

Diagnostic des Infections Fongiques Invasives (IFI)

**Dr B Lebeau
Laboratoire de Parasitologie-Mycologie
CHU GRENOBLE
Janvier 2011**

**Infections fongiques invasives (IFI) :
grande hétérogénéité**

Agents fongiques nombreux ...

Levures

- *Candida* sp, *Trichosporon* sp,
- *Saccharomyces* sp, *Malassezia* sp
- *Cryptococcus neoformans*

Champignons filamenteux

- *Aspergillus* sp
- Mucorales
- *Fusarium* sp, *Scedosporium* sp

Patients à risque variés ...

- **Immunodépression différente suivant IFI :
PNN, lymphocytes**
- **Sans immunodépression mais agression**

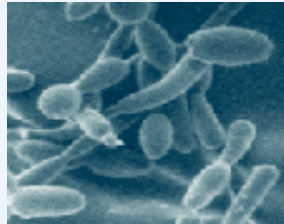
Diagnostic pluriel ...

Terrain

recherche directe
du champignon

à visée Δg

suivi
colonisation



immunologie

Ag

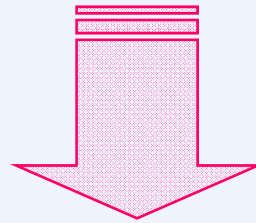
Ac

PCR

Points importants du Dg des IFI

- Les IFI de Dg « spécifique »
- L'apport de l'examen direct
- L'hémoculture
- Réanimation et colonisation candidosique
- La signification du Dg sérologique candidosique
- La signification des marqueurs fongiques : GM, BG
- Le diagnostic moléculaire aujourd'hui

Diagnostic sensible et spécifique ??



Cryptococcose
Pneumocystose

Cryptococcose



1. Ex direct + culture : \neq 100%

2. Ag circulants :

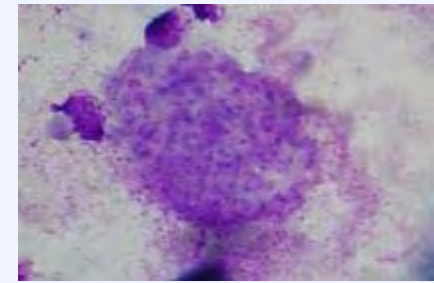
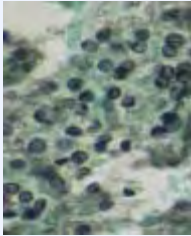
- ☛ Ag polysaccharidique de capsule : tests latex ou ELISA
- ☛ Sensibilité : LCR \neq 100% sérum \neq 50%
- ☛ Spécificité \neq 100%
- ☛ Suivi thérapeutique : meilleur corrélation chez non sidéen



Tests au latex	1.Cryptococcal Ag LA system 2.Murex <i>Cryptococcus</i> test 3.Crypto LA tests	Meridian Remel, KS Wampole lab.	Faux + (facteur rhumatoïde) RC avec <i>Trichosporon sp</i>
ELISA	1.PREMIER Cryptococcal EIA AG	Meridian	

Pneumocystose

1) Ex direct sur LBA (\pm BA) sur coloration (Musto, RAL) ou par IF directe : *Pneumocystis jirovecii*



Stain	No. of positive slides	Total no. of slides examined	SEN (%)	SPEC (%)	PPV (%)	NPV (%)
Calcofluor	48	308	73.8	99.6	98.0	93.4
Merifluor (IF)	59	310	90.8	94.7	81.9	97.5
Giemsa	31	307	48.4	99.6	96.9	88.0
Grocott modifié	50	310	76.9	99.2	96.2	94.2

CHU
Grenoble

LAU, *future Microbiol*, 2009

2) PCR : indications limitées +++

PROCOP, *J Clin Microbiol*, 2004

- Terrain +++
- Suspicion Rx clinique +++
- ED négatif (faible charge parasitaire à l'ED chez non VIH)
- LBA uniquement

ROBBERTS, *Diagn Microbiol Inf Dis*, 2007

GUPTA, *India J Chest Allied Sci*, 2008

PCR Pneumocystose

Table 4B. Diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*.

Study (year), Ref.	Clinical specimen ¹	Study design ²	Extraction (kit or fungal cell wall lysis)	Extraction (DNA purification)	PCR format	PCR target gene	n ³	Prv ⁴ (%)	Sens-itivity ⁵	Spec-ificity ⁶	PPV ⁷	NPV ⁸
Sing (2000) [49]	BAL/pellet	Prospective/blinded	Proteinase K, Qiagen Tissue kit (Qiagen, Germany)		End point (single) End point (nested)	<i>LSU mt rRNA</i> ¹¹	334	7.8	100 ²² 100	100 97.5	96 96	100 100
Torres (2000) [50]	BAL and lung biopsies	Prospective/blinded	X		End point (nested)	<i>ITS</i>	47	38.3	72.2 ²³	100	81.8	100
Fischer (2001) [58]	Oral washes/pellet	Prospective/blinded	Insta Gene Matrix (Bio-rad) and NucliSens kit (Organon Teknika, Ireland)		End point	<i>MSG</i> ¹⁴ <i>LSU mt rRNA</i>	175	18.3	91 75	94 96	76 80	98 94
Olsson (2001) [51]	BAL and sputum	Retrospective	Wizard DNA Clean-up (Promega, WI, USA)		End point (nested)	<i>mt LSU rRNA</i>	91	27.5	96	59	48	97
Flori (2004) [52]	BAL/pellet	X	QIAamp DNA minikit (Qiagen)		End point Real-time	<i>LSU mt rRNA</i> <i>MSG</i>	150	7.3	100 100	87 98.6	X X	X X
Pinlaor (2004) [53]	BAL/pellet Sputum/pellet	X	Proteinase K	Phenol-chloroform	End point	<i>SS rRNA</i>	21 139	57.1 42.2	100 84.6	90 98.4	91.7 84.6	100 98.4
Larsen (2004) [59]	Oral washes/pellet	Prospective/blinded	NucliSens kit (Organon Teknika)		Quantitative touch-down	<i>MSG</i>	113	82.3	88	85	X ²⁴	X ²⁴
Nyamande (2005) [60]	Oropharyngeal washings	Prospective	Anionic surfactant, proteinase K	Phenol-chloroform, alcohol precipitation	Phenol-chloroform, alcohol precipitation	<i>mt LSU rRNA</i>	35 ^{25a} 48 ^{25b}	45.7 72.9	44 40	79 77	64 82	63 32
Bandt (2007) [56]	BAL/whole	Retrospective	QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) ^{27a} and QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) ^{27b}		Real-time quantitative	<i>5.8S rRNA</i> <i>DHFR2</i> ¹⁶	88	31.8	79 82	100 97	X X	X X
Nuchprayoon (2007) [57]	BAL/pellet Sputum/pellet	X	FTA-filter paper-based DNA extraction (Whatman Bioscience, Kent, UK)		End point	<i>mt SS rRNA</i> ²⁸	56 106	21.4 8.5	67 67	91 90	X X	X X
Fillaux (2008) [54]	BAL/pellet	Prospective	High Pure PCR template preparation kit (Roche Diagnostics, France)		Real-time, semi-quantitative	<i>MSG</i>	400	7.8	100	90.5	47	100
Huggett (2008) [55]	BAL/whole	Blinded	DNeasy tissue kit (Qiagen, West Sussex, UK) and QIAamp UltraSens Virus kit (Qiagen)		Real-time quantitative End point	<i>HSP70</i> ¹⁸ <i>mt LSU rRNA</i>	136	45.6	98 (91–100) 97 (89–99)	96 (87–99) 68 (56–78)	X X	X X

