

## Le point sur le diagnostic de l'aspergillose naso-sinusale chez le chien.

BILLEN F., CLERCX C., PEETERS D.

Département des Sciences Cliniques, Service de Médecine interne des Petits animaux, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, bâtiment B44, 4000 Liège, Belgique

Correspondance : Dr Frédéric Billen Email : fbillen@ulg.ac.be

**RESUME : L'aspergillose naso-sinusale est une des causes les plus fréquentes de jetage nasal chez le chien. Son diagnostic peut s'avérer difficile car aucun test diagnostique n'est suffisamment sensible et spécifique. Actuellement, la visualisation directe de placards fongiques par endoscopie et/ou l'identification du champignon par culture, cytologie ou histopathologie d'échantillons prélevés au niveau de lésions suspectes sous endoscopie est reconnue comme méthode de référence pour le diagnostic de l'aspergillose naso-sinusale chez le chien. Cependant, la rhinoscopie n'est pas toujours accessible aux vétérinaires praticiens. Ceux-ci doivent donc se reposer sur d'autres examens pour préciser leur diagnostic. Cet article fait le point sur les différentes méthodes utiles au diagnostic d'aspergillose naso-sinusale chez le chien.**

### INTRODUCTION

Les rhino-sinusites fongiques sont une des causes les plus fréquentes de maladie nasale chronique chez le chien avec une prévalence de 12 à 34 % (Lane et Warnock, 1977 ; Harvey et O'Brien, 1983). *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus couramment isolée contrairement à *A. niger*, *A. nidulans*, *A. flavus* ou encore *Penicillium spp.* qui ne sont rapportés qu'occasionnellement (Harvey *et al.*, 1981 ; Sharp *et al.*, 1991 ; Mathews et Sharp, 2006). *Aspergillus spp.* étant de loin l'agent étiologique le plus souvent incriminé, le terme « aspergillose naso-sinusale » (ANS) est généralement utilisée. Cependant, certaines mycoses habituellement responsables d'infection systémiques (ex. *Cryptococcus neoformans* ou encore *Scedosporium apiospermum*) peuvent occasionnellement n'infecter que les cavités nasales (Malik *et al.*, 1995 ; Malik *et al.*, 1997 ; Cabanes *et al.*, 1998 ; Caro-Vadillo *et al.*, 2005 ; Coleman et Robson, 2005). *Aspergillus* et

*Penicillium* sont des champignons filamenteux saprophytes ubiquitaires et les animaux et les humains inhalent chaque jour des centaines de leurs spores (conidies) (Latgé, 1999). Ils sont reconnus comme agents pathogènes opportunistes (Brakhage *et al.*, 1999 ; Mathews et Sharp, 2006).

La raison pour laquelle seuls certains chiens contractent une ANS n'est toujours pas élucidée. Cependant des facteurs prédisposant ont été mentionnés. Harvey et O'Brien rapportent ainsi que 19 % de leurs patients avaient eu un trauma facial avant l'apparition des symptômes d'ANS (Harvey et O'Brien, 1983). Un corps étranger nasal (un épillet par exemple) a été découvert dans 16 % des cas d'ANS lors d'une étude récente (Johnson *et al.*, 2006). Enfin, la présence d'une tumeur nasale est également citée comme facteur prédisposant (Mathews et Sharp, 2006) ; cependant, aucune publication de cas clinique rapportant cette association n'est mentionnée dans la littérature. Alors que les

deux premiers cas de figure ont également été rencontrés par les auteurs, ces derniers n'ont jamais observé de tumeur nasale chez un chien souffrant d'ANS.

L'ANS se rencontre principalement chez des chiens jeunes adultes de race méso- ou dolichocéphale (Mathews et Sharp, 2006). Elle se manifeste par une rhino-sinusite chronique accompagnée de lyse sévère des cornets nasaux. Les signes cliniques comprennent essentiellement un jetage muco-purulent à hémorragique, de l'épistaxis, des éternuements, une hyperkératose et/ou une ulcération de la truffe et une douleur nasale. Les chiens sévèrement atteints peuvent également présenter de l'abattement et de la dysorexie (Harvey *et al.*, 1981 ; Sharp *et al.*, 1991 ; Mathews et Sharp, 2006).

L'ANS peut être suspectée sur la base du signalement, de l'anamnèse et de l'examen clinique. Cependant, la confirmation du diagnostic requiert une combinaison d'examens complémentaires comme la tomodensitomé-

trie (TDM) communément appelée scanner ou CT (pour « *Computed tomography* »), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la rhinoscopie, les cultures fongiques, la cytologie, l'histologie, la recherche d'anticorps anti-*Aspergillus* ou la recherche d'ADN fongique (Saunders *et al.*, 2004 ; De Lorenzi *et al.*, 2006 ; Johnson *et al.*, 2006 ; Mathews et Sharp, 2006 ; Peeters et Clercx, 2007 ; Peeters *et al.*, 2007 ; Pomrantz *et al.*, 2007). Comme aucune de ces méthodes ne permet de poser un diagnostic de certitude dans 100 % des cas (manque de spécificité et/ou de sensibilité), Sharp (1998) a proposé que le diagnostic d'ANS ne soit posé que si deux, et de préférence trois, résultats d'examen complémentaires étaient présents parmi les suivants : (i) des images radiographiques, tomodynamométriques ou d'IRM compatibles avec une rhino-sinusite fongique, (ii) l'observation de placards fongiques à l'endoscopie, (iii) l'identification d'*Aspergillus* ou de *Penicillium* à l'examen cytologique, histologique ou sur culture fongique d'échantillons des cavités nasales et (iv) une sérologie positive. Cependant, en raison de l'amélioration de la qualité du matériel endoscopique et de l'habileté des vétérinaires spécialisés, la visualisation directe de placards fongiques par endoscopie et/ou l'identification du champignon par culture, cytologie ou histopathologie d'échantillons prélevés au niveau de lésions suspectes sous endoscopie est actuellement reconnue comme méthode de référence pour le diagnostic d'ANS chez le chien (De Lorenzi *et al.*, 2006 ; Johnson *et al.*, 2006 ; Peeters et Clercx, 2007 ; Pomrantz *et al.*, 2007).

Cet article fait le point sur les différentes méthodes utiles au diagnostic d'ANS chez le chien.

