differences observed between the Gerland area (control) and EHH [15,17]. The present study identified deconstruction work as the potential source of AFL. Distinct AFL peaks according to each deconstruction period were seen with both sampling methods.

To the best of the authors' knowledge, this is the first report of weak but significant correlation between both sampling methods of AFL monitoring during earthwork (Period C). As AFL recorded by cultivable sampling was found to be higher in Period C, the results confirmed previous studies which suggested that high concentrations of spores and numerous sampling measures are needed to find statistical relationships between both methods [14]. The kind of deconstruction works could explain these high AFL levels. Excavation and earthwork

were done at ground level or just below, at the height where the cultivable sampler was recording. In contrast, weak AFL contamination was monitored by the non-cultivable method during this period because of the height separating the collector and the deconstruction works. The absence of correlation in other periods could be explained by the location/height of the samplers according to type of deconstruction work undertaken. Some experts suggest that particle concentrations decrease with height, possibly owing to dispersion phenomena [4,17]. During Period A, only inside deconstruction work was done. The absence of correlation may be due to low spore concentrations observed with the cultivable method, possibly because of its position between buildings [18] In Period B, the non-cultivable method showed higher AFL than the cultivable method, explained by type of deconstruction work occurring during this period, i.e., deconstruction of building floors. Deconstruction work was done approximately 15 m below ground level, corresponding to the height at which the HTSTs were located. The cultivable sampler located at ground level was unable to detect variations due to these deconstruction works. It may explain the lack of correlation between both methods. In the present study, the type of deconstruction work highly impacted AFL monitored by both methods because of differences in height.

Meteorological effects on AFL data were found consistent with literature [11,14]. *Aspergillus* species are known to gain optimal growth between 30 and 35°C with average humidity of 70%. Temperature and relative humidity were closely related to AFL growth and reproduction capacity. Each deconstruction period highly corresponded to a season, heavily influencing data analysis and could help future studies in predicting and modeling AFL peaks.

The main strength of this study resides in the numerous data obtained with both methods, allowing to answer important questions in environmental monitoring during construction works and helping infection control staff in planning precautions for

immunocompromised patients. It does, however, have some limitations: the deconstruction periods were concomitant with the seasons which could have induced seasonality bias in analysis. No baseline period without deconstruction work at EHH could be studied.

It is known that air flow from outdoors can be found indoors, increasing the risk for the patient to develop IA [8]. To limit exposure, rapid detection of contamination peaks is needed to implement adequate prevention measures and policies. This study permit to confirm the careful attention needed to be taken in protecting immunocompromised patients when they are outside units during deconstruction. Analysis of day and night AFL variations showed that although lower AFL were found during the night at EHH, loads still staid stayed higher than control area. So, to ensure safety of patients, limited period of opening windows during night have to be recommended. Furthermore, this study give some new insights to improve environmental monitoring guidelines by showing importance of samplers height position in regards to king of deconstruction work applied.

Further studies, including both methods at different ground levels, are needed to better evaluate sensitivity and reliability as warning systems. Finally, our study determined that outdoor HTSTs are promising tool for outdoor AFL monitoring during major deconstruction works in hospital, helping clinical infection control practitioners to rapidly implement control measures.

Acknowledgments

The authors thank Laboratories ANIOS, France and Analyzair® for invaluable advices.

References

- [1] Vonberg RP, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect* 2006;63:246e254.
- [2] Streifel AJ, Lauer JL, Vesley D, Juni B, Rhame FS. *Aspergillus fumigatus* and other thermotolerant fungi generated by hospital building demolition. *Appl Environ Microbiol* 1983;46:375-8.
- [3] Marr KA, Patterson T, Denning D. Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations and therapy. *Infect Dis Clin North Am* 2002;16:875-94.
- [4] Gangneux JP, Adjide' CC, Bernard L *et al.* Quantitative assessment of fungal risk in the case of construction works in healthcare establishments: proposed indicators for the determination of the impact of management precautions on the risk of fungal infection. *J Mycol Med* 2012;22:64e71.
- [5] Dananché C, Gustin MP, Cassier P *et al.* Evaluation of hirst-type spore trap to monitor environmental fungal load in hospital. *Plos One* 2017;12(5):e0177263.
- [6] Brenier-Pinchart MP, Lebeau B, Quesada JL *et al.* Influence of internal and outdoor factors on filamentous fungal flora in hematology wards. *Am J Infect Control* 2009;37(8):631-7.
- [7] Grinn-Gofron A, Strzelczak A. Artificial neural network models of relationships between *Alternaria* spores and meteorological factors in Szczecin (Poland). *Int J Biometeorol* 2008;52:859e868.
- [8] Grinn-Gofron, A. Airborne *Aspergillus* and *Penicillium* in the atmosphere of Szczecin, (Poland) (2004e2009). *Aerobiologia* 2011;27:67e76.

- [9] Elvira-Rendueles B, Moreno J, Garcia-Sanchez A, Vergara N, Martinez-Garcia MJ, Moreno-Grau S. Air-spore in Cartagena, Spain: viable and non-viable sampling methods. *Ann Agric Environmental Med* 2013;20(4):664-71.
- [10] Fernández-Rodríguez S, Molina RT, Palacios IS, Garijo AG. Two sampling methods for the Petri dish detection of airborne fungi. *Grana* 2011;50:202-7.
- [11] Tormo Molina R, Palacios SI, Gonzalo Garijo A, Muñoz Rodríguez AF, Fernández-Rodríguez S, Recio Aguado D. Use of personal spore traps to complement continuous aerobiological monitoring. *Grana* 2010;49:134e141.
- [12] Hirst JM. An automatic volumetric spore trap. *Ann Appl Biol* 1952;39:257-65.
- [13] Burge H, Boise J, Rutherford J, Solomon W. Comparative recoveries of airborne fungus spores by viable and non-viable modes of volumetric collection. *Mycopathologia* 1977;61:27e33.
- [14] Fernández-Rodríguez S, Tormo-Molina R, Maya-Manzano JM, Silva-Palacios I, Gonzalo-Garijo A. Outdoor airborne fungi captured by viable and nonviable methods. *Fungal Ecology* 2014;7:16-26.
- [15] Abdel Hameed AA, Khoder MI, Ibrahim YH, Saeed Y, Osman ME, Ghanem S. Study on some factors affecting survivability of airborne fungi. *Sci Total Environ* 2012;414:696-700.
- [16] Holm SA. Simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 1979;6:65-70.
- [17] Tormo Molina R, Maya Manzano JM, Fernández-Rodríguez S, Gonzalo Garijo A, Silva Palacios I. Influence of environmental factors on measurements with Hirst spore traps. *Grana* 2013;52(1):59-70.
- [18] Bryant RH, Emberlin JC, Norris-Hill J. Vertical variation in pollen abundance in north-central London. *Aerobiologia* 1989;5:123-37.

Supporting information

S1 Table: This is the S1 table Title: Relationship between each meteorological variable and the 3 study periods.

This is the S1 Table legend: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$. Multiple comparisons were made between study periods for each meteorological variable

Figure 1: (A) Sampler locations in Lyon, France, (B) Edouard Herriot Hospital, and (C)

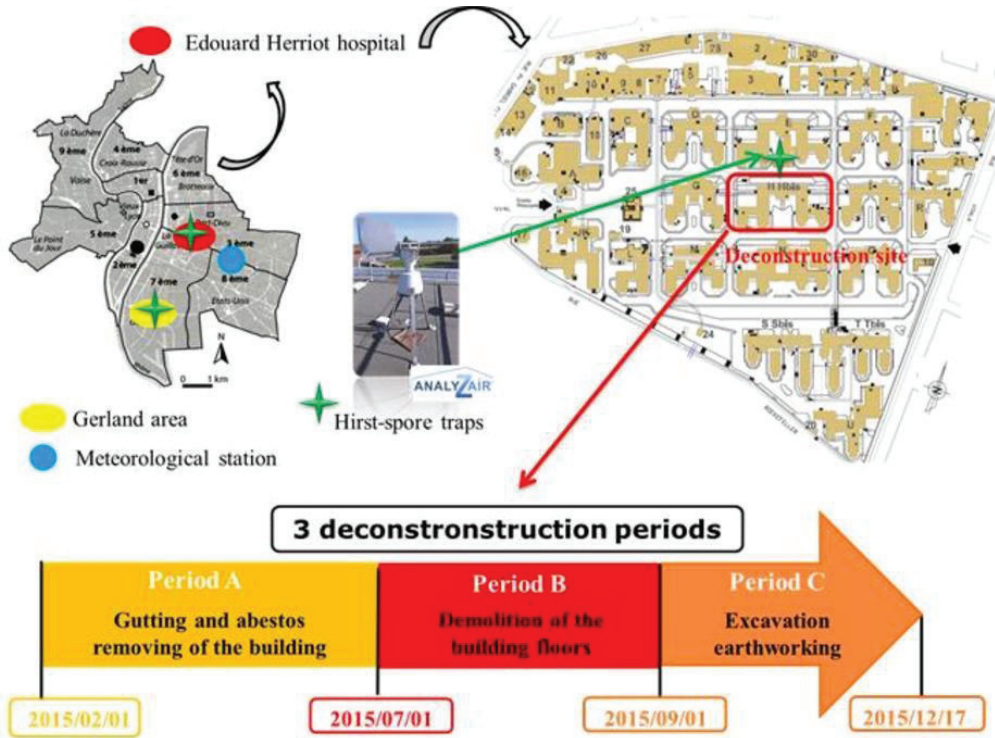
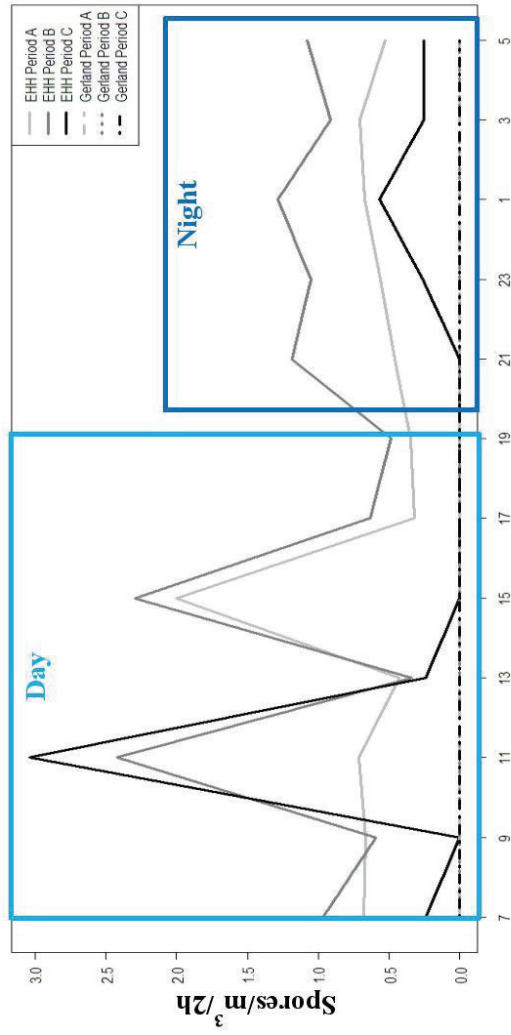
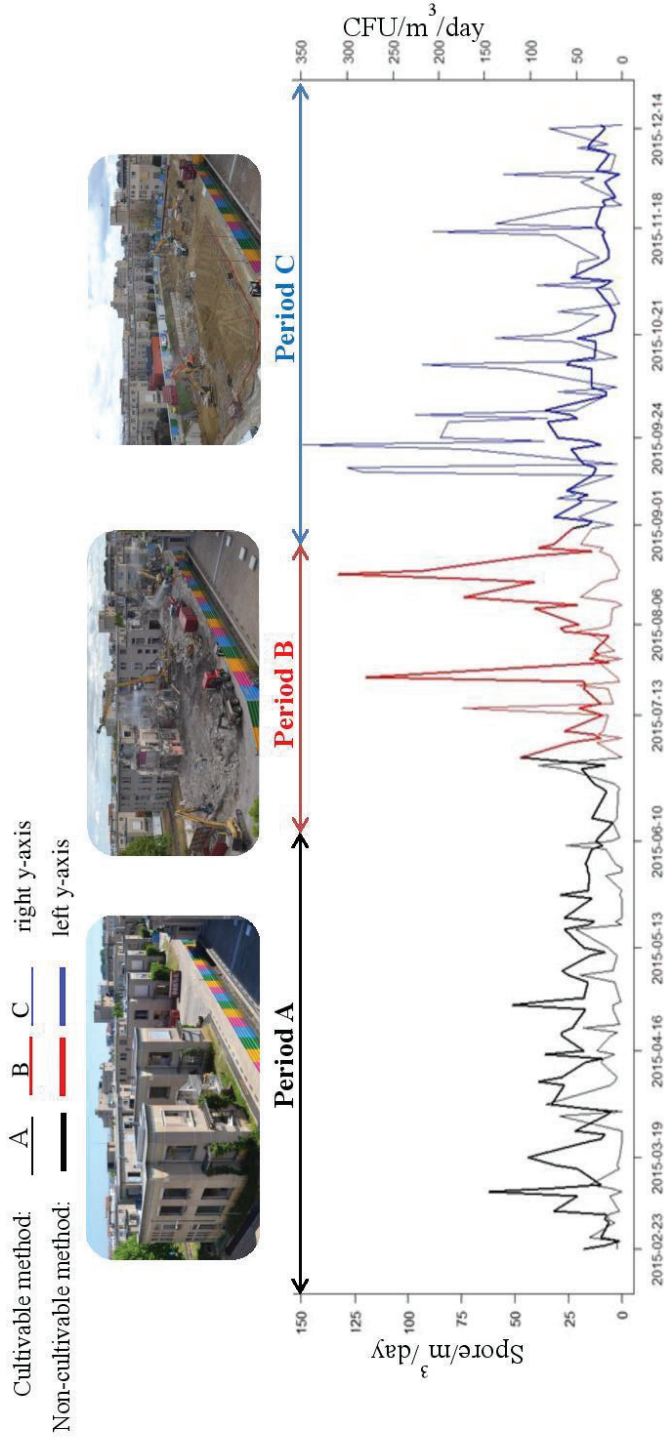


Figure 2: Median of *Aspergillaceae* levels every 2 h by the non-cultivable method at Gerland and EHH during the 3 deconstruction periods



Median (spores/m ³ /2h)	Sampling every 2 hours																							
	7	9	11	13	15	17	19	21	23	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	1	3	5
EHH Period A	0.7	0.7	0.7	0.4	2	0.3	0.3	0.5	0.6	0.7	0.7	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EHH Period B	1	0.6	2.4	0.3	2.3	0.6	0.5	1.2	1	1.3	0.9	1.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EHH Period C	0.2	0	3.0	0.2	0	0	0	0	0.3	0.6	0.3	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gerland Period A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Gerland Period B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Gerland Period C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Figure 3: Daily average concentrations of *Aspergillaceae* spores and colonies (spores/m³/day and CFU/m³) recorded by cultivable and non-cultivable methods during deconstruction



Daily average concentration of AFL spores during the 3 deconstruction periods: (A) Gutting and asbestos removal, (B) Deconstruction of floors, and (C) Excavation and earthwork.

II) Article 4

Multi-locus variable number tandem repeat analysis of clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* during one-year period of deconstruction work in a hospital in Lyon, France

Epidémiologie moléculaire des souches d'Aspergillus fumigatus isolées dans l'environnement et chez des patients infectés et/ou colonisés lors de travaux majeurs à l'hôpital. Article soumis en septembre 2017 *Journal of New England Medicine*

A l'heure actuelle, le gold standard des méthodes de génotypages permettant d'étudier l'épidémiologie moléculaire des isolats entres eux reste les techniques utilisant des Short Tandem repeat (ST) (Klaaseen *et al.*, 2009). La technique Multiple Locus Variable-Number Tandem-Repeats (MLVA) est basée sur l'amplification par PCR de séquences répétées (6 à 100 pb) en tandem et dénommées VNTR (Variable Number Tandem Repeat).

Cette technique, décrite pour la première fois en 1997 sur *Haemophilus influenzae* a depuis connue un essor important (Van Belkum *et al.*, 1997). En effet, la MLVA s'est imposée comme outil de Santé Publique pour la surveillance de nombreux pathogènes, mais aussi pour la détection d'épidémies et de leurs potentielles sources (Wuyts *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2017). Thierry *et al* a développé cet outil pour *A. fumigatus* permettant la réalisation d'enquêtes épidémiologiques rapidement. Cette technique s'est avérée facile d'utilisation et très discriminante.

Plusieurs études ont déjà investiguées les relations existantes entres isolats d'*A. fumigatus* d'origine clinique et environnementale à l'hôpital dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques (Guinea *et al.*, 2011 ; Guarro *et al.*, 2005). Cependant, peu d'étude ont pu élucider la question cruciale de savoir si les isolats cliniques retrouvés chez les patients ont été acquises depuis l'environnement hospitalier et si ces isolats pourraient provenir d'un seul et même réservoir (Bonnal *et al.*, 2015).

C'est pourquoi, dans le contexte des travaux à HEH, une collection d'isolats environnementaux et cliniques d'*A. fumigatus* ont été collectés durant les différentes phases de travaux et génotypés. Les objectifs de cette étude ont été de déterminer la diversité génétique d'*Aspergillus fumigatus* et d'évaluer les liens pouvant exister entre les souches cliniques et environnementales collectées.

Ce travail a été réalisé la dernière année de cette thèse. Mon implication personnelle a été de réaliser la campagne de prélèvements environnementaux mais également de réaliser l'identification moléculaire de la collection d'*A. fumigatus* testée. La MLVA a été réalisée par l'équipe Dynamyc de Créteil. J'ai participé à l'interprétation des résultats de génotypage obtenus. J'ai également participé à l'analyse des données (réalisation de Minimum Spaning Tree) et à la rédaction de l'article.

1
2
3 **Investigation of the relationships between clinical and environmental isolates of**
4 ***Aspergillus fumigatus* by multi-locus, variable-number, tandem-repeat analysis during**
5 **major demolition work in a French university hospital**
6
7
8
9

10
11
12 Loeffert S¹, Melloul E², Gustin MP³, Hénaff L¹, Guillot C², Dupont D⁴, Wallon M⁴, Cassier
13 P⁵, Dananché C^{1,6}, Bénet T⁶, Botterel F², Guillot J², Vanhems P^{1,6}
14
15
16
17
18
19

20
21 ¹Equipe Epidémiologie et Santé Internationale, Laboratoire des Pathogènes Emergents –
22
23 Fondation Mérieux, Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111,
24
25 CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France
26
27

28 ²EA 7380 Dynamyc, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est Créteil,
29
30 Créteil, France
31
32

33 ^{1,3}Département de Santé Publique, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques –
34
35 Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon 1, France
36
37

38 ⁴Institut de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Hôpital de la Croix Rousse, Lyon, France
39

40 ⁵Laboratoire de Biologie Sécurité Environnement, Groupement Hospitalier Centre, Hospices
41
42 Civils de Lyon, France
43
44

45 ⁶Unité d'Hygiène, Epidémiologie et Prévention, Groupement Hospitalier Centre, Hospices
46
47 Civils de Lyon, France
48
49

50
51
52 Text body: 2,424 words (Introduction to Discussion)
53
54
55
56
57

ABSTRACT

Background: Genotyping is needed to explore the link between clinical cases of invasive aspergillosis (IA) and major building construction because of increased spore emissions. One out of 32 blocks in a French university hospital was totally demolished, while care activities continued. The aim of our study was to compare the genetic diversity of clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates during a 1-year demolition period.

Methods: Fungal contamination was monitored daily for 11 months in 2015. Environmental surveillance was undertaken indoors and outdoors in 8 different units with automatic agar samplers. IA infection cases were investigated in parallel (according to EORTC/MSG) criteria. *A. fumigatus* isolates were identified by amplification and sequencing of β -*tubulin* gene. They were further genotyped by multiple-locus, variable-number, tandem-repeat analysis (MLVA). Phylogenetic relationships between isolates were assessed by generating a minimum spanning tree.

Results: Based on 3,885 samples, 403 *A. fumigatus* isolates (383 environmental and 11 clinical) were identified and genotyped by MLVA. Clinical isolates were collected from patients diagnosed as having probable (n=2) or possible (n=1) IA or bronchial colonization (n=6). MLVA generated 234 genotypes. Seven clinical isolates shared identical genotypes as environmental isolates.

Conclusions: Similar genotypes were found in clinical and environmental isolates, indicating that *A. fumigatus* infection may originate from hospital environments undergoing major demolition. MLVA was confirmed to be a useful tool for the investigation of *A. fumigatus* epidemiology.

INTRODUCTION

Aspergillus fumigatus is a saprotrophic mold widely distributed in the environment and easily transported by air due to the small size of its spores.¹ This species is most commonly involved in invasive aspergillosis (IA) in immunocompromised, hospitalized patients.^{2,3} IA occurs after inhalation, followed by invasion and dissemination of *A. fumigatus* conidia through pulmonary parenchyma.

Construction work in hospitals, such as demolition or renovation, increases the amount of spores released and has been associated with IA outbreaks.^{4, 5} Specific guidelines on protection against airborne contamination must be applied during construction work.^{6, 7} Implementation of environmental and patient protection measures has contributed to decreased hospital-acquired IA.^{8,9} However, documented IA cases attributed to environmental strains are rarely reported. In IA or colonization by *A. fumigatus*, genotyping of environmental and clinical samples is needed to demonstrate epidemiological linkage. Such investigation would be helpful in convincing healthcare professionals and “construction workers” to apply appropriate preventive measures.