- Spécificité haute : 85-100%
- Sensibilité élevée : 96-100%
- Valeur des privts autres que LBA ?? Sang ??
- Valeur pronostique ??

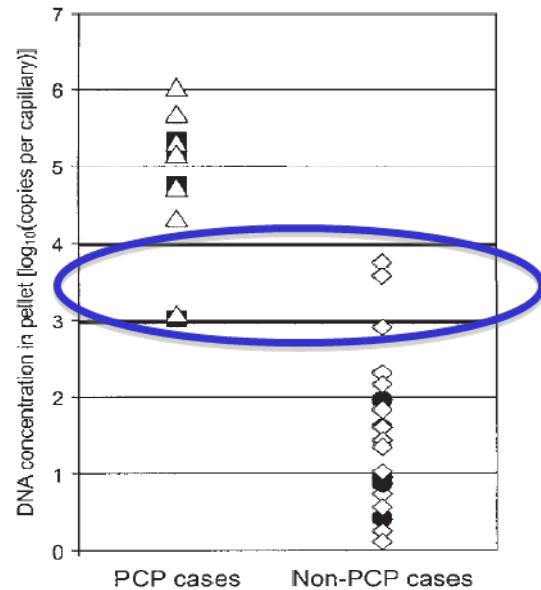
KHOT, *Expert Rev Anti Infect*, 2009

Pneumocystose et « portage »

2 à 21% de porteurs asymptomatiques selon les études...

Discrimination par la quantification +++ **MAIS:**

P. Flori and others



Q (copies / mL LBA)	Diagnostic biologique
Q = 0	Pas de pneumocystose
0 < Q < 2E+02	Portage, pas de pneumocystose
2E+02 < Q < 2E+04	Confirmer avec PCR sur surnageant Si + : portage chronique ou pneumocystose débutante
2E+04 < Q < 2E+05	Pneumocystose très probable

ZONE GRISE: Discrimination impossible entre :

- * Porteur : futur malade ?
- * Malade : ancien porteur ?

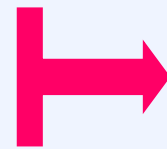
➔ **Présomption Radio-Clinique +++**

Flori, *J Med Microbiol.* 2004

Autres mycoses de l'immunodéprimé

Candidose invasive (CI) et Aspergillose invasive (AI) ou IICF : Diagnostic de certitude plus délicat

1. *Candida* = commensal
Aspergillus = ubiquiste



Pathogènes ?
Présence d'AC ?

2. CI et AI = 95% des IFI chez ID
3. Tableau radio-clinique peu ou pas spécifique

EORTC/MSG Définition des IFI

3 niveaux de preuves : prouvée, probable, possible

1. Biopsies et ponction site stérile

Hémocultures

AI : Terrain + signes radio-cliniques

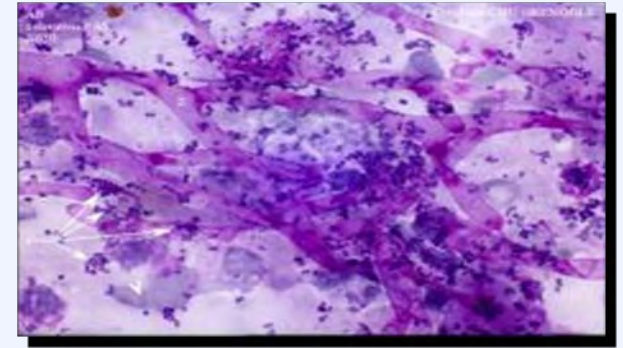
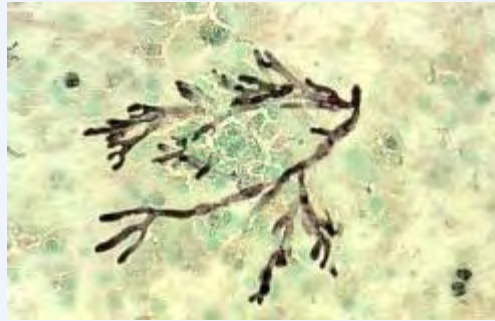
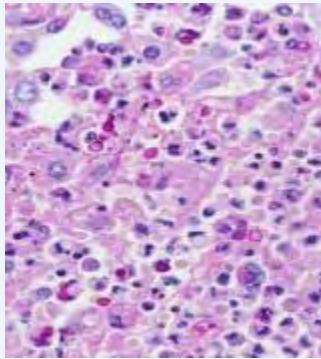
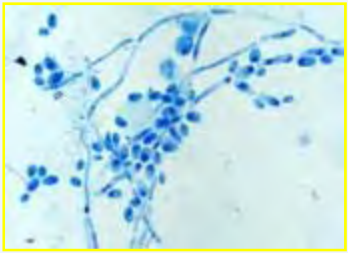
+ *Aspergillus* dans prtvt broncho pulmonaire
et/ou Ag circulants (GM) et β Glucanes)

2. Outil épidémiologique et études cliniques

3. **Mais ...** ne permet pas de poser ou d'exclure un Dg
d'IFI en pratique clinique

