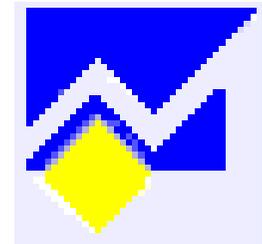


# A-t-on besoin de la biologie moléculaire en mycologie hospitalière?

Stéphane Bretagne  
Hôpital Henri Mondor, Créteil  
CNR Mycologie Antifongiques,  
Institut Pasteur, Paris



# Questions

- Diagnostic positif
- Génotypage
- Identification
- Aspergilloses invasives
- Candidoses invasives
- « Emergents »

*Diagnostic positif*

# Diagnostic microbiologique des infections fongiques

- ❑ Peu sensibles (< 50%)
- ❑ Interprétation?
  - ❑ Véritable infection?
  - ❑ Colonisation?
  - ❑ Contamination?
- ❑ Tardif
  - ❑ Mortalité de l'aspergillose invasive : 70-90%
  - ❑ Mortalité des candidémies : 50 %
- ❑ Une solution: la PCR
  - ❑ LBA
  - ❑ sérum

# PCR Aspergillus LBA

- ❑ Jusqu'à 35% de PCR+ (Spreadbury C. JCM 1993; Tang CM, Am Rev Resp Dis 1993; Verweij P. JCM 1994; Bretagne S. JCM 1995, Skladny R. JCM 1999 ...)
  - ❑ Confirmation de cultures positives
  - ❑ Conidies en transit? Colonisation? Infection?
- ❑ 5% de PCR + (Einsele H. Lancet 1998)
  - ❑ 134 patients sous flux, LBA avant greffe
  - ❑ 7/134 PCR+
  - ❑ 5 des 7 PCR+ développent une aspergillose
  - ❑ 3 des PCR- développent une aspergillose

# *PCR sérum*

- ❑ Hebart et al JID 2000
  - ❑ 84 patients greffés de moelle sous flux
  - ❑ 169/1193 PCR +
  - ❑ 37,5% (30/84) patients PCR+ avant J40 et 40% (12/30) après J40
  - ❑ 7 aspergilloses prouvées
  - ❑ Sensibilité: 100%
  - ❑ Spécificité: 65%
  - ❑ VPP: 15,2%
  - ❑ VPN: 100%

# Comment expliquer ces résultats?

- ❑ Faux + et faux -
  - ❑ Manque de standardisation
    - ❑ Pas d'intérêt commercial
    - ❑ Méthodes artisanales
- ❑ Différences dues:
  - ❑ A la méthode employée ?
  - ❑ Aux populations testées ?

# Comment expliquer ces résultats divergents ?

- ❑ Germes de l'environnement
  - ❑ On trouve de l'ADN fongique partout
  - ❑ Stratégie
    - ❑ Panfongus ?
    - ❑ Ciblé sur des germes d'intérêt ?

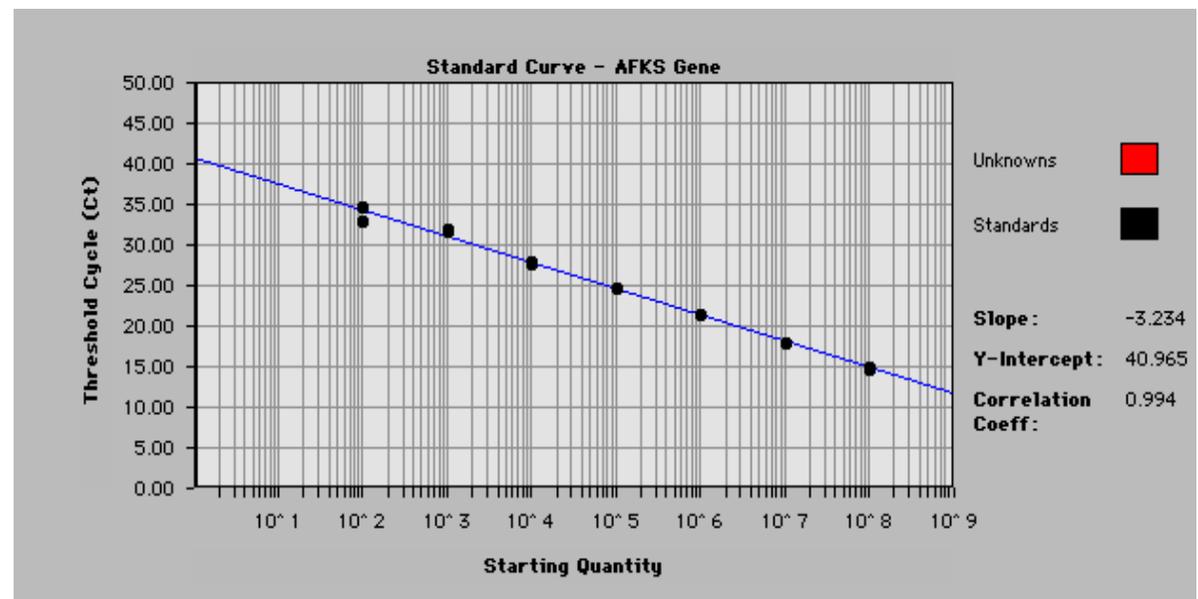
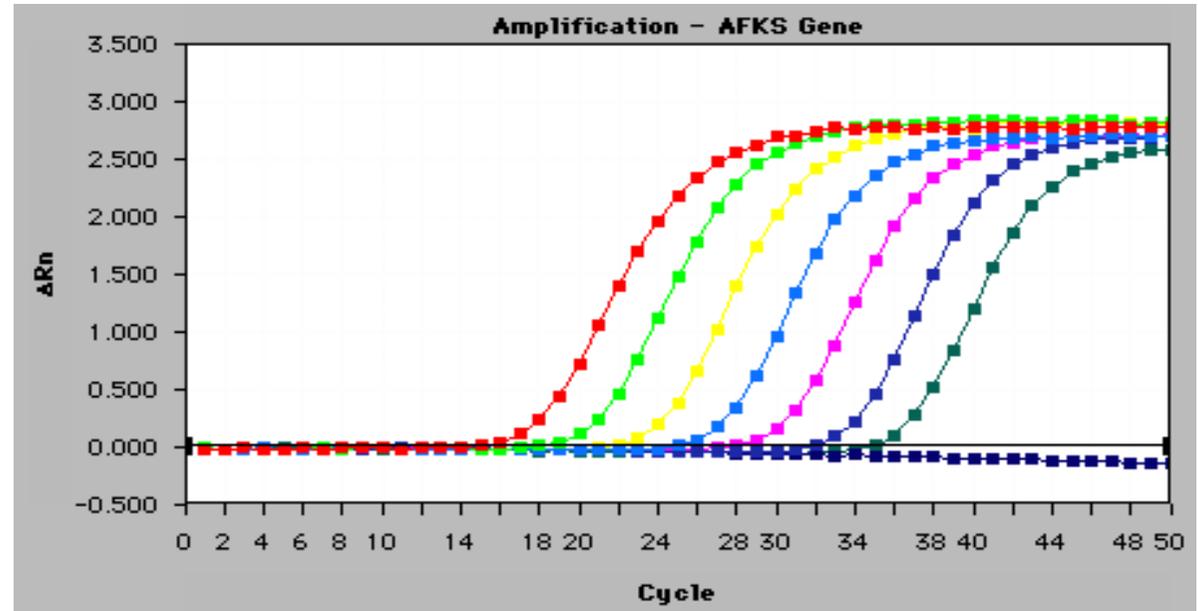
# Comment avancer?