Some reports have depicted increased IA infection among patients during hospital demolition work, but the results were often not analysable because of high genotypic diversity.¹⁰⁻¹² Indeed, epidemiological studies have largely failed to match the genotypes of clinical and environmental isolates to assess potential strain origins and transmission routes.¹³⁻
¹⁵ Different molecular typing methods have been used for *A. fumigatus* typing. Among them, recently-developed, multiple-locus, variable-number, tandem-repeat analysis (MLVA) has proven to be highly discriminating and reproducible, needing simple laboratory equipment.¹⁶⁻

18

1
2
3 We conducted MLVA in the present study to compare the genetic diversity of clinical
4 and environmental *A. fumigatus* isolates collected inside and outside units during a 1-year
5 period of deconstruction work in a French university hospital.
6
7
8
9

10 11 12 13 **MATERIALS AND METHODS**

14 15 **Hospital settings**

16
17 University-affiliated Edouard Herriot Hospital is composed of 32 independent blocks (800
18 beds/9,000 hospital stays per year). The central block, covering approximately 12.2% of the
19 total block area, was entirely demolished in 2015 to construct a central trauma center (video
20 S1 in the Supplementary Appendix). Demolition comprised 3 periods: (1) gutting and
21 elimination of asbestos from the building, (2) floor removal, and (3) excavation-earthwork.
22
23
24
25
26
27

28 29 **Patients**

30
31 In 2015, epidemiological surveillance of IA infections was conducted in all hospitalized
32 patients: sample extraction for *A. fumigatus* identification, antifungal treatment, and voluntary
33 notification by doctors. Each suspected case was reviewed and validated by a medical doctor
34 and pharmacist specializing in infection control, according to European Organization for
35 Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the
36 National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG)
37 criteria. 9 patients were included among 30 monitored patients (see result section).
38
39
40
41
42
43
44
45

46 47 **Clinical samples**

48
49 Totally, 44 clinical samples were collected from the 30 monitored patients. Eleven clinical *A.*
50 *fumigatus* isolates coming from 9 patients hospitalized in 5 different medical units (MU-4 to
51 MU-7) or 2 intensive care units (ICU-1 and ICU-3) were included after analysis. Figure 1
52 shows the location of units involved in the monitoring process. Clinical samples, including
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 bronchial aspirates (n=3), sputum (n=4) and bronchoalveolar lavage (n=4), were collected and
4
5 cultured on mycological media. Each clinical sample was incubated in a Petri dish with
6
7 Sabouraud medium and chloramphenicol for a minimum of 48 h at 37°C.
8

9 10 **Environmental samples**

11 Daily surveillance of fungal contamination, undertaken between February and December
12
13 2015, counted 3,885 samples. Environments around the hospital demolition site were
14
15 monitored. Two groups were constituted, depending on the air filtration system located in
16
17 units. ICU-1 to ICU-4 comprised a group of units with fine particular filters, a kidney and
18
19 pancreas transplantation (KPT) unit and wards with coarse filters (for leaves etc), namely,
20
21 MU-1 to MU-3 (Figure 1). Air was assessed outdoors and indoors with agar samplers (Air-
22
23 Ideal®, bioMérieux) with 100-liters and 250-liters samples respectively collected outside and
24
25 inside. Air was drawn onto Sabouraud dextrose agar plates and incubated for 48 h at 37°C.
26
27 Colony-forming units (CFU) were counted and expressed as CFU/m³, according to the
28
29 manufacturer's instructions.
30
31

32 33 **A. fumigatus identification**

34 During environmental monitoring, a maximum of 4 *A. fumigatus* colonies per day were
35
36 selected randomly and isolated from environmental samples. Clinical and environmental *A.*
37
38 *fumigatus* isolates were identified by macroscopic and microscopic examination. Phenotypical
39
40 identification was confirmed by amplification and sequencing of β -*tubulin* gene. Colonies
41
42 were sub-cultured and stored at -20°C independently of genotyping analysis.
43
44
45
46

47 48 **MLVA**

49 Isolates were genotyped by MLVA with 10 Variable Number of Tandem Repeats (VNTR), as
50
51 described previously (Method was described previously – Supplementary material).
52
53 Phylogenetic relationships between isolates were analyzed, generating a minimum spanning
54
55 tree (MST) with PHYLOViZ V2.0.¹⁹ The goeBURST full MST algorithm, based on Euclidian
56
57

58
59
60 5

Confidential: Destroy when review is complete.

1
2
3 and goeBURST distances between 2 profiles, provided cluster analysis. Its discriminating
4
5 power was ascertained with the Simpson diversity index (SDI).²⁰
6

7 RESULTS

8 *Environmental and clinical samples*

9
10
11 Totally, 3,885 air samples (2,141 from indoors and 1,744 from outdoors) were
12
13 analysed. *A. fumigatus* was detected in 999 air samples, with 3,073 microscopically-identified
14
15 colonies (Fig. S2 in the Supplementary Appendix). Mean *A. fumigatus* load (SDI) in outdoor
16
17 air samples varied from 5.2 (12.7) to 34.7 (72.8) CFU/m³ (mean of 13.4 CFU/m³), with
18
19 increases between March and December 2015, except during summer when a heatwave
20
21 occurred in Lyon. Mean *A. fumigatus* load differed inside wards, depending on the air
22
23 filtration system. Mean *A. fumigatus* load (SDI) varied from 0.3 (1.3) to 3.8 (12.8) CFU/m³
24
25 (mean of 0.9 CFU/m³) in wards with fine particular filters and from 0.6 (1.9) to 8.8 (55.4)
26
27 CFU/m³ (mean of 2.9 CFU/m³) in conventional wards without air particle filtration systems.
28
29
30
31

32
33 In total, 403 *A. fumigatus* isolates (391 environmental and 12 clinical) were
34
35 investigated. Environmental isolates were collected indoors (n=157) and outdoors (n=234).
36
37 Indoor samples were realized in protected wards with fine filtration systems (ICU n=47, KPT
38
39 unit n=17) and in conventional wards with coarse filters (3 MUs, n=93). In total, 10 patients
40
41 (12 samples) were included in this study, and all environmental isolates likely to be associated
42
43 with human cases were assessed. However one clinical sample gives no MLVA pattern. So, 9
44
45 patients were finally analysed (Table I). Patients were diagnosed as having probable (n=2) or
46
47 possible (n=1) IA or bronchial colonization (n=6).
48
49
50

51 *Genotypic diversity of A. fumigatus isolates*

52
53 403 *A. fumigatus* isolates underwent MLVA (targeting 10 VNTR markers). 394
54
55 isolates (383 environmental and 11 clinical isolates) were completely profiled. Totally, 234
56
57
58
59
60

6

Confidential: Destroy when review is complete.

1
2
3 different profiles (59.4%) were observed. The SDI was calculated for each VNTR, and for the
4
5 10 markers tested on the 394 *A. fumigatus* isolates. The SDI ranged from 0.361 to 0.814 for
6
7 individual markers. It was calculated to be 0.9938 for all 10 markers. No significant SDI
8
9 differences were evident between environmental isolates from outdoors (0.995) or indoors
10
11 (0.993).
12

13
14 In the present study, 28 environmental samples were composed of 2 to 6 isolates. A
15
16 unique genotype was found in 1 environmental sample comprised of 2 isolates. Another
17
18 environmental sample, composed of 4 isolates, had 2 isolates with the same genotype.
19
20 Analysis of the 23 remaining environmental samples showed 2, 3, 4 and 6 different
21
22 genotypes. Two patients (A and F) were sampled twice on different days. 2 isolates from
23
24 patient A had the same genotype. 2 isolates from patient F had different genotypes (Table II).
25
26
27

28 29 **Cluster analysis**

30
31 234 genotypes formed 2 main clusters (I and II) with single locus variants (1 VNTR of
32
33 differences). Cluster I comprised 53 different genotypes (for 99 isolates) while cluster II had
34
35 61 different genotypes (for 115 isolates, Figure 2).
36
37

38
39 The same genotype in environmental and clinical isolates was found in 7 clinical
40
41 samples from 5 different patients (A, B, C, F, K) (Figure 2, Table II). Some environmental
42
43 and clinical isolates from 3 patients (L, J, D) were highly-related (1 VNTR marker of
44
45 difference). Patient A, diagnosed as possible IA, was sampled twice, and both isolates had the
46
47 same genotype, shared with 4 different environmental isolates. The genotype, in patient B and
48
49 diagnosed as probable IA, had an identical genotype with 5 environmental isolates. Isolates
50
51 with the same genotype as that of clinical samples from patients A and B were encountered in
52
53 the environment after being found in clinical samples.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 For patients K and F, isolates with the same genotype were noted in the environment
4 before patient hospitalization in different units. Two clinical isolates were observed in patient
5 F with diagnosed colonization. The 2 isolates with 2 different genotypes were identical to
6 those coming from some environmental isolates. The same genotype was shared by 1 clinical
7 isolate and 13 and 4 environmental isolates respectively. Patients K and C, who developed
8 respiratory colonization, also shared the same genotype as 2 and 4 environmental isolates
9 respectively. The remaining clinical isolates from patient C had a genotype which was found
10 in the environment of the same unit a few days before hospitalization and later in other
11 hospital sites.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 *Geographic dynamics of genotypes*

24
25 Totally, 156 environmental genotypes out of 227 (69%) were detected more than once.
26
27 Seven environmental genotypes occurred at least 6 times in hospital air, at different times and
28 sites. Similarly, 3 clinical genotypes were identified at least 6 times during the study period at
29 various locations. Genotype AF-F1 was seen in the clinical sample of a patient diagnosed with
30 colonization in May 2015 but also 13 times in hospital air between March and August 2015
31 (Figure 3). It was first found on the same day in March 2015 in the indoor air of a MU and in
32 outdoor air. It was also detected 4 times inside and 7 times outside wards.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 **DISCUSSION**

46
47
48 This prospective study was initiated before and during major demolition in our
49 hospital. The objective was to link measurements of environmental contamination by *A.*
50 *fumigatus* with clinical case surveillance and thus confirm association between exposure and
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 infection or colonization based on MLVA. We determined that most clinical strains were
4
5 related to an environmental source in the hospital.
6
7

8 Different molecular typing procedures for *A. fumigatus* identification have been
9
10 described.²¹ Many of them have been compared in their ability to investigate genetic diversity
11
12 and relationships between *A. fumigatus* isolates.²²⁻²⁵ The results suggest that methods based
13
14 on short tandem-repeats combine high discriminatory power, unambiguous interpretation and
15
16 high inter-laboratory reproducibility.^{11, 21-23} van Belkum *et al.*²⁶ recommended a SDI of 0.95 or
17
18 more to resolve genetic relationships. Among genotyping methods commonly used on *A.*
19
20 *fumigatus* isolates, the discriminatory power (SDI) observed ranged between 0.832 and
21
22 0.984.^{11, 21, 27-29} In the present study, we undertook MLVA with SDI of 0.993. This technique,
23
24 which allows long-term and short-term investigation, has the advantage of rapidity and ease
25
26 of implementation.
27
28
29

30
31 Previous work has shown associations between IA cases and building
32
33 construction/demolition with increased spore emissions and re-suspension in the vicinity of
34
35 immunocompromised patients.³⁰⁻³² Guinea *et al.*¹¹ reported only 3 matches among 10 patients,
36
37 between clinical *A. fumigatus* isolates (n=109) involved in an IA outbreak and environmental
38
39 isolates (n=59) collected only indoors during a period of nearby building construction. The
40
41 small number of similarities between clinical and environmental genotypes was probably due
42
43 to the small number of environmental samples collected or the high variability of isolates in
44
45 the environment. Samples collected only inside the unit might also raise the issue about
46
47 indoor environmental reservoirs. Mellado *et al.*²⁹ discerned no related genotypes among
48
49 clinical or environmental isolates.
50
51
52

53
54 In previous investigations, samples were collected only outdoors or only indoors.^{11, 25}
55
56 In the present work, environmental *A. fumigatus* isolates were collected outside at 6 different
57
58
59
60

Confidential: Destroy when review is complete.

1
2
3 hospital sites and in 8 different units. Totally, 383 environmental isolates and 11 clinical
4 isolates give MLVA pattern, yielding 234 unique genotypes. We found high genotype
5 diversity in environmental isolates, with 169/383 having unique genotypes and confirming the
6 results of previous investigations.^{13, 22} *A. fumigatus* diversity was high both indoors and
7 outdoors, with 19% of genotypes recognized in both places. Increased outdoor contamination
8 by *A. fumigatus* during some calendar periods was not associated with amplified
9 contamination in wards. No case clusters in specific units or IA outbreaks were observed,
10 indicating the effectiveness of preventive measures.
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20
21 We found 2 clusters of 115 and 99 highly-related (only 1 VNTR of difference) isolates
22 originating from environmental and clinical samples (Figure 2). These results showed the
23 presence of highly-related populations in the hospital and implicated 2 major isolate sources
24 in the hospital environment, perhaps related to demolition or, more generally, to the local
25 ecology of an urban Lyon area. However, clustering did not allow the separation of isolates
26 according to sampling site origin or construction work period. Interestingly, in the present
27 study, unlike most epidemiological surveys, we detected matches between environmental and
28 clinical isolates.¹¹⁻¹⁴ Matches were found for 7 clinical isolates coming from 5 patients (A, B,
29 C, K and F). These results suggest a possible nosocomial origin of *A. fumigatus* transmission
30 from hospital environments.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 Some genotypes were found at different times and several hospital sites. These results
46 are similar to those reported by other authors.^{11, 17, 33} In the present study, 1 genotype (No. 37)
47 was evident 14 times. Between March and August 2015, this genotype was discerned 13 times
48 in environmental isolates from various indoor (n=5) and outdoor (n=8) units (Figure 3). The
49 same genotype occurred in May 2015 in patient F who was colonized by *A. fumigatus*.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Despite significant prevention measures inside units, environmental assessment
4 showed matches between isolates from outdoors and indoors, suggesting constant outdoor-
5 indoor exchange. This observation has implications for infection control policies,
6 demonstrating the need for active clinical surveillance, completed by regular microbiological
7 assessment during demolition work in hospital and close exchanges on preventive measures
8 between infection control teams and clinical units. In conclusion, our genotype results,
9 including clinical and environmental isolates, indicate that clinical *A. fumigatus* infection and
10 colonization may originate from hospital environments undergoing major demolition work.
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20
21 Our findings do not prove that demolition was the cause of clinical IA cases. In fact,
22 the presence of some genotypes at different times and in different parts of the hospital may be
23 explained by the persistence of isolates in the environment or the predominance of some
24 genotypes which could more easily infect humans.^{11, 34} The main results document
25 chronological events with similar strains detected in the environment before patient
26 hospitalization, in patients during their stay, and again in the environment after their
27 discharge. However, we cannot exclude a common source of these genotypes which could
28 potentially be building demolition.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 Another limitation is the lack of systematic screening of all hospitalized patients at
41 admission. We cannot totally exclude the possibility that patients diagnosed with *A. fumigatus*
42 were admitted with similar strains as those detected in the hospital environment.
43
44
45
46

47 Further studies in various hospital and city sites, including a sampling program before,
48 during and after demolition has ended, could help to describe in details the risk of IA among
49 patients and may be identified strains more susceptible to be infectious according to patient
50 status.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgments

The authors thank ANIOS Laboratories, France, for participating in this study by providing PhD support to Sophie Loeffert (by CIFRE: Convention Industrielle de la Formation par la Recherche). ANIOS Laboratories was not involved in the study design, analysis, results interpretation and discussion. Pr Bernad Hischel from Geneva University Hospitals for helpful comments.

REFERENCES

- [1] O’Gorman CM. Airborne *Aspergillus fumigatus* conidia: a risk factor for aspergillosis. *Fungal Biol Rev* 2011;25:151-7.
- [2] Marr KA, Patterson T, Denning D. Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations and therapy. *Infect Dis Clin North Am* 2002;16:875-94.
- [3] Garcia-Vidal C, Upton A, Kirby KA, Marr KA. Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clin Inf Dis* 2008;47:1041-50.
- [4] Nicolle MC, Bénet T, Thiebaut A, Bienvenu AL, Voirin N, Duclos A, Sobh M, Cannas G, Thomas X, Nicolini FE, De Monbrison F, Piens MA, Picot S, Michallet M, Vanhems P. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: incidence and description of 127 cases enrolled in a single institution prospective survey from 2004 to 2009. *Haematologica* 2011;96(11):1685-91.
- [5] Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Inf Dis* 1998;26:781-805.
- [6] Consensus Conference. Preventing the risk of *Aspergillus* infection in immunocompromised patients. *Bull Cancer* 2001;88:589-600.
- [7] Gangneux JP, Adjidé CC, Bernard L, Botterel F, Carel A, Castel O, Derouin F, Hoarau G, Labussière H, Lafaurie M, Millon L, Pottecher B, Thiebaut A, Turco M, Baron R. Quantitative assessment of fungal risk in the case of construction works in healthcare establishments: Proposed indicators for the determination of the impact of management precautions on the risk of fungal infection. *J Mycol Med* 2012;22:64-71.
- [8] Berthelot P, Loulergue P, Raberin H, Turco1 M, Mounier C, Tran Manh Sung R, Lucht F, Pozzetto B, Guyotat D. Efficacy of environmental measures to decrease the risk of hospital-

1
2
3 acquired aspergillosis in patients hospitalised in haematology wards. Clin Microbiol Infect
4
5 2006;12(8):738-44.
6

7
8 [9] Fournel I, Sautour M, Lafon I, Sixt N, L'Ollivier C, Dalle F, Chavanet P, Couillaud G,
9
10 Caillot D, Astruc K, Bonnin A, Aho-Glélé SL. Airborne *Aspergillus* contamination during
11
12 hospital construction works: efficacy of protective measures. Am J Infect Control
13
14 2010;38(3):189-94.
15

16
17 [10] Bonnal C, Leleu C, Brugière O, Chochillon C, Porcher R, Boelle PY, Menotti J, Houze
18
19 S, Lucet JC, Derouin F. Relationship between Fungal Colonisation of the Respiratory Tract in
20
21 Lung Transplant Recipients and Fungal Contamination of the Hospital Environment. PLoS
22
23 One 2015;10(12):e0144044
24
25

26
27 [11] Guinea J, García de Viedma D, Peláez T, Escribano P, Muñoz P, Meis JF, Klaassen CH,
28
29 Bouza E. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus*: an in-depth genotypic analysis of
30
31 isolates involved in an outbreak of invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 2011;49(10):3498-
32
33 503.
34
35

36
37 [12] Guarro J, Solé M, Castany R, Cano J, Teixidó A, Pujol I, Gené J, Castro A, Sarda P. Use
38
39 of random amplified microsatellites to type isolates from an outbreak of nosocomial
40
41 aspergillosis in a general medical ward. Med Mycol 2005;43(4):365-71.
42
43

44
45 [13] Araujo R, Amorim A, Gusmão L. Genetic diversity of *Aspergillus fumigatus* in indoor
46
47 hospital environments. Med Mycol 2010;48(6):832-8.
48

49 [14] Bart-Delabesse E, Cordonnier C, Bretagne S. Usefulness of genotyping with
50
51 microsatellite markers to investigate hospital acquired invasive aspergillosis. J Hosp Infect
52
53 1999;42:321-7.
54
55

- 1
2
3 [15] Chazalet V, Debeauvais JP, Sarfati J, Lortholary J, Ribaud P, Shah P, Cornet M, Vu
4 Thien H, Gluckman E, Brückner G, Latgé JP. Molecular typing of environmental and patient
5 isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. J Clin Microbiol
6 1998;36:1494-500.
7
8
9
10
11 [16] Thierry S, Wang D, Arné P, Deville M, De Bruin B, Nieguitsila A, Pourcel C, Laroucau
12 K, Chermette R, Huang W, Botterel F, Guillot J. Multiple-locus variable-number tandem
13 repeat analysis for molecular typing of *Aspergillus fumigatus*. BMC Microbiol 2010;10:315.
14
15
16
17
18 [17] Wang DY, Hadj-Henni L, Thierry S, Arné P, Chermette R, Botterel F, Hadrich I, Makni
19 F, Ayadi A, Ranque S, Huang WY, Guillot J. Simple and highly discriminatory VNTR-based
20 multiplex PCR for tracing sources of *Aspergillus flavus* isolates. PLoS One 2012;7(9):e44204.
21
22
23
24
25 [18] Wuyts V, Mattheus W, De Laminne de Bex G, Wildemauwe C, Roosens NH, Marchal K,
26 De Keersmaecker SC, Bertrand S. MLVA as a tool for public health surveillance of human
27 *Salmonella Typhimurium*: prospective study in Belgium and evaluation of MLVA loci
28 stability. PLoS One 2013;8(12):e84055.
29
30
31
32
33 [19] Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carriço JA.
34 PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence-based typing
35 methods. BMC Bioinformatics 2012;13:87.
36
37
38
39
40
41
42
43 [20] Bart-Delabesse E, Humbert JF, Delabesse E, Bretagne S. Microsatellite markers for
44 typing *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol 1998;36:2413-8.
45
46
47
48 [21] Vanhee LM, Nelis HJ, Coenye T. What can be learned from genotyping of fungi? Med
49 Mycol 2010;48(1):S60-9.
50
51
52
53 [22] Vanhee LM, Symoens F, Jacobsen MD, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple
54 typing methods for *Aspergillus fumigatus*. Clin Microbiol Infect 2009;15:643-50.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [23] de Valk HA, Meis JF, de Pauw BE, Donnelly PJ, Klaassen CH. Comparison of two
4 highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple *Aspergillus*
5 *fumigatus* isolates from patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*
6 2007;45(5):1415-9.
7
8 [24] Balajee SA, de Valk HA, Lasker BA, Meis JF, Klaassen CH. Utility of a microsatellite
9 assay for identifying clonally related outbreak isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Microbiol*
10 *Methods* 2008;73:252-6.
11
12 [25] de Valk HA, Meis JF, Bretagne S, Costa JM, Lasker BA, Balajee SA, Pasqualotto AC,
13 Anderson MJ, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Klaassen CH. Interlaboratory reproducibility of a
14 microsatellite-based typing assay for *Aspergillus fumigatus* through the use of allelic ladders:
15 proof of concept. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:180-7.
16
17 [26] van Belkum A¹, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing
18 V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M; European Society of Clinical
19 Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers
20 (ESGEM). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial
21 epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007;13 Suppl 3:1-46.
22
23 [27] Gao LJ, Sun Y, Wan Z, Li RY, Yu J. CSP typing of Chinese *Aspergillus fumigatus*
24 isolates: identification of additional CSP types. *Med Mycol* 2013;51(7):683-7.
25
26 [28] Bain JM, Tavanti A, Davidson AD, Jacobsen MD, Shaw D, Gow NA, Odds FC.
27 Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*
28 2007;45(5):1469-77.
29
30 [29] Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Buendia V, Aspa J, Prieto E, Villagrasa
31 JR, Rodriguez-Tudela JL. Characterization of a possible nosocomial aspergillosis outbreak.
32 *Clin Microbiol Infect* 2000;6(10):543-8.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [30] Sautour M, Sixt N, Dalle F, L'ollivier C, Calinon C, Fourquenet V, Thibaut C, Jury H,
4 Lafon I, Aho S, Couillault G, Vagner O, Cuisenier B, Besancenot JP, Caillot D, Bonnin A.
5 Prospective survey of indoor fungal contamination in hospital during a period of building
6 construction. *J Hosp Infect* 2007;67:367-73.
7
8
9
10
11 [31] Hansen D, Blahout B, Benner D, Popp W. Environmental sampling of particulate matter
12 and fungal spores during demolition of a building on a hospital area. *J Hosp Infect*
13 2008;70:259-64.
14
15
16
17 [32] Bouza E, Peláez T, Pérez-Molina J, Marín M, Alcalá L, Padilla B, Muñoz P, Adán P,
18 Bové B, Bueno MJ, Grande F, Puente D, Rodríguez MP, Rodríguez-Crèixems M, Vigil D,
19 Cuevas O; Aspergillus Study Team. Demolition of a hospital building by controlled
20 explosion: the impact on filamentous fungal load in internal and external air. *J Hosp Infect*
21 2002;52:234-42.
22
23
24
25 [33] Girardin H, Sarfat J, Traore F, Camet JD, Derouin F, Latge JP. Molecular epidemiology
26 of nosocomial invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1994;32:684-90.
27
28
29
30 [34] Alshareef F, Robson GD. Genetic and virulence variation in an environmental population
31 of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 2014;160(Pt 4):742-51.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1: Characteristics of 9 patients included in this study, diagnosis, number of genotypes found and potential matches with environmental isolates, Edouard Herriot Hospital, 2015

Patient	Sex/Age (years)	Vital status at discharge	Underlying condition(s)	Aspergillosis Diagnosis ^a	Origin ^b	Date of admission	Previous negative sample	Date of isolation	Delay (admission and pos sample) ^c	Clinical samples			Patient genotype matching environmental genotype
										Type of sample	Number of isolates	Number of genotypes	
A	M/74	Alive	Acute myeloid leukemia	Possible IA*	Hospital-acquired	12/01/14	Yes (14/12/10)	01/01/15	30	Sputum	2	1	Yes
B	F/60	Deceased	Lymphoma	Probable IA	Probably hospital-acquired	01/05/15	No	01/12/15	17	BAL	1	1	Yes
C	F/78	Alive	Corticosteroids	Colonization	Probably hospital-acquired	04/20/15	No	05/04/15	14	BAL	1	1	Yes
D	M/80	Alive	Myeloma	Colonization	Undetermined origin	04/20/15	No	04/22/15	2	Sputum	1	1	No
F	F/92	Alive	COPD	Colonization	Undetermined origin	05/12/15	No	05/29/15	2	Sputum	2	2	Yes
H	M/61	Alive	Myositis (immunosuppressive therapy)	Probable IA	Hospital-acquired	03/02/15	Yes (08/06/15)	08/06/15	183	Bronchial aspiration	1	1	No
J	M/86	Alive	Alteration of general health	Colonization	Hospital-acquired	08/13/15	Yes (08/18/15)	08/20/15	7	Bronchial aspiration	1	1	No
K	M/70	Alive	Cirrhosis	Colonization	Undetermined origin	08/24/15	No	15/08/27	4	Bronchial aspiration	1	1	Yes
L	F/65	Alive	Kidney and liver transplant	Colonization	Hospital-acquired	09/03/15	Yes (09/10/15)	09/22/15	19	BAL	1	1	No

18

Confidential: Destroy when review is complete.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

F: female; M: male

*This case was classified as possible IA while incomplete data might suggest that case would be probable IA.