## ANALYSES RÉALISÉES À PARTIR D'ÉCHANTILLONS SANGUINS

### 1) La détection d'anticorps spécifiques d'*Aspergillus*.

Plusieurs techniques ont été évaluées pour le diagnostic de l'ANS chez le chien. L'immunodiffusion double sur gel d'agarose (*agar gel double immunodiffusion* (AGDD)) était la première technique décrite et reste la technique sérologique la plus utilisée dans les

laboratoires. Cette méthode est basée sur l'observation de la précipitation, au sein du gel d'agarose, des anticorps dirigés contre *Aspergillus* lorsqu'ils rencontrent en quantité équivalente les antigènes d'*Aspergillus* (Ouchterlony, 1949). Les avantages de cette technique sont son faible coût et sa facilité de réalisation. Son défaut majeur réside dans le caractère non quantitatif du résultat obtenu (Latgé, 1999). Les premières études rapportaient jusqu'à 100% de sensibilité et de spécificité (Lane et Warnock, 1977 ; Poli *et al.*, 1981 ; Sharp *et al.*, 1984). Lors de ces anciennes études, le sérum des chiens était testé contre plusieurs préparations antigéniques d'*Aspergillus* ce qui explique probablement l'excellente sensibilité rapportée. Des faux négatifs peuvent néanmoins être observés lorsque seul des antigènes d'*Aspergillus* sont utilisés dans le test d'immunodiffusion alors que l'agent étiologique est par exemple *Penicillium* (Harvey et O'Brien, 1983), *Cryptococcus* ou encore *Scedosporium*. Dans de rares cas, lorsque l'AGDD est réalisé trop tôt au cours de la maladie, le résultat sérologique peut également être négatif. En effet, Mathews et Sharp (2006) ont observé que des résultats sérologiques négatifs devenaient positifs lors de l'aggravation de la maladie. Harvey et O'Brien (1983) ont quant à eux rapportés jusqu'à 15 % de faux positifs chez des chiens atteints de tumeur nasale. Il faut par ailleurs garder à l'esprit qu'un résultat positif n'élimine pas l'existence potentielle d'une seconde maladie nasale comme un corps étranger qui peut prédisposer à l'infection par *Aspergillus* (Mathews et Sharp, 2006).

La technique d'électrosynérèse (*counter-immunoelectrophoresis* (CIE)) a également été utilisée pour le diagnostic de l'ANS chez le chien, et présente une sensibilité et une spécificité comparable à celles obtenues avec l'AGDD (Richardson *et al.*, 1982 ; Khan *et al.*, 1984 ; Richardson et Warnock, 1984 ; Sharp *et al.*, 1991). L'avantage de l'électrosynérèse sur l'AGDD est sa réalisation plus rapide, c'est-à-dire 90 minutes contre 24-48 heures pour l'AGDD (Richardson *et al.*, 1982 ; Kurup et Kumar, 1991). Néanmoins, cette méthode est plus compliquée à mettre en œuvre que l'AGDD et n'est plus utilisée que par un nombre limité de laboratoires.

L'*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) est un test quantitatif per-

mettant la détection de concentrations minimales d'anticorps. Cette méthode permet également d'analyser un grand nombre d'échantillons simultanément sur un temps relativement court et d'objectiver la lecture des résultats via un spectrophotomètre (Kuby, 1997). La méthode ELISA constitue donc un test sérologique alternatif potentiellement utile au diagnostic de l'ANS. Par ailleurs, elle pourrait être utilisée pour le suivi de l'évolution du taux d'anticorps en réponse au traitement. Enfin, le test ELISA permettrait l'étude de la réaction humorale mise en place lors d'ANS chez le chien, comme par exemple l'étude des différentes sous-classes d'immunoglobulines spécifiques d'*Aspergillus*. Cependant, selon l'unique étude portant sur la valeur diagnostique de l'ELISA dans le cadre de l'ANS chez le chien, cette méthode semble moins fiable que l'AGDD ou l'électrosynérèse, car un certain nombre de faux négatifs et de faux positifs ont été observés en fonction de la préparation antigénique utilisée (Khan *et al.*, 1984). La seule autre étude publiée porte sur la valeur diagnostique de l'ELISA dans le cadre de l'aspergillose invasive (AI) chez le chien. Là encore, les résultats sont peu concluants (Garcia *et al.*, 2001).

L'inconvénient majeur de la plupart des anciennes études citées ci-avant est l'utilisation de solutions d'antigènes peu standardisées dans les examens sérologiques. En effet, chaque laboratoire possédait sa propre 'recette' de préparation d'antigènes obtenue à partir d'extraits bruts de culture d'*Aspergillus* et une nouvelle solution d'antigènes était produite lors de chaque nouvelle série de tests (Brakhage *et al.*, 1999). Il a été démontré que des variations minimales inhérentes à la préparation des solutions antigéniques pouvaient engendrer des divergences majeures des résultats sérologiques entre laboratoires (Kurup et Kumar, 1991 ; Latgé, 1999). En effet, lors de la préparation d'une solution antigénique, chaque étape (les conditions de culture, la partie utilisée du champignon pour préparer les antigènes ou la méthode de purification des antigènes utilisée) peut modifier la composition antigénique et donc le résultat final de l'analyse sérologique (Kurup et Kumar, 1991 ; Latgé, 1999). Par exemple, il a été montré que, pour le diagnostic sérologique de l'ANS chez le chien ou l'AI chez l'humain, les tests utilisant des anti-

gènes provenant du milieu de culture d'*Aspergillus* étaient moins sensibles que ceux utilisant des antigènes provenant de filaments mycéliens (Khan *et al.*, 1984 ; Richardson et Warnock, 1984 ; Kurup et Kumar, 1991). En conséquence, le manque de standardisation des solutions antigéniques utilisées rend non seulement les analyses peu reproductibles mais également les résultats de ces analyses difficilement comparables entre eux. Dans le but de surmonter cette problématique, les laboratoires ont commencé à standardiser leur production d'antigènes en utilisant des techniques de purification biochimiques ainsi que des contrôles internes de composition des lots de leurs solutions antigéniques. Ce sont les solutions d'antigènes d'*Aspergillus* que l'on retrouve actuellement en médecine humaine dans les tests diagnostiques sérologiques fongiques des firmes spécialisées (Brakhage *et al.*, 1999).

Cependant, il n'existe encore que très peu de données quant à la sensibilité et la spécificité de ces tests. Actuellement, seule une étude a porté sur la valeur diagnostique d'un test AGDD utilisant une solution standardisée d'antigènes purifiés d'*Aspergillus fumigatus*, *A. niger* et *A. flavus* commercialement disponible (Pomrantz *et al.*, 2007). En comparaison avec les études précédentes, l'AGDD utilisé avait une spécificité similaire (98 %) mais une sensibilité plus faible (67 %) pour le diagnostic de l'ANS chez le chien. Le manque de sensibilité de ce test peut probablement être expliqué par l'utilisation d'une seule solution antigénique (c'est-à-dire un sérum testé contre une solution antigénique) contrairement aux anciennes études où chaque sérum était couramment testé contre plusieurs solutions antigéniques à la fois. D'autres auteurs ont également l'impression que les tests utilisés actuellement avec les nouvelles solutions purifiées d'*Aspergillus* montrent une sensibilité plus faible que mentionnée précédemment (Mathews et Sharp, 2006 ; Peeters et Clercx, 2007).

De manière générale, en raison de son excellente spécificité, la sérologie est d'avantage utilisée pour confirmer le diagnostic d'ANS après la réalisation d'examen complémentaires de premier choix, comme l'imagerie médicale et/ou la rhinoscopie. Cependant, sa sensibilité modérée lui permet néanmoins d'être également utilisée

plus tôt dans l'approche diagnostique lorsque le vétérinaire praticien n'a pas un accès aisé à ces autres tests diagnostiques.

