

## Outils diagnostiques des infections fongiques invasives

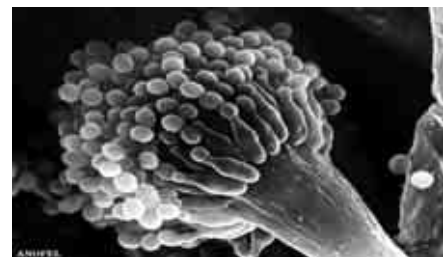
Stéphane Bretagne, Hôpital Henri Mondor,  
DESC 13 Janvier 2005

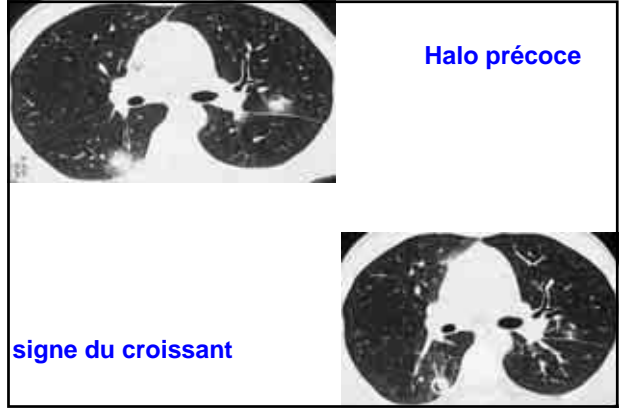
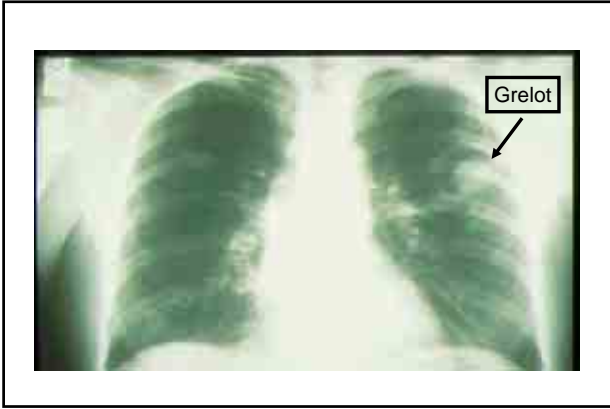
## Aspergillus spp

- Moisissures de l'environnement
- Produit des têtes avec conidies (2 µm)
- Conidies en suspension dans l'air et l'eau
- Inhalation permanente, évacuation par le tapis muco-ciliaire
- Germination, envahissement vasculaire, nécrose
- Environ 200 espèces
- Espèces en pathologie humaine: *A. fumigatus* (80%), *A. flavus* (15%), *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus* (<5%)

## Epidémiologie

- |  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| ■ <b>Levure</b>                          | ■ <b>Champignons filamenteux</b>    |
| ■ <i>Candida albicans</i>                | ■ <i>Aspergillus</i> spp.           |
| ■ Commensaux                             | ■ Décomposition des végétaux        |
| ■ Infections endogènes                   | ■ Infections exogènes (inhalation)  |
| ■ Possibilité de transmission manuportée | ■ Transmission nosocomiale aérienne |
| ■ Infections nosocomiales                |                                     |





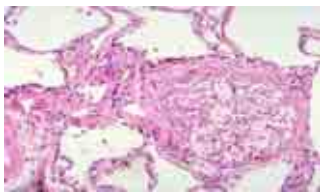
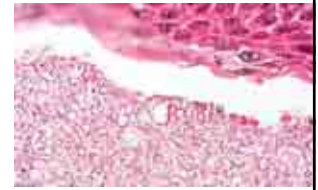
### *Diagnostic de l'aspergillose invasive*

- Biopsie
- LBA :
  - 50% de faux négatifs
  - Signification d'une culture positive?
- Expectoration: bonne valeur prédictive positive 82% pour les greffés de moelle
- Hémoculture: jamais (sauf *Fusarium* sp.)
- Méthode indirectes
  - Ag (galactomannane, glucane)
  - PCR