^a According to EORTC criteria

^b Hospital acquired if delay between admission and + sample >10 days or history of previous negative sample. Undetermined if delay between admission and + sample between 2 and 10 days associated with no previous negative sample. Community acquired if presence of symptoms at the admission or positive sample

^c Delay between admission and positive sample in days

BAL = bronchoalveolar lavage, COPD = chronic obstructive pulmonary disease

Table II: *A. fumigatus* isolates recovered from various environmental sites and clinical cases over an 11-month period, Edouard Herriot Hospital, 2015.

N° d'isolat (AF-)	Genotype number	Date of isolation	Source	Source	Sample localisation
B	22	01/12/15	Clinical	Probable IA	ICU 1 - room
25	22	02/26/15	Environment	Indoor	ICU 2 - corridor
71	22	03/30/15	Environment	Indoor	Transplantation unit - corridor
314	22	10/20/15	Environment	Outdoor	ICU 3 - Porch
319	22	10/21/15	Environment	Outdoor	Infection control unit - window
382	22	12/02/15	Environment	Outdoor	ICU 1 - Porch
43	37	03/04/15	Environment	Indoor	MU 1 - corridor
44	37	03/04/15	Environment	Outdoor	ICU 1 - Porch
63	37	03/23/15	Environment	Indoor	ICU 4 - corridor
74	37	03/31/15	Environment	Indoor	MU 2 - corridor
138	37	04/28/15	Environment	Indoor	MU 2 - corridor
160	37	05/12/15	Environment	Outdoor	ICU 3 - Porch
175	37	05/18/15	Environment	Indoor	ICU 4 - nurse treatment room
F1	37	05/29/15	Clinical	Colonization	MU 4 - room
191	37	06/04/15	Environment	Outdoor	MU 3 - porch
198	37	06/09/15	Environment	Outdoor	MU 2 - porch
207	37	06/15/15	Environment	Outdoor	ICU 4 - porch
229	37	07/06/15	Environment	Outdoor	MU 1 - porch
240	37	07/13/15	Environment	Outdoor	ICU 4 - porch
268	37	08/13/15	Environment	Outdoor	Infection control unit - window
125	99	04/22/15	Environment	Indoor	MU 1 - corridor
C	99	05/04/15	Clinical	Colonization	MU 1 - room
263	99	08/10/15	Environment	Indoor	ICU 4 - nurse treatment room
342	99	11/10/15	Environment	Outdoor	MU 2 - porch
418	99	11/25/15	Environment	Outdoor	Infection control unit - window
A1	175	01/01/15	Clinical	Possible IA	MU 5 - room
A2	175	01/03/15	Clinical	Possible IA	MU 5 - room
286	175	09/10/15	Environment	Outdoor	MU 3 - porch
321	175	10/22/15	Environment	Outdoor	ICU 2 - porch
353	175	11/17/15	Environment	Indoor	MU 2 - corridor
355	175	11/18/15	Environment	Outdoor	Infection control unit - window
114	91	04/13/15	Environment	Outdoor	ICU 4 - porch
K	91	08/27/15	Clinical	Colonization	MU 6 - room
311	91	10/14/15	Environment	Indoor	MU 1 - corridor
85	67	04/02/15	Environnement	Indoor	ICU 2 - corridor
F2	67	06/03/15	Clinical	Colonization	MU 4 - room
220	67	06/29/15	Environnement	Indoor	Transplantation unit - room
280	67	08/26/15	Environnement	outdoor	MU 1 - porch
315	67	10/20/15	Environnement	outdoor	ICU 3 - Porch
H	231	08/06/15	Clinical	Probable IA	MU 4 - room

D	232	04/22/15	Clinical	Colonization	MU 5 - room
J	233	08/20/15	Clinical	Colonization	MU 7 - room
L2	234	08/20/15	Clinical	Colonization	ICU 1 - room

*Samples were collected from 4 ICUs (ICU-1 to ICU-4), 6 medical units: MU (MU-1 to MU-6), 1 kidney and liver transplantation unit and infection control unit window.

Confidential: For Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

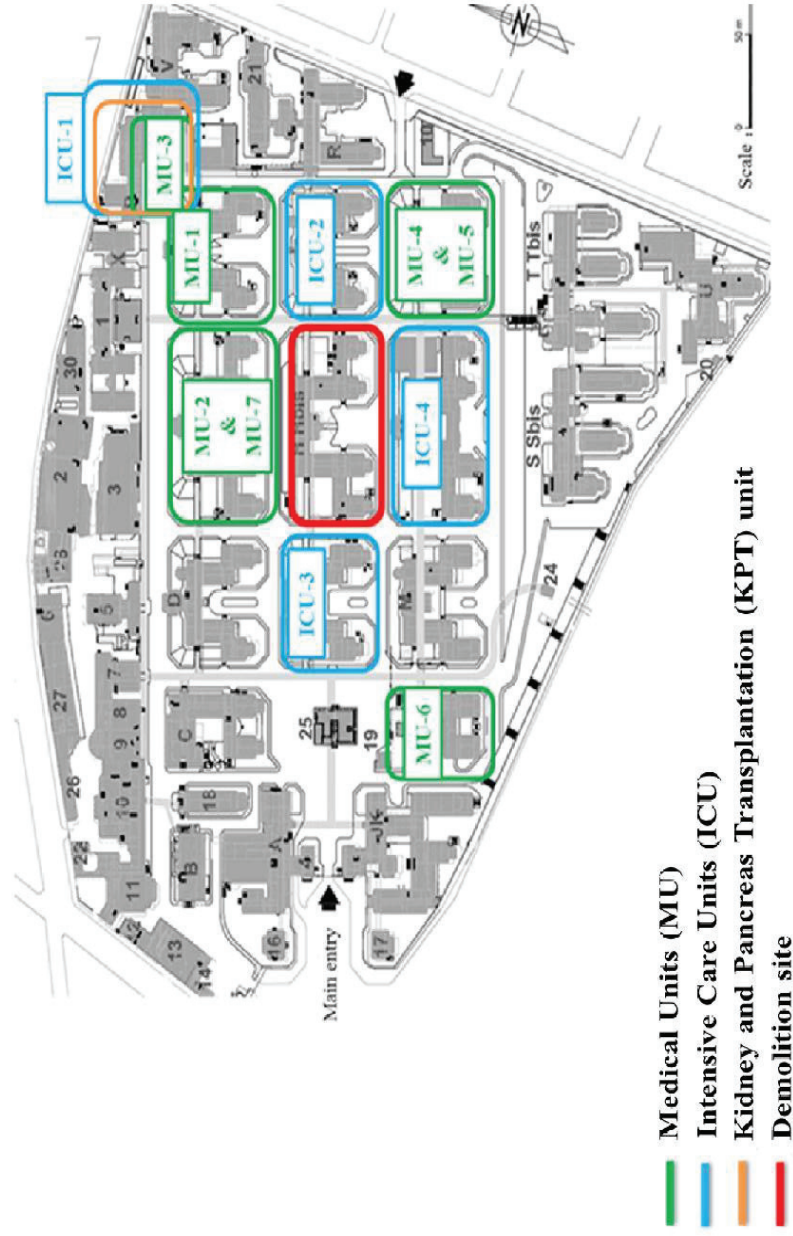


Figure 1: Location of monitored hospital units, Edouard Herriot Hospital, Lyon, 2015.

1

Confidential: Destroy when review is complete.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

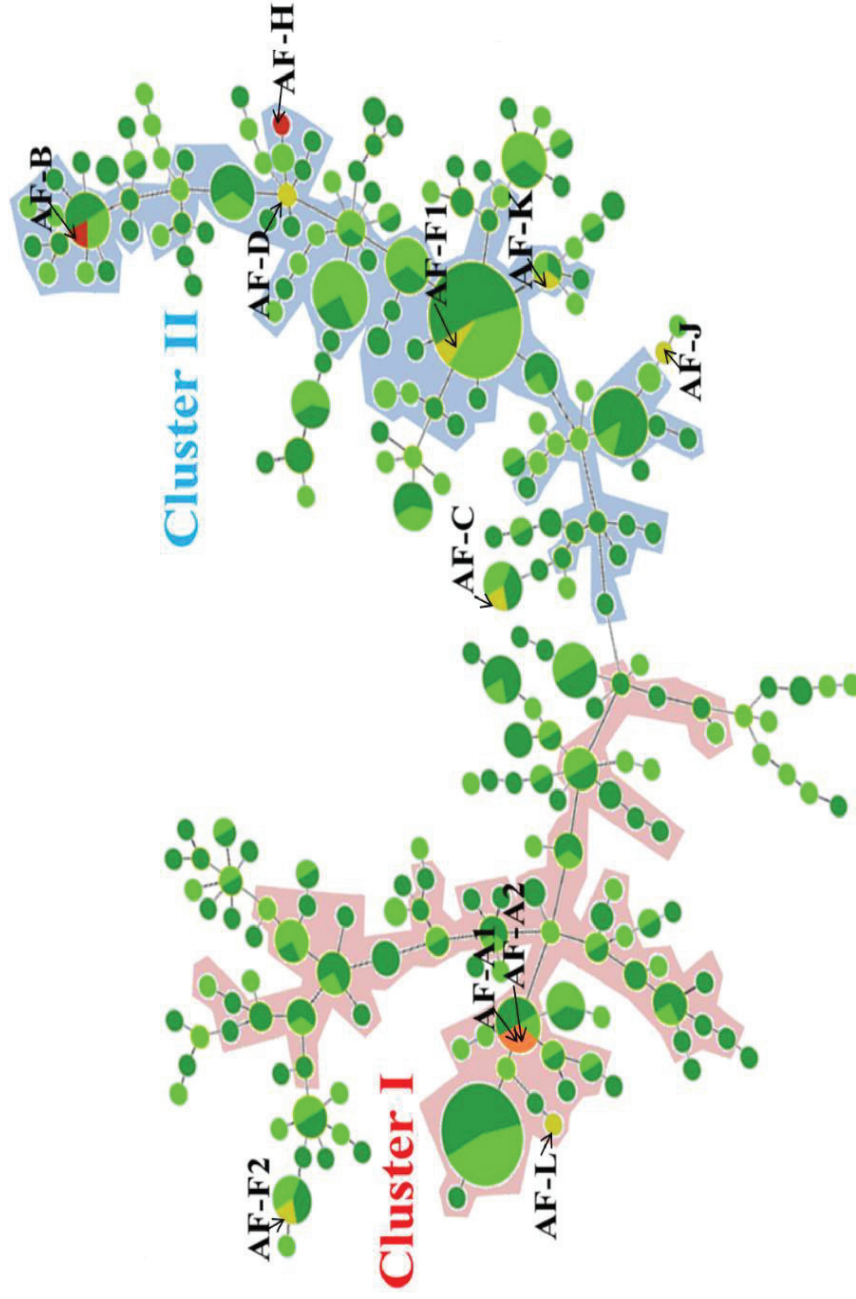


Figure 2: Minimum spanning tree representing the genotypic relationship between clinical and environmental *A. fumigatus* isolates.

1

Confidential: Destroy when review is complete.

Legend of figure 2:



Note of the figure 2: The figure shows the 234 different genotypes found (circles), the number of isolates with the same genotype (size of the circles), and sources of the strains (circles in light green indicate outdoor environmental isolates, in dark green correspond to indoor environmental isolates, and in other colors represent clinical isolates). Genotypes connected by a shaded background differ by a maximum of 1 of 10 VNTR markers and could be considered a clonal complex.

2

Confidential: Destroy when review is complete.

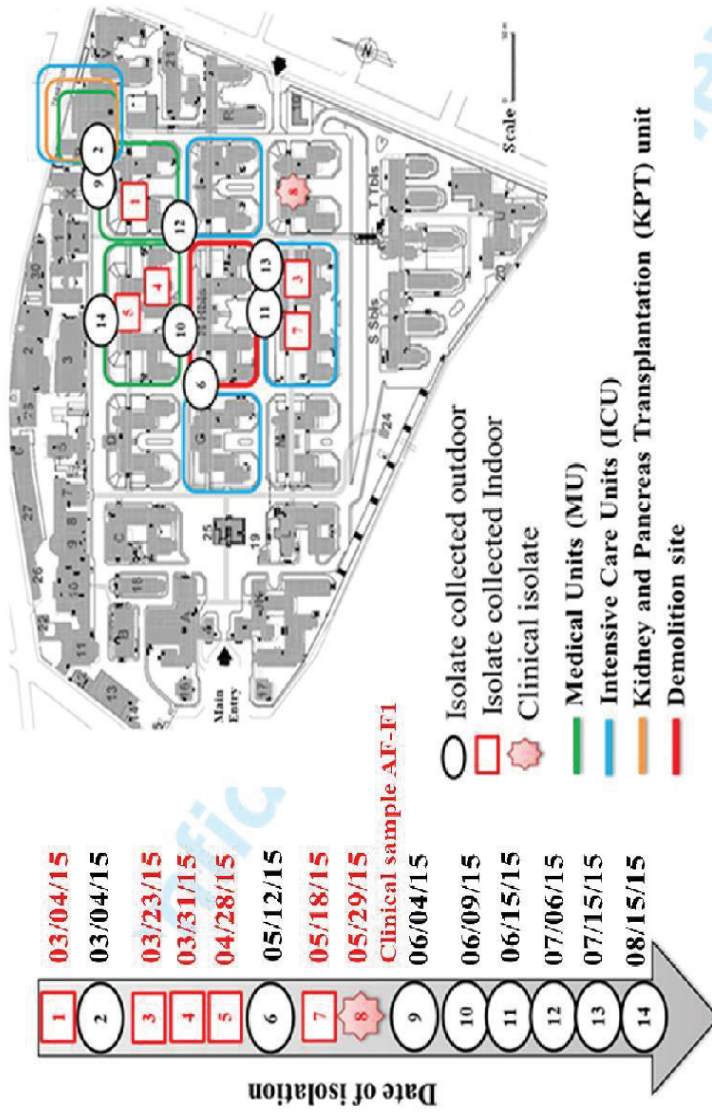


Figure 3: Sequential environmental and clinical sample analysis of 1 genotype (No. 37) of *A. fumigatus* by time and hospital site

Confidential: Destroy when review is complete.

III) Article 5

Prospective survey of azole drug resistance among environmental and clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* in a French university hospital during major deconstruction

Etude prospective de la susceptibilité aux azolés d'isolats environnementaux et cliniques d'*A. fumigatus* dans un hôpital universitaire français durant une période de travaux majeurs. Article soumis en juin 2017 à la Revue *Medical Mycology*. En attente des commentaires des reviewers.

Annuellement, *Aspergillus* est estimé responsable de problèmes de santé chez des millions de personnes dans le monde et d'AI chez approximativement 200 000 d'entre eux (Kosmidis *et al.*, 2015 ; Vervweij *et al.*, 2015). Le taux de mortalité chez les patients atteints d'AI infectés par des souches résistantes passe de 30-50% normalement, à plus de 80% (van der Linden *et al.*, 2011). Les antifongiques azolés constituent la première ligne de traitement contre ces infections. Ainsi, l'émergence des résistances aux azolés complique la prise en charge de ces patients.

Actuellement, environ 90% des cas de résistance aux azolés retrouvés chez *A. fumigatus* ont pu être reliés à des mutations du gène *CYP51A*, codant pour l'enzyme 14- α -déméthylase, cible des azolés (Bowyer *et al.*, 2011). Ces mutations ont principalement été décrites chez des patients suivant un traitement azolé au long cours, mais aussi chez des patients azole-naïf, pour qui la résistance est supposée acquise par le biais de l'environnement (Garcia-Rubio *et al.*, 2017). Deux mutations de ce gène, acquise dans l'environnement sont principalement retrouvées dans le monde TR34/L98H et TR36/Y121F/T298A.

Une plus forte prévalence de ces mutations a cependant été retrouvée en Europe et en Asie par rapport au reste du monde. Bien que certaines parties du monde n'aient pu à l'heure actuelle réaliser d'études précises sur la thématique, cette répartition peut être expliquée par la consommation importante des fongicides en Europe de l'Ouest et en Asie. Ces régions du monde comptent pour respectivement 37% et 24% de la consommation mondiale (Stensvold *et al.*, 2012). Ainsi cette forte pression de sélection exercée par les fongicides pourrait expliquer les différences de taux de prévalence des souches d'*A. fumigatus* azole résistantes retrouvées dans le monde (Rocchi *et al.*, 2015).

En France, peu d'études ont été réalisées (Figure 25). Elles ont pu observer une prévalence de la résistance aux azolés chez des isolats cliniques allant de 1,8% à 8%.

Seulement une étude a permis de retrouver la mutation TR34/L98H chez un isolat d'*A. fumigatus* provenant du sol (Rocchi *et al.*, 2014). De plus, il est actuellement difficile d'obtenir une vraie estimation de la prévalence en France, du fait que la susceptibilité des isolats d'*A. fumigatus* n'est pas évaluée en routine dans les établissements de santé français.

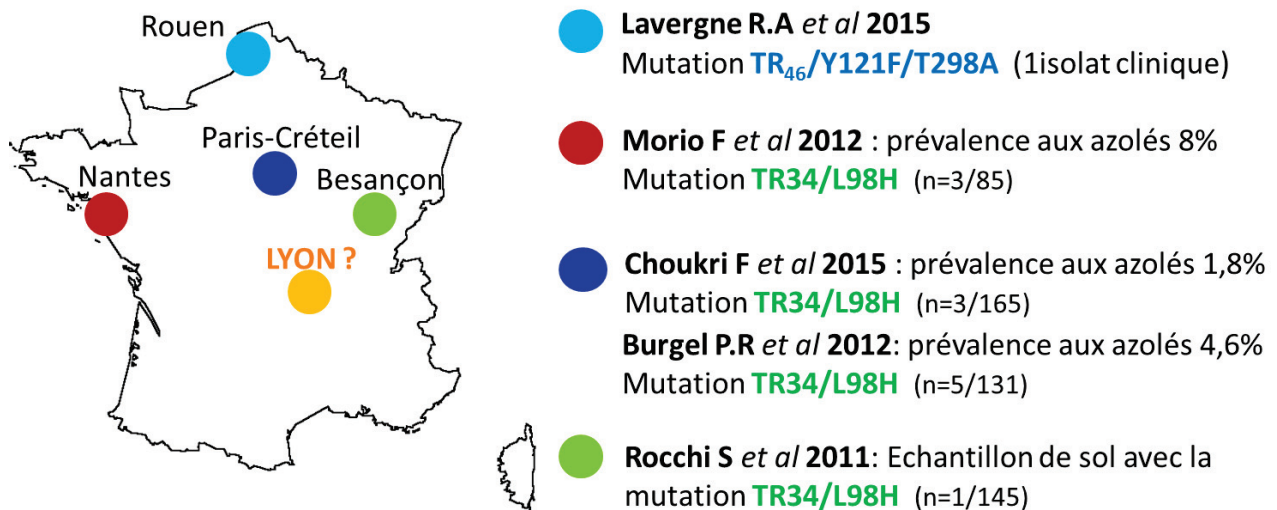


Figure 25. Liste d'études françaises non exhaustive, ayant évaluées la susceptibilité aux azolés d'isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus*

L'objectif de ce travail était d'évaluer la susceptibilité aux azolés d'isolats d'*A. fumigatus* retrouvés chez des patients et dans l'air de notre hôpital durant une période d'un an, dans un contexte de travaux majeurs afin de détecter la présence de possible réservoirs environnementaux pouvant être source d'isolats résistants aux azolés.

Cette étude a été réalisée durant la deuxième année de thèse, à partir de la collection d'*A. fumigatus* conservés au laboratoire. Mon implication dans ce travail a été le design de l'étude, la réalisation des Etests selon le protocole fournis par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital de la Croix Rousse à Lyon. J'ai également participé à l'analyse des résultats et à l'écriture de l'article.