- ❑ Standardiser les méthodes de PCR
- ❑ Associer plusieurs tests de finalités différentes
  - ❑ Comparaison Ag-ADN
- ❑ Recherche d'ARN

# Standardisation des techniques

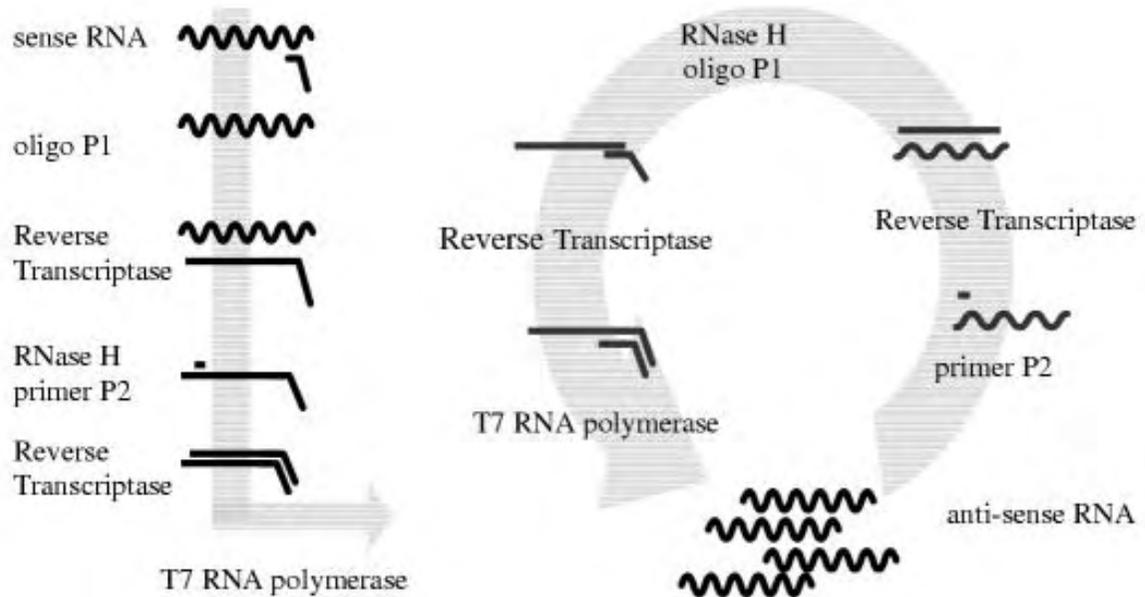
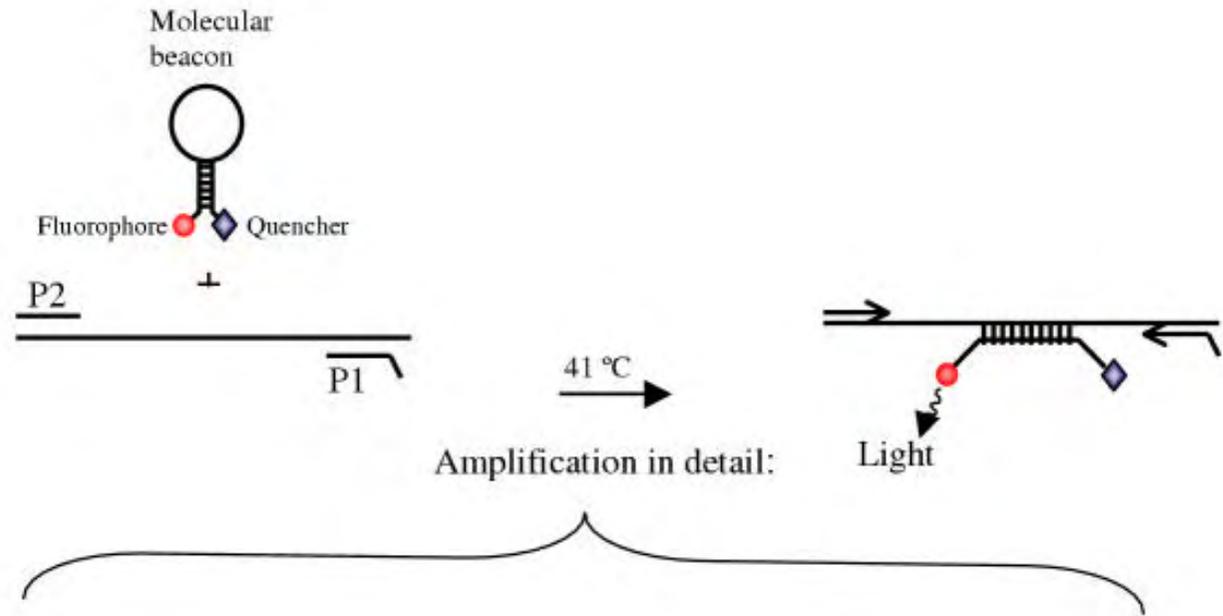
- PCR en temps réel
  - Sondes d'hydrolyse « Taqman »
  - Sondes d'hybridation « FRET »
- NASBA
  - ARN
  - ADN

PCR en temps réel  
- Prévention des  
contaminations -



# NASBA

- détection  
d'ARN -



# Comparaison de différents tests

- ❑ PCR quantitative vs GM vs  $\beta$ -D-Glucan
- ❑ Criblage hebdomadaire des sérums
- ❑ 149 épisodes, 96 patients d'hématologie
- ❑ 9 prouvées, 2 probables, 13 possibles  
(critères EORTC)

# Comparaison des différents tests

---

méthode	sensibilité	spécificité	PPV	NPV
GM	1,00	0,93	0,55	1,00
qPCR	0,55	0,93	0,40	0,96
$\beta$ -D-Glucan	0,55	0,93	0,40	0,96

---

# NASBA + GM

- 448 sérums de 128 patients
- 14 patients avec IA (2 prouvées, 12 probables)
  - Sensibilité (NASBA >5 + GM > 0,5) = 100%
  - Valeur pronostique des index NASBA
- Pb: ARNs extraits de tube EDTA

## *Seuil détection PCR Candida*

Cible ARNr	détection	Sensibilité CFU/ml	référence
5S	Br. éthidium	15	Holmes, JCM 94
5,8S	EIA	10	Fujita, JCM 95
18S	Southern-blot	100-150	van Deventer, JCM 95
18S	Southern-blot	10-100	Polanco, EJCMID 95
18S	ELISA	10	Loffler, Med Mycol, 98

# PCR Candida

- ❑ Difficultés à concurrencer les automates à hémocultures
- ❑ Détection d'ADN répété potentiellement plus sensible que les hémocultures mais signification?

