

Intérêt des nouvelles techniques de diagnostic et d'identification pour la prise en charge des mycoses invasives

Marie-Elisabeth Bougnoux

Unité de Paraitologie-mycologie, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris

Unité Biologie et pathogénicité Fongiques,

Institut Pasteur, Paris

Changement radical et récent dans différents aspects de la prise en charge des patients à risque d'infections fongiques

- Nouvelles molécules antifongiques
 - spectres plus spécifiques sur les levures et les moisissures
- Amélioration de l'évaluation et de la stratification du risque d'infections fongiques chez les patients immunodéprimés

Diagnostic mycologique des infections fongiques invasives

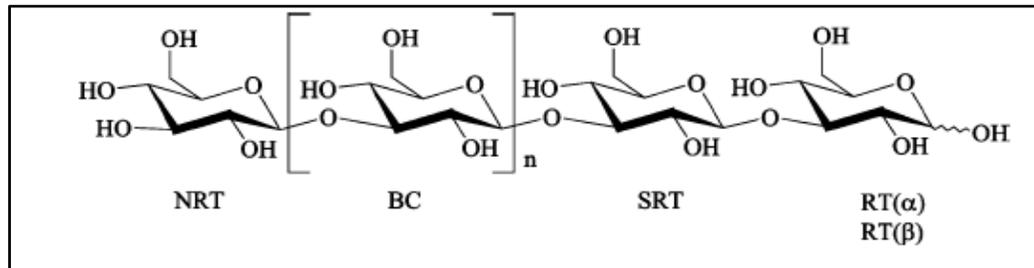
- **Précoce** : retard de 12 à 48H à l'administration d'ATF associé à une augmentation de la mortalité
(Garey K et coll CID 2006, Labelle A crit Care Med 2008)
 - **Précis** : patients ayant reçu un traitement antifongique adéquate : augmentation de la survie (Morell M et coll AAC 2005 et Parkins M et coll. JAC 2007- – Hsu JL. Crit Rev Microbiol 2011)
- marqueurs sériques : stratégie diagnostique pro-active chez les patients à très haut risque
- méthodes d'identification rapides et précises des champignons

Le diagnostic mycologique des infections fongiques doit-être précoce et précis

- Marqueurs sériques
 - ADN et antigènes polysaccharidiques : galactomannane, mannane et **béta-glucane**
 - : indications & Interprétation
- Identification rapide et précise des champignons
 - Réduire le délai et améliorer la précision des identifications des espèces fongiques :
 - identification moléculaire
 - **spectrométrie de masse MALDI TOF**

Béta 1-3 D glucane (BDG)

- Critères diagnostiques IFI probables
(critères EORTC révisés 2008, De Pauw B. et coll, CID 2008)
- Origine ?
- Quelles infections ?
- Élimination ?
- Comment l'utiliser, quand le prescrire ?



Longues chaînes de résidus glucose liées en β 1-3 et en β 1-6

BDG : composant pariétal majeur d'un grand nombre d'espèces fongiques

→ **sauf zygomycètes**

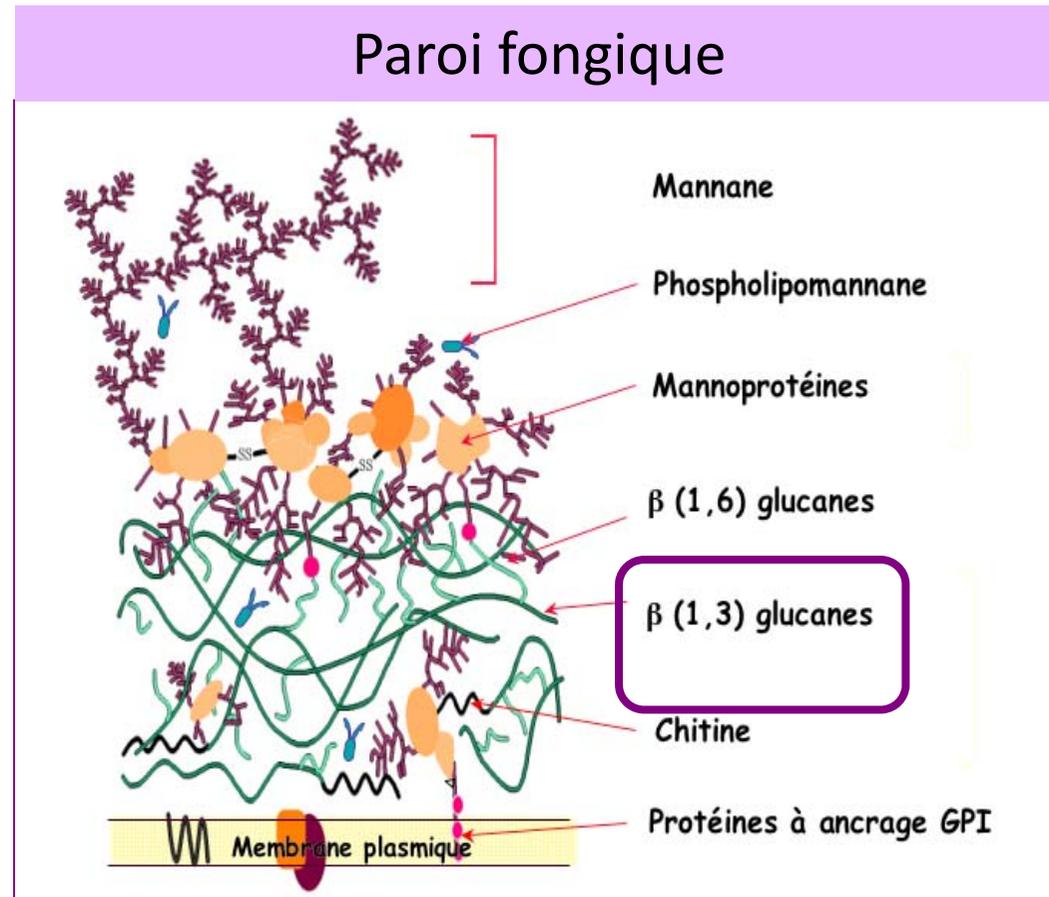
• **Test Fungitell® :**

→ Détection : β 1-3-D-glucanes

→ Infections dues à :

Candida sp., *Aspergillus* sp., *Pneumocystis jirovecii* (kystes), *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Scedosporium* sp., *Histoplasma capsulatum*, *Trichosporon* sp.