1
2
3 **Prospective survey of azole drug resistance among environmental and clinical isolates of**
4 ***Aspergillus fumigatus* in a French university hospital during major deconstruction**
5
6

7 Loeffert S¹, Hénaff L¹, Dupont D², Bienvenu AL², Dananché C^{1,3}, Cassier P⁴, Bénét T³,
8 Wallon M², Gustin MP⁵, Vanhems P^{1,3}
9

10
11 ¹Laboratoire des Pathogènes Emergents – Fondation Mérieux, Centre International de
12 Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, Université de
13 Lyon 1, France
14

15 ²Institut de Parasitologie et de Mycologie Médical, Hôpital de la Croix Rousse. Waking Team,
16 Centre de Recherche en Neurosciences, INSERM U1028, CNRS UMR5292, Lyon, France
17
18
19
20

21 ³Unité d'Hygiène, Epidémiologie et Prévention, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de
22 Lyon, France
23

24 ⁴Laboratoire de Biologie Sécurité Environnement, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils
25 de Lyon, France
26

27 ⁵Département de Santé Publique, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques,
28 Faculté de Pharmacie, Université de Lyon 1, Lyon, France
29
30
31

32 Corresponding author: Sophie T. Loeffert, Emergent Pathogens Laboratory – Fondation
33 Mérieux, Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, CNRS
34 UMR5308, ENS de Lyon, Université Claude Bernard, 21, avenue Tony Garnier, Lyon 69007,
35 France. Email: sophie.loeffert01@chu-lyon.fr. Telephone: +33.(0)4.72.11.07.20
36
37

38 Key words:

39 Fungal infection

40 *Aspergillus fumigatus*

41 Azole Drug susceptibility

42 Hospital surveillance
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Recent studies have reported the emerging worldwide problem of azole drug resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates. The aim of this work was to evaluate the antifungal susceptibility of *A. fumigatus* isolates recovered from air and clinical samples in a French university hospital (Lyon) which underwent major deconstruction over a 1-year period. Environmental and clinical *A. fumigatus* isolates were identified by conventional methods and β -tubulin sequencing. Totally, 400 *A. fumigatus* isolates were collected. Their susceptibility to Itraconazole and Voriconazole was assessed by Etest. All strains were susceptible to azoles ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$).

1
2
3 Invasive aspergillosis (IA), a major threat to immunocompromised patients, is mostly
4 caused by *Aspergillus fumigatus* (>80%).^{1,2} Mortality rates are higher in patients infected with
5 azole-resistant isolates than in those exposed to azole-susceptible strains (80% vs 30-50%).³
6
7 Azole-resistant *A. fumigatus* isolates are being increasingly reported in Europe, in patients on
8 long-term azole therapy and in environmental samples, due to the presence of azole
9 fungicides in agriculture.⁴⁻⁷ The main mechanism of resistance discerned in clinical and
10 environmental isolates is mutation of *Cyp51A* gene.⁸

11
12 In France, data are limited in terms of epidemiology and prevalence of azole resistance in *A.*
13 *fumigatus* isolates.⁹⁻¹⁴ Recently, Rivero-Menendez et al. noted that the prevalence of azole
14 resistance in French clinical *A. fumigatus* isolates ranged between 0.85 and 10.6% which is
15 challenging the therapeutic management of *A. fumigatus* infections.⁴ Furthermore, the
16 association between nosocomial IA and renovation/deconstruction in healthcare institutions
17 has been well-recognised.^{15,16} Our aim was to evaluate the antifungal susceptibility of *A.*
18 *fumigatus* isolates recovered from air and clinical samples collected in a French university
19 hospital (Lyon) undergoing major deconstruction.

20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41 This study was performed at University of Lyon-affiliated Edouard Herriot Hospital,
42 France, from February to December 2015. The hospital was undergoing major deconstruction
43 with the entire demolition of 1 of 32 hospital blocks. Environmental and clinical surveys were
44 undertaken to assess IA risks. Air specimens were collected inside and outside 8 wards,
45 including 4 intensive care units (ICUs), 1 kidney-pancreas transplantation (KLP) unit and 3
46 medical wards. Totally, 3,885 air samples were collected during the study period. Finally, 388
47 environmental *A. fumigatus* strains were selected randomly. The clinical survey was based on
48 epidemiological investigation of IA cases according to consensus criteria defined by European
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

3

1
2
3 Organization for research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infections Cooperative
4 Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. A
5 total of 12 *A. fumigatus* isolates from the clinical samples were included. Air specimens were
6 collected by agar impact sampler (Air Ideal[®], bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) on 90-mm
7 diameter Petri dishes containing Sabouraud Chloramphenicol agar. After 48-h incubation at
8 37°C, colonies were identified in the Fumigati section based on macroscopic and microscopic
9 characteristics and confirmed by thermotolerance testing (48-h incubation at 55°C).
10
11
12
13
14
15
16
17

18 Identification at the species level of *A. fumigatus* isolates was confirmed by
19 sequencing β -tubulin gene (benA, with Bt2a/Bt2b primers).¹⁷ Sequences were analyzed and
20 compared with Genbank[®] and Mycobank[®] databases. To ensure proper sporulation, stored
21 isolates were cultured on Sabouraud dextrose agar supplemented with Chloramphenicol at
22 37°C for at least 5 days. Conidia suspensions of *A. fumigatus* were prepared in sterile,
23 distilled water tubes and adjusted to an optical density of 0.5 McFarland units. RPMI-1640
24 supplemented with 2% glucose agar (bioMérieux) was inoculated by dipping a sterile swab
25 into the suspension and streaking it in 3 directions on the agar surface. Antifungal Etest strips
26 of itraconazole (ITZ) and voriconazole (VCZ) (bioMérieux) were then deployed. Plates were
27 incubated at 37°C for 48 h. A *C. parapsilosis* ATCC reference strain served as quality control
28 for both antifungals. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were estimated visually at no-
29 growth endpoints, where the edge of the inhibition ellipse intersected the sides of the strips.
30 For MICs analysis, the breakpoints proposed by Verweij *et al.*¹⁸ were adapted from European
31 Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing methodology.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 Graphics analysis and Shapiro's test appraised data normality. Mean MICs between
50 isolates and antifungals were compared by Student's test in case of data normality and by the
51 Wilcoxon test in case of asymmetric distribution or extreme values. P<0.05 values were
52 considered to be statistically significant.
53
54
55
56
57
58
59
60

4

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Totally, 3,073 (79%) *A. fumigatus* colonies were identified from 3,885 environmental samples between February and December 2015. From this collection, 388 (10%) of *A. fumigatus* colonies (157 from indoor samples and 231 from outdoor samples) were stored randomly and tested for antifungal susceptibility. Indoor samples originated from ICUs (n=47), the KPT unit (n=17) and 3 medical wards (n=93). Outdoor samples (n=231) were collected in direct proximity to the hospital deconstruction site. Totally, 12 *A. fumigatus* clinical isolates were collected from 10 patients diagnosed as having probable (n=3) or possible (n=1) nosocomial IA, localized aspergillosis (n=1) or bronchial colonization (n=5) (Table 1). In our study, all environmental (n=388) and clinical isolates (n=12) of *A. fumigatus* displayed no high MIC azole values. All strains were susceptible to VCZ and ITZ (Figure 1). ITZ MIC mean was 0.39 µg/mL (range: 0.032-1 µg/mL) in environmental and 0.42 µg/mL (range: 0.19-0.5 µg/mL) in clinical isolates. In environmental and clinical isolates, VCZ MIC means were respectively 0.09 (µg/mL) and 0.11 (µg/mL), ranging from 0.023 to 0.5 (µg/mL) and 0.094 to 0.19 (µg/mL). Higher MIC values were observed in clinical isolates ($p < 10^{-2}$). On the other hand, ITZ MICs were not significantly different between environmental and clinical isolates ($p = 0.14$). Similarly, no significant differences in antifungal MIC means of ITZ ($p = 0.06$) and VCZ ($p = 0.28$) were evident between indoor and outdoor environmental isolates.

Our study objective was to screen for possible sources of azole resistance of *A. fumigatus* isolates in a hospital undergoing major deconstruction. It is a topical and interesting subject owing to the emerging phenomenon of azole resistance in clinical strains worldwide, which challenges therapeutic management.³ Two different routes of azole resistance development in *A. fumigatus* by selective pressure have been described: a medical route generated by long-term azole therapy and the environmental pathway.¹⁹ Recently, triazole-

1
2
3 resistant *A. fumigatus* isolates with *cyp51A* gene mutations due to selective pressure by
4
5 previous azole fungicide exposure were associated with high rates of treatment failure,
6
7 complicating patient care.^{6,7} In Europe, some countries around France – the Netherlands and
8
9 Germany – have witnessed highly prevalent azole resistance of clinical and environmental *A.*
10
11 *fumigatus* isolates.⁴
12

13
14 In France, some studies have already described azole-resistant *A. fumigatus* isolates in clinical
15
16 samples.⁹⁻¹² However, only 1 team reported azole-resistant *A. fumigatus* isolates from the
17
18 environment in a soil sample coming from an agricultural area where triazole fungicides were
19
20 common.^{13,14} Against this backdrop, our study provides interesting results by showing no MIC
21
22 (ITZ and VCZ) elevation in environmental and clinical *A. fumigatus* isolates from our urban
23
24 hospital undergoing major deconstruction. This could be related to its geographic location
25
26 within the city, and results may differ in healthcare centers built at the city's periphery, near
27
28 agricultural areas. These data are original since very few studies have been conducted in
29
30 French healthcare establishments. Similarly, few worldwide have evaluated the antifungal
31
32 susceptibility of a large amount of environmental *A. fumigatus* isolates from healthcare
33
34 institutions.²⁰
35
36
37
38
39

40 Our investigation has some limitations. No soil samples in the hospital environment and no
41
42 rural samples were collected. However, it provides new data on azole resistance among
43
44 clinical and environmental *A. fumigatus* isolates in France where it appears difficult to obtain
45
46 true estimates of prevalence, because antifungal susceptibility testing is not routinely
47
48 integrated in hospital microbiology laboratories. To respond to growing risks to patients
49
50 infected by inhaling strains already resistant to azoles, it is important to monitor the
51
52 environmental ecology of *A. fumigatus* strains.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Further research is needed with larger numbers of clinical and environmental *A. fumigatus*
4
5 isolates from agricultural areas and healthcare establishments to better appreciate the
6
7 occurrence and prevalence of azole resistance.
8
9

10 11 12 13 **Acknowledgment**

14
15
16 The authors thank Bruno Simon (medical intern) for his valuable advice and Laboratories
17
18 ANIOS, France, for participating in this study by providing PhD salary support (CIFRE:
19
20 Conventions Industrielles de Formation par la Recherche). (Laboratories ANIOS was not
21
22 involved in study design, analysis, results interpretation and discussion.) The authors also
23
24 thank Analyzair® for invaluable advice.
25
26
27
28
29
30

31 32 **Disclosure of potential conflict of interest**

33
34 All authors approved the final version of the manuscript and vouch that it is not being
35
36 considered for publication elsewhere. PhD salary support of the first author by Laboratoires
37
38 ANIOS is acknowledged. The other authors of this article declare that they have no conflicts
39
40 of interest.
41
42
43
44

45 46 **Funding**

47
48 This study was supported by a PhD grant (*Conventions Industrielles de Formation par la*
49
50 *Recherche*) from Laboratories ANIOS, France. The study sponsor was not involved in the
51
52 study design, analysis, results interpretation, discussion and conclusion.
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

- [1] Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Inf Dis* 1998;26:781-805.
- [2] Garcia-Vidal C, Upton A, Kirby KA, Marr KA. Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clin Inf Dis* 2008;47:1041-1050.
- [3] van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA, et al. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1846-1854.
- [4] Rivero-Menendez O, Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. Triazole Resistance in *Aspergillus* spp.: A Worldwide Problem? *J Fungi* 2016;2:21.
- [5] Bader O, Tunnermann J, Dudakova A, Tangwattanachuleepom M, Weig M, Gross U. Environmental isolates of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:4356-4359.
- [6] Hagiwara D, Watanabe A, Kamei K, Goldman GH. Epidemiological and Genomic Landscape of Azole Resistance Mechanisms in *Aspergillus* Fungi. *Front Microbiol* 2016;7:1382.
- [7] Lelièvre L, Groh M, Angebault C, Maherault AC, Didier E, Bougnoux ME. Azole resistant *Aspergillus fumigatus*: an emerging problem. *Med Mal Infect* 2013;43(4):139-145.
- [8] Chowdhary A, Sharma C, Hagen F, Meis JF. Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms. *Future Microbiol* 2014;9(5):697-711.
- [9] Alanio A, Sitterle E, Liance M, et al. Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:371-374.
- [10] Choukri F, Botterel F, Sitterle E, et al. Prospective evaluation of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* clinical isolates in France. *Med Mycol* 2015;53(6):593-596.
- [11] Morio F, Aubin GG, Danner-Boucher I, et al. High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1870-1873.
- [12] Burgel PR, Baixench MT, Amsellem M, et al. High prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:869-874.
- [13] Rocchi S, Reboux G, Millon L. Azole resistance with environmental origin: What alternatives for the future? *J Mycol Med* 2015;25:249-256.

- 1
2
3
4 [14] Rocchi S, Daguindau E, Grenouillet F, et al. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolate
5 with the TR34/L98H mutation in both a fungicide-sprayed field and the lung of a
6 hematopoietic stem cell transplant recipient with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*
7 2014;52:1724-1726.
8
9 [15] Vonberg RP, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect*
10 2006;63:246-254.
11
12 [16] Alberti C, Bouakline A, Ribaud P, et al. Relationship between environmental fungal
13 contamination and the incidence of invasive Aspergillosis in haematology patients. *J Hosp*
14 *Infect* 2001;48:198-206.
15
16 [17] Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to
17 amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.*
18 1995;61(4):1323-30
19
20 [18] Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJ, et al. Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed
21 nomenclature and breakpoints. *Drug Resist Updat* 2009;12:141-147.
22
23 [19] Garcia-Rubio R, Cuenca-Estrella M, Mellado E. Triazole Resistance in *Aspergillus*
24 Species: An Emerging Problem. *Drugs* 2017;77:599-613.
25
26 [20] van der Linden JW, Arendrup MC, Warris A, et al. Prospective multicenter international
27 surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis* 2015;21(6):1041-
28 1044.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1. Characteristics and MIC results of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*

Patient #	Isolates	Sex*/Age (years)	Diagnosis	Underlying disease	Date of isolation	Type of sample	Treatment	MICs (µg/mL)	
								ITZ	VCZ
1	A1	M/74	Possible nosocomial IA	Acute myeloid leukemia	15.01.01	Sputum	Voriconazole	0.5	0.125
1	A2				15.01.03			0.38	0.094
2	B	60	Probable nosocomial IA	Lymphoma	15.01.12	Bronchoalveolar lavage	Voriconazole Amphotericin B	0.5	0.094
3	C	F/78	Bronchial colonization	Long-term corticotherapy	15.05.04	Bronchoalveolar lavage	None	0.38	0.094
4	D	M/80	Bronchial colonization	Myeloma	15.04.22	Sputum	None	0.5	0.125
5	E	M/47	Probable nosocomial IA	Glomerulonephritis	15.05.12	Bronchial fluid	Voriconazole	0.5	0.19
6	F1	F/92	Localized aspergillosis	COPD**	15.05.29	Sputum	None	0.5	0.125
6	F2				15.06.03	Bronchoalveolar lavage		0.38	0.094
7	H	M/61	Probable nosocomial IA	Myositis	15.05.06	Bronchial fluid	None	0.5	0.125
8	J	M/86	Bronchial colonization	Suspicion of tuberculosis	15.08.20	Bronchial fluid	None	0.19	0.094
9	K	M/70	Bronchial colonization	Cirrhosis	15.08.27	Bronchial fluid	None	0.38	0.094
10	L	F/65	Bronchial colonization	Kidney and Pancreas transplantation	15.09.22	Bronchoalveolar lavage	Triflucan Fluconazole	0.38	0.094

*F: female; M: male

**COPD: chronic obstructive pulmonary disease

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

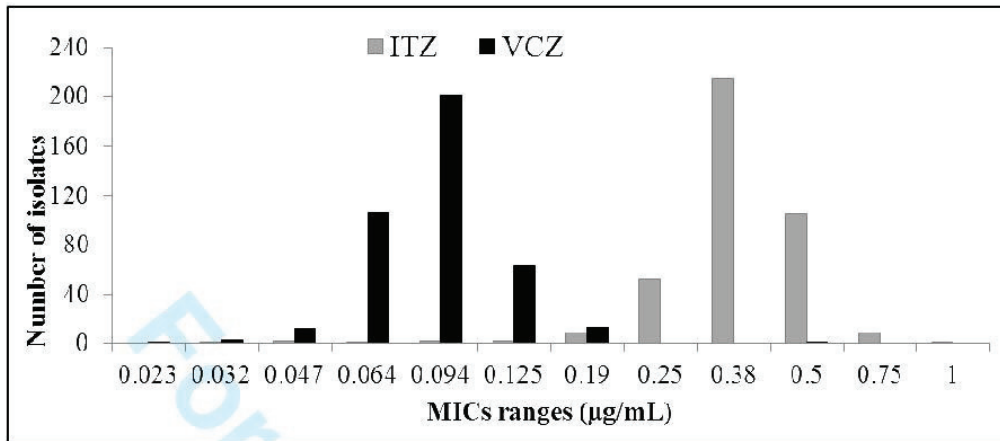


Figure 1: Minimum inhibitory concentration (MIC) values obtained by testing the susceptibility of clinical and environmental *A. fumigatus* isolates to itraconazole (ITZ) and voriconazole (VCZ)

DISCUSSION

DISCUSSION

Au fil des années, les établissements de santé sont de plus en plus fréquemment confrontés à des travaux de construction/déconstruction dans le but de moderniser leurs structures et équipements afin d'assurer la meilleure prise en charge possible des patients. En période de travaux, la mise en suspension des spores d'*Aspergillus* constitue un facteur de risque reconnu de développer une aspergillose invasive (AI). A l'heure actuelle il reste difficile d'évaluer les facteurs pouvant influencer cette dispersion. De même, les connaissances restent limitées en ce qui concerne les liens pouvant exister entre l'exposition environnementale engendrée par des travaux et l'apparition de cas d'infections chez les patients. Durant l'année 2015, un pavillon entier de notre hôpital (6000 m² – 60 lits) a été entièrement démoli sans arrêt de l'activité de soins au niveau des pavillons environnants.

L'approche proposée dans notre étude pour évaluer la dispersion d'*Aspergillus* lors de travaux repose sur la réalisation d'une surveillance environnementale par 2 méthodes différentes, associée à un monitoring des paramètres météorologiques. Enfin, pour évaluer et caractériser les relations pouvant exister entre les souches cliniques et les souches environnementales d'*A. fumigatus* retrouvées pendant la période de travaux, le profil génétique des souches a été évalué ainsi que leur susceptibilité aux antifongiques.

1) Evaluation de l'efficacité des mesures de prévention pour réduire l'aérocontamination environnementale et influence des facteurs météorologiques sur la dispersion d'*Aspergillus* (article 1).

Les champignons filamenteux ubiquitaires, saprophytes *Aspergillus spp.* sont responsables d'infections opportunistes au pronostic parfois sévère tel que l'AI. Les espèces à l'origine d'AI sont majoritairement *A. fumigatus* (> 80 %), puis les espèces *A. flavus*, *A. terreus*, et plus rarement *A. nidulans* (Garcia-Vidal *et al.*, 2008). La contamination se fait par inhalation des spores qui sont aéroportées dans l'air et qui peuvent ainsi pénétrer les voies aériennes jusqu'au niveau alvéolaire et engendrer une aspergillose pulmonaire invasive (Marr *et al.*, 2002). *Aspergillus* est responsable d'environ 200 000 AI par an dans le monde (Denning *et al.*, 2011b; Denning *et al.*, 2013). Malgré un traitement approprié, le taux de mortalité des AI reste élevé : 28,5% (Bitar *et al.*, 2014).

Il a été démontré que l'environnement a un impact direct sur l'incidence des infections aspergillaires (IA). Une étude interventionnelle contrôlée conduite en 2005-2006 a montré qu'en délocalisant les patients d'une unité d'hématologie dans un environnement protégé par surpression, le taux d'infections aspergillaires diminue significativement (13,6% à 1,6% ; p<0.018) (Bénet *et al.*, 2013). Des études ont également mis en évidence que le taux d'*Aspergillus* dans l'environnement

variait en fonction de la température extérieure et de l'humidité (Cavallo *et al.*, 2013; Mahieu *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1995). Ainsi, de multiples facteurs semblent influencer la contamination environnementale à *Aspergillus* à l'hôpital, constituant ainsi des situations à risque pour les patients hospitalisés.

La présence de travaux (terrassment, construction, manipulations de faux plafonds...) dans l'environnement hospitalier accentue l'émission de spores et constitue une situation à risque d'infection aspergillaire (Nicolle *et al.*, 2011). C'est pourquoi lors de travaux dans un établissement de santé, il est recommandé de mettre en place une cellule dédiée pour évaluer le niveau de risque aspergillaire et d'organiser mettre en place des mesures de prévention : confinement des travaux, fumigation, installation de filtres HEPA (High Efficiency Particulate Air filter), protection des patients, mise en place de surveillance environnementale... (Hygiènes 2011). En France, peu d'études ont permis d'évaluer l'efficacité de ces mesures de protection sur l'aérocontamination environnementale à *Aspergillus* (Fournel *et al.*, 2010; Brenier-Pinchart *et al.*, 2009). Les limites souvent retrouvées sont, soit un nombre insuffisant de prélèvements environnementaux, uniquement réalisés dans un service précis, soit ou encore l'absence de prélèvements environnementaux à la fois extérieurs et intérieurs.

Dans cette étude, nous avons réalisé durant 11 mois une surveillance environnementale, par prélèvements d'air extérieurs et intérieurs de 8 unités différentes localisées tout autour du pavillon en démolition au sein de notre hôpital. Au total 3709 prélèvements d'airs provenant de l'extérieur pour 1744 et de l'intérieur pour 1965 prélèvements (n=1156 unités conventionnelles sans traitement d'air particulier), n=809 unités protégées, avec une filtration d'air pour particules fines) ont été collectés. Cette importante campagne de prélèvements réalisée pendant les 3 périodes de déconstruction dans notre hôpital a permis de calculer des ratios de contamination à *Aspergillus* « Extérieur vs Intérieur » pour évaluer l'efficacité des mesures de prévention, principalement maintien des fenêtres et portes de l'unité fermées. Ainsi, les services protégés (réanimations et transplantation) étaient moins contaminés par *Aspergillus* que les services conventionnels pour lesquels le risque de présence d'*Aspergillus* était RR=3,14 (95% IC 2,51-3,93, $p < 10^{-24}$) plus élevé. Le risque de présence d'*Aspergillus* à l'extérieur était RR=1,33 fois plus important qu'à l'intérieure des services protégés (95% IC 1,19-1,49). Les barrières physiques et mesures de préventions propres aux types de services jouent un rôle dans la prévention de la contamination fongique intérieur (Mahieu *et al.*, 2000). Récemment, Brenier-Pinchart *et al.*, ont montré une corrélation positive ($r=0,0126$, $p=0,31$) entre l'ouverture des portes de l'unité et la contamination de la flore fongique de l'air. Dans ce travail, une observation du nombre de portes et fenêtres laissées ouvertes alors que les mesures de précautions recommandaient de les maintenir fermées, a été réalisée lors de chaque prélèvement intérieur. Ainsi, le non-respect des mesures de précautions a pu être associé

avec une augmentation du risque de contamination à *Aspergillus* de respectivement 1,80 (95%IC 1,05-3,09, p=0,03) et 1,34 (95% IC 1,08-1,65, p=0,07) pour les unités conventionnelles (sans traitement air particulier) et les unités dites protégées (avec une filtration d'air pour particules fines).