# Diagnostic

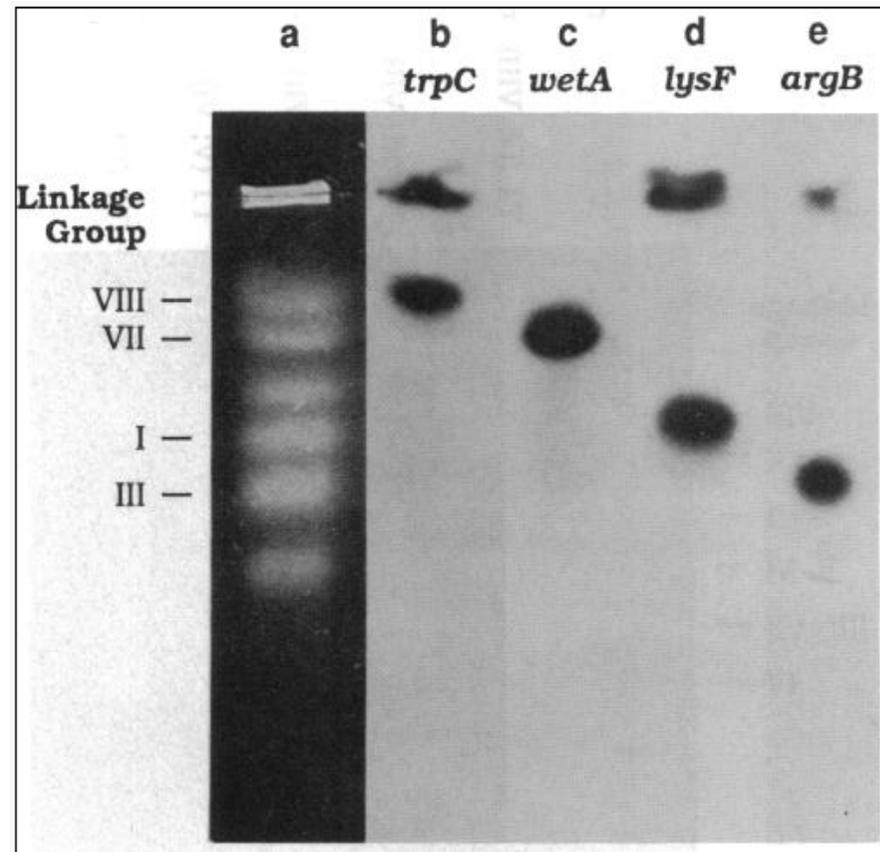
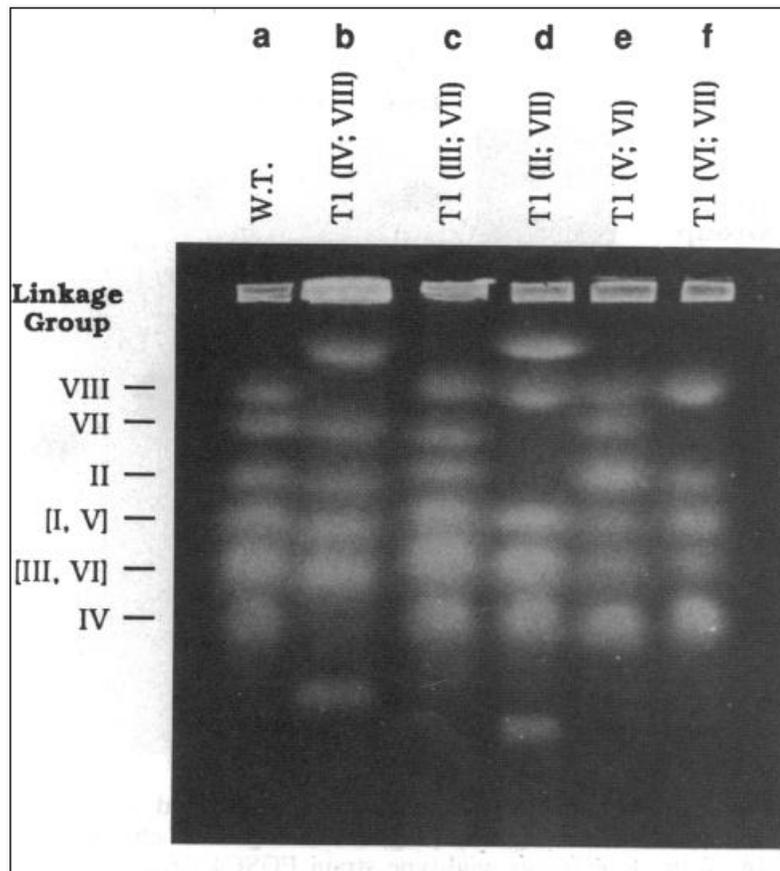
- ❑ Standardisation des méthodes de détection
- ❑ Standardisation des méthodes d'extraction
- ❑ Association de tests de finalité différente

# *Typage moléculaire*

# Pourquoi disposer d'un système de génotypage?

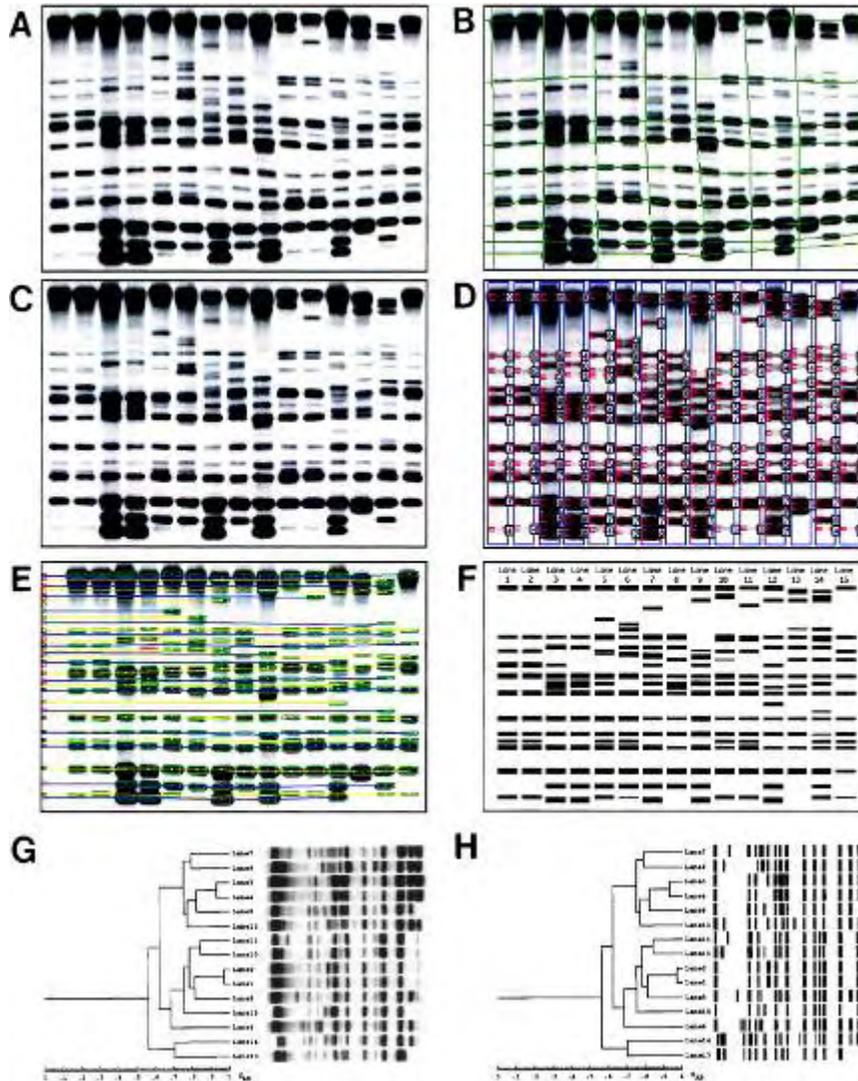
- ❑ Génétique
  - ❑ Populations
  - ❑ Reproduction clonale
  - ❑ Sexualité
- ❑ Epidémiologie clinique
  - ❑ Transmission nosocomiale
  - ❑ Investigation d'épidémies
  - ❑ Isolats pathogènes versus non pathogènes
  - ❑ Correspondance génotype-phénotype (résistance aux antifongiques, variation des génotypes sous pression médicamenteuses)
  - ❑ Physiopathologie d'une infection (même isolat ou contamination avec un nouveau)
  - ❑ ...