→ Non détectables dans les infections dues à *Cryptococcus neoformans* et à des



Miyazaki T et al. *J Clin Microbiol* 1995 - Obayashi T et al. *Lancet* 1995 - Pazos C et al. *J Clin Microbiol* 2005 - Mitsutake KT et al. *J Clin Microbiol* 1996 - Marty H. & Koo S, *Med Myco* 2009 - Nakase K. et coll. *Int J Inf Dis* 2012 - Rivière S et coll. *AM J Trop Med* 2012

BD Composant pariétal majeur d'un grand nombre d'espèces fongiques

→ **Sa**

• Test Fungite

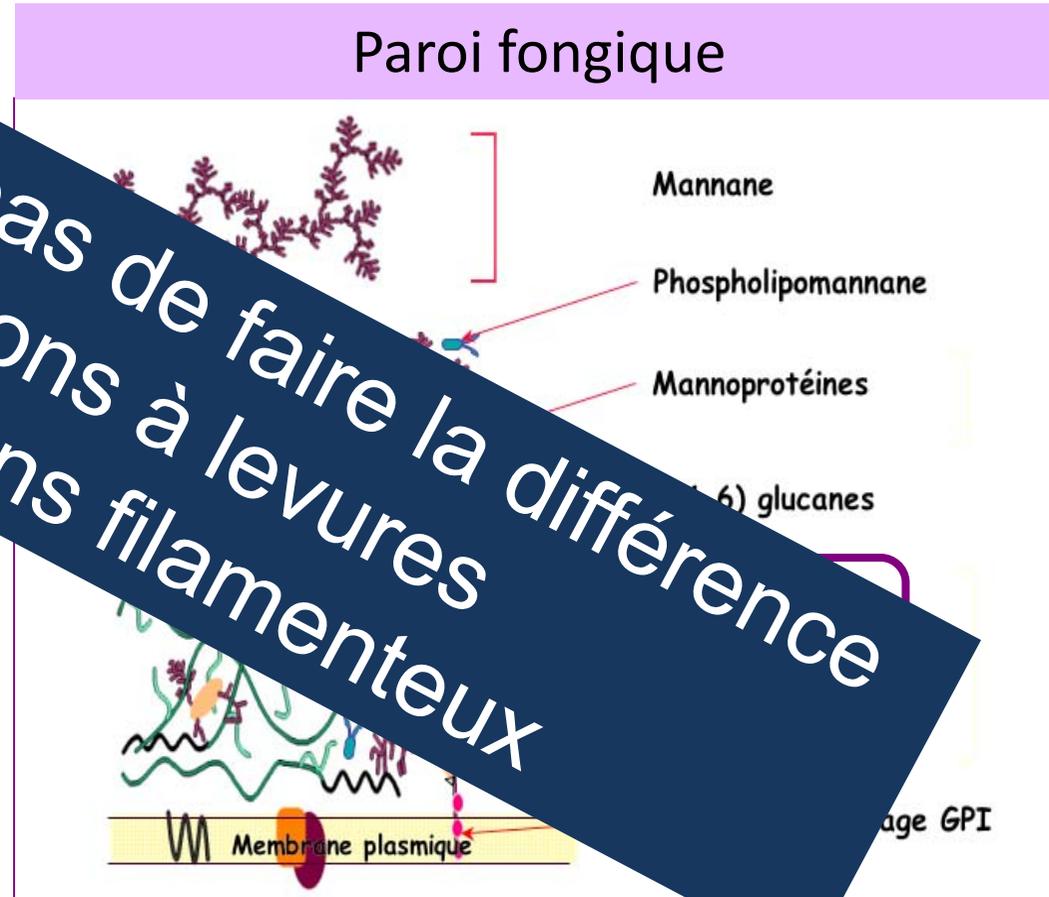
→ Détection : β 1-3-D-gluc

→ Infections dues à

Candida sp., *Aspergillus* sp., *Pneumocystis jirovecii* (kystes), *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Scedosporium* sp., *Histoplasma capsulatum*, *Trichosporon* sp.

→ Non détectables dans les infections dues à *Cryptococcus neoformans* et à des

Ce test ne permet pas de faire la différence entre infections à levures ou à champignons filamenteux



Miyazaki T et al. *J Clin Microbiol* 1995 - Obayashi T et al. *Lancet* 1995 - Pazos C et al. *J Clin Microbiol* 2005 - Mitsutake KT et al. *J Clin Microbiol* 1996 - Marty H. & Koo S, *Med Myco* 2009 - Nakase K. et coll. *Int J Inf Dis* 2012 - Rivière S et coll. *AM J Trop Med* 2012

BDG : composant pariétal majeur d'un grand nombre d'espèces fongiques

→ sauf zygomycètes

•Test Fungitell® :

→ Détecte β 1-3-D-glucanes

→ Infections dues à
Candida sp., *Aspergillus* sp.,
Pneumocystis jirovecii (kystes), *Fusarium*
sp. , *Paecilomyces* sp., *Scedosporium*
sp., *Histoplasma capsulatum*,
Trichosporon sp.

→ Non détectables dans les infections
dues à *Cryptococcus neoformans*

Valeurs intrinsèques du test

→ Sensibilité : 77,8%
(68% AI, 85% CI, 100% PCP)

→ Spécificité :
- donneurs sang : 92%
- patients à risque : 70,5%

BDG : Problème de spécificité

hypothèses faux positifs → +/- confirmées

- **Réactivités croisées avec des substances d'origine iatrogène**
 - membrane de cellulose : hémodialyse
 - compresses : chirurgie
 - Immunoglobulines IV, ABT (amoxicillin-clavulanic)
- **Réactivités croisées avec d'autres microorganismes :**
 - Bactéries : patients bactériémiques ou inf bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa*)
 - colonisation multiple à *Candida* sp.

Miyazaki T et al. *J Clin Microbiol* 1995; Obayashi T et al. *Lancet* 1995; Mitsutake KT et al. *J Clin Microbiol* 1996 ; Pazos C et al. *J Clin Microbiol* 2005 ; Vlieger G et al; *JCM* 2011

