



Nouvelles méthodes diagnostiques des infections fongiques invasives

Marie-Elisabeth Bougnoux

marie-elisabeth.bougnoux@nck.aphp.fr

Unité de Mycologie-Parasitologie,

Hôpital Necker Enfants Malades

Université Paris Descartes

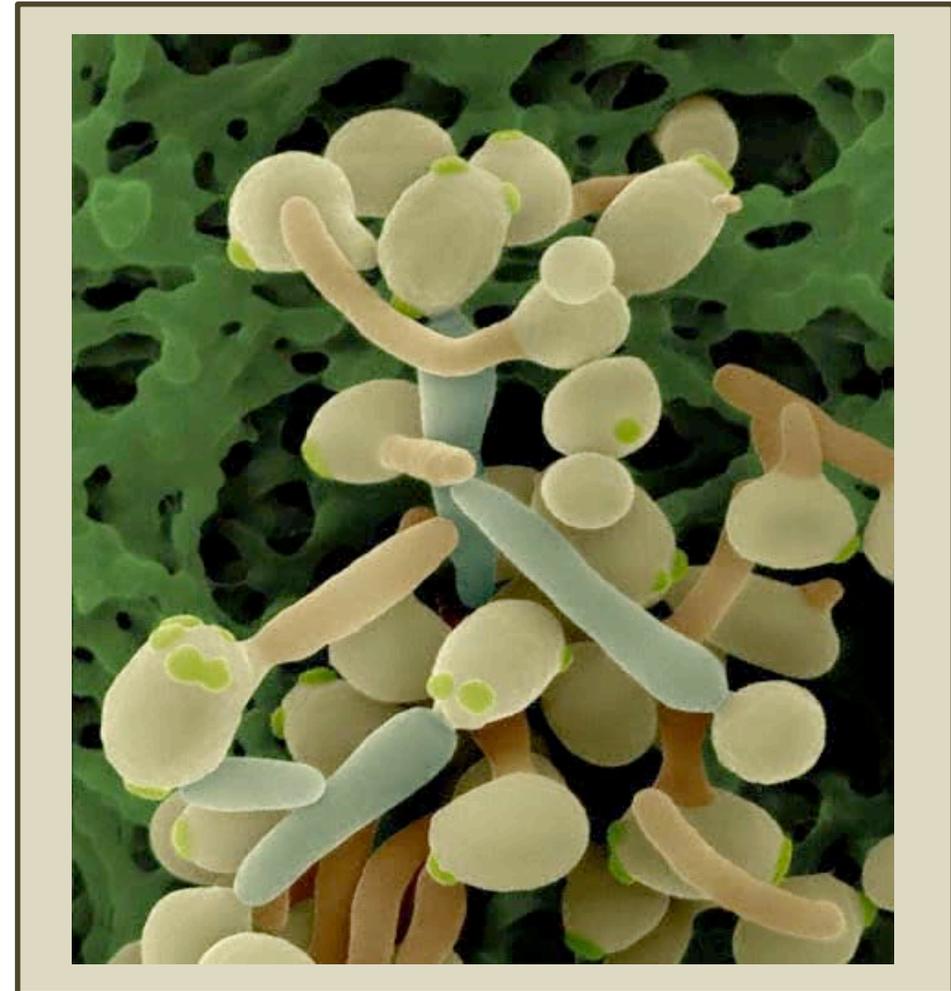
Paris, France



Les infections fongiques invasives sont le plus souvent des infections associées aux soins

Les pathogènes fongiques les plus fréquents :