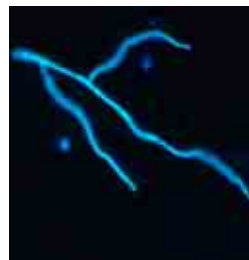
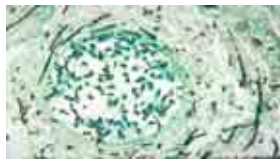
Aspergillome (truffe)

Anatomopathologie:  
absence d'invasion



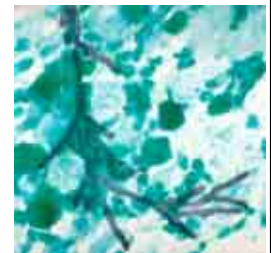
Aspergillose invasive

Anatomopathologie:  
Invasion vasculaire



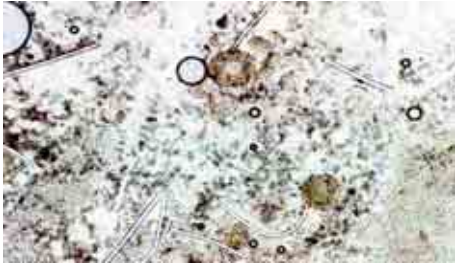
Examen direct (fluorescence)

Filaments aspergillaires  
(absence de spores)

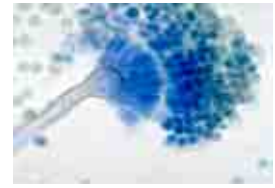


Coloration argentique

Présence de têtes aspergillaires dans une oreille (*A. niger*)



*A. flavus*



*A. fumigatus*



## Recherches d'anticorps

- Précipitation en gélose (double diffusion, IEP et ES)
- Intérêt diagnostique
  - Aspergillose allergique
  - Aspergillomes
  - DDB
  - Mucoviscidose
- Souvent négatif chez les immunodéprimés



## Détection de Galactomannane

### 1) Test au latex PASTOREX® (15 ng/ml)



● sérum  
● galactomannane

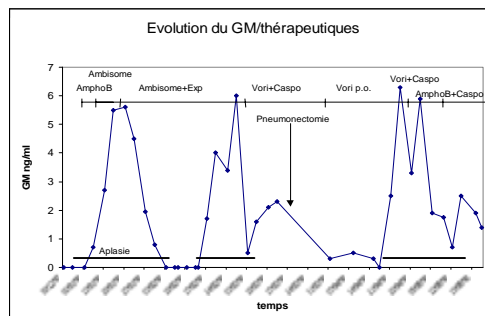
### 2) Test ELISA-sandwich PLATELIA® (1ng/ml)



● bille de latex  
● anticorps monoclonal anti-galactomannane  
● anticorps monoclonal anti-galactomannane lié à la peroxydase

Laboratoire des Aspergillus  
Institut Pasteur, Paris

## Evolution du GM/thérapeutiques



## Valeur de l'antigénémie sur patients autopsiés (Maertens et al, JCM, 1999)

Test ELISA	Aspergilles invasives	Absence d'aspergillose	Total
Positif	25	2	27
Négatif	2	42	44
Total	27	44	71

Sensibilité: 92%

Spécificité: 96%

## Apports de l'antigénémie

- GM+ avant les cultures mycologiques
  - 10 jours chez 27 des 29 patients (Maertens et al Blood 2001)
- GM+ avant les signes radiologiques
  - 8,4 jours chez 31 des 48 patients (Sulahan et al Cancer 2001)
  - 5 jours chez 19 des 28 patients (Maertens et al Blood 2001)
- GM+ avant les signes cliniques
  - 6,9 jours chez 18 des 48 patients (Sulahan et al Cancer 2001)
- GM+ avant antifongiques
  - 6 jours pour 18 des 29 patients traités (Maertens et al Blood 2001)

### ***L'antigénémie***

Renforce le diagnostic  
(critère diagnostique EORTC pour greffe de moelle: 2 sérums positifs)  
(Ascioglu et al , CID 2002)

Donne des notions évolutives

Plus précoce que les techniques mycologiques  
(examen direct et culture)

