

Diagnostic précoce des mucormycoses de l'immunodéprimé par détection d'ADN circulant sérique

L. Millon^{1,3}, F. Larosa², Q. Lepiller¹, E. Daguindau², F. Legrand², S. Rocchi³, F. Grenouillet^{1,3}

¹ Parasitologie-Mycologie, ² Hématologie, CHRU de Besançon, Besançon, France

³ Chrono-environnement UMR 6249, Université de Franche-Comté, Besançon, France

Introduction – Objectifs

Différentes études ont montré l'incidence croissante des mucormycoses chez les patients avec greffe de souches hématopoïétiques et chez les autres patients à risque (transplantés d'organe solide, hémopathies, diabète non contrôlé...). Les Mucorales ne sont pas sensibles au voriconazole, qui est la 1^{ère} ligne de traitement de l'aspergillose.

Un diagnostic spécifique précoce des mucormycoses et une réponse thérapeutique précoce adaptée (amphotéricine B) sont essentiels pour améliorer le pronostic des ces infections. **Il n'existe pas de biomarqueurs évalués pour le diagnostic des mucormycoses.**

Notre but était d'évaluer l'intérêt de la détection d'ADN sérique circulant des principaux genres de Mucorales par PCR quantitative (qPCR) pour le diagnostic précoce des mucormycoses chez le patient immunodéprimé.

Résultats

Aucune réactivité croisée n'a été observée, ni avec des ADN de 19 souches de référence d'autres opportunistes fongiques, ni avec 31 sérums de patients avec pneumocystose ou aspergillose invasive. La limite de détection variait de 3,7 à 15 fg/10 µL, suivant la Mucorale testée (qPCR négative si Cq > 46 cycles). Le descriptif des patients et des résultats est présenté dans le tableau ci dessous.

L'ADN de Mucorales a été détecté dans le sérum de **11/12 patients entre 68 jours et 2 jours avant la date du diagnostic de mucormycose** (J0 : histopathologie et/ou culture).

Tous les résultats de qPCR ont été concordants avec la culture et/ou l'identification par PCR-séquençage sur tissu de la Mucorale: *Lichtheimia* sp. (n=5), *Rhizomucor* sp. (n=4), *Rhizopus* sp. (n=3).

La qPCR a été négative chez une seule patiente avec infection disséminée à *Lichtheimia* sp.

Matériel et méthodes

La détection d'ADN sérique reposait sur une combinaison de 3 qPCR (sondes d'hydrolyse) ciblant les genres *Lichtheimia* (ex *Absidia*), *Rhizomucor* et *Mucor/Rhizopus* décrite par Haugland et coll. (<http://www.epa.gov/microbes/moldtech.htm>).

Cette **étude rétrospective monocentrique** a inclus **12 patients avec mucormycose prouvée** (critères EORTC) avec des sérums antérieurs au diagnostic disponibles (2 à 9 sérums par patient).

Une **extraction d'ADN automatisée** était réalisée à partir d'**1mL de sérum** sur automate MagNa Pure Compact (Roche Diagnostics), avec élution de 50 µL. Les sensibilité et spécificité de la méthode ont été évaluées avec des extraits de sérums de témoins sains et de patients avec d'autres infections fongiques (aspergillose, pneumocystose) et avec des ADN de souches fongiques de référence (autres moisissures et levures).

Le **résultat** est exprimé en **cycle seuil (Cq)**, qui est le cycle à partir duquel la détection du signal de fluorescence diffère de la ligne de base: **plus le cycle seuil est petit, plus la quantité d'ADN initiale est importante.**

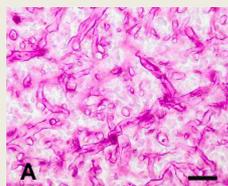
Conclusion

Notre étude montre l'intérêt de la détection d'ADN sérique circulant, par association de qPCR spécifiques ciblant les principales espèces de Mucorales, afin d'établir un diagnostic plus précoce chez les patients immunodéprimés.

