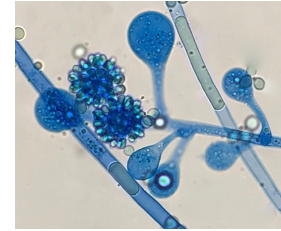
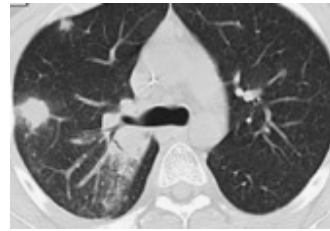
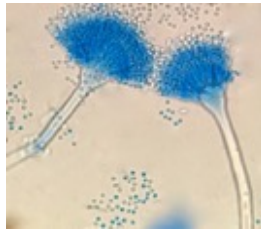


## PCR et infections fongiques invasives : actualités et modalités d'interprétation



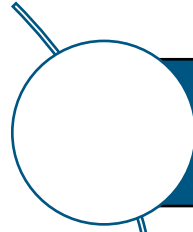
Dr Sébastien Imbert  
Laboratoire de parasitologie – mycologie  
CHU et Université de Bordeaux

[sebastien.imbert@u-bordeaux.fr](mailto:sebastien.imbert@u-bordeaux.fr)



**Pourquoi  
s'intéresser aux  
PCR fongiques ?**

---

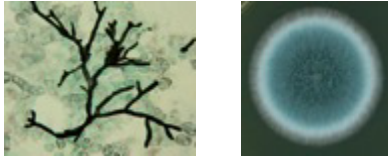


**Font partie des outils diagnostiques  
mycologiques**

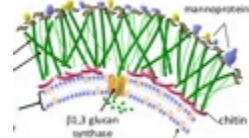
# Outils mycologiques disponibles

## Recherche directe du champignon

### Examen mycologique / anatomopathologique



### Recherche de structures fongiques = biomarqueurs

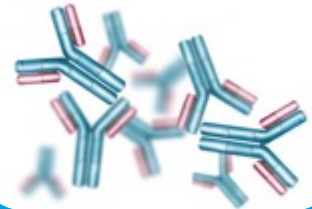


### Techniques de biologie moléculaire



## Recherche d'une réponse de l'hôte vis-à- vis du champignon

### Techniques sérologiques



## Techniques de biologie moléculaire



### Avantages



**Applicable à tous les tissus, tous les fluides et tous les pathogènes**

**Très spécifique**

- Dépend de la cible utilisée

**Très sensible**

- Faible quantité d'ADN cible dans le prélèvement



### Inconvénients

**Trop sensible ?**

- Signification de la présence d'ADN

**Trop spécifique**

- On ne trouve que ce que l'on cherche

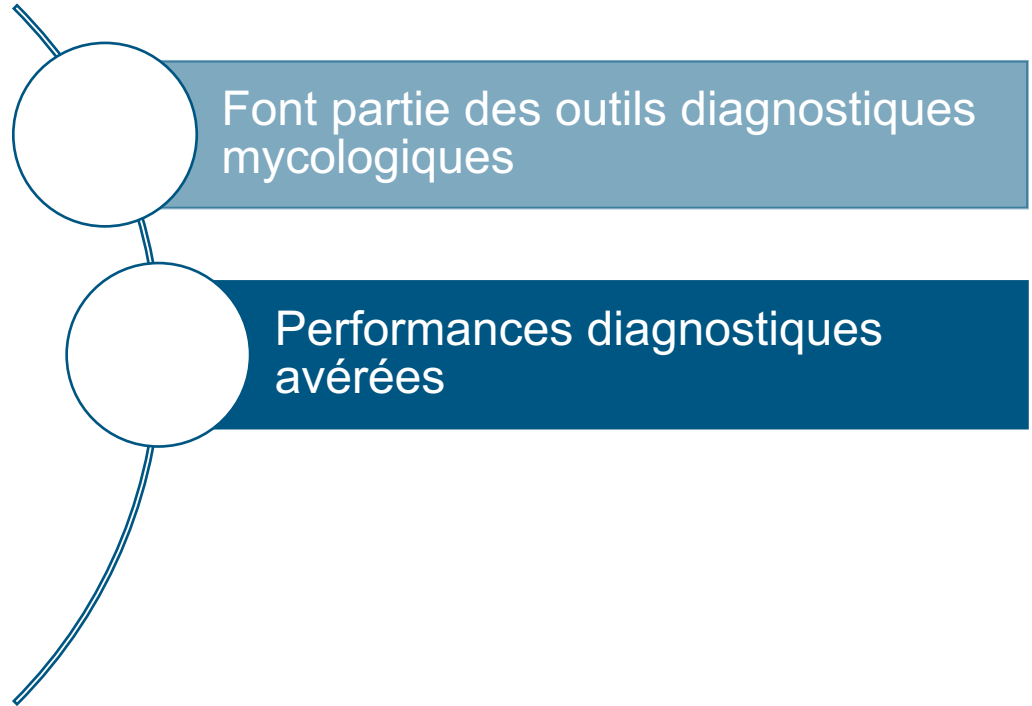
**Contraintes techniques**

- Importance de l'extraction ADN



## Pourquoi s'intéresser aux PCR fongiques ?

---



# Performances diagnostiques

**Sensibilité /  
Spécificité**



# PCR sur sérum



## PCR *Aspergillus* sur sérum

### Méta-analyse :

Se cumulée : **79,2%**

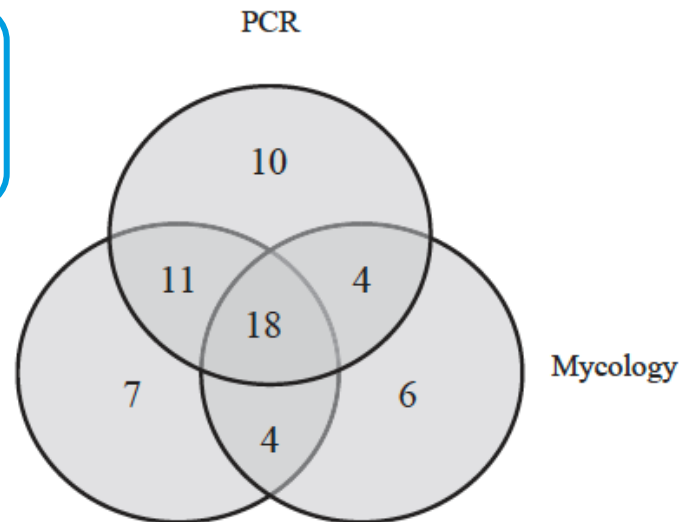
Sp cumulée : **79,6%**

### Combinaison avec le GM sérique :

Se : **90%**

Crucinani, Cochrane database, 2019

Galactomannan  
index



Imbert, Clin Microbiol Infect, 2016

# PCR sur sérum / sang total

---



PCR *Mucorales* sur sérum

Se : 81 – 92 % selon  
le volume utilisé

Millon, CMI, 2016

PCR *Fusarium* sur sérum

Se : 93 % pour cas  
prouvés

Dellière, Med Mycol,  
2022 (Submitted)