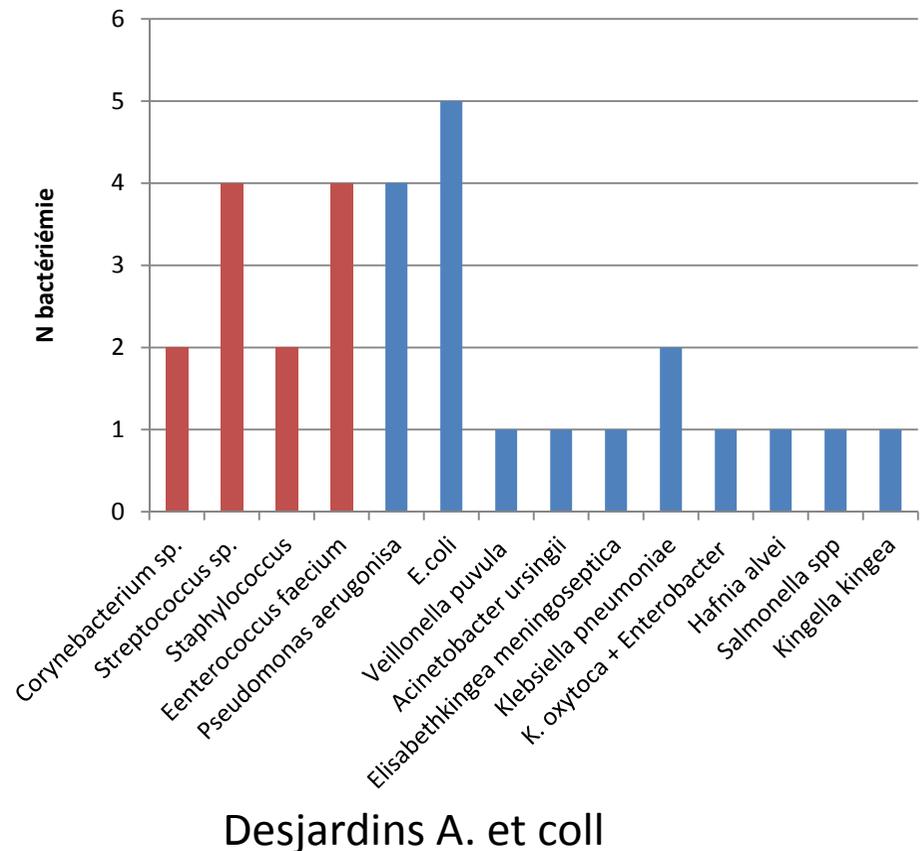
Réactions croisées Bactériémies et BDG ?

Données préliminaires...

Etude prospective Hôpital Necker

- Inclusion :
 - enfants & adultes Hc positives à Gram+ et Gram-
 - BG prélevé dès résultats HC + (délai < 4 jours)
- Exclusion : IFI et IgIV
- Résultats : 27 pts, 30 épisodes
- Tous les BDG négatifs (< 80 pg/ml)

Episodes de bactériémies étudiés



Etude clinique :

Performance diagnostique du glucane (BDG)

- Prospective, monocentrique, 2004-2006
- 871 patients et 1308 prélèvements obtenus au moment de l'épisode
- Infections fongiques : n=116
 - Prouvées n= 80 (44 candidoses, 14 AI, 22 autres)
 - Probables n = 36 (1 candidose, 18 AI, 1 PCP, 4 autres)
 - Possibles n = 93

	Nb patient	Sensitivité	Spécificité	RV +	RV-
IFI vs non IFI	871	71 %	81%	3,71	0,36
Pts hématologie	497	62 %	84 %	4,55	0,44
Greffe de moelle	251	64 %	91%	7,26	0,39
Neutropénie fébrile	212	50 %	90 %	4,86	0,56
Pneumopathie	304	77 %	81 %	4	0,29

Koo S et coll. CID 2009

Facteurs influençant la présence et la concentration sérique de BDG

- **Type d'infection et espèce en cause**

- Structure et poids moléculaire des BDG relargués pendant l'IFI

→ Meilleure performance au cours des Pneumocystoses avec des taux très élevés
+++

- **Facteurs de l'hôte :**

- Degré de neutropénie et d'immunosuppression, charge fongique, organe infecté
- Fonction hépatique et rénale ??
 - la clairance des BG chez l'homme mal connue
 - l'homme ne possède pas de B glucanases
 - BG de faible PM : dépend de la filtration glomérulaire.
 - BG de haut PM apparaissent retenus dans le foie et dégradés par les cellules de Küpffer

Espèces et performances de la détection de BDG chez les patients candidémiques

Espèce	Nombre épisodes de candidémie	sensibilité
Candida sp	92	78,3 %
Candida albicans	36	80,6 %
Candida parapsilosis	18	61,1 %
Candida tropicalis	11	81,8 %
Candida glabrata	26	80,8 %
Candida krusei	3	100 %

Facteurs influençant la présence et la concentration sérique de BDG

- **Type d'infection et espèce en cause**

- Structure et poids moléculaire des BGD relargués pendant l'IFI

→ Meilleure performance au cours des Pneumocystoses avec des taux très élevés
+++

- **Facteurs de l'hôte :**

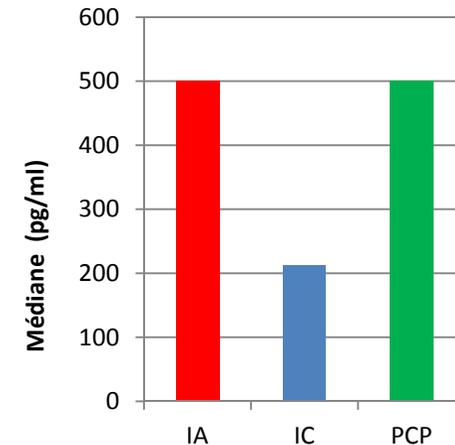
- Degré de neutropénie et d'immunosuppression, charge fongique, organe infecté
- Fonction hépatique et rénale ??
 - la clairance des BG chez l'homme mal connue
 - l'homme ne possède pas de B glucanases
 - BG de faible PM : dépend de la filtration glomérulaire.
 - BG de haut PM apparaissent retenus dans le foie et dégradés par les cellules de Küpffer

Cinétique des BDG au cours du traitement des patients atteints de AI, CI ou PCP

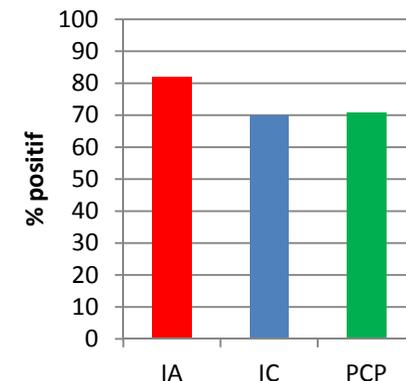
- **Taux initial BG :**
 - n'est pas prédictif du pronostic (évolution clinique ou mortalité à 6S)
- **Cinétique post-diagnostique**
 - S1-S2 : pas de diminution significative du taux des BDG parfois augmentation : évolution des taux non prédictif du pronostic ou de la mortalité à 6S ou 12S
- **Persistence** de la détection à 6 ou 12 semaines

Koo S et coll., CMI 2012

BDG taux initial
IA n=53; IC n= 39; PCP n=18



Fréquence de la détection de BG 6S après début du traitement



BDG : comment le prescrire ?

- Surveillance des patients à haut risque ? :
screening 1 ou 2 fois par semaine ?
- **Patients d'hématologie** : ?
→ Problèmes : clearance lente et dépendante de nombreux facteurs → inutilisable dès la première infection fongique (ni en surveillance, ni en diagnostic), lors de l'utilisation de IgIV
- **Patients de réanimation** : ?