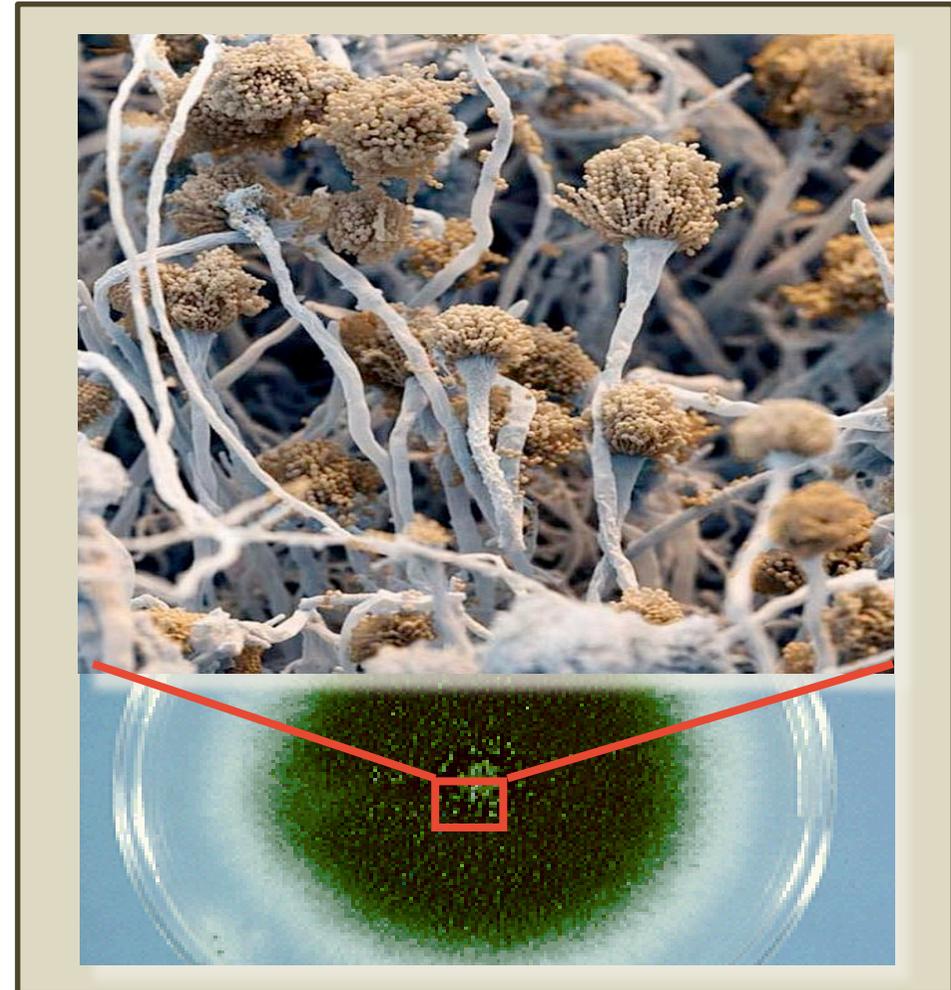
- Levures
 - *Candida* spp.- *Cryptococcus*
- Champignons filamenteux
 - *Aspergillus* spp.
 - Mucorales :
 - *Mucor*, *Rhizopus*, *Lichtheimia*
 - Dématiés : *Alternaria*...
 - Autres CH :
 - *Fusarium* spp., *Sedosporium* spp.



Les infections fongiques invasives sont le plus souvent des infections associées aux soins

Les pathogènes fongiques les plus fréquents :

- Levures
 - *Candida* spp.- *Cryptococcus*
- Champignons filamenteux
 - *Aspergillus* spp.
 - Mucorales:
 - *Mucor*, *Rhizopus*, *Lichtheimia*
 - Dématiés : *Alternaria*...
 - Autres CH :
 - *Fusarium* spp., *Sedosporium* spp.