CI et AI : apport de l'examen direct

1. Orientation de genre et/ou d'espèce :
très rapide, peu coûteux mais sensibilité < culture



2. Spécificité +++ sur biopsies et ponction site stérile

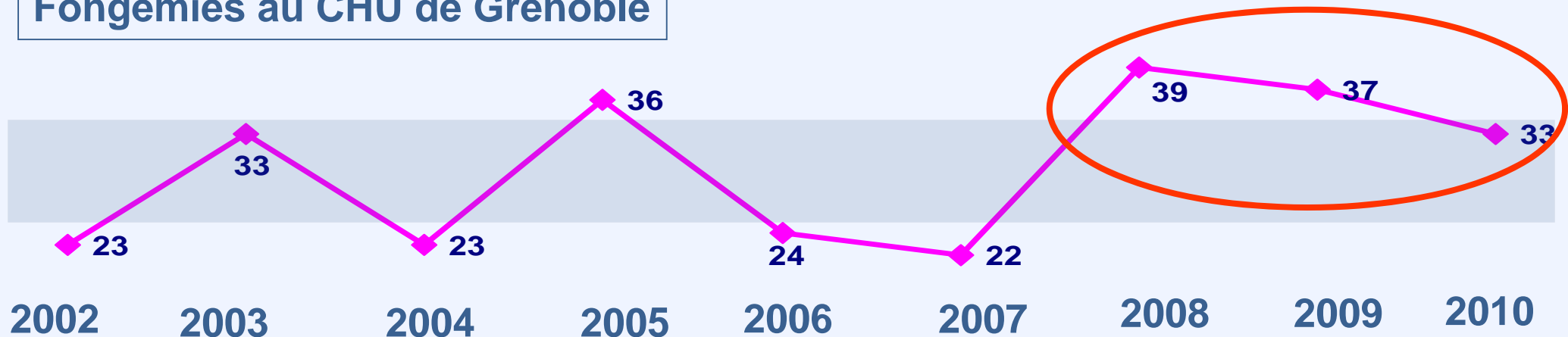
Place de l'hémoculture

1. Levures +++ (*Candida*, *CRN*, *Saccharomyces*, *Malassezia furfur*....)

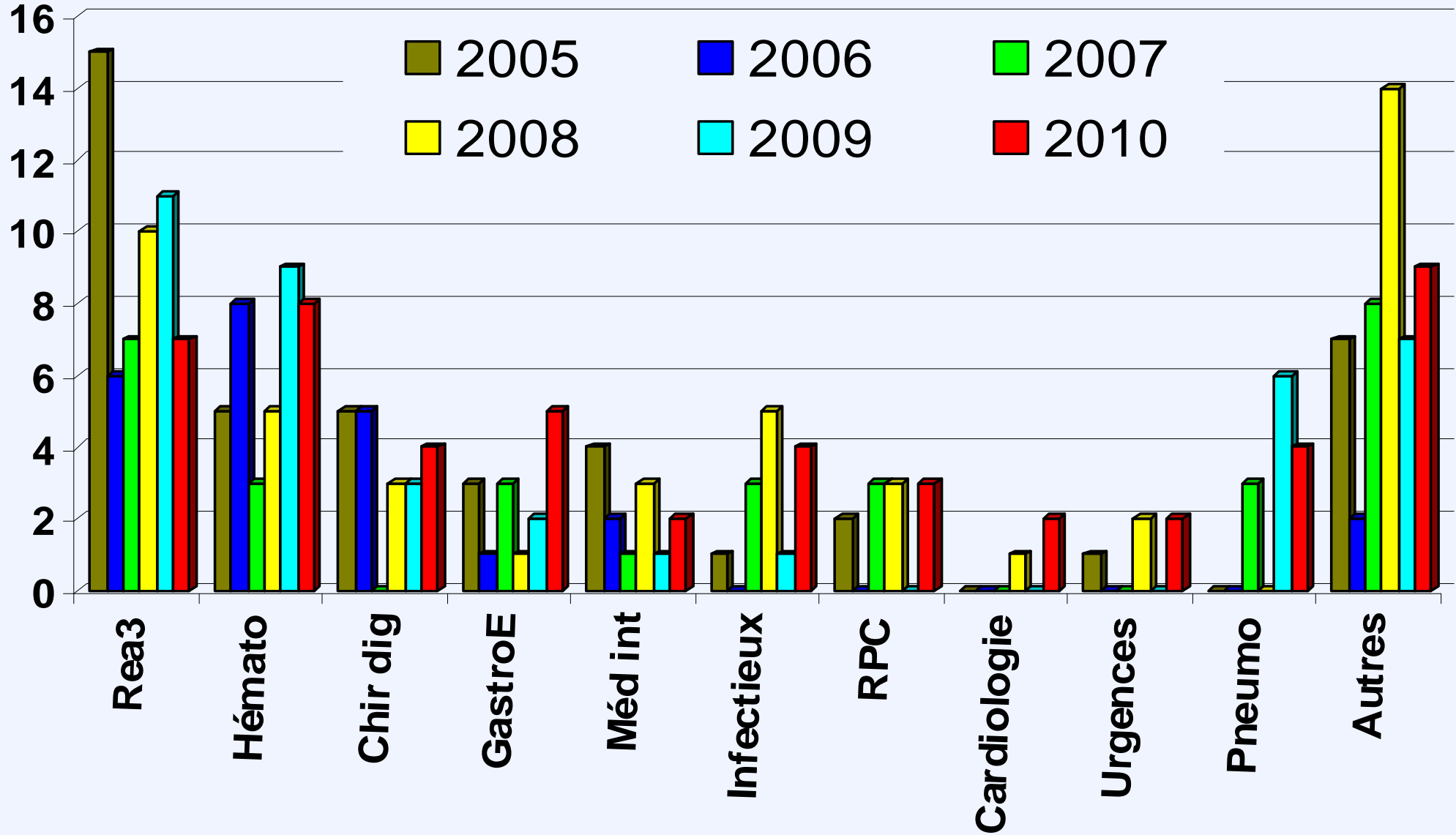
2. Certains champignons filamenteux (*Fusarium* sp)