Un monitoring des paramètres météorologiques extérieurs a également été réalisé afin d'évaluer l'impact de ces derniers sur la probabilité de présence d'*Aspergillus* à l'extérieur mais également à l'intérieur des services. Les résultats obtenus confirment ceux de la littérature (Cavallo *et al.*, 2013; Li *et al.*, 1995) montrant l'influence de plusieurs paramètres météorologiques dont les principaux sont la température et l'humidité relative. Un effet de la vitesse du vent sur la contamination extérieure à *Aspergillus* a également été retrouvé (Li *et al.*, 1995) avec une probabilité de présence d'*Aspergillus* deux fois plus faible à l'extérieur lorsque la vitesse du vent est faible (<25Km/h). Au contraire de l'étude de Pilmis *et al.*, qui a montré un impact de la température sur la contamination extérieure globale à *Aspergillus*, les facteurs météorologiques extérieurs ayant significativement le plus d'impact dans notre étude étaient l'humidité relative et la température. L'humidité relative influence significativement la contamination extérieure à *Aspergillus* lorsqu'il y a des températures moyennes (15-20°C) ou faibles (<15°C). Son effet est moindre lorsque les températures sont importantes (20-37°C). L'outil météorologique se confirme être un outil simple et utile pour aider à prévenir le risque aspergillaire et permettre ainsi une bonne gestion des mesures de prévention dans les unités.

Cependant, cette étude a été réalisée pendant des travaux majeurs de déconstruction répartis en 3 périodes, au sein de notre hôpital. Contrairement à l'étude de Pilmis *et al.*, les périodes de travaux semblent également influencer la contamination d'*Aspergillus* à l'extérieur ($p > 10^{-24}$). Le risque de contamination à *Aspergillus* était 1,25 (95% IC 1,08-1,44) fois plus important lors des travaux de démolition des étages que lors de la phase de curage/désamiantage du bâtiment. De même, ce risque était 1,77 (95% IC 1,58-1,97) fois plus important durant les travaux d'excavation terrassement que lors du curage/désamiantage. Dans notre étude, les paramètres météorologiques et les périodes de travaux sont fortement associés aux saisons puisque le curage/désamiantage a eu lieu entre Février et Juin, la démolition des étages en Juillet-Août et l'excavation terrassement entre Septembre et fin Décembre 2015. Ainsi, des travaux de déconstruction réalisés pendant les périodes fraîches (hiver) semblent moins à risque.

Cette étude a permis de démontrer l'efficacité des mesures de prévention (barrières physiques tels que fermeture des fenêtres et portes) pour réduire la contamination environnementale à *Aspergillus* influencés par les facteurs météorologiques et les travaux. Le monitoring des paramètres météorologiques s'est également révélé être un outil pouvant aider à prédire les pics

d'*Aspergillus* et ainsi améliorer la mise en place et la gestion des mesures de prévention au sein des services. Les principales limites de ce travail sont l'absence de prélèvements à l'extérieur de l'hôpital, hors période de travaux, mais également l'absence de mesure des paramètres météorologiques à l'intérieur des unités. Une des perspectives possibles de ce travail serait d'essayer de corrélérer les données sur la concentration des particules de pollution enregistrées à Lyon en 2015 avec la contamination à *Aspergillus*. Grinn-Gofroń *et al.*, a ainsi pu prédire les pics de certains champignons (*Alternaria* – *Cladospodium*) à partir des données de pollution enregistrées 3 jours avant.

2) Comparaison de deux produits désinfectants pour réduire le risque aspergillaire avant travaux des faux plafonds (article 2).

Depuis les années 1980, les faux plafonds sont reconnus comme réservoir environnemental d'*Aspergillus* spp. et leur manipulation lors de travaux a pu être associé avec la présence d'épidémies d'AI à l'hôpital (Perraud *et al.*, 1987; Krasinski *et al.*, 1985). Encore récemment, dans l'étude de Reboux *et al.*, 4 pics d'aérocontamination à *A. fumigatus* allant de 58 à 400 CFU/m³ ont pu être associés à des travaux à l'hôpital au niveau des faux plafonds. Afin de réduire la présence d'*Aspergillus* spp. dans l'air lors de travaux de rénovation des faux plafonds, la mise en place de mesures de protection est recommandée dont les principales sont l'installation de barrières physiques ou de systèmes de filtration d'air, mais également l'ajout d'une surveillance environnementale et clinique (Hygiènes 2011; Chang *et al.*, 2014). Cependant, la manière la plus efficace de prévenir le risque d'AI est de réduire l'exposition des patients en éliminant les réservoirs d'*Aspergillus* spp. par une désinfection appropriée (Dancer *et al.*, 2009).

Dans cette étude, la concentration d'*A. fumigatus* présente sur les dalles de faux plafonds de 4 chambres d'un service médical vide du pavillon avant déconstruction a été déterminée montrant une contamination moyenne, significativement similaire, des chambres de 8,4 CFU/m². Ces résultats confirment la position de réservoir des faux plafonds, montrant une présence homogène d'*A. fumigatus* sur les dalles de faux plafond des chambres investiguées. L'efficacité de deux produits désinfectants (#AD1) (LCB Food Safety) et (#AD2) (Laboratoires ANIOS) a été comparé pour réduire la contamination à *A. fumigatus* des réservoirs environnementaux que constituent ces faux plafonds (Loeffert *et al.*, 2017). Pour autant que nous sachions, cette étude est la première à évaluer l'efficacité de systèmes de « désinfection par voie aérienne » pour réduire la contamination à *A. fumigatus* au niveau des faux plafonds. Le produit (#AD2) est apparu être le plus efficace pour réduire la contamination au niveau des dalles avec une réduction observée de 66% après désinfection contre 16% pour (#AD1). Cette différence peut être due à la différence de composition des produits mais également au mode d'aérosolisation du produit. En effet le produit (#AD2) est

principalement constitué d'acide peracétique et de peroxyde d'hydrogène diffusé par vapeur humide alors que le produit (#AD1) est constitué d'acide hydro-acétique diffusé par vapeur sèche. Le produit (#AD2), nouvellement testé dans notre hôpital a démontré une efficacité à réduire la contamination à *A. fumigatus* des dalles de faux plafonds plus importante que l'ancien produit (#AD1) utilisé ponctuellement.

Les limites de cette méthode de désinfection par voie aérienne sont le temps nécessaire à la réalisation de la désinfection par voie aérienne (dépendant du produit et du fournisseur) mais aussi la nécessité de l'appliquer au sein d'une chambre vide avec obstruction des portes, fenêtres et bouche de ventilation pendant la durée de la désinfection (selon les recommandations de l'entreprise) (Falagas *et al.*, 2011). Cependant, lors de travaux de rénovation, de modernisation ou de démolition d'une partie d'un service hospitalier ou d'un bâtiment entier, les locaux où sont réalisés les travaux sont vides. Ainsi, la réalisation d'une désinfection par voie aérienne avec un produit adapté (AD#2) avant travaux pourraient aider à diminuer le risque d'exposition à *A. fumigatus* pour les patients situés à proximité. Une perspective de ce travail serait de déterminer la cinétique de re-contamination des dalles après désinfection afin de pouvoir recommander un délai avant travaux dans lequel appliquer cette méthode de désinfection par voie aérienne.

3) Evaluation de nouveaux outils pour la surveillance environnementale permettant de servir de système d'alerte lors de travaux à l'hôpital (article 3).

Lors de travaux de démolition, une augmentation de la charge fongique extérieure jusqu'à 10^5 fois plus importante a pu être observée, par rapport au taux avant démolition (Streifel *et al.*, 1983). Or, les taux de charge fongique extérieures influencent fortement la contamination fongique retrouvée à l'intérieure (Brenier-Pinchart *et al.*, 2009). C'est pourquoi, lors des travaux à l'hôpital, il est recommandé de réaliser un monitoring de la contamination fongique environnementale afin de prévenir l'apparition d'infection fongique invasive (IFI) chez les patients immunodéprimés exposés à ce risque (Gangneux *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2001). Ainsi, mesurer la contamination environnementale extérieure pourrait permettre de prévenir la contamination intérieure en servant de « système d'alarme » (Dananché *et al.*, 2017).

A l'hôpital, le gold standard utilisé pour mesurer l'aérocontamination fongique dans l'environnement est la méthode dite « cultivable », par l'utilisation d'un aérobiocollecteur (Nesa *et al.*, 2001; Méheust *et al.*, 2013). Cependant cette méthode est contraignante et nécessite un personnel dédié pour le temps de prélèvement et d'analyse. De plus, le temps d'incubation

permettant de dénombrer et d'identifier les colonies est long, ralentissant la mise en place de mesures de précautions adéquates. Ainsi, le délai nécessaire à la détection d'une augmentation de charge fongique dans l'air, expose de manière prolongée les patients au risque d'infection fongique invasive.

Il existe d'autres méthodes de monitoring de l'aérocontamination fongique dites « non cultivables » par l'utilisation de collecteurs volumétriques tels que le collecteur Hirst (Hirst, 1952). Ce collecteur est capable de monitorer les *Aspergillacées* (= *Aspergillus* spp. + *Penicillium* spp.) en continu sans l'aide d'une action humaine. L'étude de Dananché *et al.*, a servi d'étude préliminaire au sein de notre hôpital afin d'évaluer l'utilité de ces collecteurs pour mesurer la contamination à *Aspergillacées* présente dans l'environnement hospitalier intérieur et extérieur. Les résultats ont montré une faible efficacité des collecteurs Hirst par rapport à l'aérobiocollecteur (Air Ideal, bioMérieux®) dans l'environnement intérieur. Cependant, l'efficacité de cette technique comme outil de surveillance de l'environnement extérieur nécessitait d'être approfondi. C'est pourquoi, deux collecteurs Hirst ont été mis en place durant la période de travaux de déconstruction de notre hôpital. Les capteurs étaient placés sur le toit de deux bâtiments, un pavillon de notre hôpital, face au chantier de déconstruction qui était en cours et le deuxième à Gerland, situé quelques kilomètres au Sud de notre hôpital sans travaux durant la période d'étude (servant ainsi de témoin de contrôle).

L'utilité d'un capteur Hirst pour la surveillance environnementale extérieure du taux d'*Aspergillacées* à l'hôpital, lors de travaux majeurs de déconstruction a ainsi été évaluée. Le capteur Hirst de HEH a ainsi montré sa capacité à détecter des taux différents de ceux du capteur de Gerland (témoin) en étant sensible aux travaux l'environnant. De plus, le capteur situé à HEH a montré des taux d'*Aspergillacées* plus haut durant la journée que la nuit, avec en moyenne, pour chaque période de travaux deux pics durant la journée pouvant correspondre aux pics d'activité du chantier (11h et 15h pour les périodes A et B et seulement 11h pour la période C). Ces données sont importantes pour aider à la gestion des mesures de préventions à appliquer chez les patients immunodéprimés, rappelant l'importance de porter un masque FFP2 à l'extérieur mais également de maintenir les fenêtres fermées durant la journée afin de réduire l'exposition des patients.

Ces données extérieures continues obtenues par la méthode non-cultivable (capteur situé à environ 10 m du sol) ont également été corrélées avec les résultats obtenus lors de l'aérocontamination extérieure à *Aspergillacées* mesurée par la méthode cultivable (capteur situé au niveau du sol). Pour cela, seules les données du capteur Hirst correspondant aux horaires de prélèvements réalisés à l'aide de l'aérobiocollecteur ont été prises en compte (le matin entre 10-12h et l'après-midi entre 14-16h). Contrairement à l'étude de Fernández-Rodríguez *et al.*, une corrélation faible entre les données des deux méthodes a pu être observée ($r=0.26$, $p=0.0475$) sur

une période de 109 jours correspondant à la période de déconstruction C (excavation et terrassement). Cependant ceci peut en partie s'expliquer par la différence de hauteur à laquelle sont situés les deux capteurs. En effet, lors de la période de démolition des étages (Période B), les travaux étaient réalisés à plusieurs mètres du sol (les étages de l'ancien pavillon), soit plus proche du capteur Hirst qui lui était placé à environ 15 m de haut. Ainsi, le capteur Hirst a été capable de détecter d'importants pics d'*Aspergillacées* qui n'ont pas été retrouvés par les prélèvements avec l'aérobiocollecteur réalisés au niveau du sol (environ 60 cm du sol). Au contraire, l'aérobiocollecteur a détecté un nombre plus important de pics d'*Aspergillacées* que le capteur Hirst lors de la période d'excavation terrassement (Période C) où les travaux étaient réalisés au niveau du sol et plusieurs mètres en dessous du niveau du sol. Durant cette période de travaux, une faible corrélation entre les pics détectés par les deux méthodes a été observée, qui peut être expliquée, malgré l'importante différence de hauteur entre le capteur Hirst et la localisation des travaux, par la tendance qu'ont les spores à suivre un mouvement de dispersion vers le haut (Tormo *et al.*, 2013).

Ainsi, cette étude a mis en évidence l'importance de la hauteur à laquelle placer le capteur en fonction du type de travaux. C'est un point méthodologique important afin d'améliorer le monitoring de la contamination à *Aspergillus* extérieure mais aussi intérieure. En effet, selon le type de travaux réalisés, la hauteur et distance à laquelle se trouvent les services est à prendre en compte. Les limites de ce travail sont en particulier l'absence de prélèvements avant le début des travaux à HEH, mais aussi l'impossibilité de réaliser des prélèvements avec l'aérobiocollecteur à côté du capteur Hirst (difficulté d'accès au toit où se trouvait le capteur Hirst).

Enfin, la dernière partie de cette étude était d'explorer l'impact de la variation des paramètres météorologiques sur la contamination extérieure à *Aspergillacées* observée avec la méthode cultivable et non-cultivable. Nos données correspondent à celles de la littérature (Tormo *et al.*, 2010; Fernández-Rodríguez *et al.*, 2014). Les *Aspergillus* sont connus pour avoir une croissance optimale entre 30 et 35°C et une humidité relative d'environ 70%. Ainsi une température trop importante ou trop faible auront un effet négatif sur la présence d'*Aspergillus*, tout comme une trop forte ou faible humidité relative. Par exemple, durant la période de démolition des étages en juillet et août 2015, il y a eu une importante canicule à Lyon. Durant cette période, seul le capteur Hirst a détecté des pics importants et l'augmentation de 20% de l'humidité relative à l'extérieur avait ainsi pour impact l'augmentation de la probabilité de présence d'*Aspergillacées* multipliée par 1.21. Globalement ces données (*Aspergillacées*) corrélaient avec les données observées pour l'influence des paramètres météorologiques sur la probabilité de présence d'*Aspergillus* spp (1^{ère} partie de cette discussion /article 1)

Les deux méthodes ont montré des données similaires sur l'impact des facteurs météorologiques sur la contamination extérieure à *Aspergillacées*. Cependant, les périodes de travaux évaluées dans cette étude correspondent aux saisons ce qui peut influencer l'analyse des données. Cet outil simple, pourrait permettre d'aider à prévenir les pics d'*Aspergillacées* et ainsi améliorer la mise en place et le suivi des mesures de protection lors de travaux à l'hôpital.

Cependant, une de limites de ces capteurs est leur coût. En effet, des études coût bénéfice sont nécessaires pour évaluer au mieux l'apport de ces capteurs. Une autre limite de cette méthodologie est la même qu'avec les aérobiocollecteurs : le délai d'analyse des données. En effet, même si ce délai est réduit par rapport aux méthodes viables (aérobiocollecteur) du fait de l'absence d'incubation, il existe toujours un temps d'analyse au microscope optique des segments impactés.

4) Evaluation des relations génétiques entre les souches cliniques et environnementales d'*A. fumigatus* (article 4).

Le choix de la technique de génotypage pour évaluer les relations génétiques entre les isolats repose principalement sur des critères tels que la reproductibilité, le pouvoir discriminant et la praticité de la technique. Dans les recommandations actuelles du choix de la technique, un pouvoir discriminant basé sur l'index de Simpson (DI) ≥ 0.95 est préconisé (van Belkum *et al.*, 2007). Plusieurs techniques ont déjà été évaluées et comparées pour l'étude de la diversité génétique d'*A. fumigatus* (Vanhee *et al.*, 2010; Vanhee *et al.*, 2009; de Valk *et al.*, 2007; Balajee *et al.*, 2008; de valk *et al.*, 2009). Parmi ces études, il a été observé que les techniques basées sur le polymorphisme de marqueurs microsatellites présentent les meilleurs résultats (Klaaseen *et al.*, 2009).

C'est pourquoi lors de ce travail nous nous sommes intéressés à une méthode de typage nouvellement adapté pour les *Aspergillus* : la MLVA, décrite et mise au point par l'équipe Dynamyc (EA 7380 Dynamyc, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, Université Paris Est Créteil, Créteil, France) (Thierry *et al.*, 2007). Cette technique basée sur le polymorphisme de 10 marqueurs VNTR a montré un pouvoir discriminant important (DI) 0.993. L'analyse par MLVA de la collection de 394 isolats d'*A. fumigatus* (n=383 isolats environnementaux et n=11 isolats cliniques) a permis d'identifier 234 génotypes différents. L'analyse par MST des génotypes obtenus a permis de mettre en évidence/ confirmer un rôle de l'environnement hospitalier dans l'infection ou la colonisation des patients par la présence de profils génétiques similaires entre les isolats cliniques et environnementaux.

En effet, 7 isolats cliniques provenant de 5 patients différents partagent le même génotype que des isolats environnementaux provenant aussi bien de l'intérieur que de l'extérieur des

pavillons hospitaliers. Certains de ces génotypes (5/7) ont d'ailleurs été premièrement retrouvés dans l'environnement avant d'être retrouvés chez le patient. Un génotype a été retrouvé au niveau d'un isolat environnemental, 12 jours avant de coloniser le patient dans le couloir de la même unité où se trouvait hospitalisé le patient. Ainsi, cette technique a permis de par son pouvoir discriminant de confirmer le lien entre exposition environnementale et colonisation voir infection. D'autre part, l'analyse par MST a également permis de regrouper respectivement 99 et 115 isolats d'*A. fumigatus* dans 2 clusters. Ces isolats (environnementaux et cliniques) ont des génotypes très proches. En effet, ces isolats sont séparés les uns des autres par un seul VNTR de différent avec leur voisins. La présence de ces deux populations suggère la présence de deux sources principales d'*A. fumigatus* dans l'environnement. La présence de travaux de gros œuvre à proximité directe des lieux de prélèvement laisse penser que le bâtiment en déconstruction pourrait être à l'origine de la libération de réservoirs d'*A. fumigatus*. Cependant, ceci n'a pas pu être démontré.

L'un des autres résultats marquant de cette étude est la présence de certains génotypes à différents lieux et moments. Un génotype a été retrouvé 14 fois en 6 mois. Il a été détecté 5 fois au niveau d'isolats environnementaux prélevés à l'intérieur des unités de 3 pavillons distincts et 8 fois à l'extérieur, tout autour du chantier (4 fois au nord du chantier, 1 fois à l'ouest et 2 fois au sud). Ce génotype a également été retrouvé au niveau d'un prélèvement clinique d'un patient diagnostiqué avec une colonisation. Ces résultats suggèrent la persistance de certains isolats dans l'environnement confirmant les résultats observés par de précédentes études (Guinea *et al.*, 2011; Araujo *et al.*, 2010). Afin de confirmer la prédominance ou la persistance de certains génotypes, il serait intéressant de réaliser une campagne de prélèvement d'air à la fin de la période de travaux dans notre hôpital.

Cette étude a permis d'observer une grande diversité au sein des isolats environnementaux. Sur les 230 génotypes identifiés pour les isolats environnementaux, 169 ont été retrouvés qu'une seule fois. 20% des génotypes obtenus sont retrouvés aussi bien au niveau des isolats environnementaux prélevés à l'extérieur que à l'intérieur, témoignant de l'échange constant extérieur/ intérieur et ceci malgré la présence de mesures de préventions à l'intérieur des unités (fenêtres et portes des unités maintenues fermées). Cependant, aucun regroupement de génotype n'a pas pu être réalisé en fonction du lieu de prélèvement, ou de la période de travaux, ni même de la météo. Une perspective possible de ce travail serait de comparer les résultats de typage avec ceux d'autres régions françaises mais aussi d'autres pays afin d'identifier la répartition de ces génotypes et d'observer une possible « discrimination géographique ». En effet, certaines études ont déjà suggéré l'importance des facteurs écologiques et historiques locaux dans la diversité génétique de la population (Ashu *et al.*, 2017; Thierry *et al.*, 2007; Duarte-Escalante *et al.*, 2009). Malgré tout, la plupart des études réalisées cette dernière décennie n'ont pas permis d'observer des liens entre des

isolats environnementaux et cliniques (Pringle A et al 2005 ; RydholmC et al et al 2006 ; Klassen *et al.*, 2012) du fait des limites des techniques de génotypage utilisées, mais aussi de la taille de l'échantillon analysé ou encore la difficulté d'obtenir des isolats cliniques et environnementaux. Rares sont les études ayant permis d'observer des liens entre patients et environnement hospitalier (Bonnal *et al.*, 2015; Mellado *et al.*, 2000) et à notre connaissance, une seule étude a été réalisée dans un environnement hospitalier en travaux (Guinea *et al.*, 2011). L'étude de Guinea *et al* (2011) a permis d'observer sur une collection de 109 souches d'*A. fumigatus* cliniques et 59 environnementaux, 3 génotypes identiques entre isolats cliniques et environnementaux. Les isolats n'ayant été prélevés que dans une seule unité, aucun réservoir d'origine environnementale n'a pu être défini clairement.

Dans notre étude, la technique MLVA a fait ses preuves, permettant d'établir un lien entre isolats cliniques et environnementaux. L'importante collection d'isolats environnementaux provenant de l'extérieur et de l'intérieur de 8 unités différentes a également permis d'observer la circulation de ces souches au sein de l'hôpital remettant l'accent sur la nécessité du respect des mesures de protection au sein des unités. Une des limites de cette étude est l'absence d'isolats prélevés avant et/ou après travaux mais également au niveau d'un autre site que cet hôpital, freinant l'étude des relations entre les isolats et leur possible origine. Ainsi, ces travaux n'ont pas permis de déterminer une origine environnementale précise des souches de nos 2 clusters mais l'hypothèse d'une source au sein du bâtiment en déconstruction ne peut pas être écartée.