# Caryotype *A. nidulans*



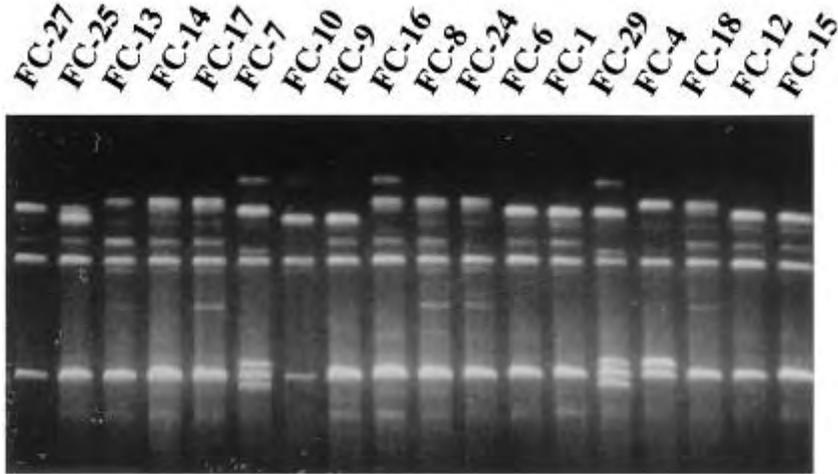
H. Brody, PNAS 1989

# RFLP + hybridation: différentes étapes pour informatiser les données expérimentales

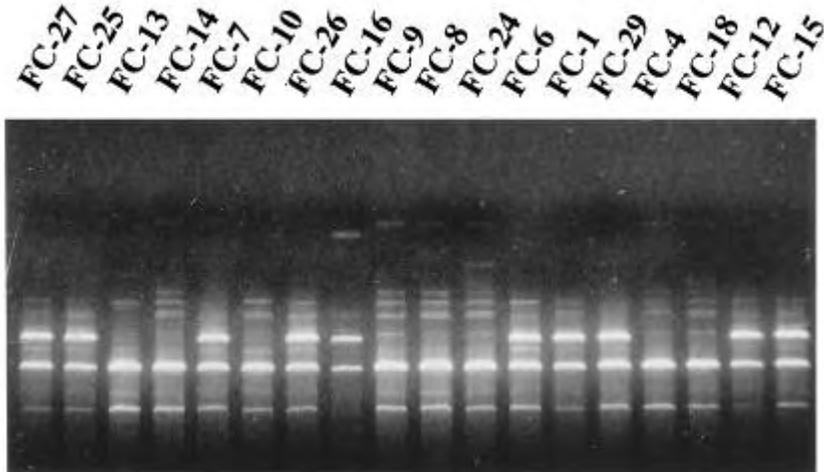


# RAPD *C. albicans*

## A. OPE-03



## B. OPE-18





# Microsatellites

- ❑ Short tandem repeats: motifs de 2-6 nucléotides
- ❑ Polymorphes et nombreux (*Weber, Genomics 1990*)
- ❑ Présents chez les eucaryotes inférieurs, e.g. *Candida albicans* (*Field et al., FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996; Bretagne et al., Clin. Microbiol. 1997*) et *Aspergillus fumigatus*
- ❑ Analyse par PCR et séquenceur automatique