### ***Limites de l'antigénémie (2)***

- Nécessité d'un suivi 1-2 prélèvements par semaine pendant les périodes à risque
- Nécessité de délimiter les patients à risque pour suivi prospectif
- Test ELISA ne peut être réalisé en urgence
- Possibilité de "faux" négatifs
- Coût: 450 € pour 96 puits
- Actuellement non validée en dehors de l'hématologie

### ***Principale limite de l'antigénémie***

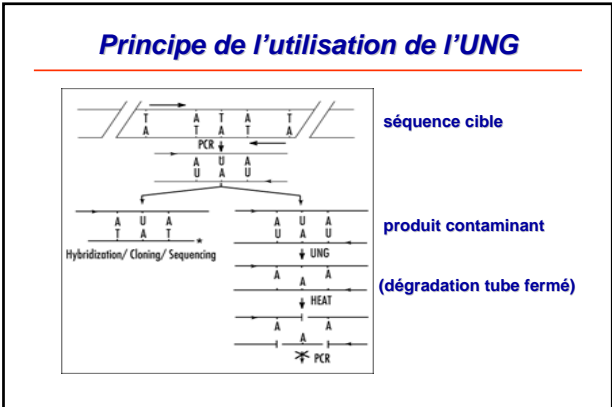
**Faux positifs: 14%** (Maertens et al, Blood 2001)

- Raisons
  - Manque de spécificité (non)
  - Aspergilloses non pulmonaires (Pautas et al, J Infection, 2001)
  - Aspergillose spontanément résolutive ?
  - Absorption digestive de galactomannane
  - Antibiotiques (Ansorg R, Mycoses, 1997)

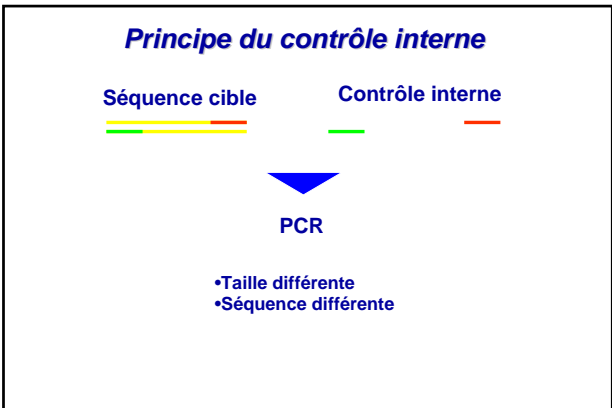
### **GM sur autres milieux biologiques**

- Liquide de LBA
- Liquide pleural
- Liquide céphalo-rachidien ...
- En général, déjà positif dans le sérum
- Absence d'arguments évolutifs dans les prélèvements non sanguins

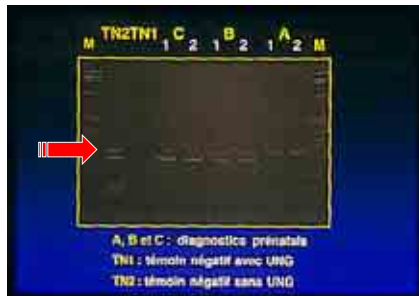
<b>PCR</b>			
	Volume contaminant (µl)	Copies du produit de PCR	% de réaction positive
<b>AEROSOL</b>	100	10 <sup>9</sup>	100
	10	10 <sup>8</sup>	100
	1	10 <sup>7</sup>	100
	0.1	10 <sup>6</sup>	100
	0.01	10 <sup>5</sup>	100
	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>4</sup>	100
	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>3</sup>	100
	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>2</sup>	100
	10 <sup>-6</sup>	10	100
	10 <sup>-7</sup>	1	63
10 <sup>-8</sup>	0.1	9	
10 <sup>-9</sup>	0.01	1	



- ### Solutions apportées par les industriels (Amplicor® Roche)
- Faux +: contaminations (un aérosol de 10<sup>-6</sup> µl contient 10 copies)
    - Remplacement de la désoxythymine par le désoxyuracil (Uracil-N-Glycosylase)
  - Faux -: si rendement < 2<sup>n</sup> par copie => inhibiteurs
    - co-amplification d'un témoin interne à 5-20 copies dans l'échantillon à tester