PCR *Candida* sur sang total

Se : 33 – 100 %  
Sp : 91,8 – 96 %

White, Expert Rev  
Mol Diagn, 2022



# PCR sur prélèvements respiratoires



## PCR *A. fumigatus* sur LBA

Imbert, Front Microbiol, 2018

Clinical form	Method	Number of samples with result		Sensitivity (%)	p-value <sup>a</sup>	Specificity (%)	p-value <sup>a</sup>	Positive predictive value (%)	Negative predictive value (%)
		Positive	Negative						
All aspergillosis	PCR	41	7	85.4		97.2		71.9	98.7
	GM	20	25	44.4	<0.001	97.9	0.41	64.5	95.4
	Mycology (direct examination) <sup>b</sup>	32 (15)	14 (31)	69.6	0.06	96.4	0.45	61.5	97.4
Invasive aspergillosis	PCR	31	4	88.6		95.5		54.4	99.3
	GM	18	14	56.3	0.003	97.6	0.05	58.1	97.4
	Mycology (direct examination)	21 (11)	12 (22)	63.6	0.01	94.5	0.44	40.4	97.8

**Excellente VPN**  
**VPP médiocre (colonisation transitoire, formes non invasives)**

# PCR sur prélèvements respiratoires



## PCR Mucorales sur LBA

**Sensibilité 100 %**  
**Spécificité 97 %**

Scherer, JCM, 2018

**Groupe à très haut risque**

Test method	Sensitivity	Performance characteristics (%)			
		Specificity	PPV	NPV	DOR (95% CI)
Culture AND/OR cytology	35 (13/37)	98 (99/101)	87	81	26.8 (6.3-NA)
GM BAL $\geq 0.5$	81 (30/37)	78 (79/101)	58	92	15.4 (6.1-39)
GM BAL $\geq 1.0$	49 (18/37)	92 (93/101)	69	83	11 (4.3-28.5)
PCR <i>Aspergillus</i>	27 (10/37)	91 (92/101)	53	77	3.79 (1.4-10)
PCR <i>Mucorales</i>	5 (2/37)	95 (96/101)	29	73	1.1 (0-5.2)
PCR panfungal <sup>a</sup>	14 (5/37)	99 (100/101)	83	76	15.6 (2.3-NA)

**IFI en général**

**VPP médiocre**

Wehrle-Wieland, Mycoses, 2018

# PCR sur prélèvements respiratoires

## PCR *Pneumocystis* sur LBA et lavage oro-pharyngé

### Méta-analyse

TABLE 2. Pooled test performance of the studies included in our meta-analysis of the diagnosis of PCP using PCR

Study subjects or method	No. of articles	No. of studies	SEN	SPE	PLR	NLR	AUC <sup>b</sup>
Whole population	13	20	0.99 (0.96–1.00) <sup>a</sup>	0.90 (0.87–0.93)	10.2 (7.8–13.4)	0.01 (0.00–0.04)	0.98 (0.96–0.99)
AIDS population	10	16	0.99 (0.98–1.00)	0.91 (0.86–0.95)	11.5 (6.9–19.3)	0.01 (0.00–0.03)	0.99 (0.98–1.00)
Non-AIDS population	5	8	0.99 (0.33–1.00)	0.92 (0.90–0.94)	12.2 (9.6–15.6)	0.01 (0.00–2.10)	0.95 (0.93–0.97)
BALF PCR	8	11	1.00 (0.98–1.00)	0.88 (0.82–0.92)	8.0 (5.4–11.7)	0.01 (0.00–0.02)	1.00 (0.98–1.00)
OW PCR	4	5	0.76 (0.60–0.87)	0.93 (0.88–0.96)	10.4 (5.4–19.8)	0.26 (0.14–0.47)	0.94 (0.92–0.96)

Lu, JCM, 2011

# PCR sur autres matrices

## PCR *A. fumigatus* sur LCR

**Sensibilité 75%**  
**Spécificité 98,3%**

**Alternative à la biopsie  
cérébrale**

**Attention au type d'atteinte**

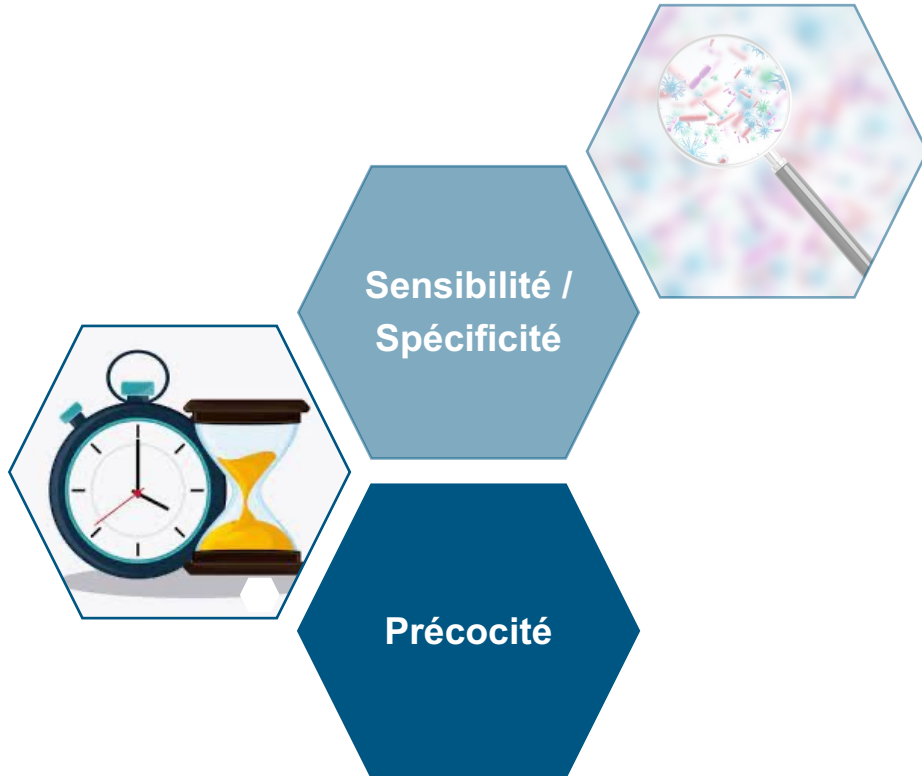
Imbert, CMI, 2017

## PCR sur tissus formolés

Diagnosis from histopathology (no. of specimens)	Species or genus detected by real-time qPCR assay (no. of specimens)
Aspergillosis (59)	<i>A. fumigatus</i> (9), <i>A. flavus</i> (20), <i>A. terreus</i> (1), <i>A. niger</i> (1), <i>F. oxysporum</i> (4), <i>F. solani</i> (1), <i>R. oryzae</i> (1)
Mucormycosis (29)	<i>R. oryzae</i> (7), <i>Mucor</i> (3), <i>R. microsporus</i> (1), <i>A. flavus</i> + <i>Mucor</i> (2), <i>A. flavus</i> + <i>R. oryzae</i> (1), <i>A. flavus</i> (2), <i>Syncephalastrum</i> (1), <i>Scedosporium</i> (1)
Concomitant aspergillosis and mucormycosis (4)	<i>A. flavus</i> (2), <i>Mucor</i> (1), <i>R. oryzae</i> + <i>A. flavus</i> (1)
Unknown (10)	
Total	59