Mais pas ~~Aspergillus~~, ~~Zygomycètes~~

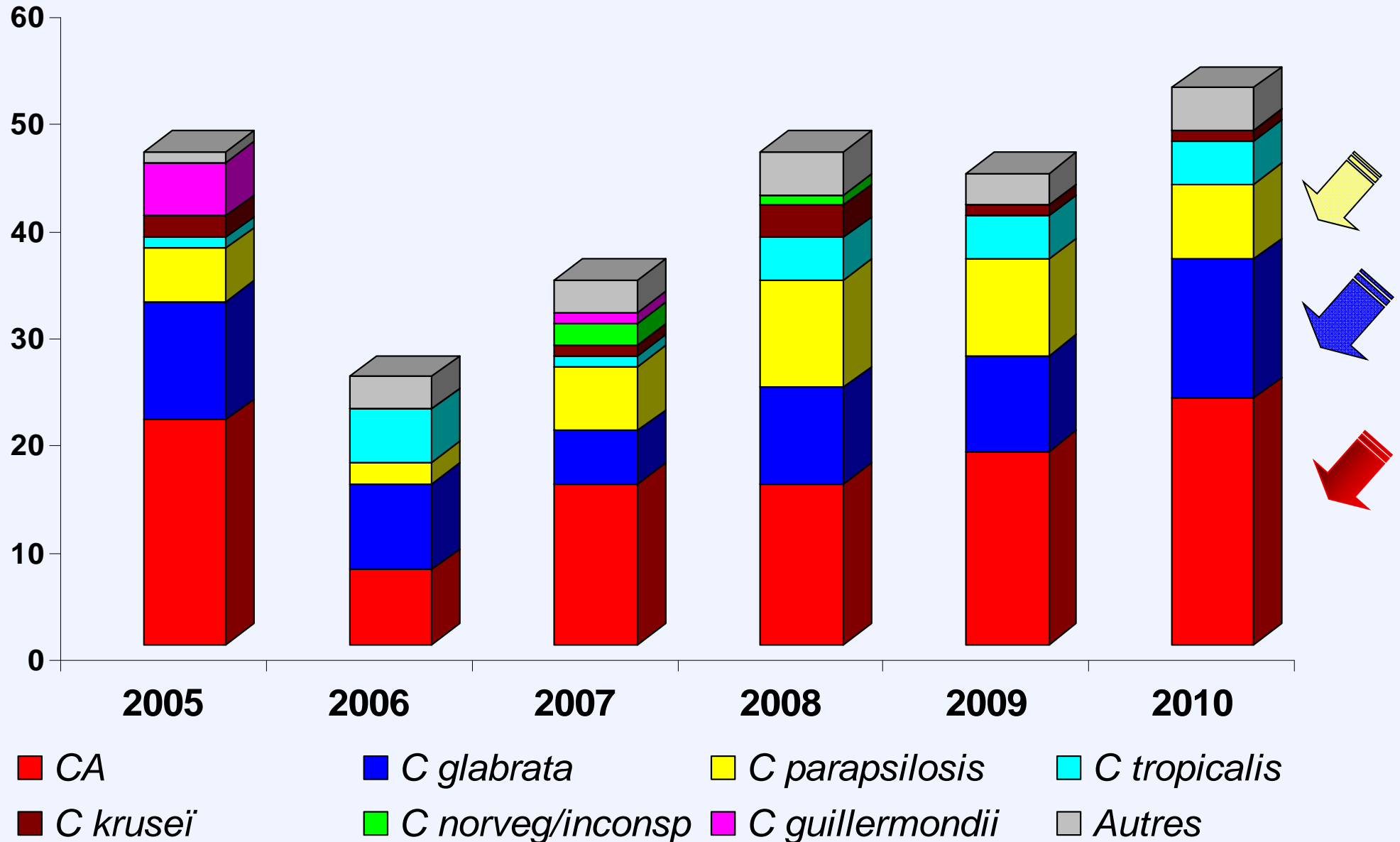
Fongémies au CHU de Grenoble



Fongémies : services



Fongémies : espèces



Intérêt des hémocultures spécifiques

- ☞ ≠ 50% CI non diagnostiquées par hémocultures
- ☞ Automate ⇒ milieu adapté (Mycosis IC/F)
 - * H Carbones spécifiques : temps de détection ⚡
 - * inhibiteur = septicémies mixtes bactéries/levures
 - * cytolytique = levures intra-cellulaires (*CRN*, *Histoplasma* sp)

Mais

- ☞ Volume optimal +++ : 8 à 10ml/flacon
- ☞ Fréquence recommandée ? : terrain +++

**Quelle est la place de la
surveillance de la
colonisation candidosique en
réanimation ?**

CI, colonisation en réanimation (1)

- 👉 CI = 14% des infections documentées en réa
- 👉 CI ↗ mortalité →
- 👉 Dg de CI sous-estimé en réa
- 👉 Début Tt lié à mortalité

300 CI : facteurs indépendants associés décès

	Analyse multivariée	
	OR (95% CI)	p-value
Diabète	4.5 (1.7-12.0)	0.002
Immunosuppression	2.6 (1.4-5.1)	0.005
Ventilation mécanique	2.5 (1.3-4.8)	0.005
Température >38.2°C	0.4 (0.2-0.8)	0.008

Leroy O. *Crit Care Med* 2009

GAREY, *CID* 2006
GAREY, *CID* 2006



Connaître facteurs de risque dont colonisation pour traitement précoce +++

CI, colonisation en réanimation (2)

👉 Index de Pittet (1991, 2004)

- USI : 650 pts, 29 colonisés dont 11 CI sévères
- $IC > 0.5$ ou $ICC > 0.4 \rightarrow$ risque CI \uparrow : traitement ATF

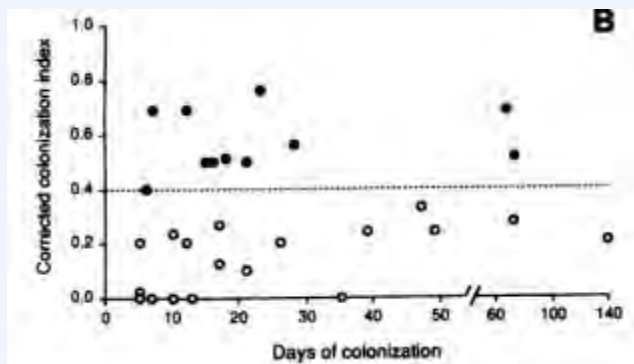


Table 5. *Candida* score vs. colonization index discriminatory power

	<i>Candida</i> Score ≥ 3 (95% CI)	Colonization Index ≥ 0.5 (95% CI)
Area under ROC curve	0.774 (0.715–0.832)	0.633 (0.557–0.709)
Sensitivity	77.6 (66.9–88.3)	72.4 (60.9–83.9)
Specificity	66.2 (63.0–69.4)	47.4 (44.0–50.8)
Predictive positive value	13.8 (10.0–17.5)	8.7 (6.2–11.3)
Predictive negative value	97.7 (96.4–98.9)	96.1 (94.2–98.0)
Relative risk for invasive candidiasis	5.98 (3.28–10.92)	2.24 (1.28–3.93)

ROC, receiver operating characteristics; CI, confidence interval.