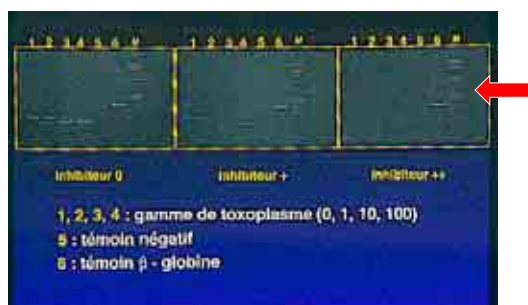
### Nécessité de l'UNG



### Problème supplémentaire spécifique pour les PCR fongiques: contaminations des produits avec de l'ADN fongique (Aspergillus et autres)

- Zymoliase (Rimek, 1999)
- Zymoliase 10 X buffer (Loeffler 1999)
- Produits cosmétiques et pharmaceutiques (Jimenez, 2001)

### Nécessité du contrôle interne



### 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 résultats**

- 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%

### **Comparaison GM/PCR**

- Bretagne CID 1998
  - 18 patients avec aspergillose prouvée ou probable
  - 9 PCR+
  - Pas plus sensible que le GM
- Becker et al JCM 1999
  - Aspergillose expérimentales du rat
  - ELISA>PCR pour le diagnostic et le suivi des aspergilloses invasives

### **Techniques PCR Aspergillus Analyses de 20 publications**

Kits d'extraction d'ADN	3/20
Hot-start	6/20
Prévention enzymatique (UNG)	6/20
Fragment amplifié <200 bp	4/20
PCR non-nichée	14/20
Contrôle interne	2/20
Contrôle spécificité	15/20

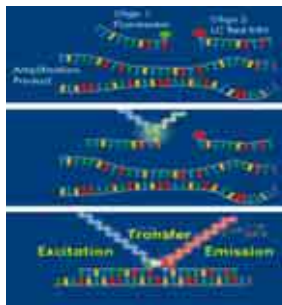
### **PCR en temps réel**

---

#### **2 principes de détection**

- Sondes d'hybridation « FRET »
- Sondes d'hydrolyse « Taqman »

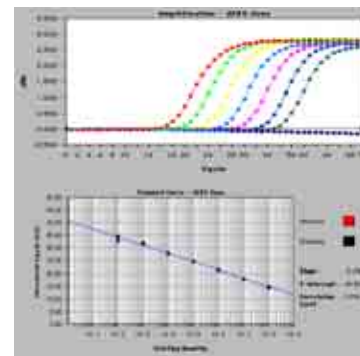
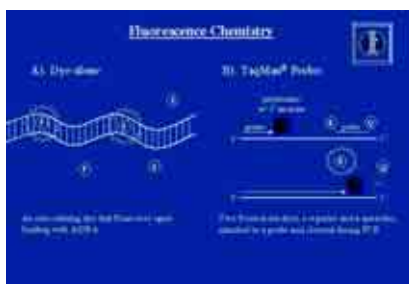
## Principe FRET

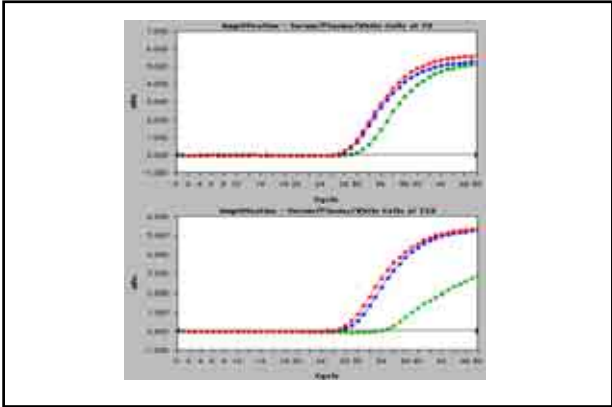


## Avantages de la PCR en temps réel

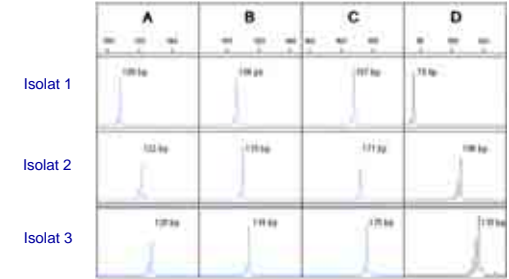
- Double protection contre les contaminations
  - mécanique (lecture en temps réel)
  - enzymatique par l'UNG
- Rapide (2-3h ) avec contrôle de la spécificité
- Quantitatif avec arguments évolutifs