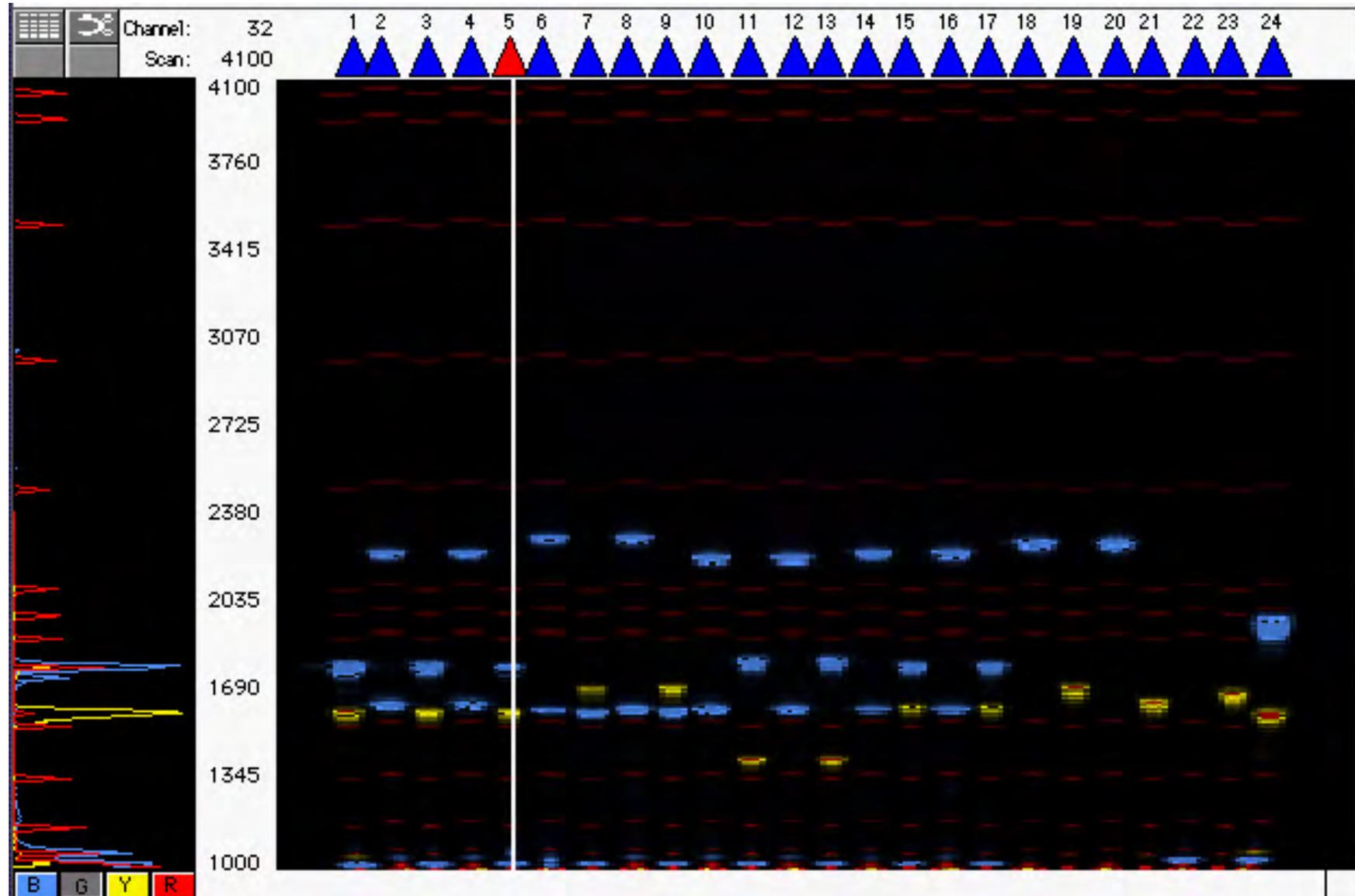
# Microsatellite parfait

Figure 1

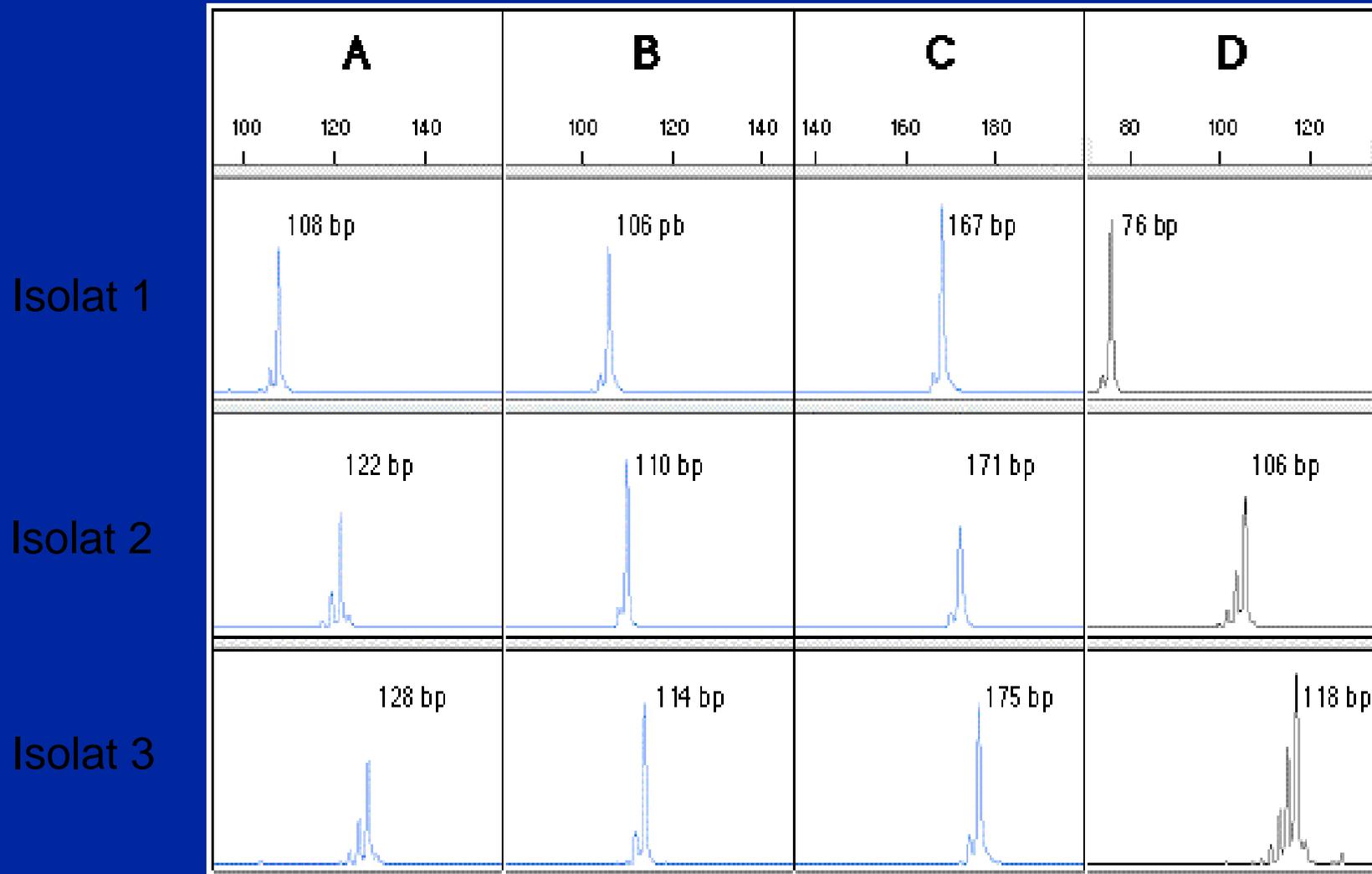
Allele 1 (122bp)	-----TTAGCATTAGCATTAGC [ACAAGC] <b>4</b> TTTATAA-----
Allele 2 (128bp)	-----TTAGCATTAGCATTAGC [ACAAGC] <b>5</b> TTTATAA-----
Allele 3 (134bp)	-----TTAGCATTAGCATTAGC [ACAAGC] <b>6</b> TTTATAA-----
Allele 4 (140bp)	-----TTAGCATTAGCATTAGC [ACAAGC] <b>7</b> TTTATAA-----
Allele 5 (146bp)	-----TTAGCATTAGCATTAGC [ACAAGC] <b>8</b> TTTATAA-----

Gène RPM2 *C. glabrata* (F. Foulet, JCM accepté)