Surveillance du BDG chez les patients à risque de candidose invasive en réanimation chirurgicale

- Prospective monocentrique (Houston), avril 2003 - février 2007
 - 57 pts. H> 48h + signes d'infection
 - Screening : 2 sérums/semaine. (239 sérums, m= 4 sérums/pt (1-11))
- Infections fongiques : 15/57 pts (29%) candidose invasive (CI)
 - 3/15 (20%) CI prouvée → Hc + *C. albicans*
 - 6/15 (40%) probable
 - 6/15 (40%) possible
- 14/57 (25%) patients BDG positif (faux +) à J3 post admission

<i>No. of + BG Samples</i>	<i>Proven N=3</i>		<i>Proven + Probable N=9</i>		<i>Proven + Probable + Possible N=15</i>	
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
1	100	50	91	57	93	61
2	100	59	66	73	73	80
≥ 3	100	67	63	73	71	80

BG : conclusions

- Données nouvelles à confirmer → études indispensables
- analyser la cinétique en fonction/ stratifiant
 - facteurs de l'hôte (fonction rénale et hépatique)
 - type d'infection PCP et de pathogène
- test diagnostique pan-fongique : VPN et VPP ?
- Difficile de proposer « en surveillance systématique »
- Facteur pronostique ? cinétique apparemment lente, dépendant de nombreux facteurs
- Attention BDG est un critère diagnostique des IFI (EORTC/MSG) → essais cliniques !
- Ne permet pas de différencier le type d'IFI : levures/ champignons filamenteux !!

Le diagnostic des pathogènes fongiques doit être précis

- **La documentation** des IFI permet d'utiliser d'emblée un traitement antifongique adapté et le plus efficace.
→ Facteur pronostic essentiel
- La documentation de nombreuses infections, en particulier dues à des champignons filamenteux est actuellement insuffisante

Distribution des espèces d'*Aspergillus* isolées chez des patients AI après greffe de moelle (HSCT) ou transplantation (SOG)

<i>Aspergillus</i> spp.	HSCT (N=149)	SOT (N= 128)
<i>A. fumigatus</i>	36.9	61.7
<i>A. flavus</i>	3.4	10. 2
<i>A. niger</i>	3.4	10.2
<i>A. terreus</i>	0.6	3.1
other spp.	3.4	7.8
unknown spp.*	52.3	7

* Obtenu par histopathologie ou par détection de marqueurs sériques

Le diagnostic des pathogènes fongiques doit être précis

- En fonction des espèces : différences de pathogénicité et de spectre de sensibilité aux antifongiques
 - Certains pathogènes fongiques regroupent plusieurs espèces (*sensus stricto*) -→ *Aspergillus* sp., *Scedosporium* sp., zygomycètes, levures....
 - Procédures conventionnelles de diagnostic mycologique insuffisantes !!
- Il existe actuellement des outils → identification précise (levures et des CH filamenteux)
- Méthodes moléculaires
 - Spectrométrie de masse de type MALDI TOF

Diagnostic mycologique conventionnel :

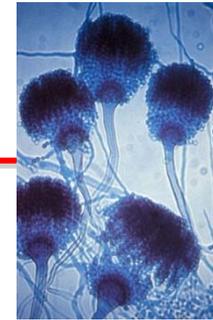
2 limites → long et imprécis

champignons filamenteux : **délai identification : 3 à 7 jours**

Cultures +

3 à 7 jours

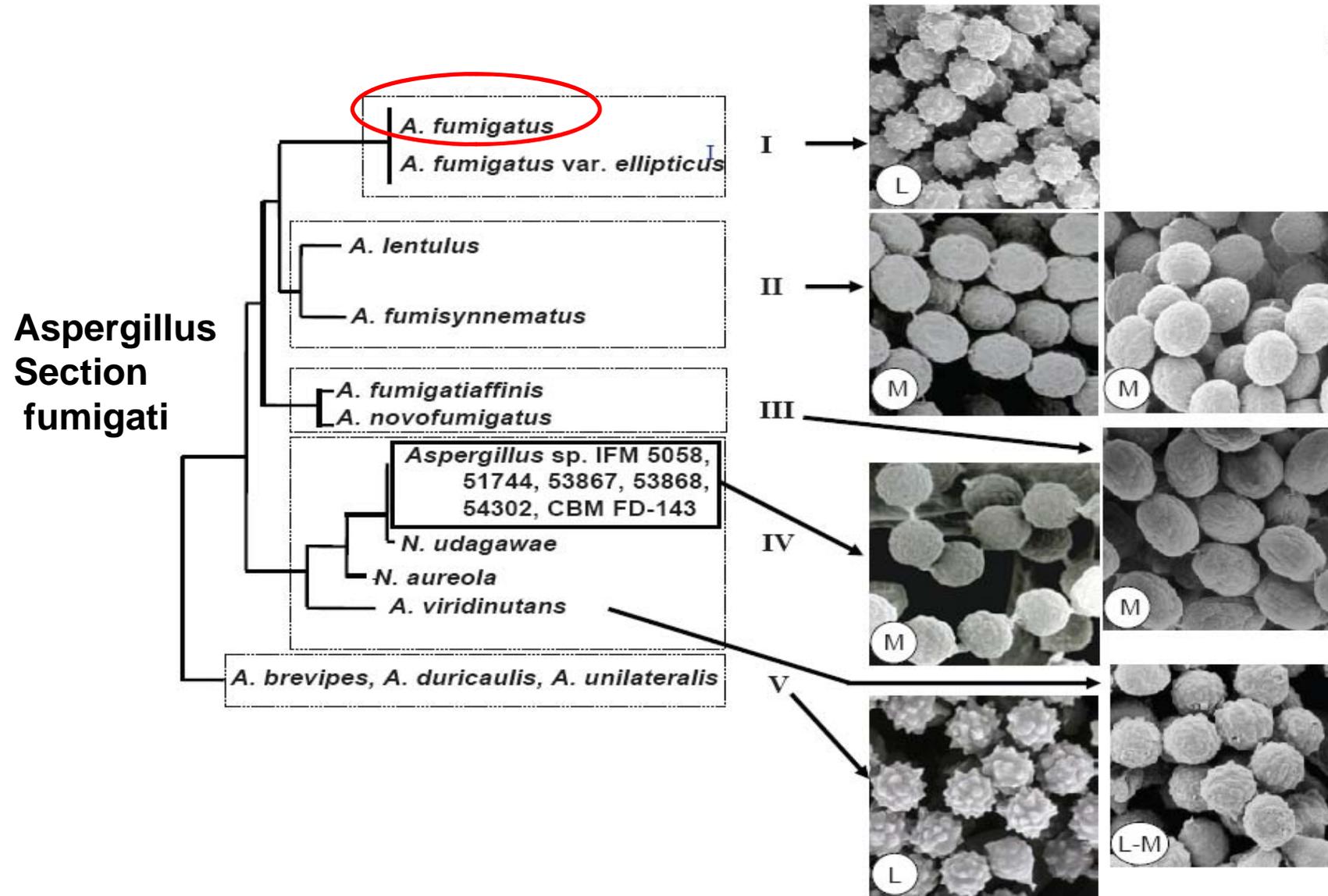
→ *Aspergillus fumigatus* ?