## Principe TaqMan

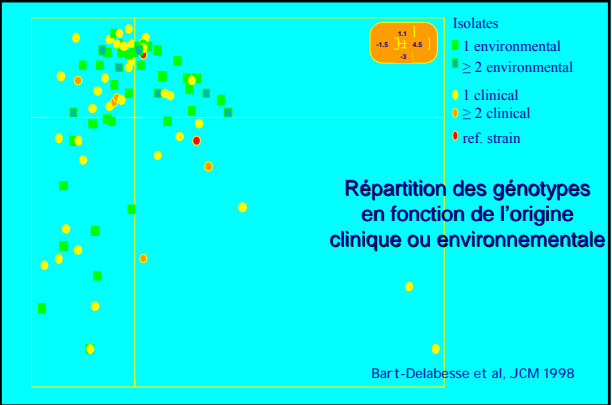
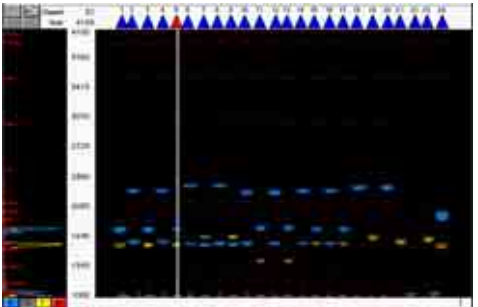




Analyse des microsatellites d'isolats d'*Aspergillus fumigatus*



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



### Intérêt du génotypage des isolats d'*A. fumigatus*

- Différentes méthodes (RFLP, microsatellites)
- Enorme polymorphisme de la population d '*A. fumigatus*
- Pas de biotope privilégié pour un génotype donné:
  - Persistance d'un génotype au cours du temps
  - Même génotype à deux endroits différents
  - => Impossibilité de dater la contamination
- Plusieurs génotypes chez patients colonisés
- Généralement un génotype chez l'immunodéprimé
- Pas de génotype pathogène

Debeaupuis JP et al, Inf Immun 1997  
Bart-Delabesse et al, JCM 1998

### Hémocultures

- Lyse centrifugation
- Automates avec culture agitée
- Simples à recenser
- Faible sensibilité (50%)

### Diagnostic des infections à levures

- Diagnostic microbiologique
  - Hémocultures (automates, lyse-centrifugation)
  - Biopsie (culture et anatomopathologie)
  - Prélèvements de surveillance
- Méthodes indirectes
  - Protéines (énolase) (Walsh, NEJM, 1991)
  - Métabolites (Arabinitol) (Sigmundsdottir, J. Clin Microbiol. 2000)
  - Polysaccharides (glucane, mannane +/- Ac) (Sendid, J Clin Microbiol. 1999)
  - PCR

### Détection de *Candida* spp. (candidémies simulées 10<sup>3</sup> / 10 ml de sang)

<i>Candida</i> spp.	BACTEC 9240			BacT/ALERT 3D		
	aérobie	anaérobie	mycologie	aérobie	anaérobie	mycologie
<i>C. albicans</i>	10	0	10	10	10	10
<i>C. glabrata</i>	6	5	10	10	8	10
<i>C. krusei</i>	9	0	10	10	9	10
<i>C. parapsilosis</i>	10	0	10	10	1	10
<i>C. tropicalis</i>	10	0	10	10	7	10
Total (50)	45	5	50	50	35	50

Horvath et al, JCM, 2004

Examen direct avec agent clarifiant des prélèvements

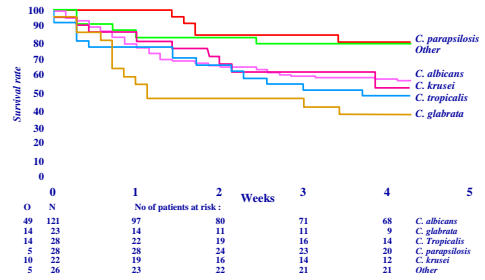


*Aspergillus sp.*



*Candida sp.*

Mortalité en fonction des espèces de levures en onco-hématologie (Viscoli C et al, 1999)