LEON, *Crit Care Med* 2006

👉 *Candida* score (2006) :

- Cohorte prospective 1107 pts, 73 réas, 58 CI
- Sepsis (2) + HAP (1) + Chirurgie (1) + colonisation (1)
- Score ≥ 3 : **Spécificité et VPN $>$ IC**

CI, colonisation en réanimation (3)

- ➡ Règle prédictive d'Ostrosky-Zeichner (2007) :
 - AB ou VVC
 - 2 facteurs : HAP, dialyse, chirurgie, pancréatite, corticoïdes, IS
 - Se 34%, Sp 90%, VVP 1%, VPN 97% ➡ non initiation Tt ATF

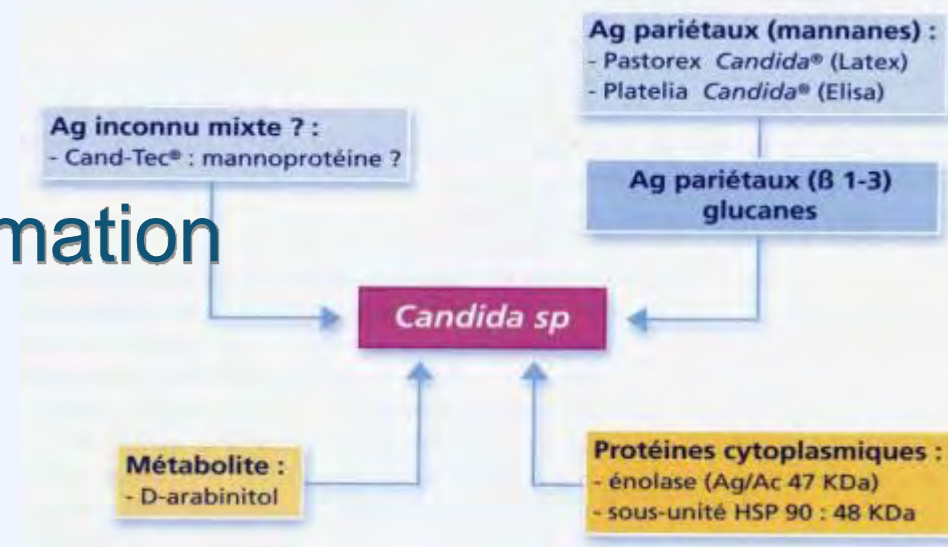
➡ Avenir : association avec autres marqueurs :
β-glucanes, ADN ???

➡ Mais coût +++

PAZOS, 2006

Recherche des Ac *Candida*

- Très nombreuses molécules antigéniques secrétées, excrétées ou libérées
- Nombreuses études
- IFI ou ELISA avec IEP confirmation
- Se et Sp faibles
- Intérêt de la cinétique +++



**Production d'Ac : reflet de colonisation
et non pas d'invasion +++**

Recherche combinée Ag / Ac

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2003, p. 4551–4558
0095-1137/03/\$08.00+0 DOI: 10.1128/JCM.41.10.4551–4558.2003
Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 41, No. 10

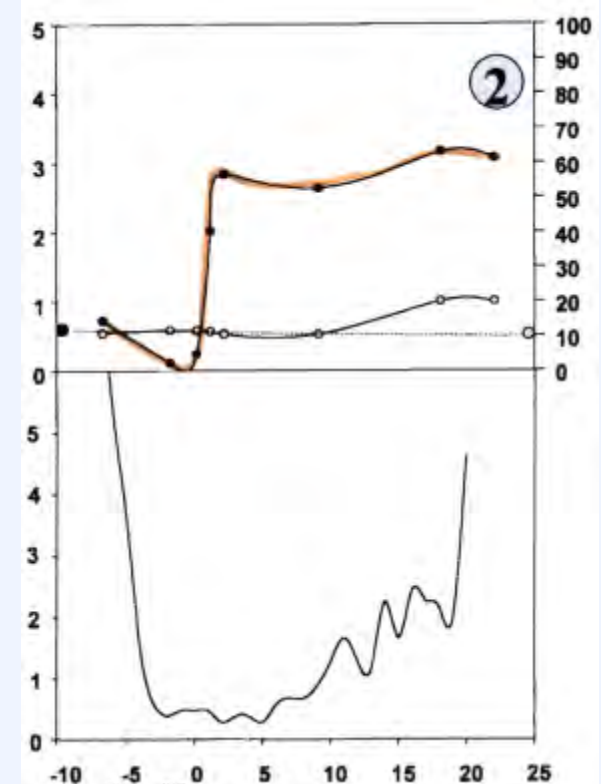
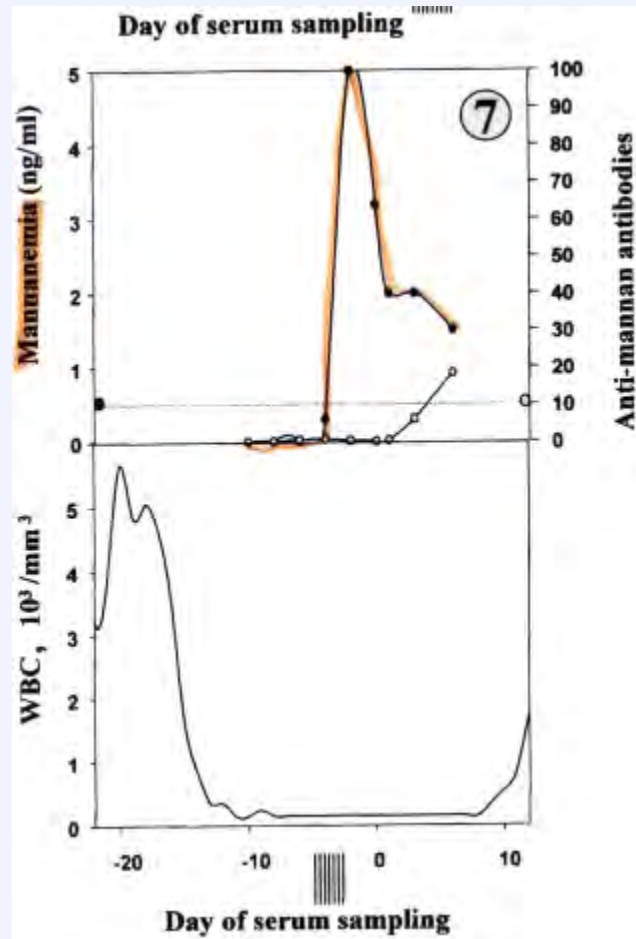
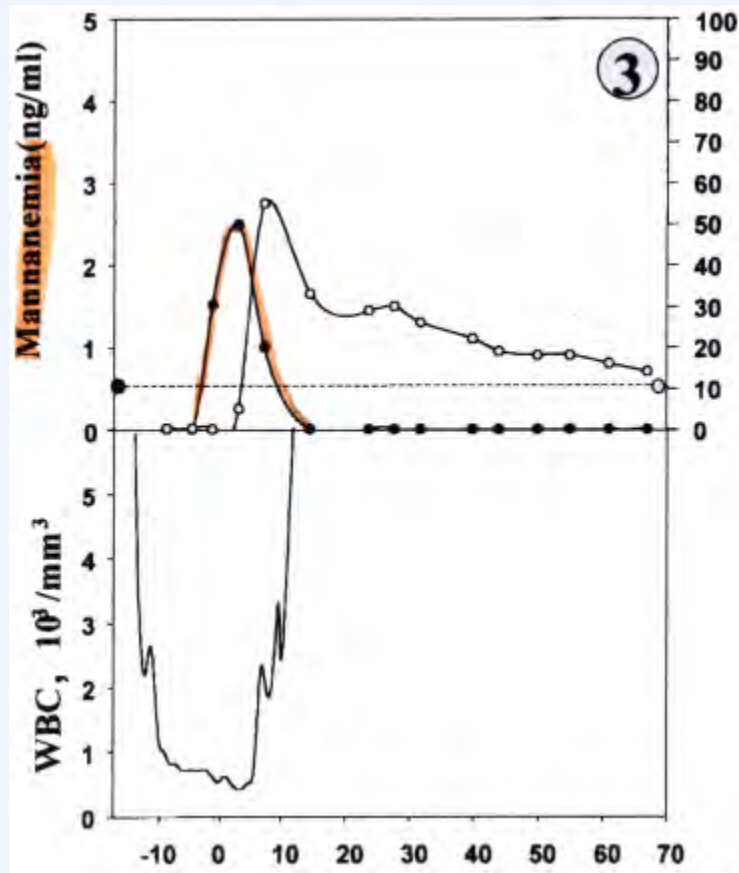
Contribution of the Platelia *Candida*-Specific Antibody and Antigen Tests to Early Diagnosis of Systemic *Candida tropicalis* Infection in Neutropenic Adults