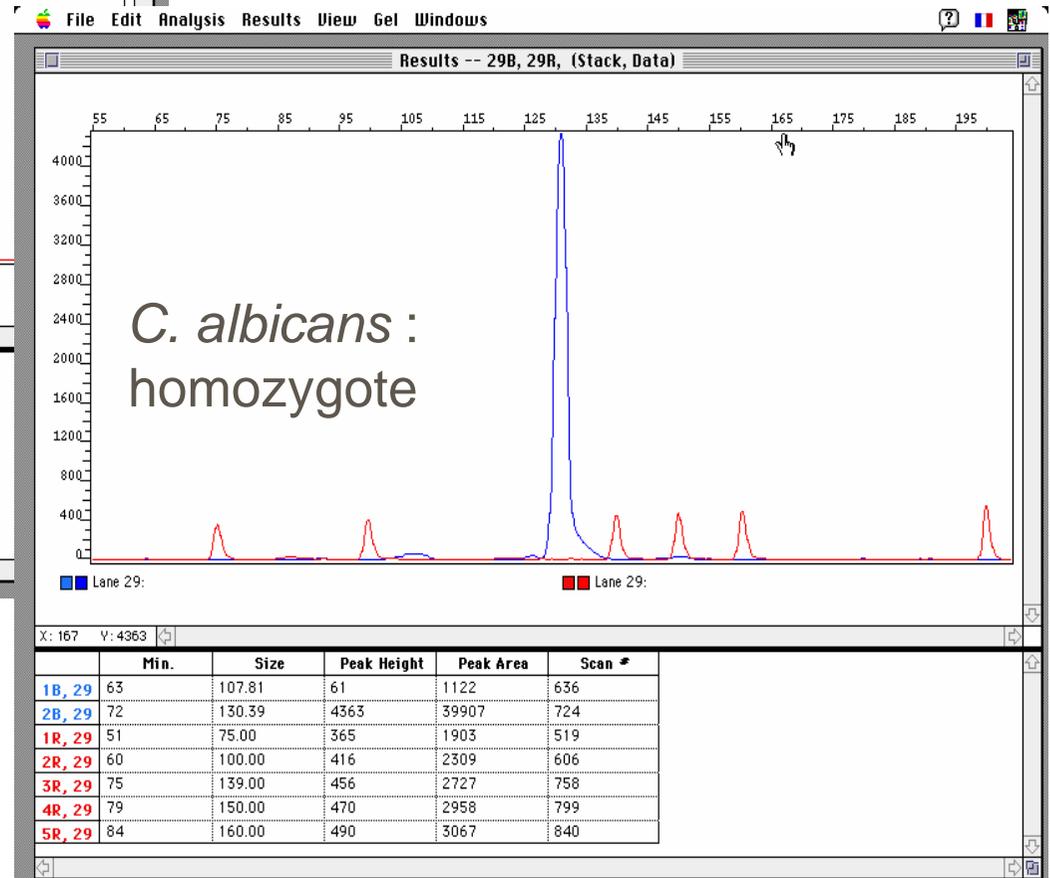
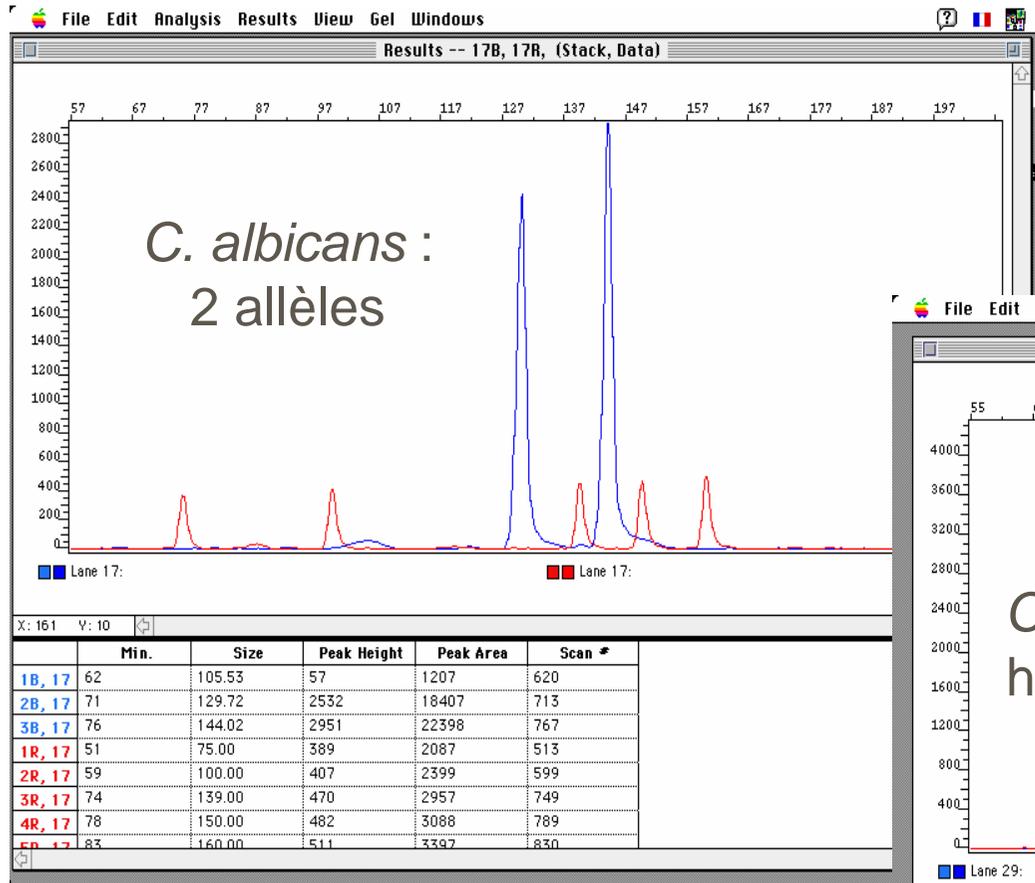
# Microsatellite: analyse des produits de PCR d'*A. fumigatus*