Salehi, JCM, 2016

# Performances diagnostiques

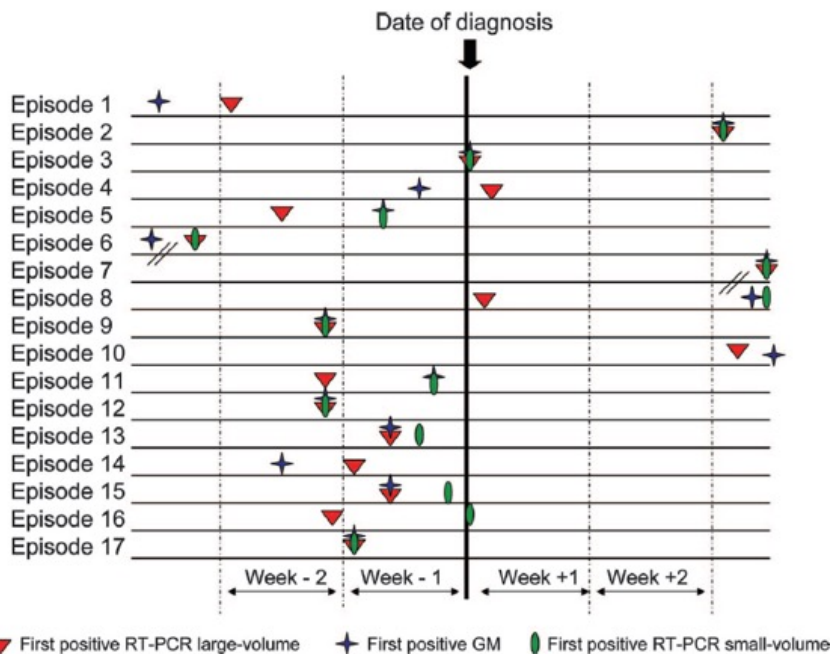


# Précocité diagnostique



## PCR *A. fumigatus* sur sérum

Suarez, JCM, 2008



## PCR *Mucorales* sur sérum

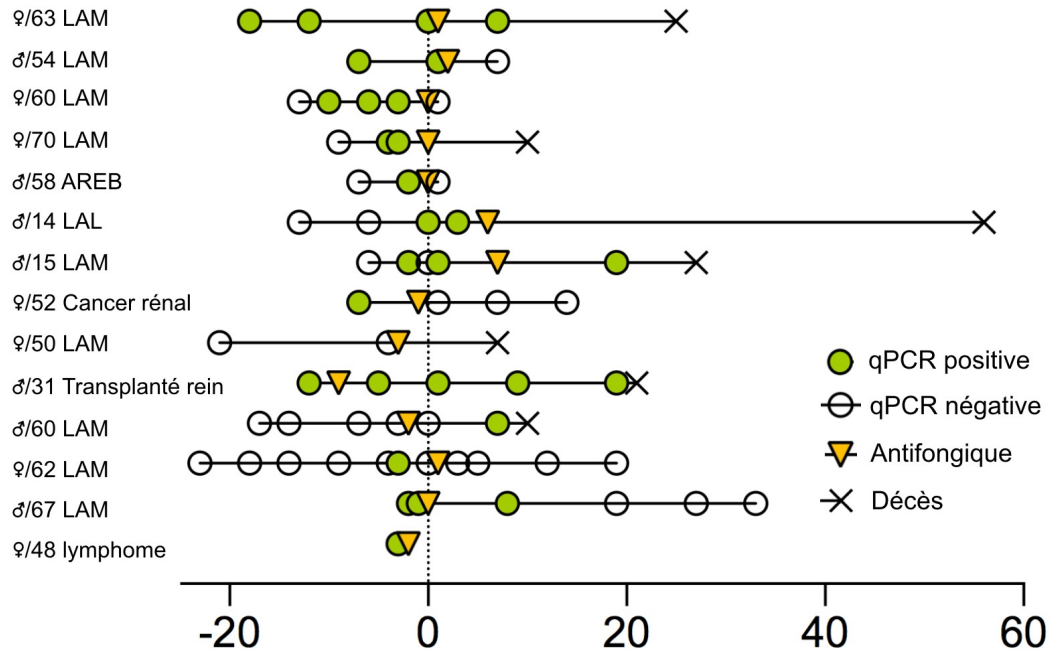
Days From 1st Positive PCR to 1st Clinical Signs <sup>c</sup>	Days From 1st Positive PCR to Positive Histology <sup>d</sup>
/	/
+13	-3
-7	-8
+5	0
-18	-23
+20	-10
-6	-68
0	-18
+20	-4
+1	-49