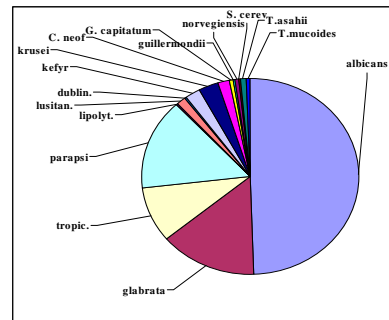


Cultures levures sur milieux chromogéniques

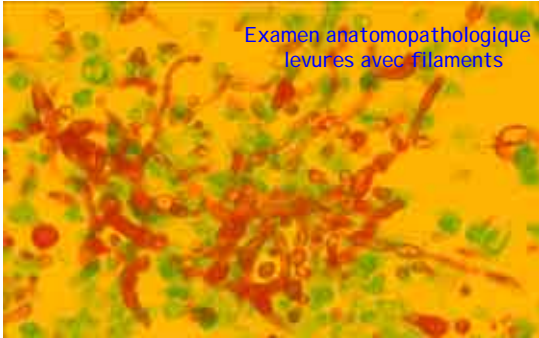


- Test d'agglutination rapide
- Test enzymatique (*C. glabrata*)
- Galerie phénotypique, chlamydo-spores
- PCR (*C. dubliniensis*)

Répartitions par espèces après un an de surveillance des candidémies sur l'AP-HP



Examen anatomopathologique :  
levures avec filaments



Sensitivity, specificity, and predictive values for the detection of antigen and antimannan antibodies\*

	Mannanemia Pastorex® Candida	Mannanemia Platelia® Candida Ag	Anti-mannan Antibodies Platelia® Candida Ab	Combination of ELISA tests
Sensitivity (%)	28	40	53	80
Specificity (%)	100	98	94	93
PPV (%)	100	85	72	78
NPV (%)	82	84	87	93

\* Values are calculated per patient according to the results of an analysis of 162 sera from 43 patients with systemic candidiasis and 230 sera from controls Blood donors, ICU colonized patients, Aspergillosis, Cryptococcosis and Pneumocystosis patients.

Diagnostic indirect des candidoses

- Anticorps
- Autres molécules
  - Protéines (énolase) (Walsh, NEJM, 1991)
  - Métabolites (Arabinitol) (Sigmundsdottir, J. Clin Microbiol. 2000)
  - Polysaccharides (glucane, mannane +/- Ac) (Sendid, J Clin Microbiol. 1999)
- ADN

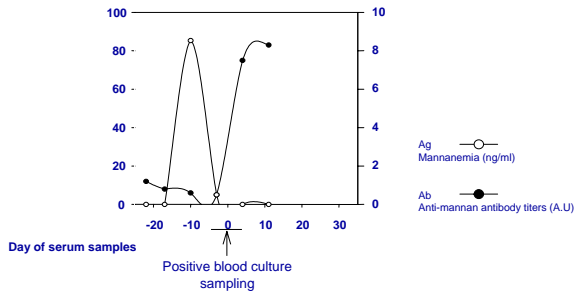
Sensitivity, specificity, and predictive values for the detection of antigen and antimannan antibodies\*

	Mannanemia Pastorex® Candida	Mannanemia Platelia® Candida Ag	Anti-mannan Antibodies Platelia® Candida Ab	Combination of ELISA tests
Sensitivity (%)	28	40	53	80
Specificity (%)	100	98	94	93
PPV (%)	100	85	72	78
NPV (%)	82	84	87	93

\* Values are calculated per patient according to the results of an analysis of 162 sera from 43 patients with systemic candidiasis and 230 sera from controls blood donors, ICU colonized patients, Aspergillosis, Cryptococcosis and Pneumocystosis patients.