## 2) La détection d'antigènes d'*Aspergillus*

En médecine humaine, l'AI est une cause croissante de morbidité et de mortalité chez les patients immunodéprimés (Aquino *et al.*, 2007). Ceux-ci sont incapables d'assurer une production adéquate d'anticorps rendant les tests basés sur la détection d'anticorps spécifiques d'*Aspergillus* inutiles pour le diagnostic (Maertens *et al.*, 2007). Par ailleurs, les méthodes diagnostiques habituelles comme la culture, la cytologie/histologie ou encore l'imagerie médicale possèdent une valeur diagnostique limitée et/ou tardive pour l'AI (Kedzierska *et al.*, 2007). En conséquence, les méthodes diagnostiques se sont concentrées sur la détection d'antigènes d'*Aspergillus* dans le sang. Le galactomannane (GM) est un antigène de paroi d'*Aspergillus* et de *Penicillium* alors que le (1→3)- $\beta$ -D-glucane (BDG) provient de la paroi de la plupart des champignons pathogènes (Maertens *et al.*, 2007). Ces antigènes sont libérés dans la circulation systémique lors de la croissance du champignon au sein des tissus. Le GM est l'antigène le plus étudié actuellement, probablement parce qu'il est découvert plus tôt que le BDG. Actuellement, le GM est détecté dans le sang et autres fluides biologiques, par un test ELISA commercialisé sous le nom de Platelia™ *Aspergillus* EIA (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) (Aquino *et al.*, 2007). Un avantage majeur du GM est qu'il peut être détecté dans le sang en moyenne une semaine avant l'apparition de signes cliniques ou avant que d'autres tests diagnostiques, tels la culture ou la radiographie, ne deviennent positifs (Kedzierska *et al.*, 2007). Dans le cadre de l'AI chez l'homme, la majorité des études rapportent une excellente spécificité (entre 90 et 100 %) pour le test Platelia™. Par contre, la sensibilité du test varie considérablement (entre 30 et 90 %) en fonction de la population de malades testés (Maertens *et al.*, 2002 ; Husain *et al.*, 2004 ; Kwak *et al.*, 2004).

En médecine vétérinaire, la valeur diagnostique de la détection de GM dans le sang n'a été étudiée que sporadi-

quement dans le cadre d'AI. Chez le chien, une seule étude a été menée, dans laquelle la valeur diagnostique du test Platelia® a été comparée avec l'ELISA chez des chiens atteints d'AI. Même si la spécificité était excellente, les résultats ont été peu concluants car sur 19 analyses effectuées, seule 6 concordaient (Garcia *et al.*, 2001). Chez le mouton et le faucon, un grand nombre de faux positifs et de faux négatifs ont été observés (Garcia *et al.*, 2004 ; Arca-Ruibal *et al.*, 2006). Chez la vache et le cheval, beaucoup de résultats faussement négatifs ont également été observés (Jensen *et al.*, 1993 ; Guillot *et al.*, 1999).

Cependant, en médecine humaine, les performances du test Platelia® sont en continuelle amélioration grâce à des variations du *cut-off* du test (Maertens *et al.*, 2007) ou à des modifications de la procédure du traitement pré-analytique de l'échantillon de sang (Mennink-Kersten *et al.*, 2008). Il existe donc potentiellement des perspectives à son utilisation en médecine vétérinaire.

## 3) La détection d'ADN d'*Aspergillus*

En médecine humaine, la détection d'ADN d'*Aspergillus* dans le sang par PCR en temps réel fait également partie des examens permettant la détection des cas d'AI chez les patients à risques (Maertens *et al.*, 2007 ; Maschmeyer *et al.*, 2007). En médecine vétérinaire, une étude récente a porté sur la valeur diagnostique de la détection d'ADN d'*Aspergillus* par PCR en temps réel dans le sang de chiens atteints de maladie nasale chronique. Aucune différence significative dans les quantités d'ADN fongique n'a pu être mise en évidence entre les chiens souffrant d'ANS, les chiens avec tumeur nasale, les chiens atteints de rhinite lymphoplasmocytaire et les chiens sains (Peeters *et al.*, 2007). La détection d'ADN d'*Aspergillus* dans le sang ne semble donc avoir aucune valeur diagnostique dans l'ANS chez le chien.

## IMAGERIE MÉDICALE

Les méthodes d'imagerie médicale ayant un intérêt diagnostique dans le cadre des pathologies naso-sinusales sont la radiographie, la TDM et l'IRM. Même si les techniques d'imagerie en coupe (TDM et IRM) sont de plus en

plus fréquemment utilisées en médecine vétérinaire, elles restent principalement réservées aux centres vétérinaires spécialisés et seule la radiographie est communément accessible au praticien généraliste.

Il est à noter que tout examen d'imagerie des cavités nasales doit précéder la rhinoscopie et le prélèvement de biopsies car l'hémorragie secondaire à ces examens peut rendre délicate l'interprétation des images (Saunders *et al.*, 2004).

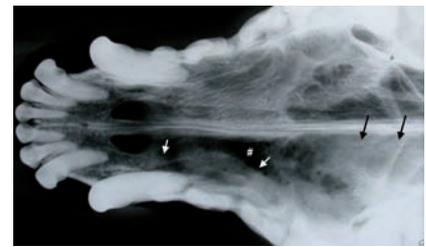
### 1) La radiographie des cavités nasales et des sinus frontaux

La radiographie est utilisée depuis longtemps pour le diagnostic des maladies nasales chez le chien (Gibbs *et al.*, 1979 ; Harvey *et al.*, 1979) et les signes radiologiques de l'ANS chez le chien sont décrits (Sullivan *et al.*, 1986 ; Saunders et van Bree, 2003a ; Saunders *et al.*, 2004). Un placement adéquat de la tête étant indispensable, une anesthésie générale est impérative (Johnson et Wisner, 2007). Les incidences dorso-ventrale (intra-orale) des cavités nasales et rostro-caudale des sinus frontaux sont les plus informatives (Sullivan *et al.*, 1986). L'analyse des radiographies de la tête est délicate vu le nombre de structures osseuses. Lors d'ANS, les lésions radiographiques sont principalement unilatérales, mais des cas d'atteinte bilatérale sont également décrits. Au niveau des cavités nasales, les anomalies radiologiques principales incluent, en partie rostrale, la présence de zones radio-transparentes (destruction des cornets nasaux) et, en partie caudale, l'association de zones radio-transparentes et radio-opaques (hyperplasie de la muqueuse nasale, accumulation de sécrétions nasales et/ou de placards fongiques) (figure 1). Au niveau des sinus frontaux, on observe généralement une augmentation de la radio-opacité ainsi qu'un épaississement de l'os frontal (figure 2) (Sullivan *et al.*, 1986 ; Saunders et van Bree, 2003a ; Saunders *et al.*, 2004). Dans certains cas, la radiographie permet d'observer la présence d'un corps étranger nasal, un élément pouvant favoriser la colonisation des cavités nasales par le champignon (Saunders *et al.*, 2004). Cependant, les radiographies ne permettent pas toujours de visualiser l'étendue exacte des lésions nasales ni de différencier un processus néoplasique d'un processus inflammatoire

sévère (Park *et al.*, 1992 ; Codner *et al.*, 1993 ; Petite et Dennis, 2006). Dans une étude portant sur des chiens atteints de maladie nasale, la radiographie n'a pu identifier que 83 % des tumeurs nasales, 60 % des cas d'ANS et 23 % des rhinites non-spécifiques (Harvey *et al.*, 1979). La capacité de la radiographie à détecter des lésions de la lame criblée de l'ethmoïde est limitée vu que seule une destruction sévère de celle-ci ne peut être visualisée (Schwarz *et al.*, 2000). L'intérêt de la radiographie comme examen complémentaire lors du diagnostic de maladie nasale chronique chez le chien, et en particulier l'ANS, est donc limité.