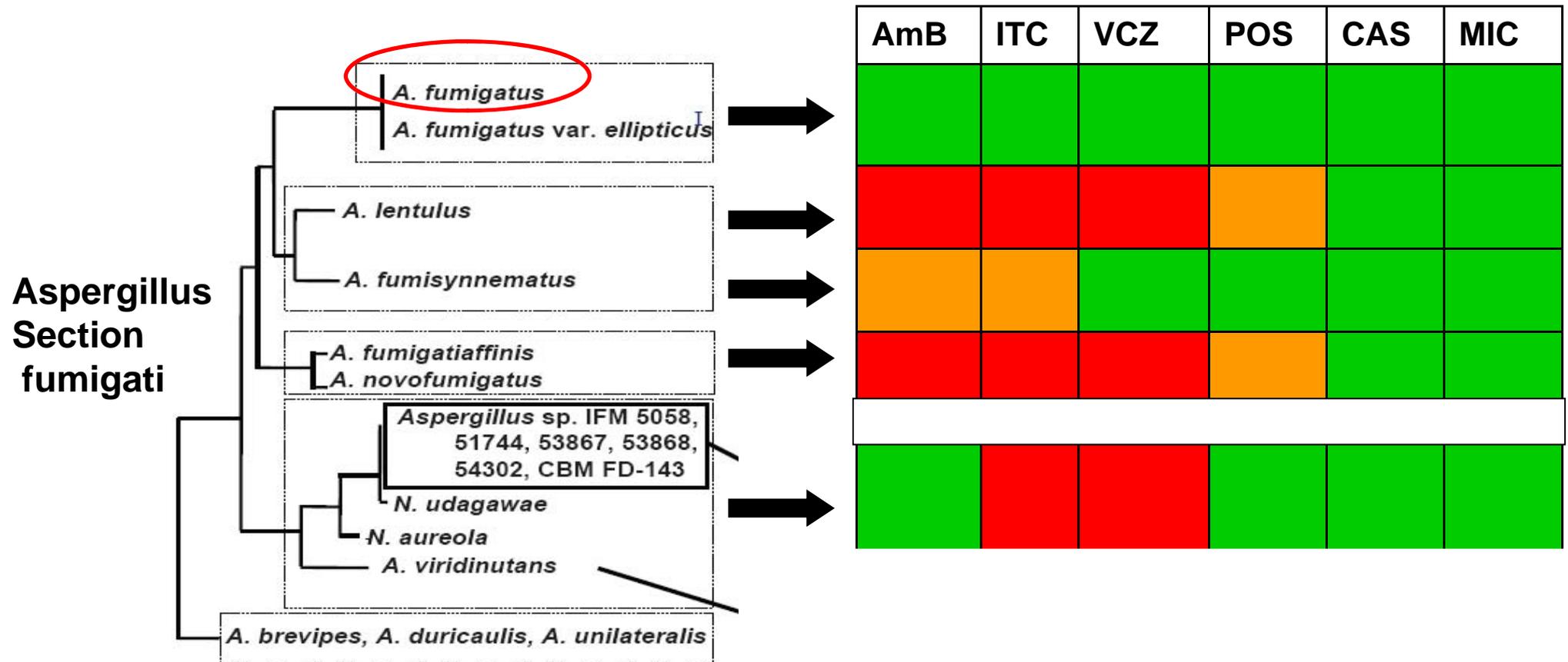
Les critères morphologiques ne sont pas suffisants pour une identification précise de l'espèce ?

A. fumigatus ?

Les critères morphologiques ne sont pas suffisants pour une identification précise de l'espèce ?



Spectre de sensibilité des *Aspergillus* section fumigati

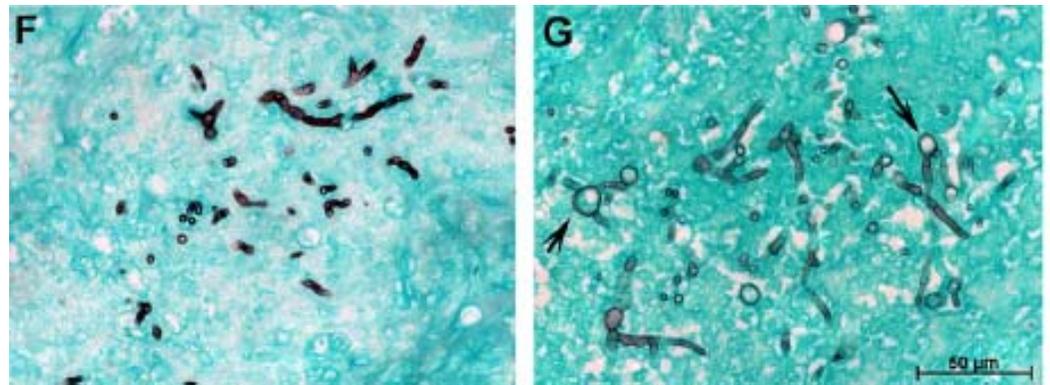
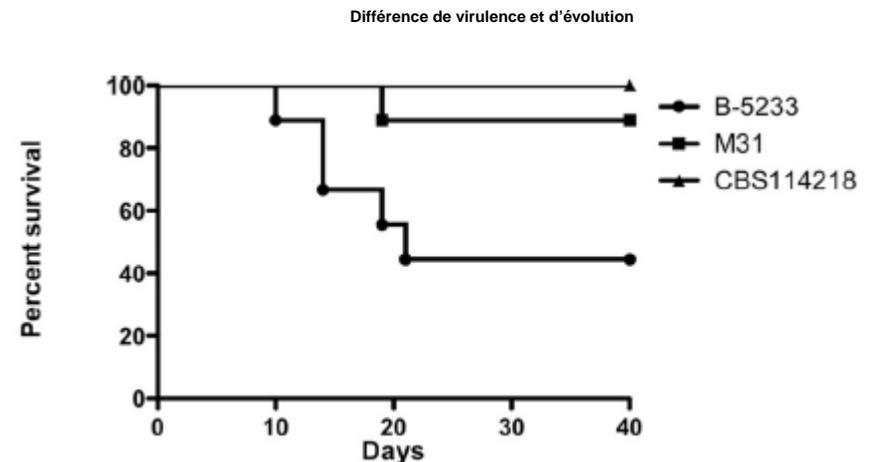