Sendid *et al*, JCM, 1999

**Example 1 : kinetic values of Platelia® *Candida* Ag and Ab tests during the time course of systemic candidosis in an ICU patient**

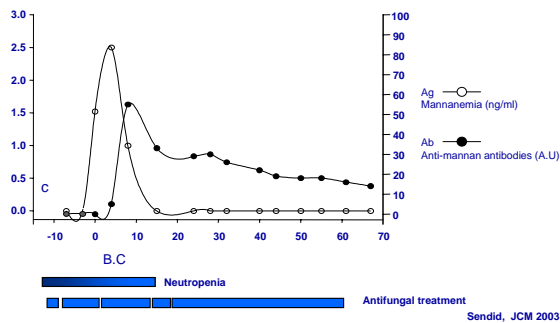


**Seuil détection PCR *Candida***

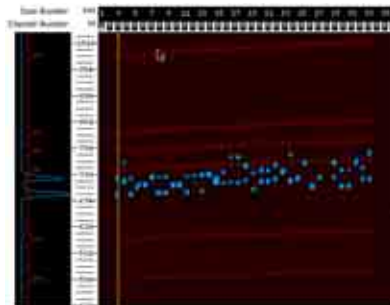
Cible ARNr	d'tect ion	Sens ibilité CFU / ml	r'f' r'ence
5S	Br. thidium	15	Holmes, JCM 94
5,8S	EIA	10	Fujita, JCM 95
18S	Souhe m - blot	100 - 15 0	van Deventer, JCM 95
18S	Souhe m - blot	10 - 100	Polanco, EJC MID 95
18S	Souhe m - blot	1	Einsiele, JCM 97
18S	ELISA	10	Loffler, Med Mycol, 98

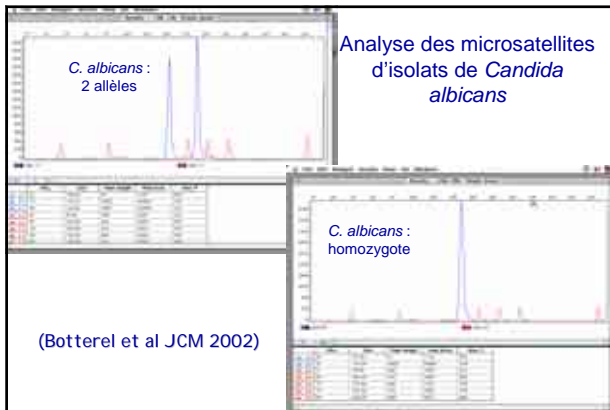
(à comparer aux candidémies simulées  $10^3$  / 10 ml de sang)

**Example 2 : kinetic values of Platelia® *Candida* Ag and Ab tests during the time course of systemic candidosis in an haematology patient**



**Analyse des microsatellites d'isolats de *Candida albicans***





## Index de colonisation

*Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients Pittet et al. Ann Surg 1994; 220: 751*

- 650 pts admis en réanimation chirurgicale
  - *Candida* sp. dans 3 prélèvements du même ou de différents sites à 2 reprises
- 29 inclus dont 11 développeront une infection à *Candida* sévère
  - Index de colonisation: rapport entre le nombre de sites colonisés sur le nombre total de sites prélevés

## Intérêt du génotypage des isolats de *C. albicans*

- Différentes méthodes
  - Séquençage de plusieurs locus (MLST) (Bougnoux ME et al JCM 2002)
  - Microsatellites (Botterel et al JCM 2002)
- Principaux résultats
  - Identité des isolats colonisants et infectants (Stéphan et al CID 2002)
  - Pas de génotypes pathogènes (Dalle F et al JCM 2003)

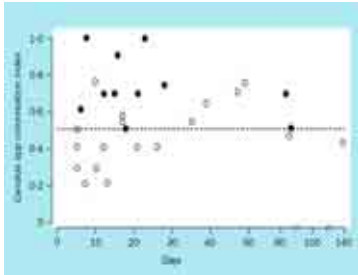
## Valeur de la colonisation

*Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients Pittet et al. Ann Surg 1994; 220: 751*

Nb de sites colonisés	Se	Sp	VPP	VPN
2 sites	100	22	44	100
> 2 sites	73	56	50	77
> 3 sites	45	72	50	68
Index de colonisation	100	69	66	100

## Index de colonisation

*Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients  
Pittet et al. Ann Surg 1994; 220: 751



Average CI  
0.47 vs 0.70,  $p < 0.01$

Le seuil est atteint 6 jours  
avant l'infection

11 pts infectés dont 8 candidémies

2 FdR en analyse multivariée  
-Index de colonisation  
-Score APACHE II

## Stratégie diagnostique des candidoses sévères

Suspicion clinique de candidose sévère

Colonisation?

non

2 FdR majeurs  
1 majeur + 3 mineurs ou > 3 mineurs

non  
Détermination du degré de colonisation  
FO  
Autre causes de fièvre ou sepsis

Prise en compte des résultats

oui

Traitement  
empirique précoce?