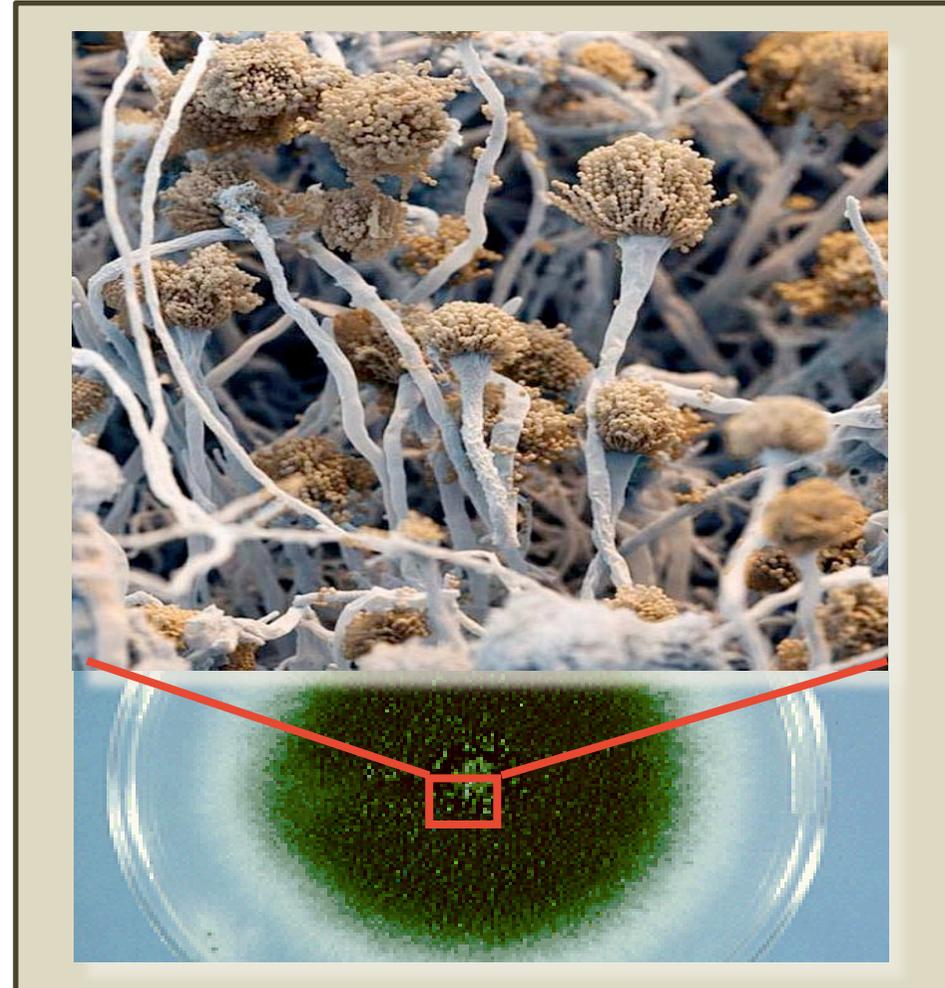
Les infections fongiques invasives sont le plus souvent des infections associées aux soins

Les pathogènes fongiques les plus fréquents :