Millon, CID, 2013

# Précocité diagnostique

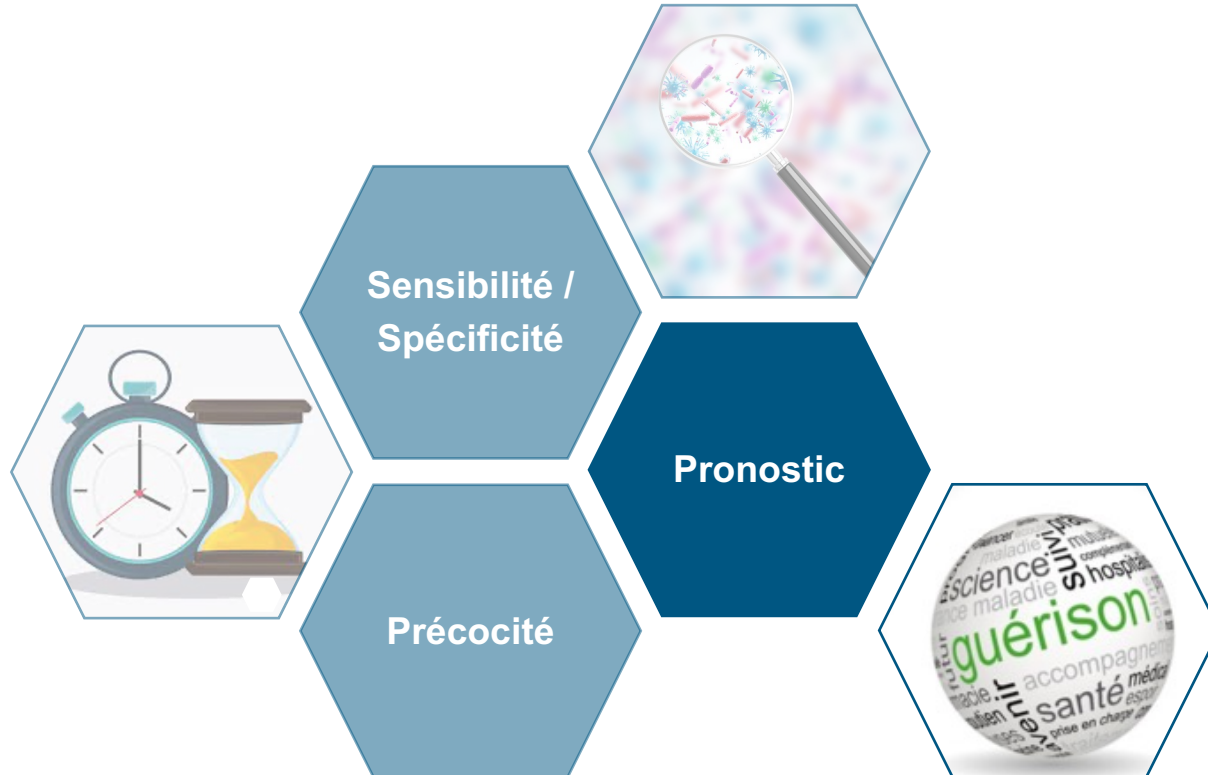


## PCR *Fusarium* sur sérum



Delliere, Med Mycol, 2022, submitted

# Performances diagnostiques



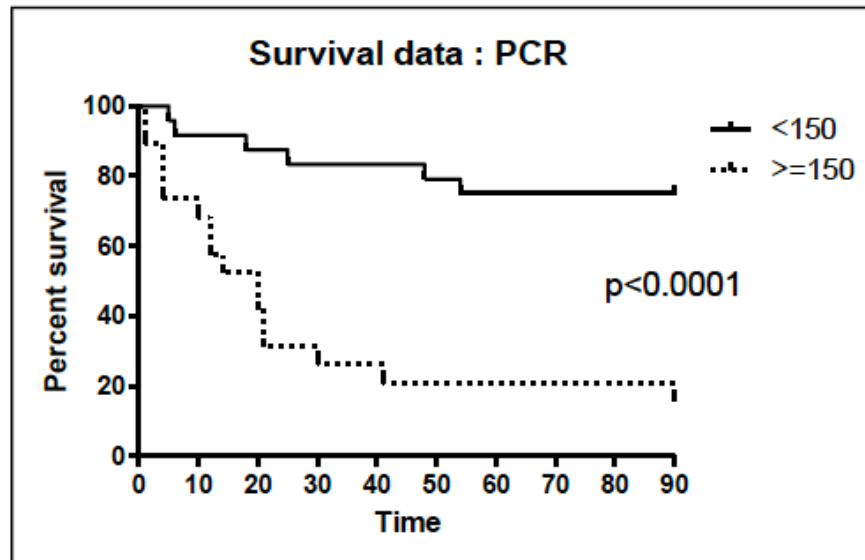


# Intérêt pronostique



## PCR *A. fumigatus* sur sérum

Imbert, CMI, 2016



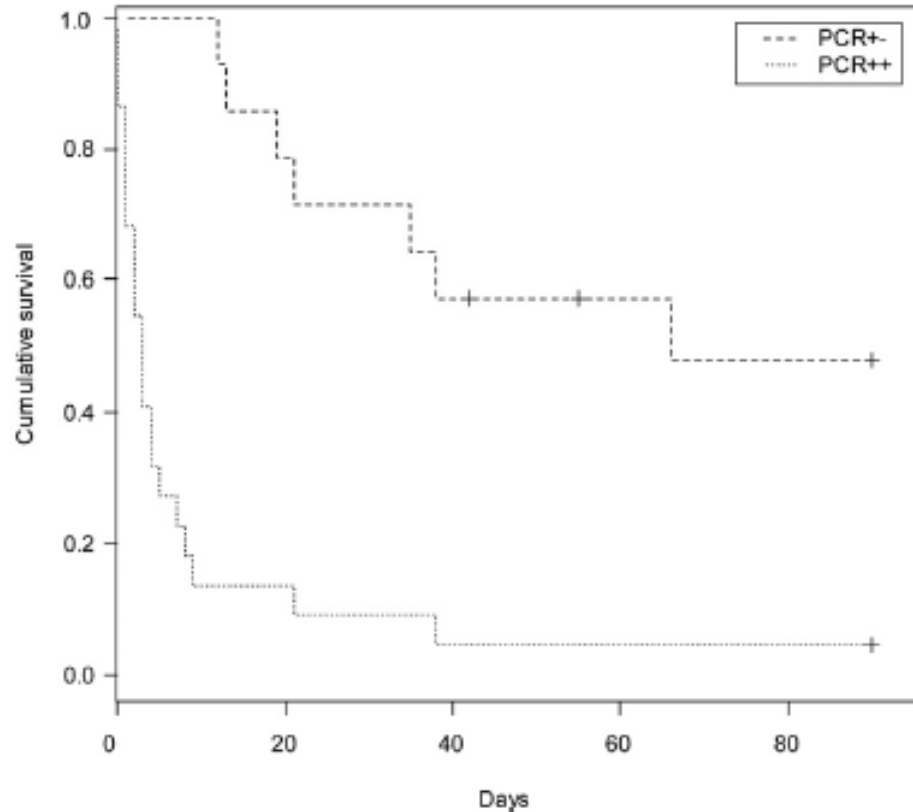
<i>Aspergillus</i> PCR result in serum sampled between days 14 and 20	Outcome at day 30			Outcome at day 90		
	Alive	Dead	p	Alive	Dead	p
Positive	1	4	<0.005	0	5	<0.05
Negative <sup>a</sup>	9	0		7	2	