Cependant, les limites connues des techniques de génotypage, dont la MLVA, sont principalement dus aux différents modes de reproduction d'*A. fumigatus* mais également au niveau de différenciation génétique des populations d'*A. fumigatus* (Klaassen *et al.*, 2012).

5) Détermination de la susceptibilité aux antifongiques des souches cliniques et environnementales d'*A. fumigatus* (article 5).

Depuis une dizaine d'années, une émergence de la résistance aux azolés des souches cliniques et environnementales d'*A. fumigatus* a été rapportée (Hagiwara *et al.*, 2016; ECDC 2013). Le mécanisme impliqué repose sur des mutations au niveau du gène *CYP51A* codant pour l'enzyme 14- α -déméthylase, cible des antifongiques azolés (Chowdary *et al.*, 2014). Les deux principales mutations retrouvées sont : TR₃₄/I98H et TR₄₆/Y121F/T289A. Elles sont responsables de plus de 80% des AI résistantes aux azolés et complique la prise en charge de ces patients en augmentant leur taux de mortalité à 80% vs 30-50% lorsqu'elles sont absentes (Vermeulen *et al.*, 2015; van der Linden *et al.*, 2011). L'apparition de ces mutations a pu être corrélée avec la mise sur le marché agricole de fongicides composés de molécules triazolés (tebuconazole, propiconazole, bromuconazole...) (Rocchi *et al.*, 2014). Ces molécules triazolées agricoles sont structurellement

identiques aux molécules azolés médicales et sont ainsi pointées comme responsable de l'acquisition des mutations du gène *CYP51A* (Snelders *et al.*, 2012). L'étude de Stensvold *et al.*, a mis en avant la consommation de ces fongicides, montrant ainsi que l'Europe de l'ouest représente 37% de la consommation totale, soit plus d'un tiers de la consommation mondiale. Ces chiffres peuvent ainsi expliquer une partie de l'actuel relatif confinement de ces mutations à certaines parties du monde.

En France, les données restent limitées sur la prévalence des souches d'*A. fumigatus* résistantes aux azolés, qui ne sont habituellement pas évalué en routine à l'hôpital. Récemment Rivero-Menendez *et al.*, a reporté une prévalence des souches résistantes allant de 0,85 à 10,6% des souches cliniques d'*A. fumigatus*. Au niveau des souches environnementales, une seule étude française a décrit la présence de la mutation TR₃₄/198H au niveau d'*A. fumigatus* retrouvé dans un prélèvement de sol en milieu agricole (Rocchi *et al.*, 2014).

Au vu de ce contexte européen, la susceptibilité aux antifongiques azolés et à l'amphotéricine B a été évaluée pour la collection de souche d'*A. fumigatus* conservée dans ce projet. Au total, la susceptibilité aux antifongiques (ITZ, VCZ et AMB) a été testée pour 400 souches d'*A. fumigatus* (n=388 environnementales et n=12 cliniques) par l'utilisation de bandelettes Etest[®] (bioMérieux[®], Marcy l'Etoile, France) largement utilisée pour le screening des souches (Guinea *et al.*, 2007; Alcazar-Fuoli *et al.*, 2014). Les résultats ont montré que malgré l'importante diversité génétique retrouvée au sein de cette collection de souches, les CMI aux azolés et AMB étaient toutes $\leq 1\mu\text{g/mL}$. Pas de CMI élevé n'a pu être observée. Ces résultats sont rassurants montrant que malgré la forte diversité génétique observée dans notre collection, il n'y a pas de résistance aux antifongiques. Cependant, l'étude d'Ashu *et al.*, a identifié deux voies principales de dispersion des isolats d'*A. fumigatus* dites de « petite distance », par voie aérienne, ou de « grande distance », principalement par l'intermédiaire de l'action humaine (transport sur soit, sur des objets...). Ces hypothèses se confirment par l'identification de plusieurs mutations du gène *CYP51A* au niveau d'isolats cliniques, dans des études réalisées dans la moitié nord de la France (Morio *et al.*, 2012; Choukry *et al.*, 2015; Burgel *et al.*, 2012), non loin des pays comme la Belgique, les Pays-Bas, le Danemark...qui sont eux largement touchés par la présence de populations d'*A. fumigatus* résistantes aux azolés (Vermeulen *et al.*, 2015 ; Steinmann *et al.*, 2015). Ainsi, l'idée d'une dispersion par voie aérienne ou par l'intermédiaire du transit humain entre la France et ces pays voisins européens de certains isolats d'*A. fumigatus* semble possible/envisageable.

Ainsi, cette étude a permis de faire un état des lieux de la susceptibilité aux antifongiques d'une collection de 400 souches d'*A. fumigatus* collectées à l'hôpital Edouard Herriot (zone

urbaine). Au vu de nos résultats et de l'absence dans la littérature d'étude provenant de la moitié Sud de la France avec une forte prévalence d'isolats d'*A. fumigatus* résistants aux azolés, il semblerait que la France soit moins touchée que les pays situés au nord de l'Europe ayant une politique de gestion des fongicides différente. Ainsi, la prévalence d'isolats résistants semble plus importante dans la moitié Nord de la France, du fait de leur contact avec des pays européens plus touchés.

Afin de s'assurer de l'absence de souches résistantes à Lyon et ses environs, il serait intéressant d'évaluer des souches provenant de prélèvements de terre de différents terrains agricoles situés aux alentours de Lyon. De plus, l'étude de Zhang *et al.*, a récemment mis en évidence l'apparition d'une nouvelle mutation du gène *CYP51A* (TR₄₆³/Y21F/M172I/T298A/G448S), entraînant la résistance aux azolés au niveau d'*A. fumigatus*. L'émergence de cette mutation, retrouvée dans l'environnement mais également au niveau clinique remet l'accent sur l'importance de monitorer et contrôler l'évolution de ces mécanismes de résistance. Au vu du contexte mondial, il paraît important de suivre les recommandations de l'ECDC (2013) préconisant une évaluation régulière et continue de la susceptibilité aux antifongiques de souches d'*A. fumigatus* environnementales mais également cliniques.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Ce travail a été réalisé en partenariat avec différents services médicaux de HEH, du laboratoire de Parasitologie et Mycologie de la Croix Rousse et l'équipe Dynamic de la faculté de médecine de Créteil. Cette thèse est l'une des premières études prospectives pluridisciplinaires au niveau national. Ces dix dernières années, une augmentation croissante du nombre de travaux et de leur niveau de risque a pu être observée et associée avec un taux d'AI qui diminue (Berthelot *et al.*, 2006). Cette diminution peut être due à l'amélioration des pratiques et recommandations mais aussi à la mise en place de surveillance environnementale et clinique (Kanamori *et al.*, 2015). L'étude de Reboux *et al.*, dans laquelle 2706 prélèvements environnementaux ont été réalisés entre 2002 et 2012, confirme l'importance de la mise en place d'une surveillance environnementale, soulignant que même si elle ne permet pas de prévenir tous les risques d'AI, son absence pourrait réduire la vigilance des personnels.

Depuis 2006, 4 études françaises ont réalisées une surveillance environnementale lors de travaux à l'hôpital avec un nombre de prélèvement environnementaux variables, 2010 pendant 2 ans (Pilmis *et al.*, 2017), 3653 prélèvements en 8 ans (Berthelot *et al.*, 2006), 1301 prélèvements en 6 mois (Fournel *et al.*, 2010) et 2706 prélèvements en 10 ans (Reboux *et al.*, 2014). Dans ces études, aucun lien entre les cas cliniques d'AI et les travaux à l'hôpital n'a pu être établi. Ainsi, ces données soulignent l'absence de standardisation de la surveillance environnementale, les difficultés à la mettre en place au sein de l'hôpital et également la nécessité de récolter de nouvelles données afin de mieux apprécier les liens entre l'environnement et les patients.

Lors de nos travaux de recherches, un nombre important de prélèvements environnementaux (3885 en 11 mois) ont été réalisés afin d'obtenir de nouvelles données statistiquement significatives sur la dispersion d'*Aspergillus* spp. Différentes approches ont été étudiées pour tenter d'apporter des pistes d'amélioration des recommandations actuelles de surveillance environnementale d'*Aspergillus* spp mais aussi de mise en place des mesures de précautions au sein des unités hébergeant des patients à risque.

Au total, l'importante campagne de prélèvements environnementaux réalisée à l'extérieur et à l'intérieur des unités pendant les travaux a permis de confirmer une efficacité des mesures de précautions mises en place pour réduire l'aérocontamination intérieure à *Aspergillus* spp. Cette surveillance a également permis à l'équipe d'hygiène de réaliser des bulletins hebdomadaires et mensuels de surveillance sur le risque aspergillaire. Ce suivi régulier aidait à la bonne gestion de la mise en place et contrôle des mesures de précautions dans les unités en permettant de détecter des taux plus importants de contamination dans certaines unités. Cependant, malgré une apparente efficacité des mesures de précautions appliquées pour réduire l'aérocontamination intérieure des

unités, des génotypes similaires ont pu être retrouvés entre des isolats d'*A. fumigatus* cliniques et environnementaux prélevés à l'extérieur et à l'intérieur. Aucune résistance aux antifongiques azolés n'a été détectée au sein de notre collection de souches cliniques et environnementales d'*A. fumigatus* mais la découverte récente de nouvelles mutations et de leur dispersion possible par l'intermédiaire de l'action humaine ou par dispersion dans l'air, renforcent le besoin d'évaluer de manière plus régulière la prévalence de la résistance en France. Ces similarités retrouvées pour 7/11 isolats cliniques soulignent l'importance du respect et de la bonne gestion des mesures de précautions à appliquer dans les unités tels que la fermeture des ouvrants des unités à risque. Les résultats de surveillance environnementale obtenus avec la méthode non-cultivable ont également confirmé l'importance du respect de la fermeture des fenêtres durant la journée mais aussi l'obligation du port de masque pour les patients de passage à l'extérieur en montrant la présence de pics de spores fongiques pouvant correspondre à des pics d'activité du chantier à 11h et à 15h. Durant la nuit, l'autorisation d'ouverture des fenêtres est en accord avec nos résultats montrant des taux de contamination extérieurs beaucoup plus faible que dans la journée.

Enfin, les trois résultats permettant d'apporter des pistes d'amélioration simples pour prévenir le risque aspergillaire lors de travaux à l'hôpital sont le suivi régulier des variations des paramètres météorologiques, l'importance d'anticiper la hauteur à laquelle sont réalisés les travaux mais également l'utilité d'une désinfection avant démolition des faux plafonds. En effet, l'étude de l'influence des paramètres météorologiques extérieurs sur la contamination extérieure et intérieure à *Aspergillus* spp. semble pouvoir permettre de prédire les pics de contamination. Ainsi, le suivi des prévisions météorologiques pourrait permettre d'aider à planifier les périodes les plus à risque pour pouvoir renforcer et gérer au mieux les mesures de précaution à mettre en place.

Concernant la hauteur de réalisation des travaux, notre étude a démontré que si les travaux sont réalisés à plusieurs mètres du sol (dans les étages d'un bâtiment), les services qui seront le plus exposés aux spores fongiques dégagés par le chantier seront ceux situés à la même hauteur ou plus haut encore. Lors de travaux en hauteur (étages), les services des bâtiments aux alentours situés au rez-de-chaussée ou au premier étage sont moins exposés que ceux situés en hauteur. De même, la hauteur à laquelle est placé le collecteur d'air pour le suivi environnemental des travaux doit être étudié en fonction de la hauteur à laquelle se passent les travaux. Ces deux paramètres semblent importants à confirmer au cours d'études futures mais représentent des pistes d'amélioration non négligeable à la prévention et gestion du risque aspergillaire lors de travaux à l'hôpital.

Les résultats obtenus de la contamination des dalles à *A. fumigatus*, avant/après désinfection par voie aérienne montrent l'efficacité de certains produits pour éradiquer les réservoirs environnementaux avant manipulation de ces derniers lors de travaux de rénovation ou

déconstruction...Ainsi dans certaines configuration de travaux, lorsqu'une partie de l'unité seulement est en travaux mais qu'il reste des patients à risque à proximité direct, il semble important d'éradiquer les réservoirs environnementaux pour diminuer le risque de dispersion des spores fongiques durant les travaux.

Enfin, le respect des mesures de précautions imposées aux entreprises de démolition et construction mais aussi aux services a été fondamental dans cette étude. Les résultats de ces travaux transversaux ont été permis grâce à l'implication de l'ensemble des professionnels (personnel médical, ingénieurs en charge des travaux, mycologistes, personnel soignant, direction de l'hôpital etc) qui sont restés vigilants tout au long de l'étude.

Les perspectives individuelles, propres à chaque étude réalisée dans cette thèse ont été discutées plus haut. Cependant, de manière globale, ces travaux ont permis de collecter un nombre important de données qui n'ont pas pu être toutes analysées et évaluées au sein de cette thèse. Ainsi, quelques perspectives possibles de ces travaux seraient de calculer des seuils d'alerte de contamination intérieure à *A. fumigatus* afin de prévenir le risque d'AI chez les patients en fonction des services (conventionnels, protégés etc). De même, il existe peu de données permettant une bonne gestion des changements de filtres des systèmes de filtration d'air à l'intérieur des unités telles que les réanimations. Il serait intéressant de calculer les cinétiques de recontamination à *A. fumigatus* à l'intérieur des réanimations en fonction des maintenances et dates de changement de filtres afin de pouvoir recommander une fréquence de changement de filtre aux services techniques. Enfin, s'inscrivant dans une démarche plus globale de santé publique, il serait possible d'évaluer l'impact de l'ensemble des moisissures (*Botrytis*, *Sporobolomyces*, *Alternaria*, *Fusicladium* etc) mesurées toutes les 2 heures pendant 296 jours par le capteur Hirst sur la prévalence des infections respiratoires (population asthmatique ou atteinte de bronchopneumopathie chronique obstructive) observées à HEH en 2015.

REFERENCES

- Abad A**, Fernández-Molina JV, Bikandi J, *et al.* What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol.* 2010, 27(4):155-82.
- Albarrag AM**, Anderson MJ, Howard SJ, *et al.* Interrogation of related clinical pan-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains: G138C, Y431C, and G434C single nucleotide polymorphisms in *cyp51A*, upregulation of *cyp51A*, and integration and activation of transposon *Aft1* in the *cyp51A* promoter. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55(11):5113-5121.
- Alberti C**, Bouakline A, Ribaud P, *et al.* Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive aspergillosis in haematology patients. *J of Hosp Infect* 2001, 48(3):198-206.
- Aigner M**, Lass-Flörl C. Treatment of drug-resistant *Aspergillus* infection. *Expert Opin Pharmacother* 2015, 16(15):2267-70.
- Alcazar-Fuoli L**, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, 52:1244-51.
- Alcazar-Fuoli L**, Mellado E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *Br J Haematol* 2014, 166(4):471-84.
- Alfandari S**, Bajolet O, Bernet C, *et al.* Enquête nationale de prévalence 2012 des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissement de santé - Protocole / Guide de l'enquêteur. Technical report, *InVS*, 2012.
- Aliff TB**, Maslak PG, Jurcic JG, *et al.* Refractory *Aspergillus* pneumonia in patients with acute leukemia: successful therapy with combination caspofungin and liposomal amphotericin *Cancer* 2003, 97(4):1025—32.
- Amich J**, Calera JA. Zinc acquisition: a key aspect in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mycopathologia* 2014, 178(5-6):379-85.
- Amitani R**, Taylor G, Elezis EN, *et al.* Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infect Immun* 1995, 63:3266-3271.
- Anaes.** (Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé). Manuel d'accréditation des établissements de santé. Paris: Anaes, 1999.
- Araujo R**, Amorim A, Gusmão L. Genetic diversity of *Aspergillus fumigatus* in indoor hospital environments. *Med Mycol* 2010, 48(6):832-8.
- Ascioglu S**, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, *et al.* Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. *Clin Infect Dis* 2002, 34(1):7-14.
- Ashu EE**, Hagen F, Chowdary A, Meis JF, Xu J. Global Population Genetic Analysis of *Aspergillus fumigatus*. *mSphere* 2017, 2(1):pii:e00019-17.
- Bader O**, Tunnermann J, Dudakova A, Tangwattanachuleeporn M, Weig M, Gross U. Environmental isolates of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2015, 59(7):4356–4359.

- Bain JM**, Tavanti A, Davidson AD, *et al.* Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2007, 45(5):1469-1477.
- Baker SE**, Bennett JW. The aspergilli: genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods; 2007.
- Balajee SA**, Tay ST, Lasker BA, Hurst SF, Rooney AP. Characterization of a novel gene for strain typing reveals substructuring of *Aspergillus fumigatus* across North America. *Eukaryot Cell* 2007, 6(8):1392-9.
- Balajee SA**, de Valk HA, Lasker BA, Meis JF, Klaassen CH. Utility of a microsatellite assay for identifying clonally related outbreak isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Microbiol Methods* 2008, 73(3):252–256
- Balloy V**, Huerre M, Latge JP, Chignard M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun.* 2005;73(1):494–503.
- Barbut F**. How to eradicate *Clostridium difficile* from the environment. *J Hosp Infect* 2015, 89(4):287-95.
- Barrs VR**, van Doorn TM, Houbraken J, *et al.* *Aspergillus felis* sp. nov., an Emerging Agent of Invasive Aspergillosis in Humans, Cats, and Dogs. *PLoS One* 2013,8:e64871.
- Bart-Delabesse E**, Sarfati J, Debeauvais JP, *et al.* Comparison of restriction fragment length polymorphism, microsatellite length polymorphism and random amplification of polymorphic DNA analyses for fingerprinting *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 2001, 39(7):2683–2686.
- Beauvais A**, Bozza S, Knemeyer O, *et al.* Deletion of the α -(1,3)-glucan synthase genes induces a restructuring of the conidial cell wall responsible for the avirulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* 2013,9(11):e1003716.
- Bellanger AP**, Reboux G, Scherer E, Vacheyrou M, Millon L. Contribution of a cyclonic-based liquid air collector for detecting *Aspergillus fumigatus* by QPCR in air samples. *J Occup Environ Hyg* 2012, 9(1):D7-D11.
- Bénet T**, Nicolle MC, Thiebaut A, *et al.* Reduction of invasive aspergillosis incidence among immunocompromised patients after control of environmental exposure. *Clin Infect Dis* 2007, 45(6):682-6.
- Bénet T**, Voirin N, Nicolle MC, *et al.* Estimation of the incubation period of invasive aspergillosis by survival models in acute myeloid leukemia patients. *Med Mycol* 2013, 51(2):214-8.
- Berkova, N**, Lair-Fullerenger S, Femenia F, *et al.* *Aspergillus fumigatus* conidia inhibit tumour necrosis factor- or staurosporine-induced apoptosis in epithelial cells. *Int Immunol* 2006, 18(1):139-50.
- Berthelot P**, Loulergue P, Raberin H, *et al.* Efficacy of environmental measures to decrease the risk of hospital-acquired aspergillosis in patients hospitalised in haematology wards. *Clin microbiol Infect* 2006, 12:738-44.
- Bhabhra R**, Miley MD, Mylonakis E, *et al.* Disruption of the *Aspergillus fumigatus* encoding nucleolar protei CgrA impairs thermotolerant growth and reduces virulence. *Infect Immun* 2004, 72(8):4731-40.

- Bitar D**, Lortholary O, Le Strat Y, *et al.* Population-based analysis of invasive fungal infections France, 2001–2010. *Emerg. Infect Dis* 2014; 20:1149–1155.
- Bocquet P**, Aggoune M, Aussant M, Rykner G, Brücker G. Aspergillose invasive nosocomiale et travaux hospitaliers. Recommandations. *Les Guides AP-HP Doin* 1993. 36 pages.
- Boff C**, Brun CP, Miron D, *et al.* Technical note: The effect of different incubation temperatures on the recovery of *Aspergillus* species from hospital air. *Am J Infect Control* 2012, 40:1016-7.
- Bonnal C**, Leleu C, Brugière O, *et al.* Relationship between Fungal Colonisation of the Respiratory Tract in Lung Transplant Recipients and Fungal Contamination of the Hospital Environment. *PLoS One* 2015, 10(12).
- Bouza E**, Peláez T, Pérez-Molina J, *et al.* Demolition of a hospital building by controlled explosion: the impact on filamentous fungal load in internal and external air. *J of Hosp Infect* 2002, 52(4):234–42.
- Bowyer P**, Moore CB, Rautemaa R, Denning DW, Richardson MD. Azole antifungal resistance today: focus on *Aspergillus*. *Curr Infect Dis Rep* 2011, 13(6):485-91.
- Brahm S.D.** Aspergillosis. *N Engl J Med* 2009, 360:1870-84.
- Brenier-Pinchart MP**, Lebeau B, Quesada JL, *et al.* Influence of internal and outdoor factors on filamentous fungal flora in hematology wards. *Am J Infect Control* 2009,37(8):631-7.
- Bunger J**, Westphal G, Monnich A, Hinnendahl B, Hallier E, Muller M. Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology* 2004, 202:199-211.
- Burgel PR**, Baixench MT, Amsellem M, *et al.* High prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56(2):869–874.
- Caillot D**, Couaillier JF, Bernard A, *et al.* Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J Clin Oncol* 2001, 19:253-9.
- Camps SM**, van der Linden JW, Li Y, *et al.* Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of the literature. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56(1):10-16.
- Cavallo M**, Andreoni S, Martinotti MG, Rinaldi M, Fracchia monitoring environmental *Aspergillus* spp. Contamination and meteorological factors in a haematological unit. *Mycopathologia* 2013,176(5-6):387-94.
- Chang CC**, Cheng AC, Devitt B, *et al.* Successful control of an outbreak of invasive aspergillosis in a regional haematology unit during hospital construction works. *J Hosp Infect* 2008, 69(1):33-8.
- Chang CC**, Ananda-Rajah M, Belcastro A, *et al.* Consensus guidelines for implementation of quality processes to prevent invasive fungal disease and enhanced surveillance measures during hospital building works, 2014. *Intern Med J* 2014, 44(12b):1389-97.
- Cheng SM**, Streifel AJ. Infection control considerations during construction activities: land excavation and demolition. *Am J Infect Control* 2001, 5:321-8.
- Choukri F**, Botterel F, Sitterlé E, *et al.* Prospective evaluation of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* clinical isolates in France. *Med Mycol* 2015, 53(6):593-6.