Boualem Sendid,^{1,2} Denis Caillot,³ Bénédicte Baccouch-Humbert,² Lena Klingspor,⁴
Monique Grandjean,³ Alain Bonnin,³ and Daniel Poulain^{1,2*}

- Diagnostic précoce des CI par détection combinée Ag/Ac anti- α -mannanes par test ELISA
- Très séduisant dans son principe
- **Mais... plus délicate dans sa réalisation en routine ...**

Recherche combinée Ag / Ac

Phénomène de « balance » Ac/Ag



Ac et Ag *Candida* en 2010

Current diagnostic approaches to invasive candidiasis in critical care settings

PEMAN, *Mycoses*, 2009

Javier Pemán¹ and Rafael Zaragoza²

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain and ²Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia, Spain

Table 1 Microbiological tools to diagnosis invasive candidiasis in ICU settings

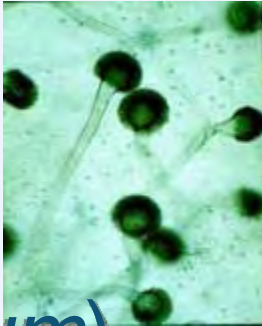
Technique	SEN (%)	SPE (%)	PRO (Advantages)	CONTRA (Disadvantages)
(1,3)- β -D-Glucan detection	70–100	87–96	Panfungal marker, high sensitivity and PPV, useful in serum and other clinical samples	Limited experience, false-positive results, methodological concerns
Fungal DNA detection	90	100	High specificity, useful in serum and other clinical samples	Few standardised and validated commercial methods
<i>Candida albicans</i> germ-tubes antibodies detection	77–89	91–100	Diagnosis and therapeutic monitoring, high specificity, detect several <i>Candida</i> species	Limited experience
Mannan and anti-mannan antibodies detection	60–89	80–84	Good specificity and sensitivity in combined use	Limited experience
Combination of non-culture methods	87	100	High specificity, sensitivity, PPV, useful for diagnosing and monitoring	High cost and laboratory requirement
Culture methods	50	100	'Gold standard', useful in blood and other clinical samples, allow antifungal susceptibility studies	Low sensibility, time consuming

SEN, sensitivity; SPE, specificity; PPV, positive predictive value.

**Aspergillose invasive :
Place de l'antigénémie
aspergillaire (GM)?**

Ag aspergillaire ou GalactoMannane (GM)

- Hétéropolysaccharide, thermostable,
- Structure chimique parfaitement caractérisée,
- Paroi des *Aspergillus* sp (et aussi de *Penicillium*)
- Secrété par le champignon en phase de croissance
- Relargué dans l'organisme (sérum et autres liquides biologiques) au cours du processus invasif aspergillaire
- Détecté par « *Platelia – Aspergillus* » (Bio-Rad)
sensibilité analytique : 1ng/ml



Diagnosis of Invasive Aspergillosis Using a Galactomannan Assay: A Meta-Analysis

Christopher D. Pfeiffer,¹ Jason P. Fine,² and Nasla Salfar¹

Departments of ¹Medicine and ²Biostatistics, University of Wisconsin Medical School, Madison, Wisconsin