# Intérêt pronostique

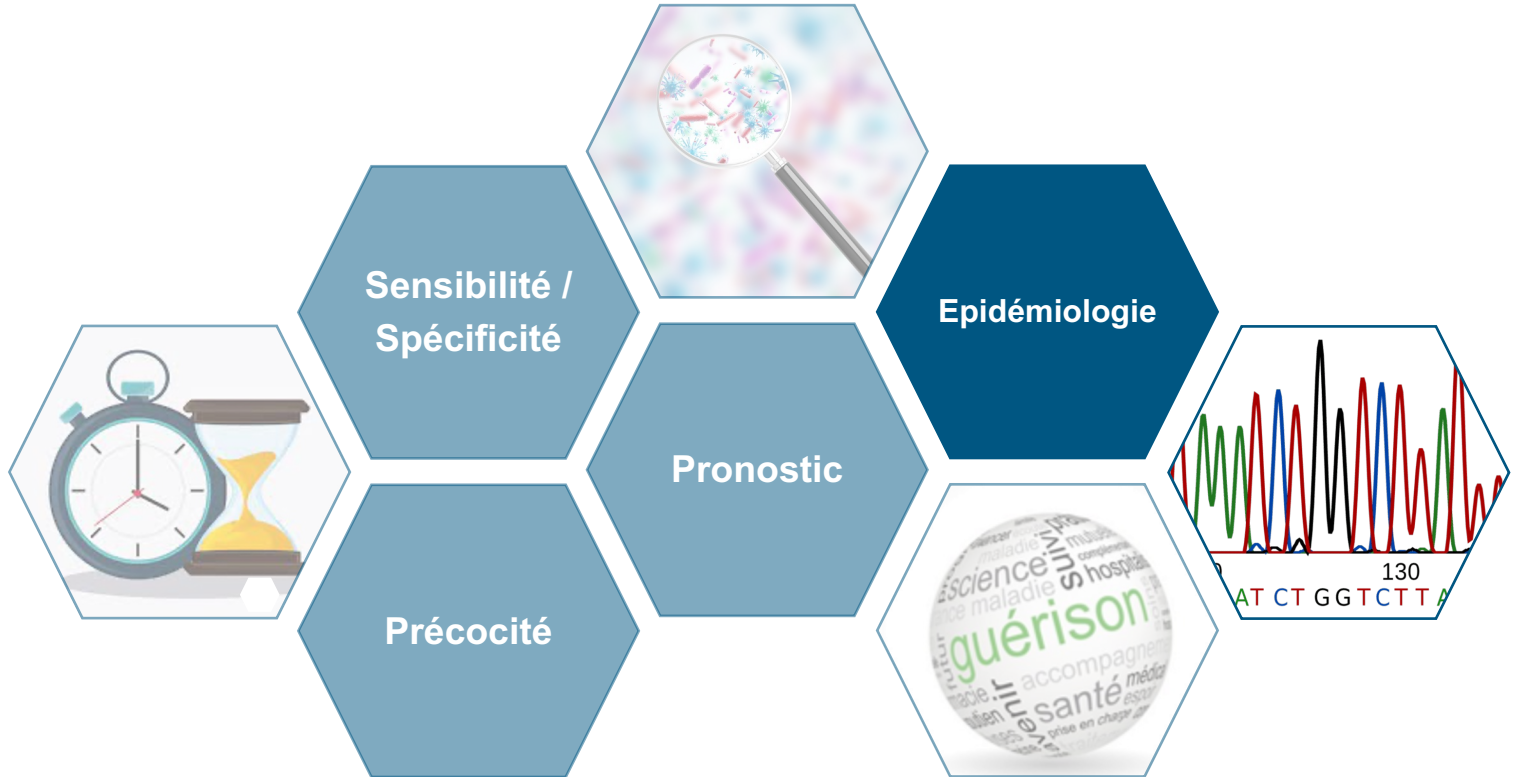


## PCR Mucorales sur sérum

Millon, CMI, 2016



# Performances diagnostiques



# Epidémiologie

Détection de  
coinfections

Détection de résistances  
aux antifongiques




Identification  
d'espèces

V. Rickerts · G. Just-Nübling · F. Konrad · J. Kern ·  
E. Lambrecht · A. Böhme · V. Jacobi · R. Bialek

## Diagnosis of invasive aspergillosis and mucormycosis in immunocompromised patients by seminested PCR assay of tissue samples

*Article*

### Evaluation of Three Commercial PCR Assays for the Detection of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* from Respiratory Samples of Immunocompromised Patients

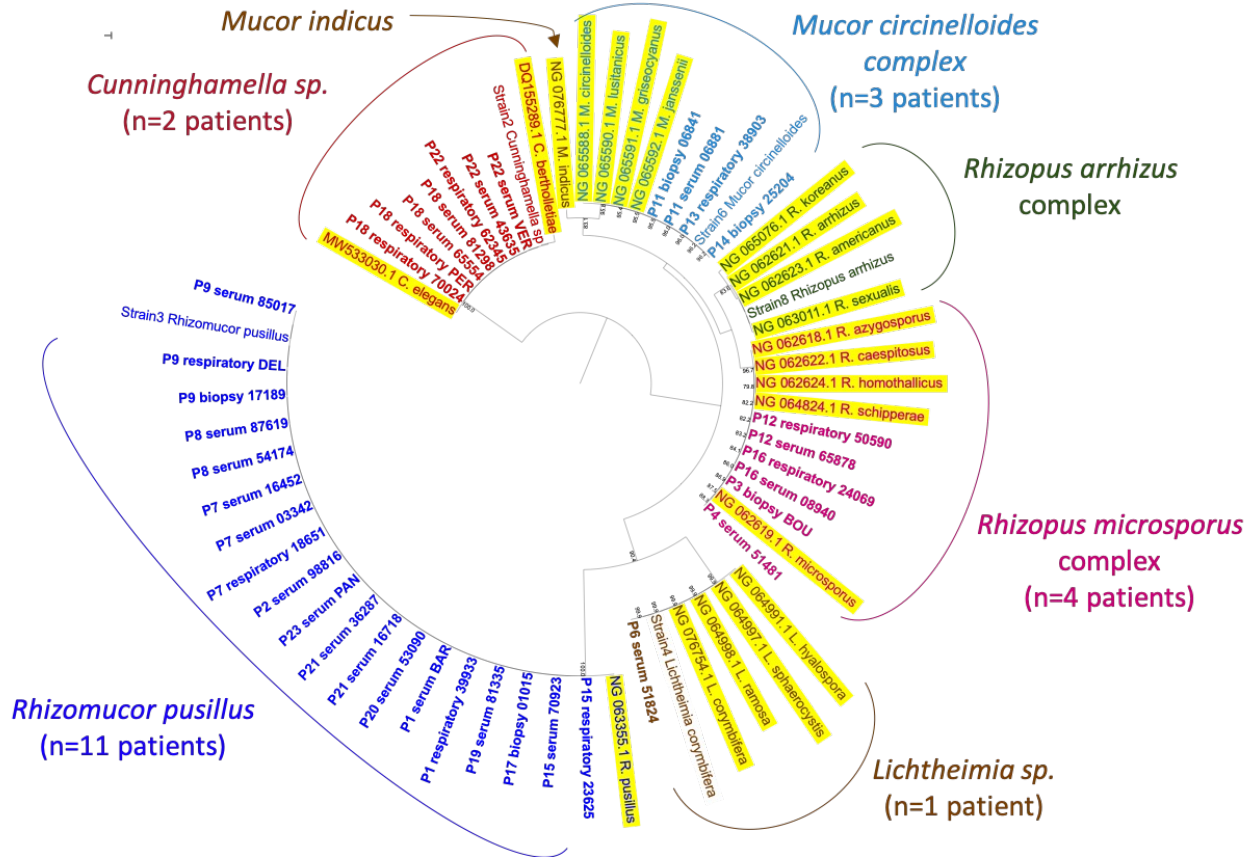
Ulrike Scharmann <sup>1,\*</sup>, Lisa Kirchhoff <sup>1</sup>, Andrea Hain <sup>1</sup>, Jan Buer <sup>1</sup>, Michael Koldehoff <sup>2</sup>, Joerg Steinmann <sup>1,3</sup>  
and Peter-Michael Rath <sup>1</sup>