# Analyse des microsatellites d'isolats d'*Aspergillus fumigatus*

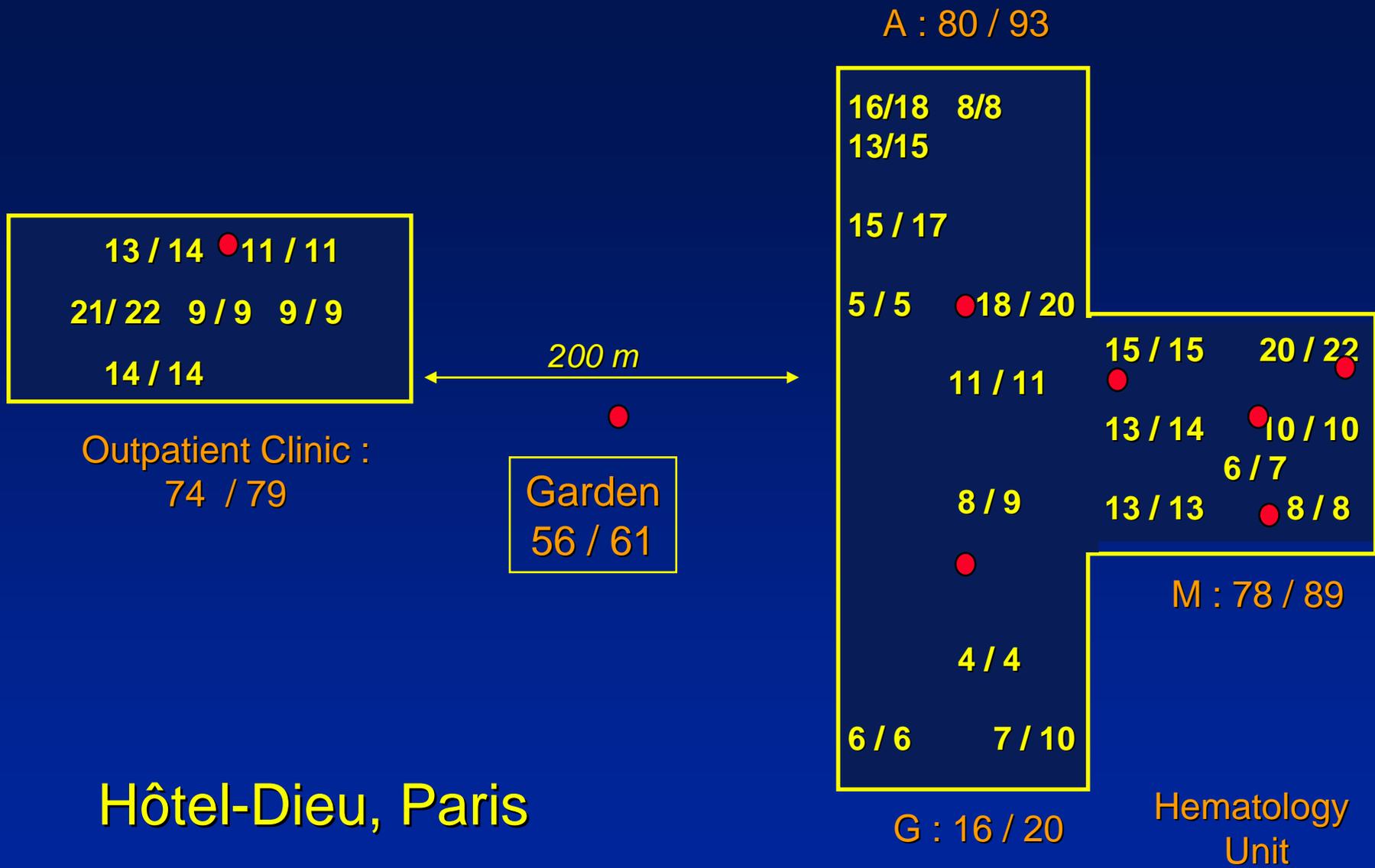


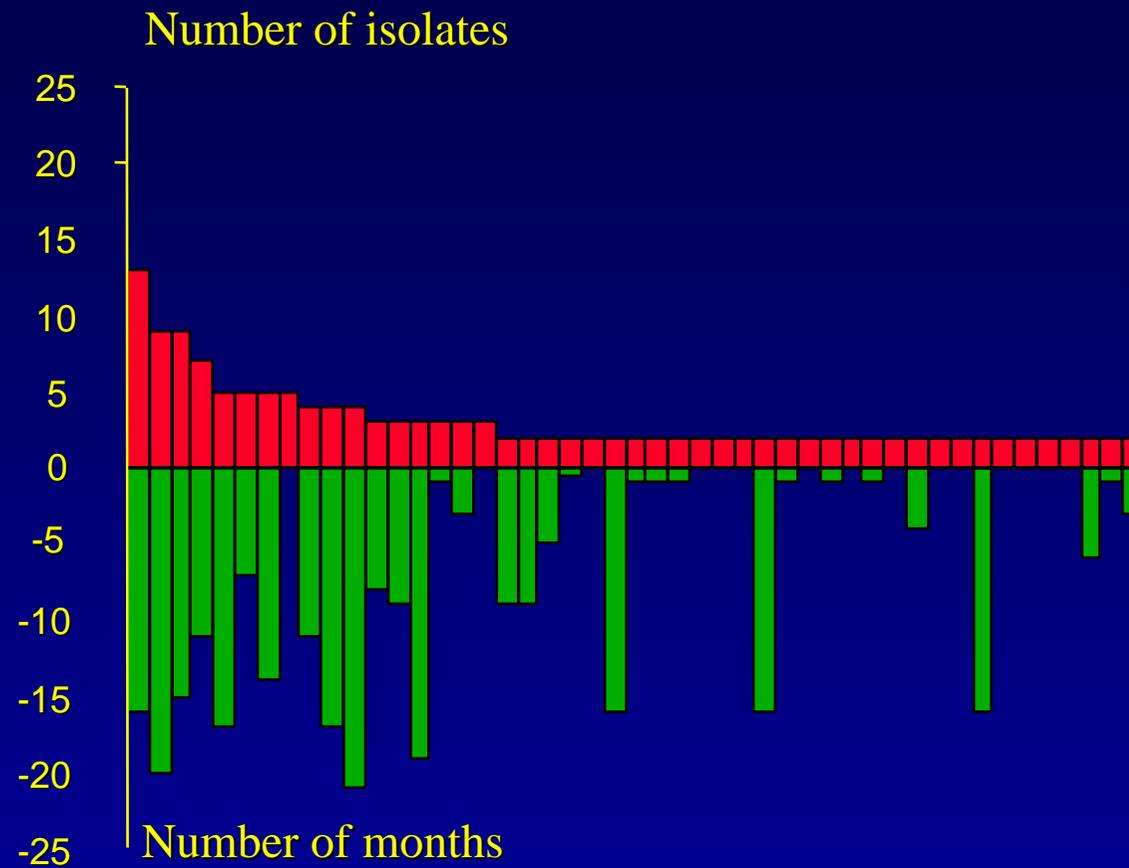
# Microsatellite: analyse des produits de PCR de *C. albicans*

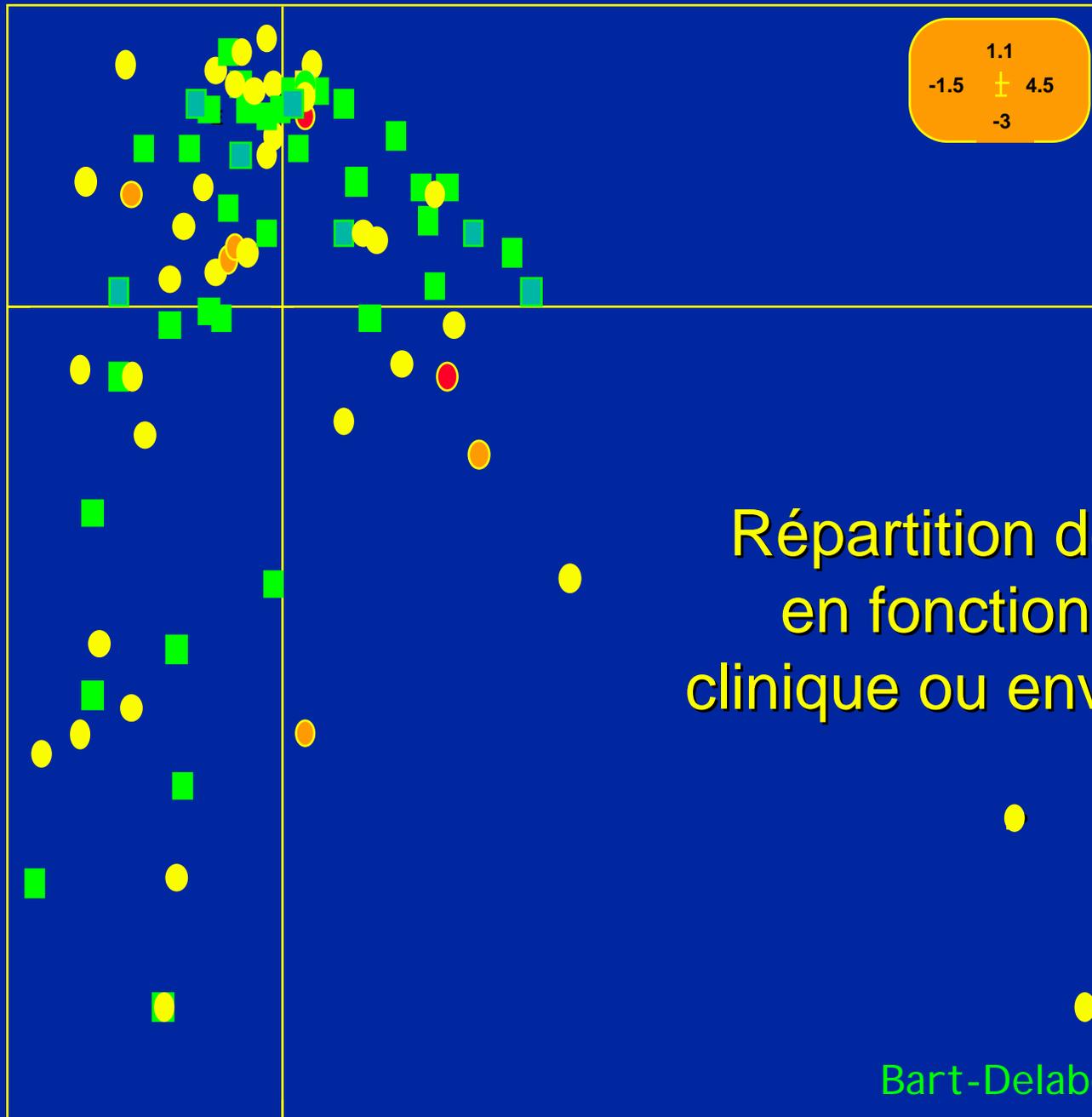


# Applications du génotypage:

- ❑ Question: Infection nosocomiale ou non?
- ❑ Deux exemples
  - ❑ *Aspergillus fumigatus*
  - ❑ *Candida albicans*