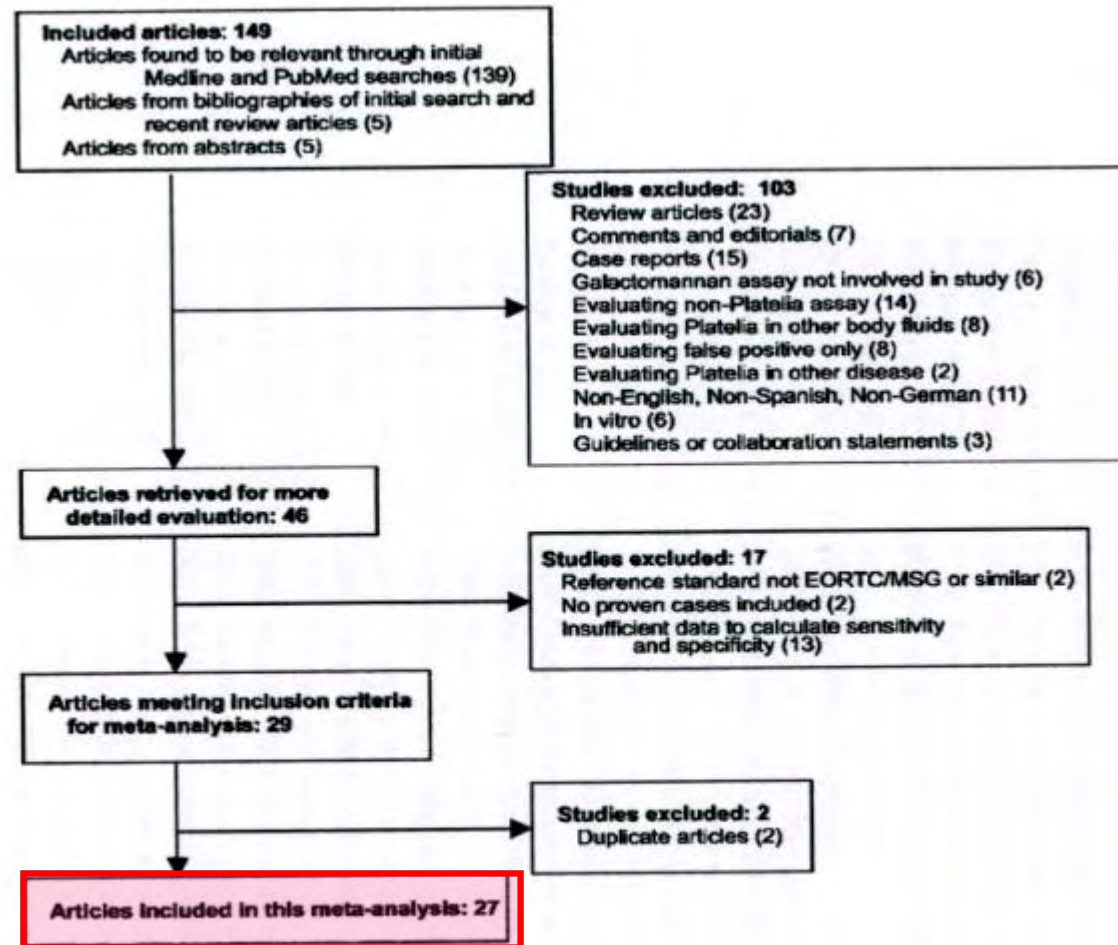


Figure 1. Summary of study assessment and inclusion in a meta-analysis of studies involving diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay. EORTC, European Organization of the Research and Treatment of Cancer; MSG, Mycoses Study Group.

Ag aspergillaire ou GalactoMannane (GM)

Sensibilité modérée 61 – 71%,

Spécificité très bonne 89 – 93%,

VPN excellente 95 - 98%,

VPP faible 26 - 53%.

→ Capacité à exclure AI > Confirmation

→ Mais dépend du terrain, de fréquence des tests et d'un éventuel Tt antifongique

Ag aspergillaire ou GalactoMannane (GM)

Cut-off et cinétique ?

PARK, 2009

- 519 épisodes de neutropénies fébriles
- 66 AI
- 416 groupe contrôle

Cut-off	Se (%)	Sp (%)
0.5	79	72
1.5	47	95
2 x >0.5	62	91.5
2 x >0.5 ou 0.7	75.7	81

➔ GM : association cut-off + cinétique +++

Gestion d'une prescription de GM

- Terrain à risque d'AI +++
- Tests bi-hebdomadaires
- Si positif :
 - ✓ Confirmer par 2nd test
 - ✓ Toujours dans contexte radio-clinique évocateur
 - ✓ Valeur du taux
 - ✓ Evaluer risque faux +
- Suivi régulier comparé à évolution : pronostic

MAIS

SULAHIAN, *NEJM*, 2003

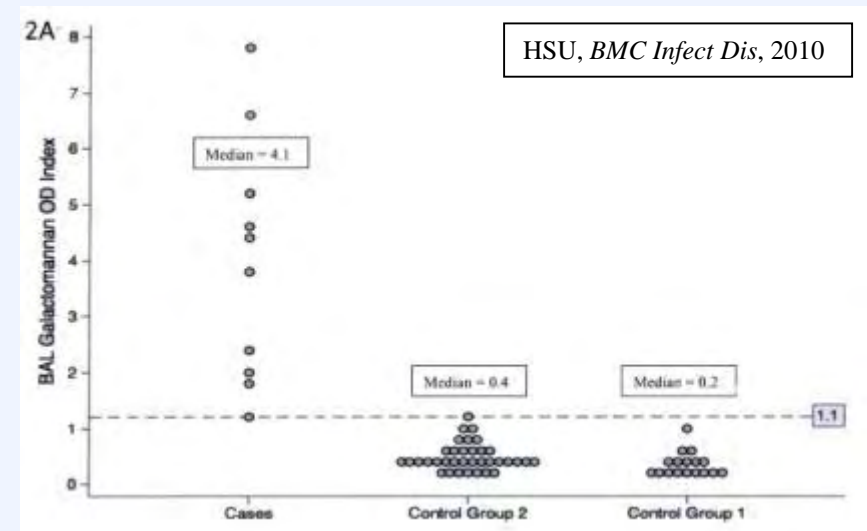
- **Faux positifs connus : alimentation, ATB**
(pipéracilline/tazobactame mais aussi céphalosporines)

LBA et antigène aspergillaire (GM)

- Plusieurs petites études : sensibilité 60 à 100%
- Mais très bonne spécificité

Table 3—GM and Mycologic Results in Patients with IPA

BERGERON, <i>Chest</i> , 2010	Proven (n = 6)	Probable (n = 23)	Possible (n = 4)	Total (N = 33)
BAL GM				
Positive ≥ 0.5	5	12	2	19
Negative < 0.5	1	11	2	14
Serum GM				
Positive ≥ 0.5	6	15	0	21
Negative < 0.5	0	8	4	12
Respiratory samples mycologic examination				
Positive direct examination	4	12	0	16
Negative direct examination	2	11	4	17
Positive culture	5	15	0	20
Negative culture	1	8	4	13
At least one positive criterion*	6	23	2	31



Cut-off ≥ 1 : spécificité 98% sensibilité 100%

- Difficulté de définir un cut-off : variabilité du prlv

LBA et antigène aspergillaire (GM)

- Interférence Tt antifongique et GM dans LBA :
semble moins importante que dans le sérum

MEERSSEMAN, *Am J Resp Crit Care Med*, 2008

- Interférence avec *Candida albicans* :

- 66 patients :

LBA négatifs 2/20 + (> 0.5)

LBA avec CA : 13/23 + (>0.5)

LBA ED – mais *Aspergillus* + : 12/17 > 0.5

LBA avec ED et *Aspergillus* + : 9/10 > 1.5

PERSAT, *ECMMID*, 2010

**1,3 β D-glucane : un nouveau
marqueur des IFI ?**

β glucanes (BG)