# Epidémiologie

## Phylogenetic tree rDNA 18S

### 23 patients with mucormycosis

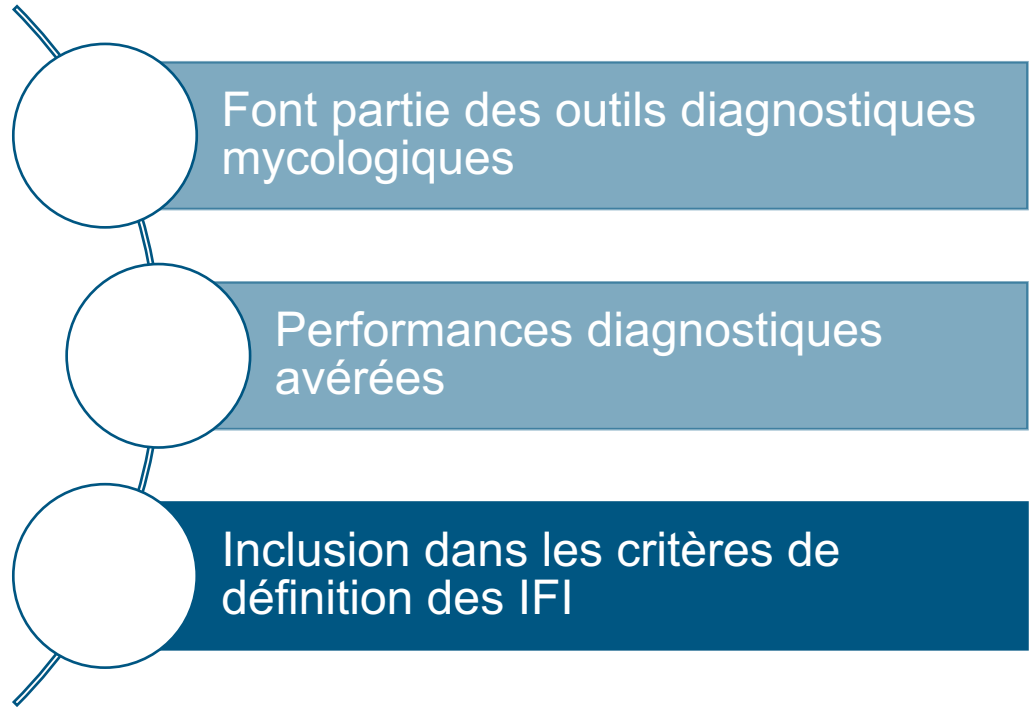
- 19 disseminated
- 4 post traumatic





## Pourquoi s'intéresser aux PCR fongiques ?

---



# Définitions IFI EORTC/MSGERC

Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group

*Clinical Infectious Diseases*  
MAJOR ARTICLE



Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium

**2008 : PCR  
exclue**



**2019 : PCR  
rajoutée**

# IFI prouvées

Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium

**Table 1. Criteria for Proven Invasive Fungal Disease**

Fungus	Microscopic Analysis: Sterile Material	Culture: Sterile Material	Blood	Serology	Tissue Nucleic Acid Diagnosis
Molds <sup>a</sup>	Histopathologic, cytopathologic, or direct microscopic examination <sup>b</sup> of a specimen obtained by needle aspiration or biopsy in which hyphae or melanized yeast-like forms are seen accompanied by evidence of associated tissue damage	Recovery of a hyaline or pigmented mold by culture of a specimen obtained by a sterile procedure from a normally sterile and clinically or radiologically abnormal site consistent with an infectious disease process, excluding BAL fluid, a paranasal or mastoid sinus cavity specimen, and urine	Blood culture that yields a mold <sup>c</sup> (eg, <i>Fusarium</i> species) in the context of a compatible infectious disease process	Not applicable	Amplification of fungal DNA by PCR combined with DNA sequencing when molds are seen in formalin-fixed paraffin-embedded tissue
Yeasts <sup>a</sup>	Histopathologic, cytopathologic, or direct microscopic examination of a specimen obtained by needle aspiration or biopsy from a normally sterile site (other than mucous membranes) showing yeast cells, for example, <i>Cryptococcus</i> species indicating encapsulated budding yeasts or <i>Candida</i> species showing pseudohyphae or true hyphae <sup>d</sup>	Recovery of a yeast by culture of a sample obtained by a sterile procedure (including a freshly placed [ $<24$ hours ago] drain) from a normally sterile site showing a clinical or radiological abnormality consistent with an infectious disease process	Blood culture that yields yeast (eg, <i>Cryptococcus</i> or <i>Candida</i> species) or yeast-like fungi (eg, <i>Trichosporon</i> species)	Cryptococcal antigen in cerebrospinal fluid or blood confirms cryptococcosis	Amplification of fungal DNA by PCR combined with DNA sequencing when yeasts are seen in formalin-fixed paraffin-embedded tissue



# IFI probables

## Critères mycologiques

### Aspergillose invasive

*Aspergillus* PCR

Any 1 of the following:

Plasma, serum, or whole blood 2 or more consecutive PCR tests positive

BAL fluid 2 or more duplicate PCR tests positive

At least 1 PCR test positive in plasma, serum, or whole blood and 1 PCR test positive in BAL fluid

### Pneumocystose

Detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA by quantitative real-time polymerase chain reaction in a respiratory tract specimen

### Candidose invasive

Positive T2Candida<sup>a</sup>

Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium

**Autres IFIM  
et mycoses endémiques**

**PCR non incluse**



## Comment interpréter les PCR fongiques ?

---



... de la PCR utilisée et du germe ciblé

# Multitude de PCR existantes

Pan-fongique

Spécifique d'un ordre

Ex : Mucorales

Spécifique d'un genre

Ex : *Aspergillus spp.*  
*Fusarium spp.*  
*Candida spp. ...*

Spécifique d'espèce

Ex : *A. fumigatus*  
*A. terreus*, *C. auris*,  
*P. jiroveci ...*

Bonne connaissance  
des outils utilisés

PCR multiplex  
Plusieurs cibles

Multiples combinaisons  
possibles

# Performances par pathologie

	<b>Aspergillose invasive</b>	<b>Pneumocystose</b>	<b>Mucormycose</b>	<b>Candidose invasive</b>
<b>PCR disponibles</b>	Commercial / maison Genre / spécifique d'espèce / mutations	Commercial / maison Quantitative Mutations	Commercial / maison Ordre / Genre	Commercial / maison Quelques espèces
<b>Performances diagnostiques</b>	+++	+++	+++	+/-
<b>Inclusion dans les recommandations</b>	EORCT/MSGERC, ECIL, ESCMID, ATS, CAPA ...	EORCT/MSGERC, ECIL ...	-	T2 <i>Candida</i> (EORTC/MSGERC)