- Chowdhary A**, Sharma C, Hagen F, Meis JF. Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms. *Future Microbiol* 2014, 9(5):697-711.
- Chung D**, Barker BM, Carey CC, *et al.* CHIP-seq and in vivo transcriptome analyses of the *Aspergillus fumigatus* SREBP SrbA reveals a new regulator of the fungal hypoxia response and virulence. *PLoS Pathog* 2014, 10(11):e1004487.
- Cooper EE**, O'Reilly MA, Guest DI, Dharmage SC. Influence of building construction work on *Aspergillus* infection in a hospital setting. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003, 24(7):472-6.
- Cornet M**, Levy V, Fleury L, *et al.* Efficacy of prevention by high- efficiency particulate air filtration or laminar airflow against *Aspergillus* airborne contamination during hospital renovation. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999, 20(7):508-13.
- Cowen LE**, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015, 5(7):a019752.
- Croft CA**, Culibrk L, Moore MM, Tebbutt SJ. Interactions of *Aspergillus fumigatus* Conidia with Airway Epithelial Cells: A Critical Review. *Front Microbiol* 2016, 7:472.
- Dagenais TR**, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 2009, (3):447-465.
- Dananché C**, Gustin M.P, Cassier P, Loeffert ST, Thibaudon M, Bénet T, Vanhems P. Evaluation of hirst-type spore trap to monitor environmental fungal load in hospital. *Plos One* 2017, 12(5):e0177263.
- Dancer SJ**, White LF, Lamb J, Girvan EK, Robertson C. Measuring the effect of enhanced cleaning in a UK hospital: a prospective cross-over study. *BMC Medicine* 2009, 7:28.
- Debeaupuis JP**, Sarfati J, Chazalet V, Latgé JP. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1997, 65(8):3080-3085.
- Denning DW**, Tucker RM, Hanson LH, Stevens DA. Treatment of invasive aspergillosis with itraconazole. *Am J Med* 1989, 86 (6 Pt 2): 791-800.
- Denning, DW**, Clemons KV, Hanson LH, Stevens DA. Restriction endonuclease analysis of total cellular DNA of *Aspergillus fumigatus* isolates of geographically and epidemiologically diverse origin. *J Infect Dis* 1990, 162(5):1151-8.
- Denning DW**, Venkateswarlu K, Oakley KL, *et al.* Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997, 41(6):1364-8.
- Denning DW**. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998, 26:781–805.
- Denning, D.W**, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to tuberculosis. *Bull World Health Organ* 2011b,89:864–872.
- Denning DW**, Bowyer P. Voriconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: should we be concerned? *Clin Infect Dis* 2013, 57(4): 521-3.
- Denning, DW**, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonaryaspergillosis in adults. *Med. Mycol* 2013, 51:361–370.

- Denning, DW**, Pashley C, Hartl D, *et al.* Fungal allergy in asthma-state of the art and research needs. *Clin Transl Allergy* 2014, 4:14.
- De Pauw B**, Walsh TJ, Donnelly JP, *et al.* Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG). *Clin Infect Dis* 2008, 46(12):1813-1821.
- Desoubeaux G**, Bailly E, Chandenier J. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: Updates and recommendations. *Med Mal Infect* 2014, 44(3):89-101.
- de Valk HA**, Meis JF, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klaassen C.H.. Use of a Novel Panel of Nine Short Tandem Repeats for Exact and High-Resolution Fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* Isolates. *J of Clin Microbiol* 2005, 43(8):4112-4120.
- de Valk HA**, Meis JF, de Pauw BE, Donnelly PJ, Klaassen CH. Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2007, 45(5):1415–1419.
- de Valk, HA**, Klaassen CH, Meis JF. Molecular typing of *Aspergillus* species. *Mycoses* 2008, 51:463-76.
- de Valk HA**, Meis JF, Bretagne S, *et al.* Interlaboratory reproducibility of a microsatellite-based typing assay for *Aspergillus fumigatus* through the use of allelic ladders: proof of concept. *Clin Microbiol Infect* 2009, 15(2):180-7.
- Diaz-Guerra TM**; Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A point mutation in the 14alpha-sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47(3):1120-1124.
- Duarte-Escalante E**, Zúñiga G, Ramírez ON, *et al.* Population structure and diversity of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from different sources and geographic origins. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, 104(3):427-433.
- ECDC**. European Centre for Disease Prevention and Control. Risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species. Stockholm, 2013.
- Erwig LP**, Gow NA. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol* 2016,14(3):163–176.
- Escher BI**, Hackermüller J, Polte T, *et al.* From the exposome to mechanistic understanding of chemical-induced adverse effects. *Environ Int* 2017,99:97-106.
- Espinel-Ingroff A**. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol* 2008, 25(2):101-6.
- Etancelin P**, Silly S, Merle V, *et al.* Efficacy of a multidisciplinary team for preventing hospital-acquired invasive aspergillosis: five years' experience. *Pathol Biol* (Paris). 2009,57(1):71-5.
- Falagas ME**, Thomaidis PC, Kotsantis IK, Sgouros K, Samonis G, Karageorgopoulos DE. Airborne hydrogen peroxide for disinfection of the hospital environment and infection control: a systematic review. *J Hosp Infect* 2011, 78(3):171-7.

- Fraczek MG**, Bromley M, Buied A, et al. The cdr1B efflux transporter is associated with Non-cyp51a- mediated itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2013, 68(7):1486-1496.
- Fernández-Rodríguez S**, Tormo-Molina R, Maya-Manzano JM, Silva-Palacios I, Gonzalo-Garijo A. Outdoor airborne fungi captured by viable and nonviable methods. *Fungal Ecology* 2014, 7:16-26.
- Fournel I**, Sautour M, Lafon I, et al. Airborne *Aspergillus* contamination during hospital construction works: Efficacy of protective measures. *Am J Infect Control* 2010, 38:189-94.
- Fresenius G**. Beitrage zur Mykologie. Frankfurt: HL Bronner, 1850, 81.
- Fridkin SK**, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996, 9:499-511.
- Fu TY**, Gent P, Kumar V. Efficacy, efficiency and safety aspects of hydrogen peroxide vapour and aerosolized hydrogen peroxide room disinfection systems. *J Hosp Infect* 2012, 80(3):199-205.
- Gangneux JP**, Poirot JL, Morino O, et al. Surveillance mycologique de l'environnement pour la prevention de l'aspergillose invasive. *Presse Med* 2002, 31:841-848.
- Gangneux JP**, Noussair L, Bouakline A, Roux N, Lacroix C, Derouin F. Experimental assessment of disinfection procedures for eradication of *Aspergillus fumigatus* in food. *Blood* 2004, 104(7):2000-2.
- Gangneux JP**, Bousseau A, Cornillet A, Kauffmann-Lacroix C. Control of fungal environmental risk in French Hospitals. *Journal de Mycologie Médicale* 2006,16:204–21.
- Gangneux JP**, Camus C, Philippe B. Epidemiology of and risk factors for invasive aspergillosis in nonneutropenic patients. *Rev Mal Respir* 2008, 25(2):139-53.
- Gangneux JP**, Adjidé CC, Bernard L, et al. Quantitative assessment of fungal risk in the case of construction works in healthcare establishments: proposed indicators for the determination of the impact of management precautions on the risk of fungal infection. *J Mycol Med* 2012, 22(1):64-71.
- Gao LJ**, Sun Y, Wan Z, Li RY, Yu J. CSP typing of Chinese *Aspergillus fumigatus* isolates: identification of additional CSP types. *Med Mycol* 2013, 51(7):683-7.
- Garcia-Vidal**, C, Upton A, Kirby KA, Marr KA. Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: Biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clin Infect Dis* 2008, 47(8):1041-1050.
- Garcia-Vidal C**, Royo-Cebrecos C, Peghin M, et al. Environmental variables associated with an increased risk of invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2014,20:0939-45.
- Garcia-Rubio R**, Gil H, Monteiro MC, Pelaez T, Mellado E. A New *Aspergillus fumigatus* Typing Method Based on Hypervariable Tandem Repeats Located within Exons of Surface Protein Coding Genes (TRESP). *PLoS One* 2016, 11(10):e0163869.
- Garcia-Rubio R**, Cuenca-Estrella M, Mellado E. Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem. *Drugs* 2017, 77(6):599-613.
- Gianella P**, Gasche-Soccal P, van Delden C, Hachulla A.L, Rochat T. Aspergillose pulmonaire

- invasive et aspergillose pulmonaire chronique. *Rev Med Suisse* 2014, 10:2202-2207.
- Gravelat FN**, Ejzykowicz DE, Chiang LY, *et al.* *Aspergillus fumigatus* MedA governs adherence, host cell interactions and virulence. *Cell. Microbiol* 2010, 12(4):473–488.
- Gregg KS**, Kauffman CA. Invasive Aspergillosis: Epidemiology, Clinical Aspects, and Treatment. *Semin Respir Crit Care Med* 2015, 36(5):662-72.
- Grinn-Gofroń A**, Strzelczak A, Wolski T. The relationships between air pollutants, meteorological parameters and concentration of airborne fungal spores. *Environ Pollut.* 2011, 159(2):602-8.
- Guarro J**, Solé M, Castany R, *et al.* Use of random amplified microsatellites to type isolates from an outbreak of nosocomial aspergillosis in a general medical ward. *Med Mycol* 2005, 43(4):365-371.
- Guinea J**, Peláez T, Alcalá L, Bouza E. Correlation between the Etest and the CLSI M-38 A microdilution method to determine the activity of amphotericin B, voriconazole, and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007, 57(3):273-6.
- Guinea J**, García de Viedma D, Peláez T, *et al.* Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus*: an in-depth genotypic analysis of isolates involved in an outbreak of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2011, 49(10):3498-503.
- Hagiwara D**, Takahashi H, Watanabe A, *et al.* Whole-genome comparison of *Aspergillus fumigatus* strains serially isolated from patients with aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2014, 52(12):4202–4209.
- Hagiwara D**, Watanabe A, Kamei K, Goldman GH. Epidemiological and Genomic Landscape of Azole Resistance Mechanisms in *Aspergillus* Fungi. *Front Microbiol* 2016, 7:1382.
- Haiduven D**. Nosocomial aspergillosis and building construction. *Med Mycol* 2009, 47 Suppl 1:S210-6.
- Hansen D**, Blahout B, Benner D, Popp W. Environmental sampling of particulate matter and fungal spores during demolition of a building on a hospital area. *J Hosp Infect* 2008, 70:259-64.
- Health Canada**: Construction-related Nosocomial Infections in Patients in Health Care Facilities. Decreasing the Risk of *Aspergillus*, *Legionella* and Other Infections, 2001.
- Heinekamp T**, Thywissen A, Macheleidt J, Keller S, Valiante V, Brakhage AA. *Aspergillus fumigatus* melanins: Interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. *Front Microbiol* 2013, 3: 440.
- Herbrecht R**, Denning DW, Patterson TF, *et al.* Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002, 347:408-15.
- Hirst JM**. An automatic volumetric spore trap. *Ann Appl Biol* 1952, 39:257-65.
- Hissen AH**, Wan AN, Warwas ML, Pinto LJ, Moore MM. The *Aspergillus fumigatus* siderophore biosynthetic gene *sidA*, encoding L-ornithine N⁵-oxygenase, is required for virulence. *Infect Immun* 2005, 73(9):5493-503.
- Hope WW**, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005, 5(10):609-22.
- Hospenthal DR**, Bennett JE. Flucytosine monotherapy for cryptococcosis. *Clin Inf Dis* 1998, 27(2):260-264.

- Howard SJ**, Webster I, Moore CB, *et al.* Multi-azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Int J Antimicrob Agents* 2006, 28(5):450–453.
- Howard SJ**, Cerar D, Anderson MJ, *et al.* Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emer Infect Dis* 2009, 15(7):1068–1076.
- Hygiènes** : Société française d'hygiène hospitalière. Risque infectieux fongique et travaux en établissement de santé – Identification du risque et mise en place de mesures de gestion, Mars 2011
- Hygiènes** : Recommandations formalisées d'experts: Quelles mesures pour maîtriser le risque infectieux chez les patients immunodéprimés ? 2016.
- Jampilek J**. Potential of agricultural fungicides for antifungal drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2016;11(1):1-9.
- Jensen HL**. The fungus flora of the soil. *Soil Sci* 1931, 31:123–158.
- Kanafani ZA**, Perfect JR. Resistance to Antifungal Agents : Mechanisms and Clinical Impact. *Antimicrobial resistance* 2008, 46(1):120-128.
- Kanamori K**, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE, Weber DJ. Review of Fungal Outbreaks and Infection Prevention in Healthcare Settings During Construction and Renovation. *Clin Infect Dis* 2015, 61(3):433-44.
- Klaaseen CH**. MLST versus microsatellites for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol* 2009, 47(1):27-33.
- Klaassen CHW**, Gibbons JG, Fedorova ND, Meis JF, Rokas A. Evidence for genetic differentiation and variable recombination rates among Dutch populations of the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Mol Ecol* 2012, 21(1):57–70.
- Kontoyiannis DP**, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002, 21:161-172.
- Kosmidis C**, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax* 2015, 70(3):270–277.
- Krasinski K**, Holzman RS, Hanna B, Greco MA, Graff M, Bhogal M. Nosocomial fungal infection during hospital renovation. *Infect Control* 1985, 6(7):278-82.
- Krishnan-Natesan S**, Wu W, Cutright JL, Chandrasekar PH. In vitro-in vivo correlation of voriconazole resistance due to G448S mutation (cyp51A Gene) in *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012, 74(3):272–277.
- Lacey J**. Spore dispersal – its role in ecology and disease: the British contribution to fungal aerobiology. *Mycological Research* 1996, 100:641-660.
- Lacroix C**, Dubach. M, Feuilhade. M. Echinocandins: a new class of antifungal agents. *Médecine et maladies infectieuses* 2003, 33:183-191.
- Lang-Yona N**, Dannemiller K, Yamamoto N, *et al.* Annual distribution of allergenic fungal spores in atmospheric particulate matter in the Eastern Mediterranean; a comparative study between ergosterol and quantitative PCR analysis. *Atmos Chem Phys* 2012, 12:2681–2690.

- Lasker BA.** Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 2002, 40(8):2886-92.
- Latgé JP.** *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999, 2:310–350.
- Latgé JP.** 30 years of battling the cell wall. *Med Mycol* 2017, (1)55, 4–9.
- Lelièvre L,** Groh M, Angebault C, Maherault AC, Didier E, Bougnoux ME. Azole resistant *Aspergillus fumigatus*: an emerging problem. *Med Mal Infect* 2013, 43(4):139-45.
- Li DW,** Kendrick B. A year-round study on functional relationships of airborne fungi with meteorological factors. *Int J Biometeorol* 1995, 39(2):74–80.
- Liu ZG,** Di DD, Wang M, *et al.* MLVA Genotyping Characteristics of Human *Brucella melitensis* Isolated from Ulanqab of Inner Mongolia, China. *Front Microbiol* 2017;8:6.
- Loeffert ST,** Gustin MP, Cassier P, Bouché P, Lion C, Filoni M, Perraud M, Vanhems P. Comparison of the efficacy of two airborne disinfection products in reducing the *Aspergillus fumigatus* contamination from hospital false ceiling reservoirs. *Canadian Journal of Infection Control* 2017, 37(1):37-40.
- Lortholary O,** Gangneux JP, Sitbon K, *et al.* Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). *Clin Microbiol and Infect* 2011, 17(12):1882-1889.
- Marchiori E,** Zanetti G, Hochhegger B, Irion KL, Carvalho AC, Godoy MC. Reversed halo sign on computed tomography: state-of-the-art review. *Lung* 2012, 190(4):389-94.
- Marr KA,** Carter RA, Boeckh M, *et al.* Invasive aspergillosis in allogeneic transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* 2002, 100(13):4358-4366.
- Marr KA,** Carter RA, Crippa F, *et al.* Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002, 34(7): 909-17.
- Marr KA,** Patterson T, Denning D. Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations and therapy. *Infect Dis Clin North Am* 2002, 16 (4): 875-94.
- Mahieu LM,** De Dooy JJ, Van Laer FA, Jansens H, Ieven MM. A prospective study on factors influencing *aspergillus* spore load in the air during renovation works in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2000, 45(3):191-7.
- Meersseman W,** Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 170:621–25.
- Meersseman W,** Lagrou K, Maertens J, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2007, 45(2):205-16.
- Méheust D,** Gangneux JP, Le Cann P. Comparative Evaluation of Three Impactor Samplers for Measuring Airborne Bacteria and Fungi Concentrations. *J Occup Environ Hyg* 2013, 10(8):455-9.
- Méheust D,** Le Cann P, Reboux G, *et al.* Indoor fungal contamination: health risks and measurement methods in hospitals, homes and workplaces. *Crit rev microbiol* 2014, 40:248-60.

- Mellado E**, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Substitutions at methionine 220 in the 14 α -sterol demethylase (cyp51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48(7):2747-2750.
- Mellado E**, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Melchers WJ, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51(6):1897-1904.
- Mellado E**, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, *et al.* Characterization of a possible nosocomial aspergillosis outbreak. *Clin Microbiol Infect* 2000, 6(10):543-8.
- Mendes-Giannini MJ**, Andreotti PF, Vincenzi LR, *et al.* Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 2006, 8:1550–1559.
- Meneau I**, Coste AT, Sanglard D. Identification of *Aspergillus fumigatus* multidrug transporter genes and their potential involvement in antifungal resistance. *Med Mycol* 2016, 54(6):616-27.
- Mengoli C**, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2009, 9(2):89-96.
- Menzin J**, Meyers JL, Friedman M, *et al.* Mortality, length of hospitalization, and costs associated with invasive fungal infections in high-risk patients. *Am J Health Syst Pharm* 2009,66:1711–1717.
- Micheli PA**. Nova plantarum genera juxta Tournefortii methodum disposita. Florence: Bernardo Paperini, 1729.
- Mitchell CG**, Slight J, Donaldson K. Diffusible component from the spore surface of the fungus *Aspergillus fumigatus* which inhibits the macrophage oxidative burst is distinct from gliotoxin and other hyphal toxins. *Thorax* 1997, 52:796-801.
- Millon L**, Piarroux R, Deconinck E, *et al.* Use of real-time PCR to process the first galactomannan-positive serum sample in diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2005, 43(10):5097-5101.
- Morio F**, Aubin GG, Danner-Boucher I, *et al.* High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2012, 67(8):1870–1873.
- Morton CO**, Loeffler J, De Luca A, *et al.* Dynamics of extracellular release of *Aspergillus fumigatus* DNA and galactomannan during growth in blood and serum. *J Med Microbiol.* 2010, 59(4):408-413.
- Moye-Rowley WS**. Multiple mechanisms contribute to the development of clinically significant azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol* 2015,6:70.
- Nett JE**, Andes DR. Antifungal Agents Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect Dis Clin N Am* 2015, 30(1):51-83.
- Muñoz P**, Burillo A, Bouza E. Environmental surveillance and other control measures in the prevention of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 2001, 7(2):38-45.
- Nesa D**, Lortholary J, Bouakline A, *et al.* Comparative performance of impactor air samplers for quantification of fungal contamination. *J Hosp Infect* 2001, 47(2):149-155.

- Nicolle MC**, Bénét T, Thiebaut A, Bienvenu AL, *et al.* Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: incidence and description of 127 cases enrolled in a single institution prospective survey from 2004 to 2009. *Haematologica* 2011, 96:1685-169.
- Nicolle MC**, Bénét T, Vanhems P. Nosocomial or community-acquired? *Med Mycol* 2011, 49 (Suppl 1):S24-9.
- Nierman WC**, Pain A, Anderson MJ, *et al.* Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2005, 438(7071):1151-6
- Nucci M**, Nouér SA, Cappone D, Anaissie E. Early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in hematologic patients: an opportunity to improve the outcome. *Haematologica* 2013, 98(11):1657-60.
- O’Gorman CM**, Fuller H, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2009, 457(7228):471-4.
- O’Gorman CM**. Airborne *Aspergillus fumigatus* conidia: a risk factor for aspergillosis. *Fungal Biol Rev* 2011, 25:151-157.
- Özen M**, Yılmaz G, Coşkun B, Topçuoğlu P, *et al.* A Quasi- Experimental Study Analyzing the Effectiveness of Portable High-Efficiency Particulate Absorption Filters in Preventing Infections in Hematology Patients during Construction. *Turk J Haematol* 2016, 33(1):41-7.
- Pelaez T**, Gijon P, Bunsow E, *et al.* Resistance to voriconazole due to a G448S substitution in *Aspergillus fumigatus* in a patient with cerebral aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2012, 50(7):2531–2534.
- Peláez T**, Muñoz P, Guinea J, *et al.* Outbreak of invasive aspergillosis after major heart surgery caused by spores in the air of the intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2012, 54(3):e24-31.
- Perraud M**, Piens MA, Nicoloyannis N, *et al.* Invasive nosocomial pulmonary aspergillosis: risk factors and hospital building works. *Epidem Infect* 1987, 99:407-12.
- Pfaller JB**, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. In vitro susceptibility testing of *Aspergillus* spp.: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining voriconazole and itraconazole MICs. *J Clin Microbiol* 2003, 41(3):1126-9.
- Pfeiffer CD**, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006, 42(10):1417–27.
- Pilmis B**, Lopes A, Lortholary O, Charlier C. Les échinocandines : mise au point. *Journal des Anti-infectieux* 2013, 15:83-94.
- Pilmis B**, Thepot-Seegers V, Angebault C, *et al.* Could we predict airborne *Aspergillus* contamination during construction work ? *Am J Infect Control* 2017,45(1):39-41.
- Pini G**, Faggi E, Donato R, Sacco C, Fanci R. Invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients and the influence of hospital renovation. *Mycoses* 2008, 51(2):117-22.
- Pirofski LA**, Casadevall A. The damage-response framework of microbial pathogenesis and infectious diseases. *Adv Exp Med Biol* 2008, 635: 135-46.
- Pitt JI**. The current role of aspergillus and penicillium in human and animal health. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 1994, 32(1):17–32, .