d'après Alcazar-Fuoli L. et coll., AAC, 2008

Caractéristiques biologiques différentes

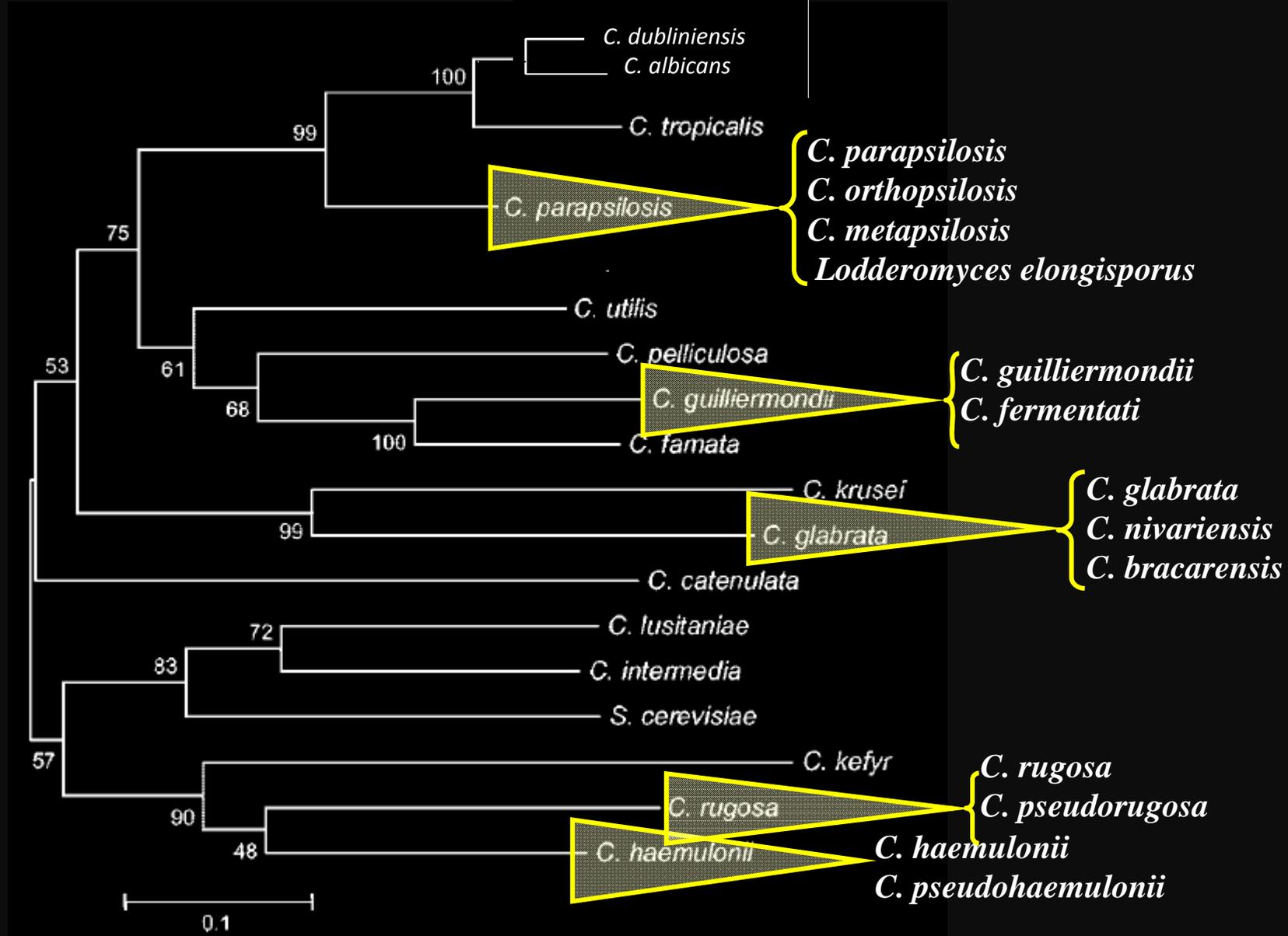
N. udagawae vs *A. fumigatus*

- Faible virulence chez la souris $gp91^{Phox-/-}$
- Taux de croissance et de germination *in vitro* plus lent et non synchrone
- Susceptibilité supérieure des conidies aux PN et au stress oxydatif



Arbre phylogénétique _ ITS1

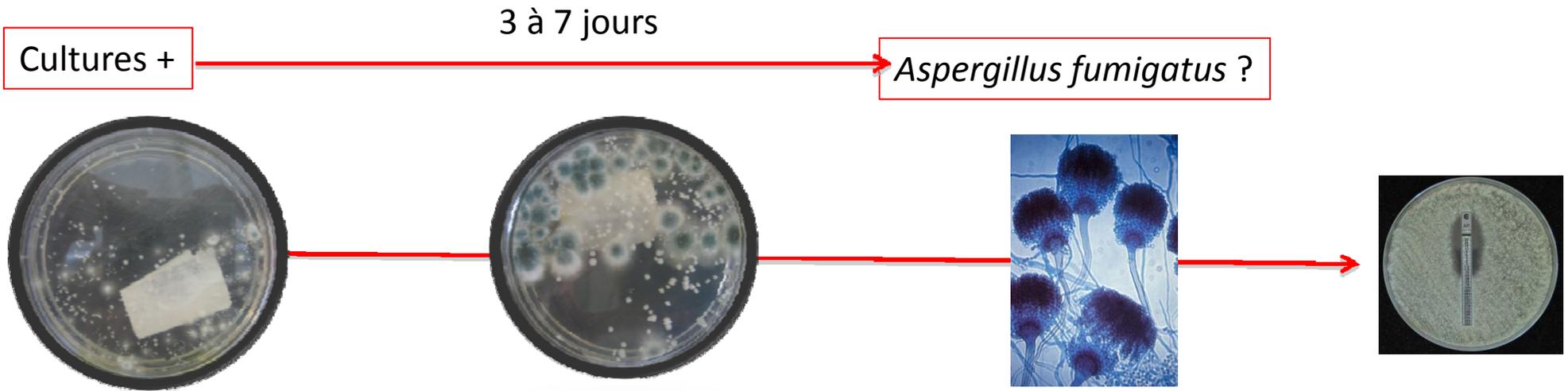
« Complexe d'espèces »