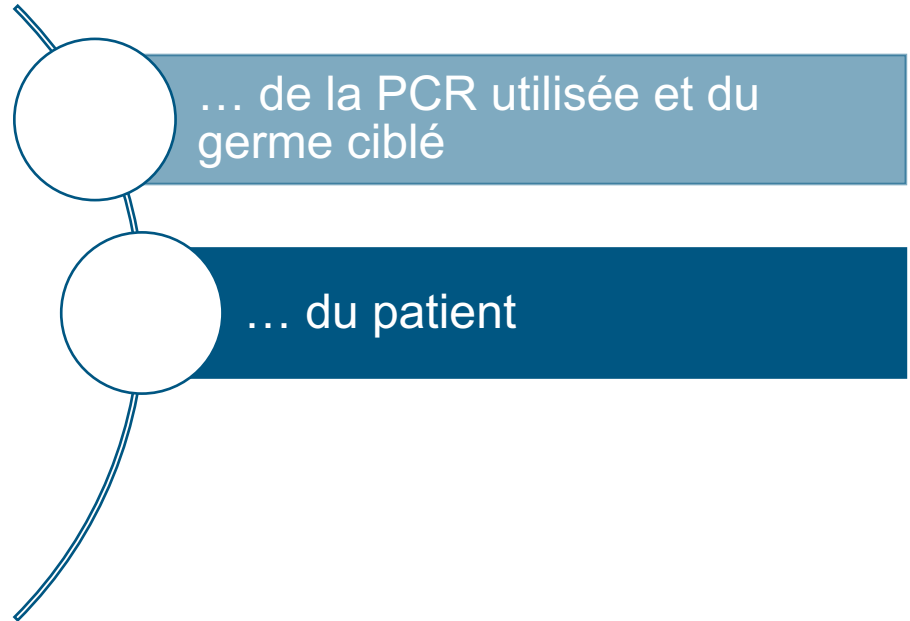
# Performances par pathologie

	Autres moisissures	Cryptococcose	Mycoses endémiques	<i>Pan-fongique</i>
PCR disponibles	Maison ( <i>Fusarium spp.</i> )	Panels méningés	Maison ( <i>Histoplasma capsulatum</i> )	Maison / Commercial
Performances diagnostiques	++	-	++	+/-
Inclusion dans les recommandations	-	-	-	Sur tissus



## Comment interpréter les PCR fongiques ?

---



# Effets du terrain



## PCR *A. fumigatus* sur sérum

Imbert, Clin Microbiol Infect, 2016

Method	Neutrophil status	Group	No. of samples with result		Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value	p <sup>b</sup>	
			Positive	Negative						
	Neutropenic	IA	23	5	82.1	98.1	74.2	98.8	0.09	Compared to nonneutropenic
		Non-IA	8	409					0.09	
	Nonneutropenic	IA	20	12	62.5	99.4	87	97.5		Compared to nonneutropenic
		Non-IA	3	461						

Meilleure sensibilité chez les patients neutropéniques (= galactomannane)

# Effets de la prophylaxie antifongique



## PCR *A. fumigatus* sur sérum

Cruciani, JAC, 2021

Parameter	Positivity threshold: 1 positive PCR test		Positivity threshold: $\geq 2$ positive PCR tests	
	prophylaxis	no prophylaxis	prophylaxis	no prophylaxis
Incidence, n/N (%)	164/1373 (11.94)	216/1156 (18.68) <sup>a</sup>	155/1356 (11.43)	72/401 (17.96) <sup>a</sup>
Sensitivity (95% CI)	0.83 (0.72–0.91)	0.81 (0.70–0.88)	0.67 (0.51–0.79)	0.70 (0.50–0.84)
Specificity (95% CI)	0.60 (0.43–0.75)	0.86 (0.75–0.92) <sup>b</sup>	0.86 (0.71–0.93)	0.98 (0.91–0.99) <sup>c</sup>
DOR (95% CI)	7.60 (3.77–15.31)	25.69 (13.32–49.54) <sup>d</sup>	11.80 (4.39–31.69)	98.06 (20.79–462.60) <sup>e</sup>
LR positive (95% CI)	2.10 (1.30–2.90)	5.72 (2.64–8.79)	4.62 (1.21–8.02)	30.29 (NE–72.30)
LR negative (95% CI)	0.28 (0.14–0.41)	0.22 (0.12–0.32)	0.39 (0.23–0.56)	0.31 (0.13–0.49)
PPV (95% CI)	0.22 (0.15–0.28)	0.57 (0.38–0.67)	0.37 (0.13–0.51)	0.87 (NE–0.94)
NPV (95% CI)	0.96 (0.95–0.98)	0.95 (0.93–0.97)	0.95 (0.93–0.97)	0.94 (0.90–0.97)

Pas de modification de la  
sensibilité ( $\neq$  galactomannane)  
Perte de VPP ++



# Effet du site d'infection



## PCR *Mucorales* sur sérum

Se : 81 – 92 % selon  
le volume utilisé

Millon, CMI, 2016

DNA load, according to the species detected and to clinical forms and I

Quantitative PCR assays	Positive qPCR number of patients (median of minimal Cq)	Negative qPCR number of patients (Cq)
All assays		
Clinical form		
Disseminated	12 (30,5)	2 (>45)
Pulmonary	15 (32)	2 (>45)
Rhinocerebral	7 (35)	1 (>45)
Cutaneous	1 (28)	3 (>45)
Host factors		
Neutropenia	26 (30)	2 (>45)
High-dose corticosteroids	13 (30)	2 (>45)
HSCT	10 (33)	3 (>45)



## Comment interpréter les PCR fongiques ?

---



- ... de la PCR utilisée et du germe ciblé
- ... du patient
- ... du site de prélèvement

# Différences selon le prélèvement

---

## Champignons : pathogènes opportunistes

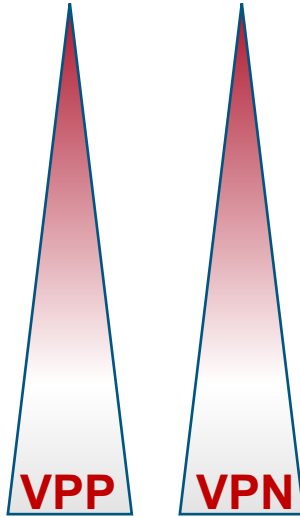
- Sites stériles (biopsies profondes, sérum, LCR) : VPP +++
- Autres sites :

## Prélèvements respiratoires

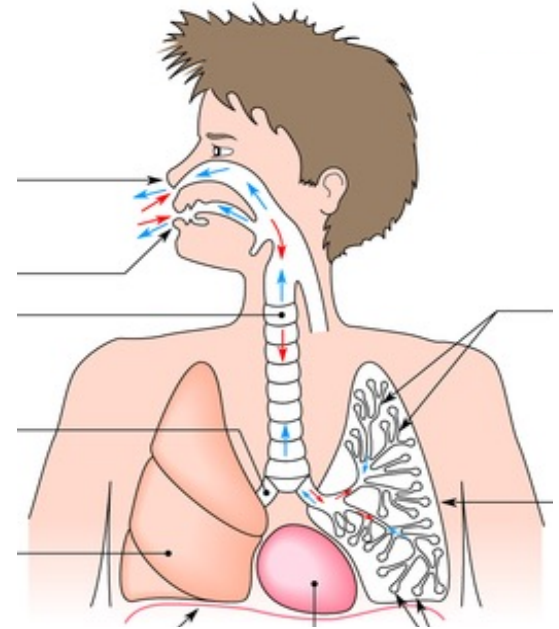
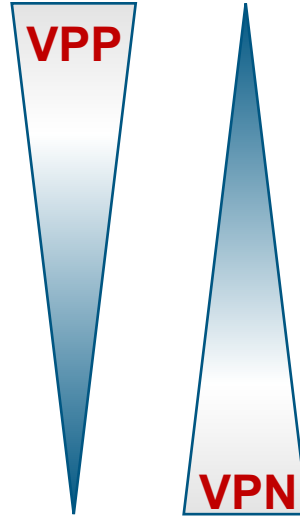
- LBA +++
- Site de l'infection