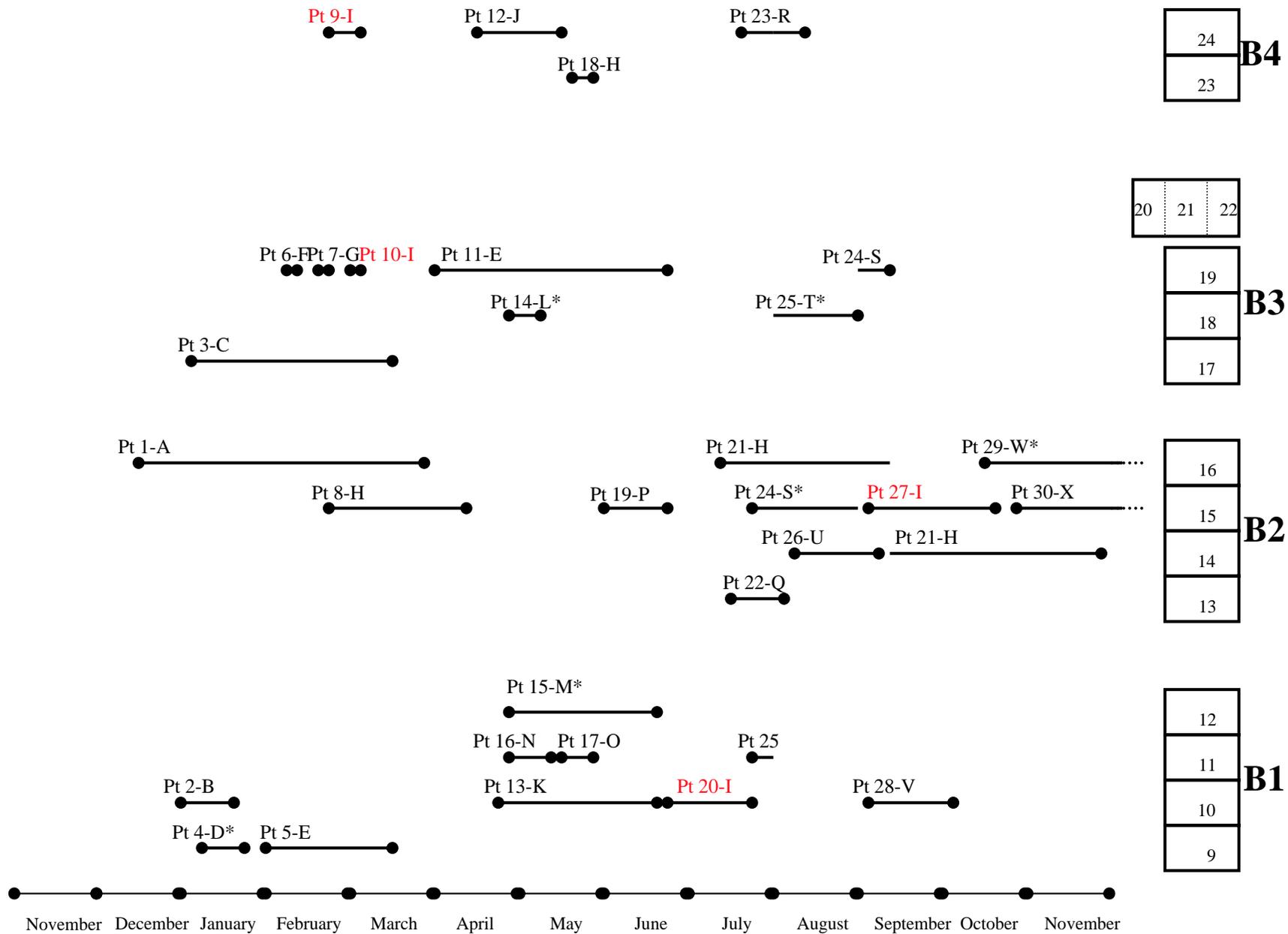


### Isolates

- 1 environmental
- ≥ 2 environmental
- 1 clinical
- ≥ 2 clinical
- ref. strain

Répartition des génotypes  
 en fonction de l'origine  
 clinique ou environnementale

Bart-Delabesse et al, JCM 1998



# Conclusion génotypage

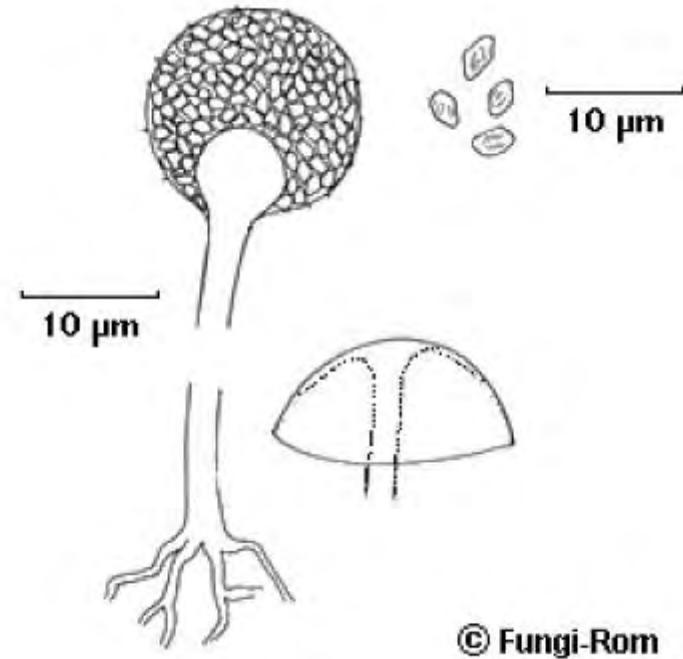
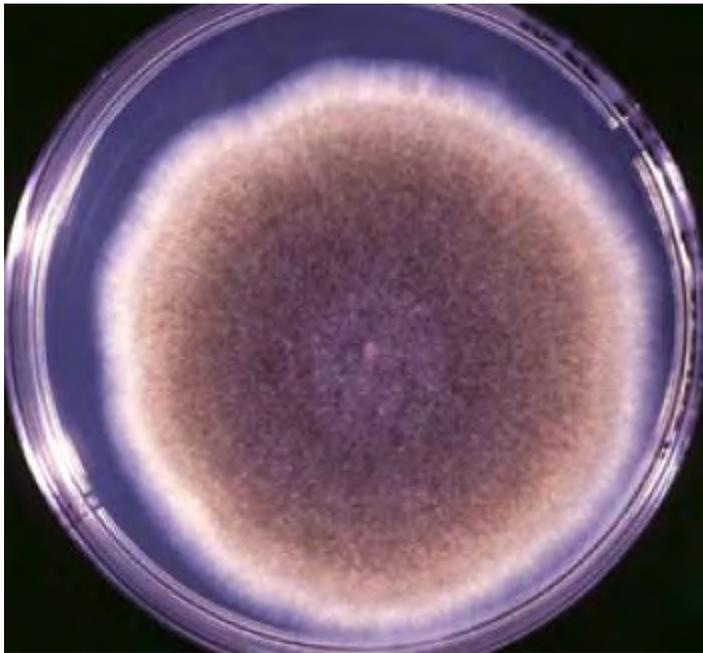
- ❑ Nombreuses techniques possibles
- ❑ Définir sa question
- ❑ Une technique donnée ne répondra pas à toutes les questions

*Identification*

# Filaments dans une biopsie ?



# Diagnostic des mucormycoses



# Identification

- ❑ Cultures difficiles de certains champignons
- ❑ Extraction d'ADN de biopsies
- ❑ Amplification, séquençage
- ❑ Comparaison aux banques de données

# A-t-on besoin de la biologie moléculaire en mycologie hospitalière?

OUI

Domaine en plein développement  
Intérêt certain pour une meilleure  
prise en charge des patients