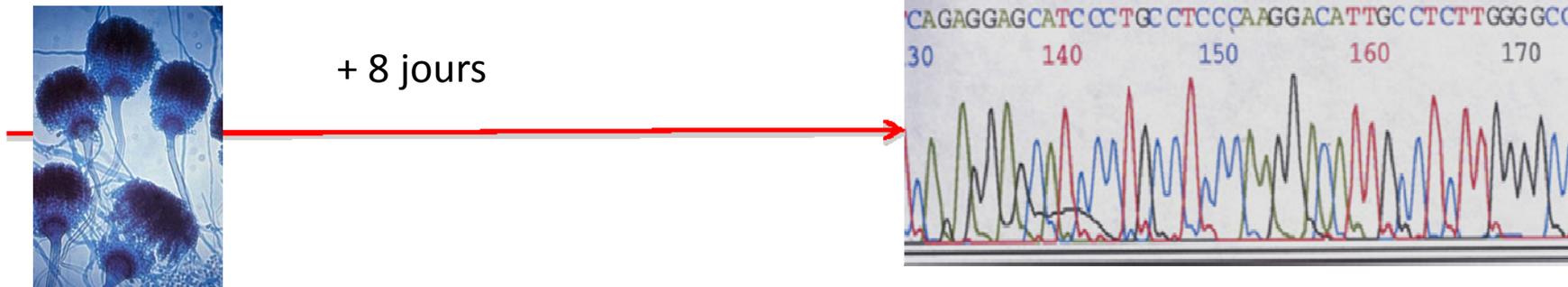
Diagnostic mycologique conventionnel : 2 limites

→ long et imprécis

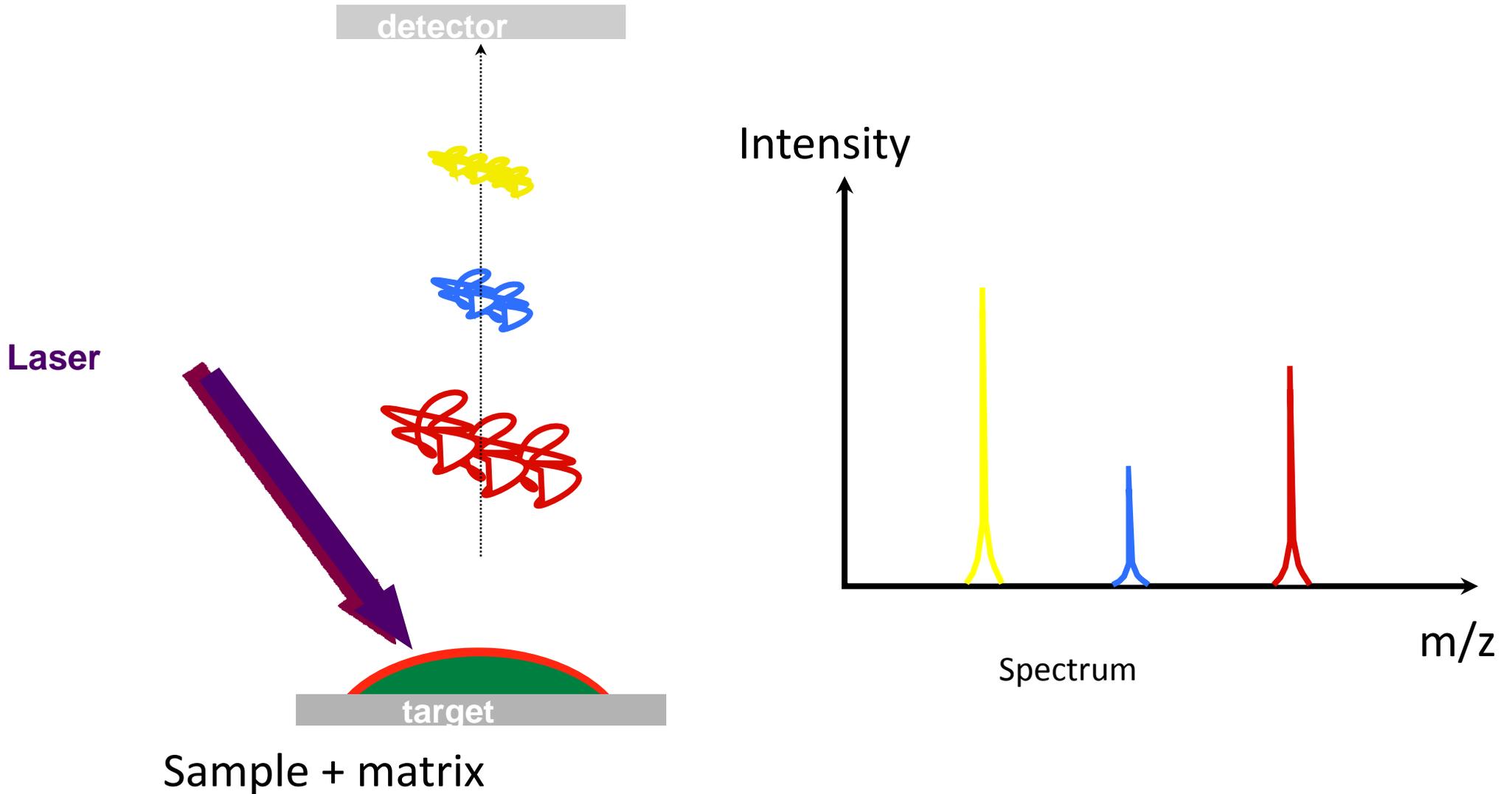
champignons filamenteux : **délai identification : 3 à 7 jours**