# Différences selon le prélèvement respiratoire

PCR *Aspergillus*



PCR *Pneumocystis*



# Interprétation des PCR fongiques

---

**Performances  
microbiologiques  
≠  
Performances cliniques**

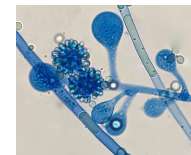
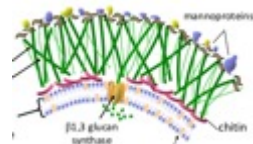
**Interprétation avec les autres outils diagnostiques**

**Interprétation en fonction du contexte clinique / patient / traitement ...**

# Importance des stratégies diagnostiques



**Bonne connaissance de l'épidémiologie**



**Bonne connaissance des outils diagnostiques**



**Mise en place de stratégies diagnostiques**

- Criblage des patients à risque
- Diagnostic ciblé

# Exemple pour les PCR *Aspergillus* et Mucorales



Screening

	Sérum
Très haut risque	+++
Transplantés pulmonaires	-
Autres patients	-

Si positif : contrôler sur un 2<sup>e</sup> sérum

PCR *Aspergillus* : Combinaison avec un GM + => forte VPP

# Exemple pour les PCR *Aspergillus* et Mucorales



Screening

	Sérum	LBA	Autres « respi »
Très haut risque	+++	-	-
Transplantés pulmonaires	-	++	-
Autres patients	-	-	-

Risque flore environnementale sur  
prélèvements respiratoires « hauts »  
Faible VPP



# Exemple pour les PCR *Aspergillus* et Mucorales



Screening

Ciblé

	Sérum
Très haut risque	+++
Transplantés pulmonaires	-
Autres patients	-
Neutropéniques	+++
Non neutropéniques	<i>Aspergillus</i> +/- Mucorales ++

PCR *Aspergillus* sérique négative chez non neutropénique ≠ absence d'AI

PCR Mucorales sérique : bonne VPN (sauf formes cutanées)

# Exemple pour les PCR *Aspergillus* et Mucorales



Screening

Ciblé

	Sérum	LBA	Autres « respi »
Très haut risque	+++	-	-
Transplantés pulmonaires	-	++	-
Autres patients	-	-	-
Neutropéniques	+++	+++	+/-
Non neutropéniques	<i>Aspergillus</i> +/- Mucorales ++	+++	+/-

Excellente VPN pour les IFI pulmonaires

Combinaison avec un sérum + : forte VPP

# Exemple pour les PCR *Aspergillus* et Mucorales



Screening

Ciblé

	Sérum	LBA	Autres « respi »	Sites « stériles »
Très haut risque	+++	-	-	
Transplantés pulmonaires	-	++	-	
Autres patients	-	-	-	
Neutropéniques	+++	+++	+/-	+++
Non neutropéniques	<i>Aspergillus</i> +/- Mucorales ++	+++	+/-	+++

# Exemple pour les PCR *Aspergillus* et Mucorales



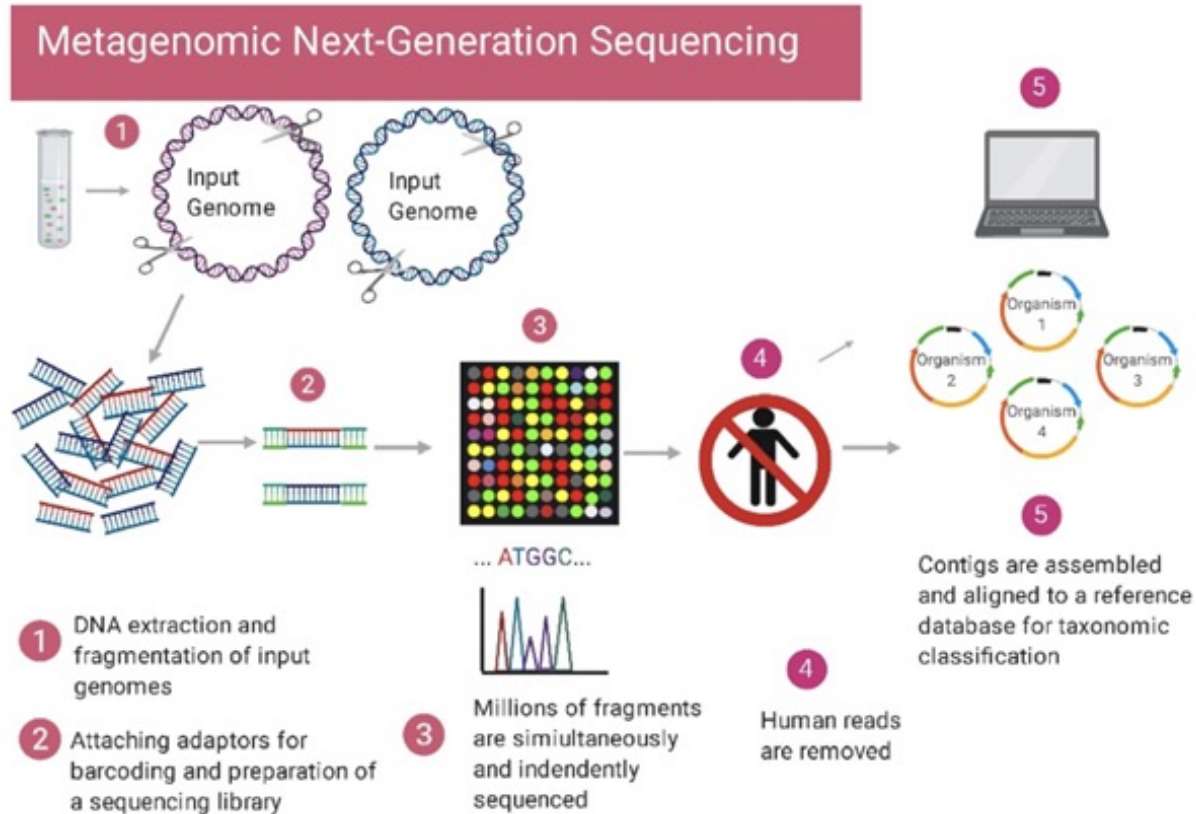
Screening

Ciblé

Suivi

	Sérum	LBA	Autres « respi »	Sites « stériles »
Très haut risque	+++	-	-	
Transplantés pulmonaires	-	++	-	
Autres patients	-	-	-	
Neutropéniques	+++	+++	+/-	+++
Non neutropéniques	<i>Aspergillus</i> +/- Mucorales ++	+++	+/-	+++
Tous les patients	<b>Jusqu'à négativation</b>	Si prélèvements effectués : jusqu'à négativation		

# Evolution du diagnostic moléculaire : mNGS



# Conclusions

## Outils moléculaires = renforcement de l'arsenal diagnostique des IFI

Amélioration du diagnostic  
(mucormycoses ++)

**Complémentaires** des autres outils  
mycologique

Diagnostic plus précoce  
Possibilités importantes de combinaison  
des cibles

## Importance d'une bonne connaissance de l'outil moléculaire

Les performances des PCR ne sont pas  
forcément comparables

Interprétation du résultat variable selon la  
matrice et le terrain du patient



**Dialogue clinico-  
biologique +++**