### 2) La tomodensitométrie et l'IRM des cavités nasales et des sinus frontaux

L'avantage majeur de l'imagerie en coupe par rapport à la radiographie est l'absence de superposition des différentes structures anatomiques, ce qui rend la lecture de l'image beaucoup plus aisée. Par ailleurs, l'utilisation de plusieurs tons de gris lors de la construction de l'image permet une meilleure différenciation des structures (Forrest, 1999). Enfin, le temps nécessaire pour effectuer un examen tomodensitométrique des cavités nasales et des sinus est nettement plus court que celui nécessaire pour réaliser les vues radiographiques conventionnelles de ces mêmes structures (Johnson et Wisner, 2007). En effet, la radiographie nécessite une anesthésie générale qui n'est plus indispensable avec les nouveaux tomodensitomètres. De plus, la radiographie digitale directe (c'est-à-dire lorsqu'elle n'utilise pas de cassette) complique singulièrement la prise de clichés radiographiques intra-oraux. Plusieurs études ont montré que tant la TDM que l'IRM sont plus sensibles que la radiographie pour le diagnostic des maladies nasales du chien (Park *et al.*, 1992 ; Codner *et al.*, 1993 ; Lefebvre *et al.*, 2005 ; Petite et Dennis, 2006) et en particulier dans le cas d'ANS (Saunders et van Bree, 2003a ; Saunders *et al.*, 2004). Dans une étude de Saunders et van Bree (2003a) comparant la valeur diagnostique de la radiographie et la TDM dans l'ANS ; la sensibilité de la radiographie n'était que de 72 % alors qu'elle était de 88 % pour la TDM. Par ailleurs, la valeur de l'IRM est similaire à celle de la TDM pour le diagnostic de l'ANS (Saunders *et al.*, 2004). Contrairement à la radiographie, les techniques d'ima-



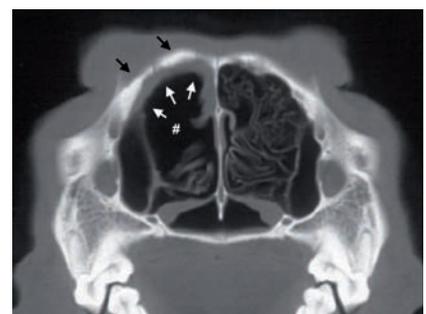
**Figure 1**

Image radiographique d'aspergillose naso-sinusale chez le chien. Vue dorso-ventrale intra-orale des cavités nasales. Au niveau de la cavité nasale droite on observe une large zone radio-transparente (destruction sévère des cornets nasaux), une opacité tissu mou le long de la face interne des os de la cavité nasale (hyperplasie de la muqueuse nasale) (flèches blanches), une opacification de la partie caudale de la cavité nasale (hyperplasie de la muqueuse, accumulation de sécrétions muco-purulentes et/ou placards fongiques) (flèches noires) (avec l'autorisation de l'auteur : Saunders et van Bree, 2003b)



**Figure 2**

Image radiographique d'aspergillose naso-sinusale chez le chien. Vue rostro-caudale des sinus frontaux. Au niveau du sinus frontal droit on observe une augmentation de la radio-opacité (accumulation de sécrétions muco-purulentes et/ou placards fongiques) ainsi qu'un épaississement de l'os frontal droit (flèches) (avec l'autorisation des auteurs : Saunders et van Bree, 2003b).



**Figure 3**

Image tomographique transverse des cavités nasales d'un chien atteint d'aspergillose naso-sinusale. On observe l'aspect cavitaire de la cavité nasale droite due à la destruction sévère des cornets nasaux, un épaississement de la muqueuse nasale adjacente à l'os maxillaire droit (flèches blanches) et une hyperostose de celui-ci (flèches noires) (avec l'autorisation des auteurs : Saunders et collaborateurs, 2002).

gerie en coupe sont particulièrement utiles pour définir l'étendue des lésions naso-sinusales et en particulier l'évaluation de la lame criblée de l'ethmoïde (Saunders *et al.*, 2004).

Au niveau des cavités nasales, les signes classiques à la TDM de l'ANS chez le chien sont la destruction modérée à sévère uni- ou bilatérale des cornets nasaux avec en conséquence la formation d'une cavité, une déviation et/ou destruction de la cloison nasale, un épaississement de la muqueuse nasale adjacente aux os de la cavité nasale atteinte, une accumulation de tissu mou (sécrétions, placards fongiques et/ou hyperplasie polypoïde de la muqueuse nasale) dans cette cavité et au niveau de l'ostium naso-sinusal et une hyperostose associée ou non à des zones de lyse osseuse des os bordant la cavité nasale affectée (figure 3). On peut également observer une destruction de la lame criblée de l'ethmoïde, un élément important pouvant influencer le choix thérapeutique. Au niveau des sinus frontaux, on observe la présence de tissu mou oblitérant partiellement ou complètement le sinus, un épaississement de la muqueuse recouvrant l'os frontal et des lésions hyperostotiques et/ou lytiques des os frontaux (figure 4). Lors d'atteinte bilatérale de l'os frontal, une lyse de la crête frontale avec extension de l'infection vers le sinus controlatéral est quasiment toujours observée (Saunders *et al.*, 2002). Lorsque l'ANS est associée à un corps étranger nasal, les lésions sont plus localisées autour de ce dernier et lorsque celui-ci n'est pas identifié à la TDM, il devient très difficile de différencier une aspergillose nasale localisée d'une rhinite sur corps étranger (Saunders et van Bree, 2003a). Dans ce cas, une endoscopie devrait être réalisée afin de préciser le diagnostic.

L'IRM est supérieure à la TDM pour l'évaluation des structures tissulaires lors du diagnostic d'ANS chez le chien. De fait, l'IRM permet de différencier une muqueuse épaissie de sécrétions nasales ou de placards fongiques. Par contre, cette technique ne permet pas de différencier ces deux derniers éléments. Néanmoins, la TDM reste la technique de choix pour l'évaluation des structures osseuses (Saunders *et al.*, 2004).

## RHINOSCOPIE

L'endoscopie des cavités nasales et sinusales est réalisée sous anesthé-

sie générale à l'aide d'un rhinoscope rigide à angle optique de 0° ou 30° et/ou d'un bronchoscope pédiatrique flexible (Peeters et Clercx, 2007). L'endoscope rigide permet d'examiner par voie antérograde la cavité nasale et, lorsqu'une lyse importante des cornets postérieurs le permet, l'ostium naso-sinusal qui constitue l'entrée du sinus frontal. Les avantages de l'utilisation d'un endoscope flexible à 180° sont la possibilité d'examiner le nasopharynx par endoscopie rétrograde et, lorsque la lyse des cornets est suffisamment importante, de visualiser l'intérieur du sinus frontal (McCarthy et McDermaid, 1990 ; Noone, 2001 ; Johnson *et al.*, 2006). Cependant, de par son épaisseur, il ne peut être utilisé chez les chiens de petite taille.