- Pringle A**, Baker DM, Platt JL, Wares JP, Latgé JP, Taylor JW. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* 2005, 59(9):1886-1899.
- Raclasky V**, Trtkova J, Ruskova L, *et al.* Primer R108 performs best in the RAPD strain typing of three *Aspergillus* species frequently isolated from patients. *Folia Microbiol (Praha)* 2006, 51(2):136-40.
- Reboux G**, Gbaguidi-Haore H, Bellanger AP, *et al.* A 10-year survey of fungal aerocontamination in hospital corridors: a reliable sentinel to predict fungal exposure risk ? *J of Hosp Infect* 2014, 87:34-40.
- Rementería A**, López-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, Pontón J, Garaizar J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol* 2005, 22(1):1-23.
- Rhodes JC**. *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. *Med Mycol* 2006, 44:S77-S81.
- Rivero-Menendez O**, Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. Triazole Resistance in *Aspergillus* spp.: A Worldwide Problem? *J Fungi* 2016, 2(3):21.
- Rocchi S**, Daguindau E, Grenouillet F, *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 trans-plant recipient with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2014, 52(5):1724-6.
- Rocchi S**, Reboux G, Millon L. Azole resistance with environmental origin: What alternatives for the future? *Journal de Mycologie Médicale* 2015, 25(4):249-256.
- Rydholm C**, Szakacs G, Lutzoni F. Low genetic variation and no detectable population structure in *Aspergillus fumigatus* compared to closely related Neosartorya species. *Eukaryot Cell* 2006, 5(4):650 -657.
- Samson RA**, Pitt, JI. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. *Amsterdam: Harwood Publishers*, 2000: 9–49.
- Sautour M**, Sixt N, Dalle F, *et al.* Prospective survey of indoor fungal contamination in hospital during a period of building construction. *J Hosp Infect* 2007, 67(4):367-73.
- Scharf DH**, Brakhage AA, Mukherjee PK. Gliotoxin--bane or boon? *Environ Microbiol* 2016, 18(4):1096-109.
- Schmidt A**, Wolff MH. Morphological characteristics of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patient samples. *Mycoses* 1997, 40:347-51.
- Semighini CP**, Delmas G, Park S, Armstrong D, Perlin D, Goldman GH. New restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers for *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001, 31(1):15-9.
- Sherris JC**. Antimicrobial susceptibility testing. A personal perspective. *Clin Lab Med* 1989, 9(2):191-202.
- Sherif R**, Segal BH. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Curr Opin Pulm Med* 2010, 16(3):242-250.
- Siopi M**, Siafakas N, Vourli S, Mouton JW, Zerva L, Meletiadis J. Dose optimization of voriconazole/anidulafungin combination against *Aspergillus fumigatus* using an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model and response surface analysis: clinical implications for azole-resistant aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 2016, 71(11):3135-3147.

- Slaven JW**, Anderson MJ, Sanglard D, *et al.* Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, atrF, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal Genet Biol* 2002, 36(3):199–206.
- Smith JMB.** Opportunistic mycoses of man and other animals. Wallingford, UK: CAB International, 1989.
- Snelders E**, Karawajczyk A, Verhoeven RJ, *et al.* The structure-function relationship of the *Aspergillus fumigatus* cyp51A L98H conversion by site-directed mutagenesis: the mechanism of L98H azole resistance. *Fungal Genet Biol* 2011, 48(11):1062-70.
- Snelders E**, Camps SMT, Karawajczyk A, *et al.* Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 2012, 7(3):e31801.
- Steinmann J**, Hamprecht A, Vehreschild MJ, *et al.* Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2015, 70(5):1522-6.
- Stensvold CR**, Jørgensen LN, Arendrup MC. Azole-Resistant Invasive Aspergillosis: Relationship to Agriculture. *Curr Fungal Infect Rep* 2012, 6(3):178–191.
- Streifel AJ**, Lauer JL, Vesley D, Juni B, Rhame FS. *Aspergillus fumigatus* and other thermotolerant fungi generated by hospital building demolition. *Appl Environ Microbiol* 1983, 46(2):375-8.
- Sugui JA**, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latgé JP, Steinbach WJ. *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 5(2):a019786.
- Thau N**, Monod M, Crestani B, *et al.* Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun* 1994, 62:4380–4388.
- Thierry S**, Wang D, Arné P, *et al.* Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing of *Aspergillus fumigatus*. *BMC Microbiol* 2010, 10:315. doi: 10.1186/1471-2180-10-315.
- Thornton, CR.** Detection of invasive aspergillosis. *Advances in Applied Microbiology* 2010 70:187-216.
- Tormo MR**, Palacios SI, Gonzalo Garijo A, Muñoz Rodríguez AF, Fernández-Rodríguez S, Recio Aguado D. Use of personal spore traps to complement continuous aerobiological monitoring. *Grana* 2010, 49:134-141.
- Tormo Molina R**, Maya Manzano JM, Fernández-Rodríguez S, Gonzalo Garijo A, Silva Palacios I. Influence of environmental factors on measurements with Hirst spore traps. *Grana* 2013, 52(1):59-70.
- Upadhyay SK**, Mahajan L, Ramjee S, *et al.* 2009. Identification and characterization of a laminin-binding protein of *Aspergillus fumigatus*: Extracellular thaumatin domain protein (AfCalAp). *J. Med. Microbiol* 2009, 58(Pt 6):714–722.
- Valiante V**, Macheleidt J, Föge M, Brakhage AA. The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Front Microbiol* 2015, 6:325.
- van Belkum A**, Tassios PT, Dijkshoorn L, *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 13(3):1-46.

- van der Linden JW**, Snelders E, Kampinga GA, *et al.* Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis* 2011, 17(10):1846-1854.
- van der Linden JW**, Camps SM, Kampinga GA, *et al.* Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin Infect Dis* 2013, 57(4):513–520.
- Vandewoude KH**, Blot SI, Depuydt P, *et al.* Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. *Crit Care* 2006, 10: R31.
- Vanhee LM**, Symoens F, Jacobsen MD, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple typing methods for *Aspergillus fumigatus* . *Clin Microbiol Infect* 2009, 15(7):643–650.
- Vanhee LM**, Nelis HJ, Coenye T. What can be learned from genotyping of fungi? *Med Mycol* 2010, 48 Suppl 1:S60-9.
- van Ingen J**, van der Lee HA, Rijs TA, *et al.* Azole, polyene and echinocandin MIC dis-tributions for wild-type, TR34/L98H and TR46/Y121F/T289A *Aspergillus fumigatus* isolates in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 2015, 70(1):178-81.
- Verbeken E**, Van Wijngaerden E. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2008, 177: 27-34.
- Vermes A**, Guchelaar H.J, Dankert J. Flucytosine: A review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* 2000, 46(2):171-9.
- Vermeulen E**, Lagrou K, Verweij PE. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: A growing public health concern. *Curr Opin Infect Dis* 2013, 26(6):493-500.
- Vermeulen E**, Maertens J, De Bel A, *et al.* Nationwide Surveillance of Azole Resistance in *Aspergillus* Diseases. *Antimicrob Agents Chemother* 2015, 59(8):4569-76.
- Verweij PE**, Ananda, Rajah M, Andes D, *et al.* International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist* 2015, 21-22:30-40.
- Verweij PE**, Zhang J, Debets AJ, *et al.* In-host adaptation and acquired triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* : dilemma for clinical management. *Lancet Infect Dis* 2016, 16(11):e251-260.
- Vonberg R.P**, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect* 2006, 63(3):246-254.
- Wagner J**, Echtenacher B, Rohde M, Kotz A, Krappmann S, Heesemann J, Ebel F. The putative alpha-1,2-mannosyltransferase AfMnt1 of the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* is required for cell wall stability and full virulence. *Eukaryot Cell* 2008, 7(10):1661-73.
- Walsh TJ**, Anaissie EJ, Denning DW, *et al.* Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008, 46:327-60.
- Warris A**, Klaassen CH, Meis JF, *et al.* Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from water, air, and patients shows two clusters of genetically distinct strains. *J Clin Microbiol* 2003, 41(9):4101-6.

- Wei X**, Chen P, Gao R, *et al.* Screening and Characterization of a Non-cyp51A Mutation in an *Aspergillus fumigatus* cox10 Strain Conferring Azole Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2016, 61(1).pii:e02101-16.
- Willger SD**, Puttikamonkul S, Kim KH, *et al.* A sterol regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* 2008, 4(11):e1000200.
- Wuyts V**, Mattheus W, De Laminne de Bex G, Wildemauwe C, Roosens NH, Marchal K, De Keersmaecker SC, Bertrand S. MLVA as a tool for public health surveillance of human *Salmonella* Typhimurium prospective study in Belgium and evaluation of MLVA loci stability. *PLoS One* 2013, 8(12):e84055.
- Zhang J**, Snelders E, Zwaan BJ, *et al.* A Novel Environmental Azole Resistance Mutation in *Aspergillus fumigatus* and Possible Role of Sexual Reproduction in Its Emergence. *MBio* 2017;8(3).pii:e00791-17.
- Zou M**, Tang L, Zhao S, *et al.* Systematic review and meta-analysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis. *PLoS One* 2012, 7(8):e43347.

ANNEXES

ANNEXE 1.

EVALUATION DU NIVEAU DE RISQUE ASPERGILLAIRE

Classification des patients

EVALUATION DU NIVEAU DE RISQUE ASPERGILLAIRE DES PATIENTS : CLASSIFICATION DES PATIENTS

GROUPE 1 (G1) : Populations à très haut risque

- Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, notamment en cas d'âge avancé, de maladie de rechute, de seconde allogreffe, de greffe phéno-*versus* géno-identique, d'incompatibilité HLS, d'irradiation corporelle totale (ICT) dans le conditionnement, du type de greffon (sang placentaire *versus* autres sources cellulaires, greffon T-déplété), de la présence d'une maladie du greffon contre l'hôte, d'une maladie à cytomégalovirus (CMV), de surcharge en fer ;
- Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques d'origine médullaire ;
- Déficits immunitaires combinés sévères ,
- Neutropénie (avec poly nucléaires neutrophiles (PNN) < 500/mm³) post-chimiothérapie de durée supérieure à 14 jours ou neutropénie avec PNN < 100 / mm³ qu'elle qu'en soit la durée ;
- Aplasie médullaire sévère.

GROUPE 2 (G2) : Populations à haut risque

- Corticothérapie haute dose dans le cadre du traitement d'une leucémie aiguë lymphoblastique ;
- Neutropénie (avec PNN < 500/mm³) post-chimiothérapie durée inférieure à 14 jours ;
- Transplantation d'organe solide ;
- Pulmonaire : selon les caractéristiques du poumon transplanté, de l'immunosuppression, de la colonisation du poumon natif et des bronches en post-greffe ;
- Foie et rein : suites opératoires compliquées (insuffisance rénale aiguë, états septiques graves), retransplantation, traitement par anticorps monoclonaux ;
- Cœur, pancréas, intestin ;
- Maladies pulmonaires chroniques bénéficiant d'un traitement par corticostéroïdes ou autre immunosuppresseur : bronchopneumopathie obstructive, emphysème, dilatation des bronches, asthme non contrôlé, mucoviscidose ;
- Granulomatose septique chronique (enfants et adultes) ;
- Nouveau-nés en réanimation néonatales ;
- Leucémie aiguë myéloblastique en rechute ou réfractaire.

GROUPE 3 (G3) : Populations à risque moindre

- Corticothérapie haute dose répétée et/ou prolongée ;
- Patients positifs pour le VIH au stade du sida avec lymphocytes T CD4+ < 50 / mm³ ;
- Patients sous ventilation mécanique ;
- Patients dialysés ;
- Patients sous chimiothérapie anticancéreuse ;
- Acidocétose diabétique ;
- Brûlés (> 50 % de la surface corporelle) ;
- Maladie systémique.

GROUPE 4 (G4) : Autres patients

ANNEXE 2.

PROCEDURE P-4

Prévention des risques liés à l'empoussièrement

Travaux hospitaliers aux HCL, version 2015

Non diffusée en ligne

ANNEXE 3.

DEMARCHE GLOBALE D'ETUDE D'IMPACT

Méthode qualitative et quantitative

DEMARCHE GLOBALE D'ETUDE D'IMPACT : METHODE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE

Tableau III - Outil **qualitatif** d'évaluation du risque en fonction de la nature des travaux d'après [Guide AP-HP 1994, Anonyme Canada 2001, CCLIN sud-ouest 2006].

Contamination	Typologie des travaux
Forte	Démolition Sablage de murs Interventions sur système de ventilation Plâtrerie (plaques de plâtre, gaines d'isolant...) VRD* lourd (route, terrassement en pleine masse) Plomberie
Modéré	Charpente bois Faux-plafonds (+/- dépose d'existant) Interventions sur coffrage de volets roulants Revêtements de sol (sol souple/carrelage/résine) Menuiserie intérieure Ventilation-Climatisation
Limitée	VRD* léger (réseaux enterrés, terrassements...) Gros œuvre maçonnerie Espaces verts Couverture (avec ou sans tuiles) Menuiserie extérieure/Façade (bardage, enduit...) Charpente métallique/Serrurerie Électricité Revêtement mural

*VRD : voirie, réseau, divers.

Tableau IV - Outil **quantitatif** d'évaluation du risque en fonction de la nature des travaux d'après [CCLIN sud-ouest 2006].

Nature des travaux	Note attribuée
Démolition	/ 10
VRD lourd (route, terrassement en pleine masse)	/ 10
VRD léger (réseaux enterrés, terrassements ponctuels)	/ 3
Fondation	/ 2
Gros œuvre (maçonnerie)	/ 3
Charpente bois	/ 5
Couverture (avec ou sans tuiles)	/ 1
Menuiserie extérieure/Façade (bardage, enduit...)	/ 1
Charpente métallique/Serrurerie	/ 1
Électricité / CVC* (+/- raccordement sur gaines existantes)	/ 1
Faux-plafond (+/- dépose d'existant)	/ 5
Intervention sur système de ventilation	/ 10
Intervention sur gaine de volet roulant	/ 5
Revêtement mural (+/- dépose d'existant)	/ 1
Revêtement de sol (sol souple/carrelage/résine)	/ 5
Plâtrerie (plaques de plâtre, gaines d'isolant...)	/ 10
Menuiserie intérieure (bois, PVC, alu, verre...)	/ 5
Espace vert	/ 3
Total	/ 81

*CVC : chauffage, ventilation, climatisation

Tableau V - Analyse du risque en fonction de la proximité des travaux et de la zone d'hospitalisation des patients à risque infectieux fongique.

Zone à protéger	Coefficient de risque « patient »	
	Critère qualitatif	Critère quantitatif
• Hématologie : secteur stérile	+++	de 5 à 10
• Hématologie : secteur conventionnel hébergeant des patients à haut RIF • Transplantation d'organes • Blocs opératoires et salles assimilées (cathétérisme cardiaque ou de radiologie interventionnelle...) • Soins intensifs et réanimation	+++ si travaux à l'intérieur du bâtiment	de 5 à 10
• Cancérologie • Autres secteurs à environnement protégé : stérilisation, pharmacie (reconstitution...)	++ si travaux à l'intérieur du bâtiment et à proximité ou si travaux à l'extérieur et sous vents dominants	de 1 à 5
• Services cliniques et chirurgicaux classiques • Radiologie • Laboratoires	+ ou ++	de 1 à 5
• Bureaux, aires publiques	+	de 0 à 1

Tableau VI - Matrice d'évaluation qualitative du niveau de risque fongique global.

Contamination	Forte	Modérée	Limitée
Risque « patient »			
+++	Élevé	Élevé	Moyen
++	Moyen	Moyen	Faible
+	Moyen	Faible	Faible

Tableau VII - Matrice d'évaluation quantitative du niveau de risque fongique global.

Index = note attribuée sur la contamination des travaux X Coefficient de risque « patient »	Risque fongique global
> 100	Élevé
25 à 100	Moyen
< 25	Faible

ANNEXE 4.
GROUPE DE PATIENS A RISQUE INFECTIEUX FONGIQUE
A l'hôpital Edouard Herriot

GROUPES DE PATIENTS A RISQUE INFECTIEUX FONGIQUES A L'HÔPITAL EDOUARD HERRIOT

GROUPE 1 (Gr1) : Population à très haut risque

- **Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques**, notamment en cas d'âge avancé, de maladie de rechute, de seconde allogreffe, de greffe phéno-versus géno-identique, d'incompatibilité HLS, d'irradiation corporelle totale (ICT) dans le conditionnement, du type de greffon (sang placentaire versus autres sources cellulaires, greffon T-déplété), de la présence d'une maladie du greffon contre l'hôte, d'une maladie à cytomégalovirus (CMV), de surcharge en fer ;
- **Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques** d'origine médullaire ;
- **Déficits immunitaires combinés sévères** ;
- **Neutropénie** (avec poly nucléaires neutrophiles (PNN) < 500/mm³) de durée **supérieure à 14 jours** ou neutropénie avec PNN < 100 / mm³ qu'elle qu'en soit la durée ;
- **Aplasie** médullaire sévère.

GROUPE 2 (Gr 2) : Populations à haut risque

- **Corticothérapie haute dose** répétée et/ou prolongée ;
- **Neutropénie** (avec PNN < 500/mm³) post-chimiothérapie durée **inférieure à 14 jours** ;
- **Transplantation d'organe solide** :
 - Pulmonaire : selon les caractéristiques du poumon transplanté, de l'immunosuppression, de la colonisation du poumon natif et des bronches en post-greffe ;
 - Foie et rein : suites opératoires compliquées (insuffisance rénale aiguë, états septiques graves), retransplantation, traitement par anticorps monoclonaux ;
 - Cœur, pancréas, intestin ;
- **Maladies pulmonaires chroniques bénéficiant d'un traitement par corticostéroïdes ou autre immunosuppresseur** : bronchopneumopathie obstructive, emphysème, dilatation des bronches, asthme non contrôlé, mucoviscidose ;
- **Granulomatose septique chronique** (enfants et adultes) ;
- **Nouveau-nés** en réanimation néonatale ;
- Leucémie aiguë myéloblastique en rechute ou réfractaire ;
- Patients positifs pour le **VIH au stade sida** avec lymphocytes T CD4+ < 50 / mm³ ;
- Patients sous ventilation mécanique ;
- Patients dialysés ;
- Patients sous chimiothérapie anticancéreuse ;
- Acidocétose diabétique ;
- Brûlés (>50 % de la surface corporelle) ;
- Maladie systémique.

ANNEXE 5.

PLAQUETTE D'INFORMATION

Pendant les travaux du pavillon H

Quelles mesures
sont prises sur le chantier
pour limiter l'émission
de poussières ?

CRÉATION DE
CIRCUITS SÉPARÉS
POUR LES PATIENTS ET
LES PERSONNELS DE
CHANTIER



EVACUATION
DES GRAVATS
DANS
DES CONTENANTS
FERMÉS



DÉCONSTRUCTION
EN MILIEU HUMIDE
(ARROSAGE)



CES CONSIGNES
SONT APPLICABLES
DURANT LES PHASES
**DE DÉCONSTRUCTION
ET DE TERRASSEMENT
DU PAVILLON H**

SE PROTÉGER DE L'INHALATION DE POUSSIÈRES

DURANT LES TRAVAUX
DU PAVILLON H.
GROUPEMENT HOSPITALIER
EDOUARD HERRIOT



Hôpital Civil de Lyon

DOCUMENT
D'INFORMATION
PENDANT LES TRAVAUX
DU PAVILLON H

Version n°1 du 9 Juin 2015
Rédaction : Unité d'Hygiène et d'Epidémiologie
Validation : Cellule Travaux, Groupement Hospitalier Edouard Herriot

VOICI QUELQUES
CONSIGNES SIMPLES
À RESPECTER
POUR SE PROTÉGER
DE L'INHALATION DES
POUSSIÈRES

LES RISQUES

Les poussières de chantier contiennent des moisissures pouvant exceptionnellement entraîner des infections chez certains patients très fragilisés.

Ces moisissures, du genre *Aspergillus*, sont présentes de façon très fréquente dans l'environnement, elles sont émises dans l'air en quantité plus importante lors de tout chantier, hospitalier ou non.

Les actions à entreprendre



- Respecter les indications de circulation piétonnière.

- Ne pas aller à proximité du chantier.



- Si l'équipe médicale vous remets un masque : le porter lors de vos déplacements en dehors de l'unité.



- Respecter les confinements (rubans adhésifs) des fenêtres mis en place.



- Tenir les fenêtres de votre chambre fermées si elles ne sont pas cauteuférées. Vous pouvez les ouvrir pour aérer entre 19h et 7h le matin.

Plan de circulation piétonnière dans l'établissement pendant la durée du chantier



DES CONSEILS
SPÉCIFIQUES POURRONT
VOUS ÊTRE APPORTÉS
PAR L'ÉQUIPE MÉDICALE

ANNEXE 6.

AUDIT n : 1

Respect des mesures au niveau de la zone de travaux

AUDIT n°1 : RESPECT DES MESURES AU NIVEAU DE LA ZONE DE TRAVAUX



Fiche d'audit rapide n°1 : Vérification de la mise en place des mesures de protection contre le risque aspergillaire au niveau de la zone de chantier

Semaine : Date : Heure : Enquêteur :

A réaliser 1 fois par semaine

Zone de démolition

- 1) Humidification de la zone de démolition
 Oui Non Non adapté à la situation

Gestion des gravats

- 2) Humidification des gravats
 Oui Non Non adapté à la situation
- 3) Gravats entreposés dans des conteneurs couverts
 Oui Non Non adapté à la situation
- 4) Évacuation régulière des gravats
 Oui Non Non adapté à la situation

Circuit du personnel de chantier

- 5) Circuits de circulation des ouvriers respectés
 Oui Non Non adapté à la situation

Entretien des abords du chantier et des voiries empruntées

- 6) Abords du chantier régulièrement entretenus
 Oui Non Non adapté à la situation

Commentaires

ANNEXE 7.

AUDIT n : 2

Respect des mesures au niveau des pavillons à risque

AUDIT n°2 : RESPECT DES MESURES AU NIVEAU DES PAVILLONS A RISQUE



Fiche d'audit rapide n°2 : Vérification de la mise en place des mesures de protection contre le risque aspergillaire au niveau des unités de soins

Semaine :

Date :

Heure :

Enquêteur :

A réaliser 1 fois par semaine

Calfeutrage issues de secours et fenêtres

1) Intégrité du calfeutrage des issues de secours
 Oui Non Non adapté à la situation

2) Intégrité du calfeutrage des fenêtres
 Oui Non Non adapté à la situation
Si non, nombre :

Fermeture des fenêtres non calfeutrées

3) Fenêtres correctement fermées en journée (07h à 19h)
 Oui Non Non adapté à la situation
Si non, nombre :

Environnement

4) Empoussièremment visible dans l'unité
 Oui Non Non adapté à la situation

5) Tapis de décontamination fonctionnel à l'entrée de l'unité
 Oui Non Non adapté à la situation

Commentaires

ANNEXE 8.

AUDIT n : 3

Respect des mesures en cas d'hébergement du patient du Groupe 1

AUDIT n°3 : RESPECT DES MESURES EN CAS D'HEBERGEMENT DU PATIENT DU GROUPE 1



Fiche d'audit rapide n°3 : Vérification de la mise en place des mesures de protection contre le risque aspergillaire pour les patients du groupe 1

Date : **Heure :** **Initiales du patient :**
Service : **Enquêteur :**

A réaliser pour chaque patient du groupe 1, 48 heures après l'entrée et après chaque transfert

Isolement protecteur

- 1) Chariot « isolement protecteur » + affichage mis en place
 Oui Non Non adapté à la situation
- 2) Application correcte des mesures d'isolement protecteur définies
 Oui Non Non adapté à la situation

Environnement du patient

- 3) Chambre sans visibilité directe sur le chantier
 Oui Non Non adapté à la situation
- 4) Fenêtres calfeutrées ou correctement fermées en journée
 Oui Non Non adapté à la situation
- 5) Porte correctement fermée
 Oui Non Non adapté à la situation
- 6) Appareil de traitement d'air mobile en fonctionnement
 Oui Non Non adapté à la situation