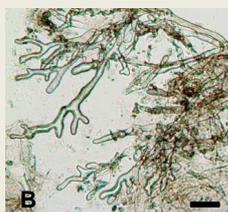
Au vu du pronostic sévère des mucormycoses et la nécessité d'initier au plus tôt une prise en charge adaptée (amphotéricine B liposomale +/- chirurgie), **cette stratégie mérite une évaluation prospective.**

Millon et al. *Clinical Infectious Diseases* 2013;56(10):e95–e101

Contact : Frédéric Grenouillet fgrenouillet@chu-besancon.fr
Mycologie, CHRU, Boulevard Fleming, 25030 Besançon Cedex



Filament de Mucorale dans les tissus
(A : PAS, poumon patient n°1)
ou à l'examen direct
(B : sinus, patient n°8)
Barre = 20 µm



N°	Sexe / Age	Terrain	Fièvre	Localisation infection (date 1er signe clin./ 1er signe radio)	Histologie positive (=J0) & PCR sur biopsies	Mycologie (site/ espèce) = J0	Thérapie ATF (date début si ATF actif)	Chir.	Devenir	Cible qPCR	Résultats qPCR : Cq (date)
1	F/ 65	Dénutrition alcoolisme	J-5	Disseminée J-1 / NF	Peau NF	Peau, urines <i>L. corymbifera</i>	FLU	Non	Décès (J1)	Acory	Neg (J-8, J-1)
2	M/ 37	Hodgkin	J-28	Disseminée J-16 / NF	Poumon, foie NF	Poumon, foie <i>L. corymbifera</i>	AMB (D-1)	Non	Décès (J0)	Acory	28 (J-3) Neg (J-10)
3	M/ 51	LAL	J-9	Rhinocerebrale J-1 / J-1	Sinus <i>L. corymbifera</i>	Sinus <i>L. corymbifera</i>	L-AMB (D0) , POS (D0)	Non	Décès (J3)	Acory	36 (J-8), 32 (J-5), 30 (J-1), 25 (J0), 27 (J2) Neg (J-18, J-15, J-12)
4	F/ 48	Polytrauma.	J0	Cutanée J-5 / NF	Peau <i>Lichtheimia</i> sp.	Peau, urines Stérile	FLU, CAS	Non	Décès (J2)	Acory	27 (J0), Neg (J-2, J-9)
5	M/ 59	LMNH, diabète	J-14	Disseminée J-5 / J-22	Rein <i>Lichtheimia</i> sp.	LCR <i>L. ramosa</i>	FLU, CAS, L-AMB (D10)	J0	Vivant (J90)	Acory	32 (J-13) 38 (J2) Neg (J9, J15)
6	F/ 41	Aplasie, HPN, deferoxamine	J-17	Disseminée J-30 / J-4	Sinus <i>Rhizopus</i> sp.	Sinus <i>R. oryzae</i>	POS (D-11) , AMB (D0)	Non	Décès (J15)	Muc1	36 (J-10), 35 (J-1), 38 (J2), 36 (J6), 38 (J9), 34 (J13)
7	F/ 13	LAM	J-65	Poumon J-62 / J-61	Poumon <i>R. oryzae</i>	NF	VOR, AMB (D-60)	J0	Vivant (J90)	Muc1	35 (J-68), 40 (J-62), 36 (J-55), 38 (J-21), 36 (J10) Neg (J-75, J29)
8	F/ 48	AlloH SCT, GVH	J-30	Rhinocerebrale J-22 / J-2	Sinus <i>R. oryzae</i>	Sinus <i>R. oryzae</i>	VOR, L-AMB (J0), POS (J0)	J0	Vivant (J90)	Muc1	39 (J-26), 38 (J-23, J-13), 37 (J-9, J0), 39 (J5) Neg (J-41, J8)
9	M/ 57	AlloH SCT	J0	Rhinocerebrale J-18 / J-11	Sinus NF	Sinus <i>R. pusillus</i>	ITR (D-96) , AMB (J0)	J0	Vivant (J90)	Rmuc	39 (J-18), 39 (J-1) Neg (J-11, J-8, J9, J13)
10	F/ 55	Transplantée renale	J-30	Disseminée J-24 / J-11	Cœur, poumon <i>R. pusillus</i>	Cœur, poumon <i>R. pusillus</i>	CAS	Non	Décès (J0)	Rmuc	29 (J-4), 22 (J-3) Neg (J-24, J-19)
11	M/ 60	LAM	J-50	Disseminée J-50 / J-47	Foie, rate <i>Rhizomucor</i> sp.	Foie, rate Stérile	L-AMB (D-44), POS (D-36)	J0	Vivant (J90)	Rmuc	41 (J-49), 28 (J-46), Neg (J-52, J-42, J-39, J-36, J-18, J-13, J-1)
12	F/ 3	LAL	J-16	Disseminée J-6 / J-6	SNC, poumon, foie <i>R. pusillus</i>	NF	CAS	Non	Décès (J0)	Rmuc	25 (J-2), 27 (J0), Neg (J-17)

Tous nos remerciements à Florence Skana pour sa précieuse aide technique