Dans la majorité des cas, des lésions non spécifiques sont observées lors de la rhinoscopie, comme une muqueuse nasale congestive, œdématiée et friable ainsi que la présence de sang et/ou de sécrétions mucopurulentes plus ou moins abondantes. Les lésions spécifiques de l'ANS sont une destruction modérée à sévère des cornets nasaux donnant à la cavité nasale un aspect « cavaire » (figure 5) et l'observation de placards fongiques dans le sinus frontal et/ou la cavité nasale correspondante (figure 6). Cependant, lorsque l'infection fongique est associée à un corps étranger nasal, les lésions sont généralement centrées autour de ce dernier. Lors d'infection modérée, les placards fongiques, d'aspect blanchâtre, peuvent être petits, plats et lisses et peuvent facilement être confondus par un opérateur inexpérimenté avec des sécrétions mucopurulentes. Lors d'atteinte plus avancée, les placards peuvent prendre un aspect grisâtre-noirâtre ou parfois verdâtre, forment une plaque irrégulière, bosselée et parfois duveteuse en surface (McCarthy et McDermaid, 1990 ; Forbes Lent et Hawkins, 1992 ; Noone, 2001). Occasionnellement, une lyse plus ou moins sévère de la cloison médiane du nez peut également être observée. Dans ce cas, une destruction des cornets nasaux controlatéraux en regard de cette communication peut également être présente.

Lors d'ANS débutante, les placards fongiques peuvent être confinés au niveau du sinus frontal et, si celui-ci n'est pas accessible par voie rhinoscopique en raison de l'absence de destruction suffisante des cornets nasaux et de l'ostium naso-frontal, le diagnos-



Figure 4

Image tomodensitométrique transverse des sinus frontaux d'un chien atteint d'aspergillose naso-sinusale. On observe des structures tissu mou oblitérant partiellement ou complètement le sinus frontal gauche (sécrétions mucopurulentes et/ou placards fongiques), de l'hyperostose de l'os frontal (flèches noires) et un épaississement de la muqueuse recouvrant l'intérieur du sinus (têtes de flèches blanches).



Figure 5

Vue endoscopique antérograde de la cavité nasale gauche d'un chien atteint d'aspergillose naso-sinusale. La cavité présente un aspect « cavaire » due à une destruction sévère des cornets nasaux. Caudo-dorsalement, on aperçoit l'ouverture vers le sinus frontal contenant des colonies fongiques (flèche). On peut également observer une lyse de la cloison médiane du nez (\*).

tic endoscopique d'ANS est compromis. Dans ces cas atypiques, il est proposé de réaliser un accès direct au sinus frontal par sinuscopie au travers d'un trou de trépanation pour observer d'éventuels placards fongiques dans le sinus (Johnson *et al.*, 2006). Ainsi lors d'une étude récente, des placards fongiques n'ont été observés par rhinoscopie au niveau des cavités nasales que dans 83% des chiens atteints d'ANS, les 17 % restants n'ayant pu être diagnostiqués que par sinusco-



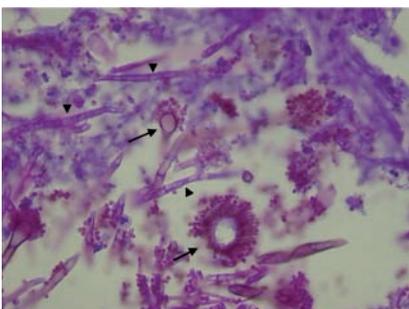
**Figure 6**

Vue endoscopique antérograde du sinus frontal d'un chien atteint d'aspergillose naso-sinusale. On observe la surface irrégulière et chevelue des grosses colonies d'*Aspergillus fumigatus*.



**Figure 7**

Étalement par écrasement d'une biopsie nasale d'une lésion suspecte prélevée sous endoscopie chez un chien atteint d'aspergillose naso-sinusale. On observe de larges hyphes septés à 45° (flèche) (May-Grünwald Giemsa, x 650).



**Figure 8**

Coupe histologique d'une biopsie nasale prélevée sous endoscopie chez un chien atteint d'aspergillose naso-sinusale. On observe des hyphes fongiques (têtes de flèches) ainsi que des têtes aspergillaires (flèches) au sein de matériel nécrotique à la surface de la muqueuse nasale (non-représentée sur la photo) (PAS, x 200) (avec l'autorisation des auteurs : Saunders et van Bree, 2003b)

pie (Johnson *et al.*, 2006). Cependant, un endoscope rigide était utilisé dans cette étude alors que, d'après notre expérience, l'accès au sinus frontal nécessite souvent un endoscope flexible, en particulier lors d'atteinte fongique restreinte au sinus frontal.

Une limite de l'endoscopie est son incapacité à évaluer les structures osseuses (Noone, 2001) dont l'intégrité de la lame criblée de l'ethmoïde séparant les cavités nasales du cerveau. L'évaluation de celle-ci est pourtant importante surtout lorsqu'un traitement topique (irrigation à l'énilconazole) est administré au cours de la même anesthésie. En effet, vu que la toxicité sur le système nerveux central des antifongiques utilisés localement est inconnue, leur utilisation en présence d'une lyse de la lame criblée pourrait entraîner une fuite d'antifongique vers la boîte crânienne. Une atteinte de la lame criblée de l'ethmoïde peut néanmoins être suspectée lorsqu'une lyse totale des cornets ethmoïdaux est observée par endoscopie. Dans ce cas, l'examen de son intégrité par imagerie en coupe devrait être réalisée avant le traitement topique (Mathews et Sharp, 2006).

Non seulement l'endoscope est la seule méthode permettant l'observation de placards fongiques mais c'est également le seul outil diagnostique permettant un prélèvement aisé d'échantillons représentatifs de l'affection nasale (McCarthy et McDermaid, 1990 ; Forbes Lent et Hawkins, 1992 ; Noone, 2001 ; Saunders *et al.*, 2004 ; Johnson *et al.*, 2006). De plus, dans le cas où l'infection est secondaire à un corps étranger nasal, l'endoscopie permet dans la majorité des cas non seulement la visualisation mais également le retrait de ce corps étranger. Par ailleurs, lorsque l'animal est traité par infusion locale d'une solution antifongique, l'endoscope flexible permet également le placement d'un cathéter dans le sinus frontal infecté afin d'administrer directement l'antifongique localement (McCullough *et al.*, 1998). Enfin, parmi tous les tests diagnostiques disponibles actuellement, seule l'endoscopie permet l'évaluation objective de la réponse au traitement (Saunders *et al.*, 2003a ; Pomrantz et Johnson, 2007 ; Schuller et Clercx, 2007).

## ANALYSES RÉALISÉES À PARTIR D'ÉCHANTILLONS OBTENUS DANS LES CAVITÉS

## NASALES

### 1) La culture fongique

La culture fongique est utile car c'est la seule méthode diagnostique, avec l'analyse ADN, capable d'identifier le champignon responsable de la rhinite fongique (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Scedosporium*...) (Mathews et Sharp, 2006). Il a été rapporté que la culture fongique d'échantillons nasaux manque de spécificité. En effet, Harvey et collaborateurs (1981) ont observé une culture positive d'*Aspergillus* et de *Penicillium* chez 27 % et 13 % de chiens sains, respectivement. Dans une autre étude, un résultat de culture positif pour *Aspergillus* ou *Penicillium* a été obtenu à partir de 30 à 40 % d'écouvillons nasaux prélevés chez des chiens atteints de tumeur nasale (Harvey et O'Brien, 1983). Cependant, ce manque de spécificité n'a pas été observé dans une étude récente (Pomrantz *et al.*, 2007). Il a également été rapporté que la sensibilité de la culture semble varier fortement en fonction du type d'échantillon nasal utilisé (Poli *et al.*, 1981 ; De Lorenzi *et al.*, 2006). En effet, la culture de sécrétions nasales provenant ou non d'écouvillons nasaux est peu sensible (9 % - 60 %) (Barrett *et al.*, 1977 ; Lane et Warnock, 1977 ; Poli *et al.*, 1981) en comparaison avec la culture de biopsie de muqueuse nasale ou de placard fongique (80 % - 100 %) (Sharp *et al.*, 1993 ; De Lorenzi *et al.*, 2006 ; Pomrantz *et al.*, 2007). Dans certains cas, enfin, une surcroissance bactérienne peut empêcher la croissance du champignon ce qui peut réduire la sensibilité de la culture (Harvey et O'Brien, 1983).