## Index de colonisation

- La valeur prédictive de l'index de colonisation n'a jamais été testée depuis dans une étude prospective

## Tests de sensibilité aux antifongiques

- Absence de définitions univoques des termes sensible et résistant
- Différencier échec clinique et résistance microbiologique
- Intérêt épidémiologique des tests d'évaluation des résistances aux antifongiques

### Propositions NCCLS (Rex et al CID 1997et 2000)

Seuils de sensibilité (µg/ml)				
Antifongique	S	SDD*	I	R
fluconazole	≤ 8	16-32	-	≥ 64
itraconazole	≤ 0,125	0,25-0,5	-	≥ 1
flucytosine	≤ 4		8-16	≥ 32

Données valables uniquement pour des levures testées avec méthode NCCLS macrométhode M27T

### E-test®



### E-test®

- Bandelettes (AMB, 5FC, ITZ, FCZ, KTZ, Voriconazole)
- CMI
- Réalisation facile
- Corrélation avec le NCCLS 90% pour les *Candida* mais 37% pour *C. glabrata* et 56% pour *C. tropicalis*

### Autres champignons

- Zygomycoses
- *Fusarium* spp.
- Daematiae (Champignons noirs)
- Cryptocoque (LCR, Ag)
- *Pneumocystis jiroveci* (ex *carinii*) (LBA)

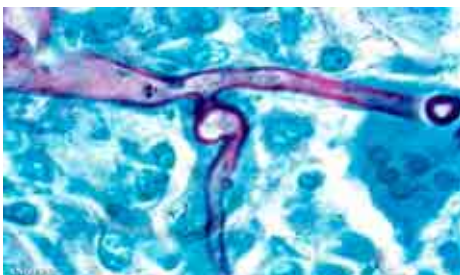
## Zygomycoses

- ☒ Facteurs de risque:
  - ☒ idem aspergillose invasive
  - ☒ Diabète insulinodépendant
  - ☒ Voriconazole (?)
- ☒ Infection rhinocérébrale aiguë
- ☒ Diagnostic microbiologique
  - ☒ Prendre des «pincés»
  - ☒ Galactomannane négatif
- ☒ Identification moléculaire si absence de fructifications ou dans biopsies (CNR pasteur)



Genre	Aspergillus	Aspergillus nidulans	Moule d'attache au substrat	Zygomycètes
Mucor				Rhizopus (supra-aérien), Zygomycètes (supra-aérien)
Wallemnia				Rhizopus (supra-aérien), Zygomycètes (supra-aérien)
Entomozoa				Rhizopus, autres des Zygomycètes (supra-aérien)
Albugo				Rhizopus, autres des Zygomycètes (supra-aérien)
Beutelia				Rhizopus, autres des Zygomycètes (supra-aérien)
Cyrenomyces				Rhizopus (supra-aérien), Zygomycètes (supra-aérien)

MUCOR : aspect des filaments caractéristiques



## Fusarioses

- Formes invasives: idem aspergilloses invasives
- Diagnostic microbiologique:
  - Hémocultures positives dans 50% des cas
  - Galactomannane négatif



## Conclusions

- Méthodes microbiologiques: première intention
  - simples, peu coûteuses
  - si cultures fongiques positives, confrontation avec la clinique avant de parler de contamination
- Savoir demander des examens plus ciblés
  - Isolator®, Ag cryptocoque, Ag aspergillaire
  - attention aux milieux et aux températures d'incubation/bactéries
- Antigénémie galactomannane Aspergillus
  - sûrement mais stratégie de criblage de patients à risque
- Biologie moléculaire
  - Nouvelles PCR en temps réel fiables: évaluation prospective
  - Epidémiologie, identification moléculaire (centres de référence)