- Polysaccharides naturels de l'environnement
- Composants majeurs de la paroi de certains micro-organismes (dont certaines bactéries)
- *Candida*, *Saccharomyces* ... mais pas *Cryptococcus*
- *Aspergillus*, *Fusarium* ... mais pas Zygomycètes
- *Pneumocystis jirovecii*

Marqueur d'infection fongique invasive (sauf CRN et zygomycètes) et de pneumocystose



1,3 β D-glucane (BG)

- Depuis 2004 : Fungitell
- Approuvé par FDA (2007)
- Seuil : 60 à 80 pg/mL
- VPN très élevée : valeur d'exclusion
- Non influencé par le Tt antifongique



1,3 β D-glucane (BG)

MAIS

- Rares publications au cours d'IFI
- BG spontanément élevés chez enfants
- Faux \oplus élevé mais \neq GM (bactéries, hémodialyse, albumine, hémoglobine, cellulose ...)
- Nécessité matériel « glucan-free » \rightarrow surcoût

1,3 β D-glucane (BG)

Avenir : expérience trop limitée et plusieurs réponses à apporter

- Test de screening ? : IFI → oui / non
- Combinaison avec autres marqueurs ? :
 - ✓ AI : GM + BG
 - ✓ CI : *Ac Candida* + BG

BMC Infect Dis. 2007 Sep 4;7:103.

Comparative evaluation of (1, 3)-beta-D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia.

Alam FF, Mustafa AS, Khan ZU.

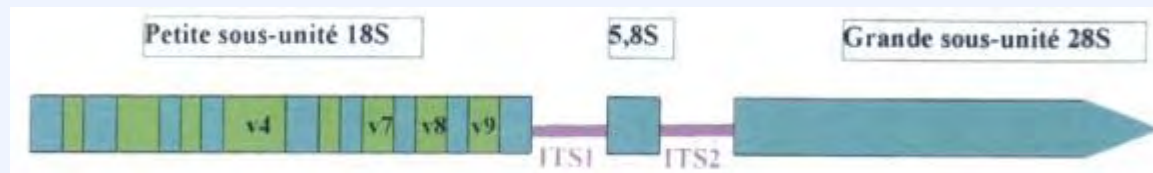
Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kuwait University, Safat 13110, P. O. Box 24923, Kuwait. ujalaalam@hotmail.com

Diagnostic moléculaire des IFI ?

Diagnostic moléculaire des IFI

Depuis 10 ans, de nombreuses études mais méthodologies très variées (hétérogénéité des cibles et méthodes de révélation) :

➔ Pas encore de standardisation +++



Différentes cibles de l'ADN ribosomique fongique pour la PCR *Candida*. BOUGNOUX, Rev Fr Lab, 2003

Difficultés de standardisation car :

- paroi fongique difficile à lyser : **faux négatifs**
- champignons ubiquistes environnement : **faux positifs**

Diagnostic moléculaire des IFI

EXPERT
REVIEWS

PCR-based diagnosis of human
fungal infections

Expert Rev. Anti Infect Ther 7(10), 1201–1221 (2009)

KHOT, *Expert Rev Anti Infect*, 2009

- 68 études fongiques PCR > 10 cas depuis 10 ans
- « Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments guidelines »
- Nécessité validation essais cliniques large échelle
- Mais aussi optimiser choix prlv, méthode extraction ADN, PCR

Table 1. Distribution of publications considered for review on the basis of disease category targeted by PCR.

Fungal disease	Total number of publications	Number of publications reporting diagnostic sensitivity and specificity
Aspergillosis	33	23
Pneumocystis pneumonia	13	12
Candidiasis	6	6
Invasive fungal infections	14	8
Mucormycosis	2	0

Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis

MENGOLI, *Lancet Infect Dis*, 2009

Carlo Mengoli, Mario Cruciani, Rosemary A Barnes, Juergen Loeffler, J Peter Donnelly

- 16 études, 1618 patients à risque d'AI
- Populations à risque variables, hétérogénéité des PCR

MAIS

- Une PCR négative : exclusion AI
- Deux PCR + nécessaires pour Dg AI

	DOR (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
One PCR-positive sample	22.11 (7.77-62.92)	0.88 (0.75-0.94)	0.75 (0.63-0.84)
Two PCR-positive samples	21.33 (6.86-466.3)	0.75 (0.54-0.88)	0.87 (0.78-0.93)

DOR=diagnostic odds ratio.

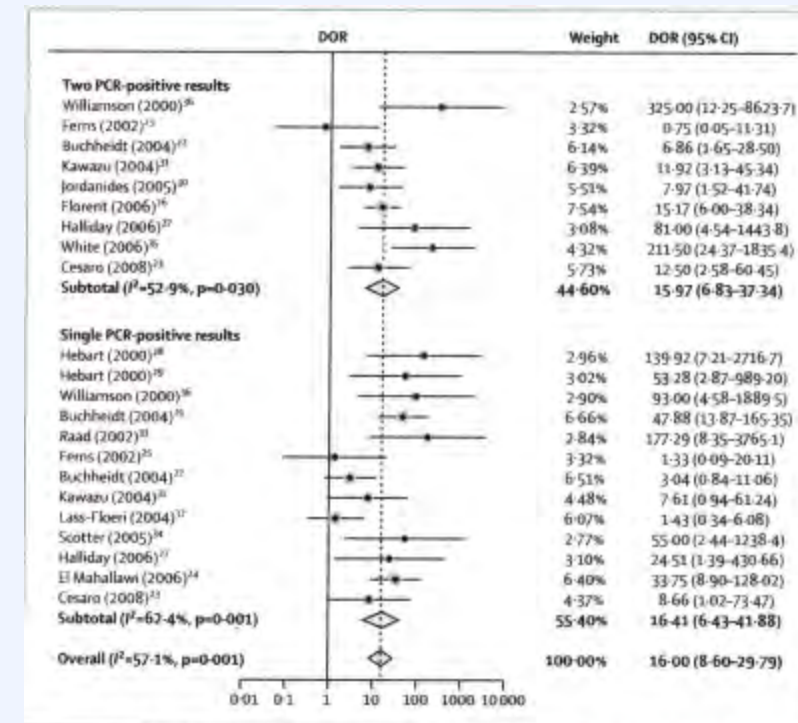


Figure 2: Forest plots of the diagnostic odds ratios (DORs) resulting from studies that used two PCR-positive results and those that used a single PCR-positive result

Conclusion

1. Diagnostic des IFI rarement aisé
2. IFI les + fréquentes (CI et AI) : faisceau d'arguments mycologiques et immunologiques **associés** à terrain + signes radio-cliniques
3. Perspectives : études biomarqueur type β D-glucane et/ou PCR