Identification moléculaire diagnostic précis



MALDI-TOF Mass spectrometry: principles

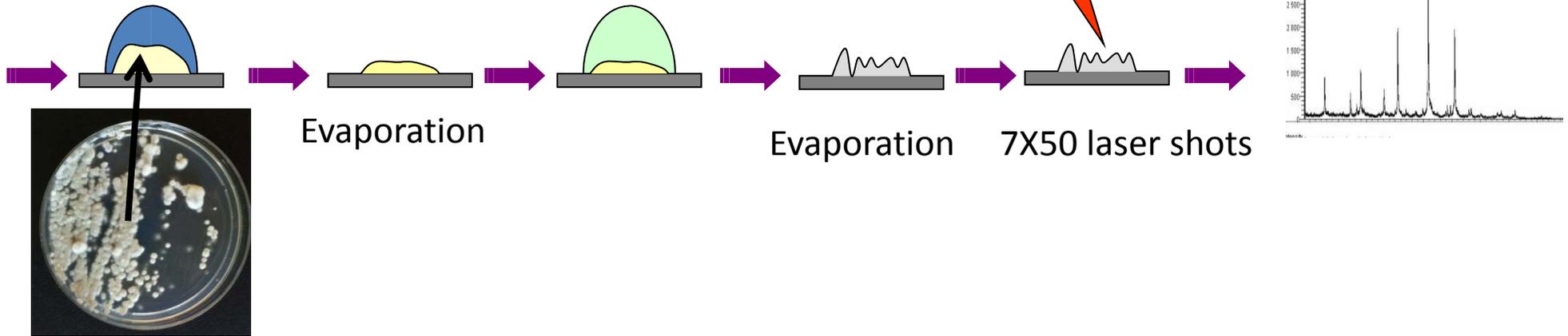




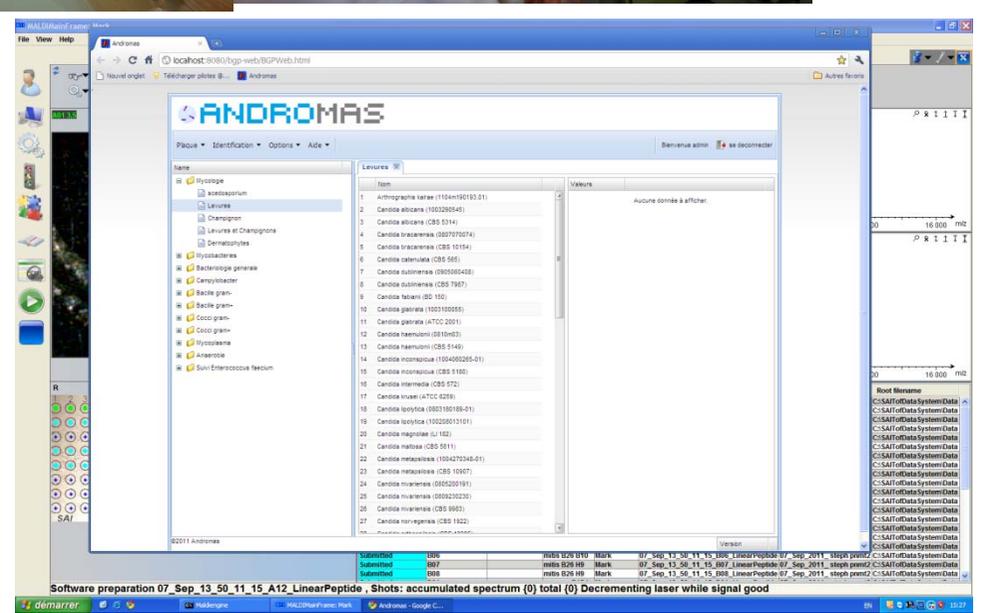
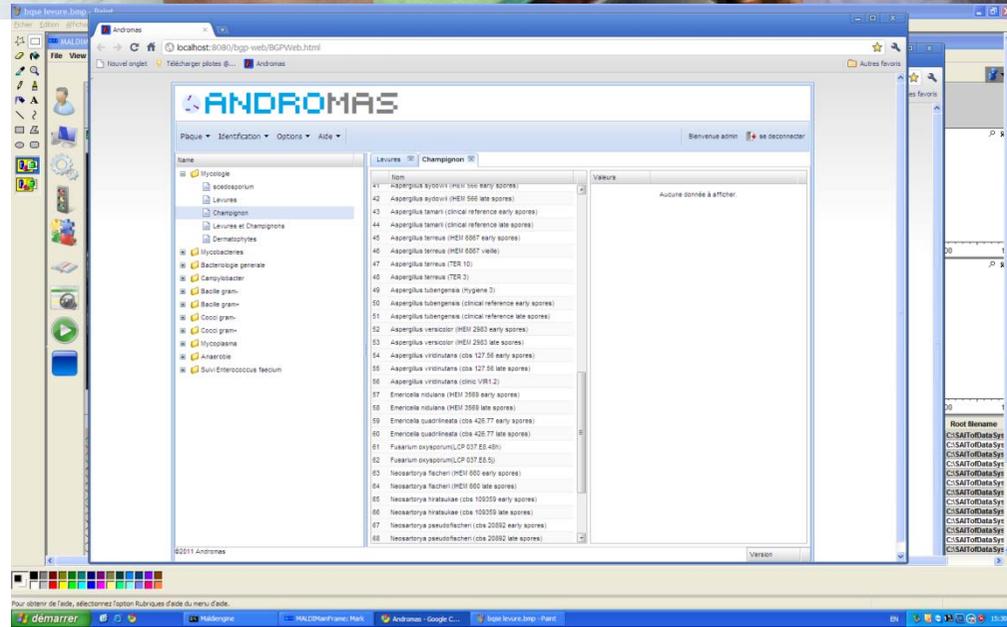
acide formique à 70%
Et lyse cellulaire

Matrix HCCA

LASER



→ protocole expérimental simple et rapide : 5 min



→ base de données peut être mise à jour et complétée facilement

Identification des champignons par Maldi Tof

✓ Champignons filamenteux

- 1^{ère} technique d'identification automatisée et standardisée
- identification précise des espèces incluant les espèces courantes et les espèces rares
- discriminant les espèces morphologiquement proches
- Améliore la prise en charge des patients en identifiant rapidement les espèces de sensibilité diminuée aux antifongiques

✓ Levures

- supérieure aux techniques conventionnelles
- permet de discriminer les espèces de *Candida* au sein des complexes et d'identifier les espèces rares non identifiables par techniques conventionnelles.
- Réduire le délai d'identification des espèces à partir des hémocultures positives

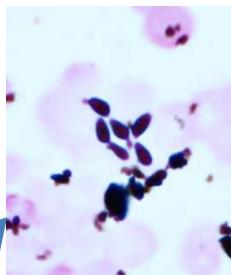
HC positive

5mn

Fongémie

15mn

Candidémie à *Candida glabrata*



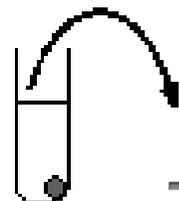
Gram
Levure

Procédure MALDI-TOF-MS

extraction
10 mn

Dépôt

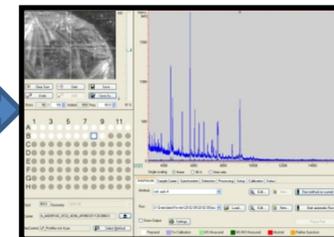
Identification de
l'espèce
MALDI-TOF-MS
= 5 mn



Evaporation



Evaporation



Détection de pathogènes fongiques à partir d'hémocultures positives

- un vrai progrès dans la prise en charge thérapeutique des candidémies
- impact direct sur la bonne adéquation des traitements antifongiques et sur le pronostic des patients ?

Conclusion

- Outils efficaces pour le diagnostic des infections fongiques invasives → d'autres à venir
- Evaluations cliniques sont nécessaires pour une utilisation optimale