Par ailleurs, des études en médecine humaine ont démontré que le manque de sensibilité des cultures fongiques réalisées à partir d'échantillons des cavités nasales peut également être dû en partie à des techniques de laboratoire sub-optimales comme le choix du milieu de culture, de la température d'incubation ou encore le traitement préalable ou non des sécrétions nasales avec un agent mucolytique (Ponikau *et al.*, 1999 ; Buzina *et al.*, 2003 ; Tarrand *et al.*, 2005).

### 2) La cytologie

Le diagnostic cytologique d'ANS repose sur l'observation de filaments mycéliens septés et branchés à 45°

(figure 7). Dans de plus rares cas, des têtes aspergillaires et des conidiospores peuvent également être observées. Dans une étude récente, quatre techniques de prélèvements cytologiques chez des chiens atteints d'ANS ont été comparées (De Lorenzi *et al.*, 2006). L'examen cytologique d'un étalement du jetage nasal a permis d'observer des filaments fongiques dans 13 % des cas. L'étalement d'un écouvillon nasal prélevé à l'aveugle dans la cavité nasale a mis en évidence des filaments fongiques dans 20 % des cas. L'étalement de frottis-brosse de lésions suspectes, obtenus sous visualisation endoscopique, a permis d'identifier des filaments fongiques dans 93 % des cas. Enfin, l'étalement par écrasement de biopsies de lésions suspectes prélevées sous endoscopie a permis d'identifier des filaments fongiques dans 100 % des cas.

De Lorenzi et collaborateurs (2006) ont ainsi démontré que la cytologie pouvait être très utile pour diagnostiquer l'ANS chez le chien à condition d'être associée à une méthode d'échantillonnage invasive nécessitant un endoscope.

### 3) L'histologie

L'histopathologie est un examen couramment utilisé lors du diagnostic des maladies nasales chez le chien. Plusieurs techniques non chirurgicales de biopsies nasales existent mais seules deux d'entre-elles sont encore utilisées couramment ; la biopsie guidée par endoscopie et, lors de large masse nasale, la biopsie à l'aveugle (Doust et Sullivan, 2004). Dans la majorité des cas, le prélèvement de biopsies nasales est donc indissociable de la rhinoscopie. Forbes Lent et Hawkins (1992) ont ainsi démontré que ces examens couplés mènent à un diagnostic dans 83 % des cas de maladie nasale chez le chien. Lors d'ANS, le matériel prélevé influence indiscutablement le résultat histologique. En effet, si de la muqueuse nasale recouverte de champignon ou un placard fongique sont directement biopsiés, il sera hautement probable d'observer des éléments fongiques et de conclure histologiquement à une ANS. Par contre, si seule de la muqueuse nasale non recouverte de champignon est prélevée, des éléments fongiques ne sont que rarement observés (Peeters *et al.*, 2005 ; Johnson *et al.*, 2006). L'image histologique de la muqueuse nasale

dans les cas d'ANS chez le chien a été décrite récemment par Peeters et collaborateurs (2005). Lors de cette étude, de la muqueuse non recouverte de placard a été prélevée en partie distale de la cavité nasale atteinte. Dans la plupart des cas, l'histopathologie révélait une muqueuse ulcérée et une infiltration lymphoplasmocytaire sévère. Des filaments fongiques n'ont été observés que rarement au sein de tissu nécrotique superficiel (13 %) (figure 8) ou directement à la surface de la muqueuse nasale (27 %) mais en aucun cas dans ou sous la muqueuse nasale. L'ANS du chien pourrait être comparée à la rhinite fongique chronique érosive non-invasive décrite en médecine humaine (Peeters *et al.*, 2005). En l'absence d'élément fongique dans la biopsie, il est donc impossible de différencier un cas d'ANS d'une rhinite lymphoplasmocytaire sévère (Windsor *et al.*, 2004 ; Peeters *et al.*, 2005).

L'intérêt de l'histopathologie dans le diagnostic de l'ANS est donc limité vu sa très faible sensibilité lorsque de la muqueuse nasale est prélevée en l'absence de placard. La seule façon de valoriser l'histologie est de l'appliquer sur des biopsies de placard fongique ou de muqueuse nasale recouverte de champignon visualisés par rhinoscopie.

En conclusion, la rhinoscopie est un élément incontournable pour le diagnostic de l'ANS chez le chien. Par contre, mis à part l'imagerie en coupe, les autres méthodes diagnostiques actuellement disponibles (au vétérinaire généraliste) sont peu fiables. Néanmoins les performances diagnostiques de certaines d'entre-elles peuvent probablement encore être améliorées comme la sérologie ou la culture fongique. Par ailleurs, des analyses existantes telles que l'analyse d'ADN ou la recherche d'antigènes fongiques pourraient se voir appliquer sur des nouveaux types d'échantillons tels que des écouvillons nasaux ou des biopsies nasales comme en médecine humaine (Klont *et al.*, 2004 ; Polzehl *et al.*, 2005).

### **Update on the diagnosis of canine sino-nasal aspergillosis.**

#### **Summary**

Sino-nasal aspergillosis is one of the most common causes of nasal discharge in dogs. Confirmation of the diagnosis remains challenging since no single diagnostic method allows a diagnosis in all cases. Direct visualization of fungal plaques by endoscopy and/or the observation of fungal elements on culture or on cytological or histopathological examination from nasal specimens sampled under endoscopic guidance have become accepted as the gold standard for the diagnosis of canine sino-nasal aspergillosis. However, endoscopic equipment is not widely available in general veterinary practice. In consequence, veterinarians have to use other diagnostic tests to confirm their diagnosis. The present paper reviews currently available diagnostic methods for sino-nasal aspergillosis in dogs.

## REFERENCES

- AQUINO V.R., GOLDANI L.Z., PASQUALOTTO A.C. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia*, 2007, **163**, 191-202.
- ARCA-RUIBAL B., WERNERY U., ZACHARIAH R., BAILEY T.A., DI SOMMA A., SILVANOSE C., MCKINNEY P. Assessment of a commercial sandwich ELISA in the diagnosis of aspergillosis in falcons. *Vet. Rec.*, 2006, **158**, 442-444.
- BARRETT R.E., HOFFER R.E., SCHULTZ R.D. Treatment and immunological evaluation of three cases of canine aspergillosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 1977, **13**, 328-334.
- BRAKHAGE A.A., JAHN B., SCHMIDT A. Aspergillus fumigatus: biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. Karger : Basel, 1999, 221 p.
- BUZINA W., BRAUN H., FREUDENSCHUSS K., LACKNER A., HABERMANN W., STAMMBERGER H. Fungal biodiversity--as found in nasal mucus. *Med. Mycol.*, 2003, **41**, 149-161.
- CABANES F.J., ROURA X., GARCIA F., DOMINGO M., ABARCA M.L., PASTOR J. Nasal granuloma caused by *Scedosporium apiospermum* in a dog. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**, 2755-2758.
- CARO-VADILLO A., GARCIA-REAL I., PAYA-VICENS M.J., SAINZ-RODRIGUEZ A., RODRIGUEZ-FRANCO F., RODRIGUEZ-BERTOS A. Fungal rhinitis caused by *Scedosporium apiospermum* in a labrador retriever. *Vet. Rec.*, 2005, **157**, 175-177.
- CODNER E.C., LURUS A.G., MILLER J.B., GAVIN P.R., GALLINA A., BARBEE D.D. Comparison of computed tomography with radiography as a noninvasive diagnostic technique for chronic nasal disease in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1993, **202**, 1106-1110.
- COLEMAN M.G., ROBSON M.C. Nasal infection with *Scedosporium apiospermum* in a dog. *N. Z. Vet. J.*, 2005, **53**, 81-83.
- DE LORENZI D., BONFANTI U., MASSERDOTTI C., CALDIN M., FURLANELLO T. Diagnosis of canine nasal aspergillosis by cytological examination: a comparison of four different collection techniques. *J. Small Anim. Pract.*, 2006, **47**, 316-319.
- DOUST R., SULLIVAN M. Rhinoscopy and sampling from the nasal cavity. In : King L.G., Textbook of Respiratory Disease in Dogs and Cats. Saunders : St. Louis, 2004, 100-109.
- FORBES LENT S.E., HAWKINS E.C. Evaluation of rhinoscopy and rhinoscopy-assisted mucosal biopsy in diagnosis of nasal disease in dogs: 119 cases (1985-1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1992, **201**, 1425-1429.
- FORREST L.J. The head: excluding the brain and orbit. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, 1999, **14**, 170-176.
- GARCIA M.E., CABALLERO J., CRUZADO M., ANDRINO M., GONZALEZ-CABO J.F., BLANCO J.L. The value of the determination of anti-Aspergillus IgG in the serodiagnosis of canine aspergillosis: comparison with galactomannan detection. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2001, **48**, 743-750.
- GARCIA M.E., DURAN C., CRUZADO M., ANDRINO M., BLANCO J.L. Evaluation of molecular and immunological techniques for the diagnosis of mammary aspergillosis in ewes. *Vet. Microbiol.*, 2004, **98**, 17-21.
- GIBBS C., LANE J.G., DENNY H.R. Radiological features of intranasal lesions in the dog: a review of 100 cases. *J. Small Anim. Pract.*, 1979, **20**, 515-535.
- GUILLOT J., SARFATI J., DE BARROS M., CADORE J.L., JENSEN H.E., CHERMETTE R. Comparative study of serological tests for the diagnosis of equine aspergillosis. *Vet. Rec.*, 1999, **145**, 348-349.
- HARVEY C.E., BIERY D.N., MORELLO J., O'BRIEN J.A. Chronic nasal disease in the dog: its radiographic diagnosis. *Vet. Radiol.*, 1979, **20**, 91-98.
- HARVEY C.E., O'BRIEN J.A. Nasal aspergillosis-penicillosis. In : Bonagura J.D., Kirk's Current Veterinary Therapy VIII. W.B. Saunders : Philadelphia, 1983, 236-240.
- HARVEY C.E., O'BRIEN J.A., FELSBURG P.J., IZENBERG H.L., GOLDSCHMIDT M.H. Nasal penicilliosis in six dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1981, **178**, 1084-1087.
- HUSAIN S., KWAK E.J., OBMAN A., WAGENER M.M., KUSNE S., STOUT J.E., MCCURRY K.R., SINGH N. Prospective assessment of Platelia *Aspergillus* galactomannan antigen for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Am. J. Transplant.*, 2004, **4**, 796-802.
- JENSEN H.E., STYNEN D., SARFATI J., LATGE J.P. Detection of galactomannan and the 18 kDa antigen from *Aspergillus fumigatus* in serum and urine from cattle with systemic aspergillosis. *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B*, 1993, **40**, 397-408.
- JOHNSON E.G., WISNER E.R. Advances in respiratory imaging. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 2007, **37**, 879-900.
- JOHNSON L.R., DRAZENOVICH T.L., HERRERA M.A., WISNER E.R. Results of rhinoscopy alone or in conjunction with sinuscopy in dogs with aspergillosis: 46 cases (2001-2004). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2006, **228**, 738-742.
- KEDZIERSKA A., KOCHAN P., PIETRZYK A., KEDZIERSKA J. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnosics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1->3)-beta-D-glucan antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2007, **26**, 755-766.

- KHAN Z.U., RICHARDSON M.D., WARNOCK D.W., LANE J.G. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of *Aspergillus fumigatus* intranasal infection of the dog. *Sabouraudia*, 1984, **22**, 251-254.
- KLONTR R.R., MENNINK-KERSTEN M.A., VERWEIJ P.E. Utility of *Aspergillus* antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin. Infect. Dis.*, 2004, **39**, 1467-1474.
- KUBY J. Immunology. 3<sup>rd</sup> edition. Freeman : New York, 1997, 664 p.
- KURUP V.P., KUMAR A. Immunodiagnosis of aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1991, **4**, 439-456.
- KWAK E.J., HUSAIN S., OBMANA., MEINKE L., STOUT J., KUSNE S., WAGENER M.M., SINGH N. Efficacy of galactomannan antigen in the Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay for diagnosis of invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**, 435-438.
- LANE J.G., WARNOCK D.W. The diagnosis of *Aspergillus fumigatus* infection of the nasal chambers of the dog with particular reference to the value of the double diffusion test. *J. Small Anim. Pract.*, 1977, **18**, 169-177.
- LATGÉ J.P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, **12**, 310-350.
- LEFEBVRE J., KUEHN N.F., WORTINGER A. Computed tomography as an aid in the diagnosis of chronic nasal disease in dogs. *J. Small Anim. Pract.*, 2005, **46**, 280-285.
- MAERTENS J., THEUNISSEN K., LODEWYCK T., LAGROU K., ELDERE J.V. Advances in the serological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections in patients with haematological disorders. *Mycoses*, 2007, **50**, 2-17.
- MAERTENS J., VAN ELDERE J., VERHAEGEN J., VERBEKEN E., VERSCHAKELLEN J., BOOGAERTS M. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J. Infect. Dis.*, 2002, **186**, 1297-1306.
- MALIK R., DILL-MACKY E., MARTIN P., WIGNEY D.I., MUIR D.B., LOVE D.N. Cryptococcosis in dogs: a retrospective study of 20 consecutive cases. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1995, **33**, 291-297.
- MALIK R., MARTIN P., WIGNEY D.I., CHURCH D.B., BRADLEY W., BELLENGER C.R., LAMB W.A., BARRS V.R., FOSTER S., HEMSLEY S., CANFIELD P.J., LOVE D.N. Nasopharyngeal cryptococcosis. *Aust. Vet. J.*, 1997, **75**, 483-488.
- MASCHMEYER G., HAAS A., CORNELLY O.A. Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. *Drugs*, 2007, **67**, 1567-1601.
- MATHEWS K.G., SHARP N.J.H. Canine nasal aspergillosis-penicilliosis. In : Green C.E., Infectious Diseases of the Dog and Cat. Saunders : St. Louis, 2006, 613-620.
- MCCARTHY T.C., MCDERMAID S.L. Rhinoscopy. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 1990, **20**, 1265-1290.
- MCCULLOUGH S.M., MCKIERNAN B.C., GRODSKY B.S. Endoscopically placed tubes for administration of enilconazole for treatment of nasal aspergillosis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1998, **212**, 67-69.
- MENNINK-KERSTEN M.A., RUEGEBRINK D., KLONTR R.R., WARRIS A., BLIJLEVENS N.M., DONNELLY J.P., VERWEIJ P.E. Improved detection of circulating *Aspergillus* antigen by use of a modified pretreatment procedure. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, **46**, 1391-1397.
- NOONE K.E. Rhinoscopy, pharyngoscopy, and laryngoscopy. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 2001, **31**, 671-689.
- OUCHTERLONY O. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1949, **26**, 507-515.
- PARK R.D., BECK E.R., LECOUTEUR R.A. Comparison of computed tomography and radiography for detecting changes induced by malignant nasal neoplasia in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1992, **201**, 1720-1724.
- PEETERS D., CLERCX C. Update on canine sinonasal aspergillosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 2007, **37**, 901-916, vi.
- PEETERS D., DAY M.J., CLERCX C. An immunohistochemical study of canine nasal aspergillosis. *J. Comp. Pathol.*, 2005, **132**, 283-288.
- PEETERS D., PETERS I.R., HELPS C.R., DEHARD S., DAY M.J., CLERCX C. Whole blood and tissue fungal DNA quantification in the diagnosis of canine sinonasal aspergillosis. *Vet. Microbiol.*, 2007, **128**, 194-203.
- PETITE A.F., DENNIS R. Comparison of radiography and magnetic resonance imaging for evaluating the extent of nasal neoplasia in dogs. *J. Small Anim. Pract.*, 2006, **47**, 529-536.
- POLI G., PONTI W., BALSARI A., ADDIS F., MORTELLARO C.M. *Aspergillus fumigatus* and specific precipitins in dogs with turbinate changes. *Vet. Rec.*, 1981, **108**, 143-145.
- POLZEHL D., WESCHTA M., PODBIELSKI A., RIECHELMANN H., RIMEK D. Fungus culture and PCR in nasal lavage samples of patients with chronic rhinosinusitis. *J. Med. Microbiol.*, 2005, **54**, 31-37.
- POMRANTZ J.S., JOHNSON L.R. Update on the efficacy of topical clotrimazole in the treatment of canine nasal aspergillosis. *J. Vet. Intern. Med.*, 2007, **21**, 608-608.
- POMRANTZ J.S., JOHNSON L.R., NELSON R.W., WISNER E.R. Comparison of serologic evaluation via agar gel immunodiffusion and fungal culture of tissue for diagnosis of nasal aspergillosis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2007, **230**, 1319-1323.
- PONIKAU J.U., SHERRIS D.A., KERN E.B., HOMBURGER H.A., FRIGAS E., GAFFEY T.A., ROBERTS G.D. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin. Proc.*, 1999, **74**, 877-884.

- RICHARDSON M.D., WARNOCK D.W. Antigen selection for optimal serological diagnosis of *Aspergillus fumigatus* infection of the nasal chambers of the dog. *Vet. Rec.*, 1984, **114**, 354-355.
- RICHARDSON M.D., WARNOCK D.W., BOVEY S.E., LANE J.G. Rapid serological diagnosis of *Aspergillus fumigatus* infection of the frontal sinuses and nasal chambers of the dog. *Res. Vet. Sci.*, 1982, **33**, 167-169.
- SAUNDERS J.H., ZONDERLAND J.L., CLERCX C., GIELEN I., SNAPS F.R., SULLIVAN M., VANBREE H., DONDELINGER R.F. Computed tomographic findings in 35 dogs with nasal aspergillosis. *Vet. Radiol. Ultrasound*, 2002, **43**, 5-9.
- SAUNDERS J.H., DUCHATEAU L., STORK C., VAN BREE H. Use of computed tomography to predict the outcome of a noninvasive intranasal infusion in dogs with nasal aspergillosis. *Can. Vet. J.*, 2003, **44**, 305-311.
- SAUNDERS J.H., VAN BREE H. Comparison of radiography and computed tomography for the diagnosis of canine nasal aspergillosis. *Vet. Radiol. Ultrasound*, 2003a, **44**, 414-419.
- SAUNDERS J.H., VAN BREE H. Diagnosis of nasal aspergillosis in the dog. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.*, 2003b, **72**, 399-408.
- SAUNDERS J.H., CLERCX C., SNAPS F.R., SULLIVAN M., DUCHATEAU L., VAN BREE H.J., DONDELINGER R.E. Radiographic, magnetic resonance imaging, computed tomographic, and rhinoscopic features of nasal aspergillosis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2004, **225**, 1703-1712.
- SCHULLER S., CLERCX C. Long-term outcomes in dogs with sinonasal aspergillosis treated with intranasal infusions of enilconazole. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 2007, **43**, 33-38.
- SCHWARZ T., SULLIVAN M., HARTUNG K. Radiographic detection of defects of the nasal boundaries. *Vet. Radiol. Ultrasound*, 2000, **41**, 226-230.
- SHARP N.J., BURRELL M.H., SULLIVAN M., CERVANTES-OLIVARES R.A. Canine nasal aspergillosis: serology and treatment with ketoconazole. *J. Small Anim. Pract.*, 1984, **25**, 149-158.
- SHARP N.J., SULLIVAN M., HARVEY C.E., WEBB T. Treatment of canine nasal aspergillosis with enilconazole. *J. Vet. Intern. Med.*, 1993, **7**, 40-43.
- SHARP N.J.H. Aspergillosis and Penicilliosis. In : Green C.E., Infectious Diseases of the Dog and Cat. Saunders : Philadelphia, 1998, 404-413.
- SHARP N.J.H., HARVEY C.E., SULLIVAN M. Canine nasal aspergillosis and penicilliosis. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, 1991, **13**, 41-47.
- SULLIVAN M., LEE R., JAKOVLJEVIC S., SHARP N.J.H. The radiological features of aspergillosis of the nasal cavity and frontal sinuses in the dog. *J. Small Anim. Pract.*, 1986, **27**, 167-180.
- TARRAND J.J., HAN X.Y., KONTOYIANNIS D.P., MAY G.S. Aspergillus hyphae in infected tissue: evidence of physiologic adaptation and effect on culture recovery. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, **43**, 382-386.
- WINDSOR R.C., JOHNSON L.R., HERRGESELL E.J., DE COCK H.E. Idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis in dogs: 37 cases (1997-2002). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2004, **224**, 1952-1957.
- WINDSOR R.C., JOHNSON L.R., SYKES J.E., DRAZENOVICH T.L., LEUTENEGGER C.M., DE COCK H.E. Molecular detection of microbes in nasal tissue of dogs with idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis. *J. Vet. Intern. Med.*, 2006, **20**, 250-256.