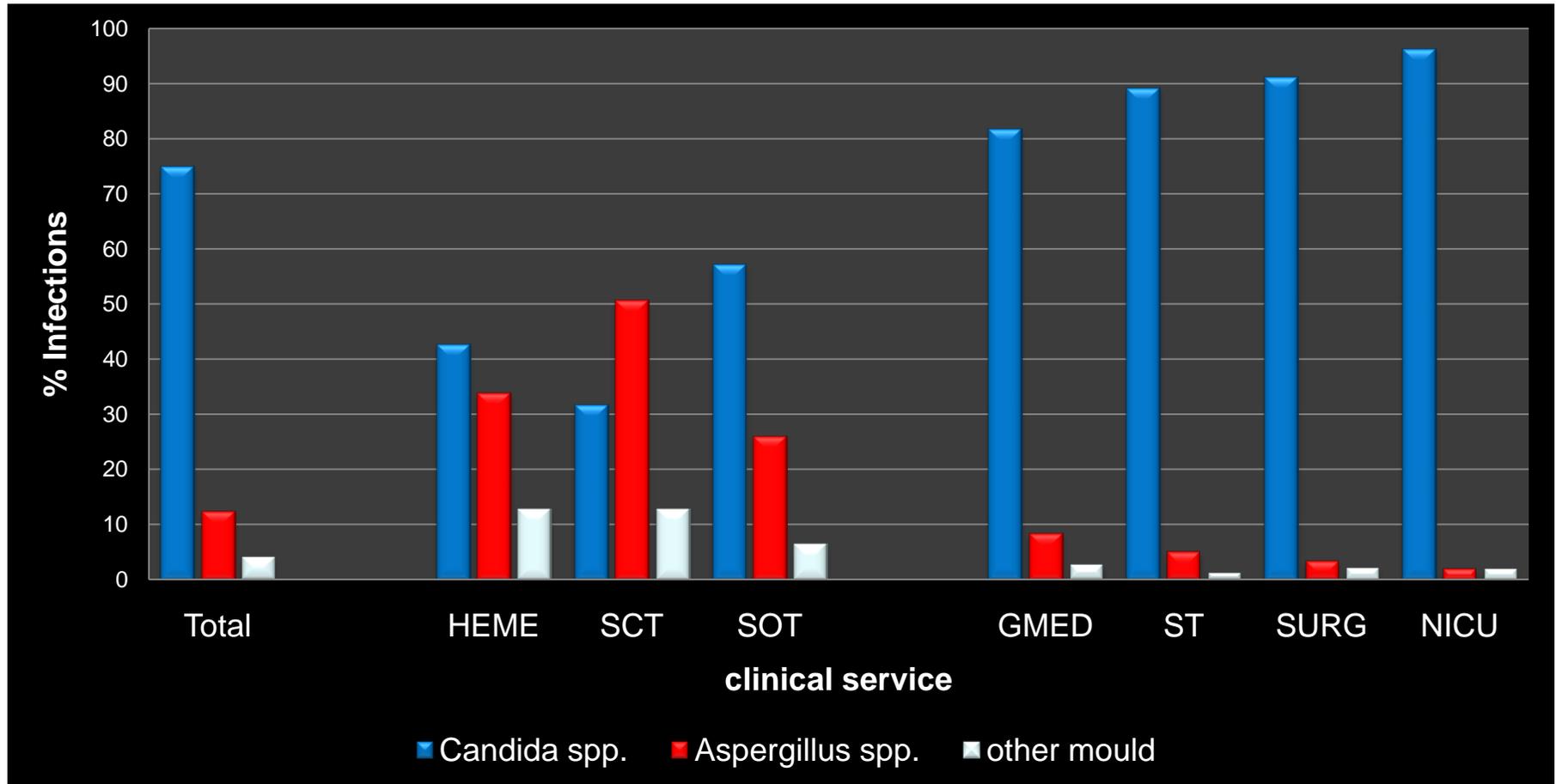
- Levures
- Champignons filamenteux

Epidémiologie des IFI très différente

→ selon les groupes de patients à risque



Distribution des champignons responsables d'IFI selon la pathologie sous jacente et le service



From D. Horn et al., CID 2009 ; D. Neofytos et al., CID 2009

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
- Amélioration des Méthodes diagnostiques

Diagnostic Mycologique des Infections Fongiques Invasives (IFI)

- **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 d'IFI** : stratégie diagnostique proactive chez les patients à très haut risque
- **Méthodes d'identification** rapides et précises des champignons

✓ Marqueurs des IFI

- **Antigènes** : polysaccharides de paroi des champignons
 - Spécifique de genre :
 - Mannane (*Candida* sp.)
 - Galactomannane (*Aspergillus* sp.)
 - Communs à plusieurs champignons
 - β (1-3) D glucane (*Candida* sp, *Aspergillus* sp., *Pneumocystis* sp)
- **ADN fongique** :
 - PCR spécifiques (Aspergillose et Mucormycose)
 - Puce à ADN (Candidose, Aspergillose et Mucormycose)

✓ Méthodes d'identification rapides et précises des champignons

- Spectrométrie de masse de type Maldi-Tof
- Biologie moléculaire

✓ Marqueurs des IFI

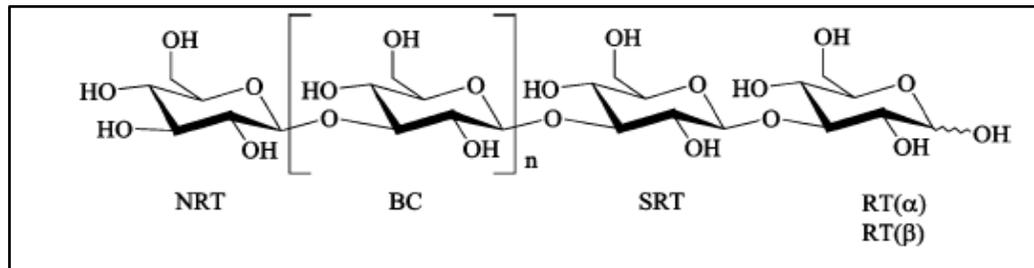
- **Antigènes** : polysaccharides de paroi des champignons
 - Spécifique de genre :
 - Mannane (*Candida* sp.)
 - Galactomannane (*Aspergillus* sp.)
 - Communs à plusieurs champignons
 - β (1-3) D glucane (*Candida* sp, *Aspergillus* sp., *Pneumocystis* sp)
- **ADN fongique** :
 - PCR spécifiques (Aspergillose et Mucormycose)
 - Puce à ADN (Candidose, Aspergillose et Mucormycose)

✓ Méthodes d'identification rapides et précises des champignons

- Spectrométrie de masse de type Maldi-Tof
- Biologie moléculaire

Béta 1-3 D glucane (BDG)

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

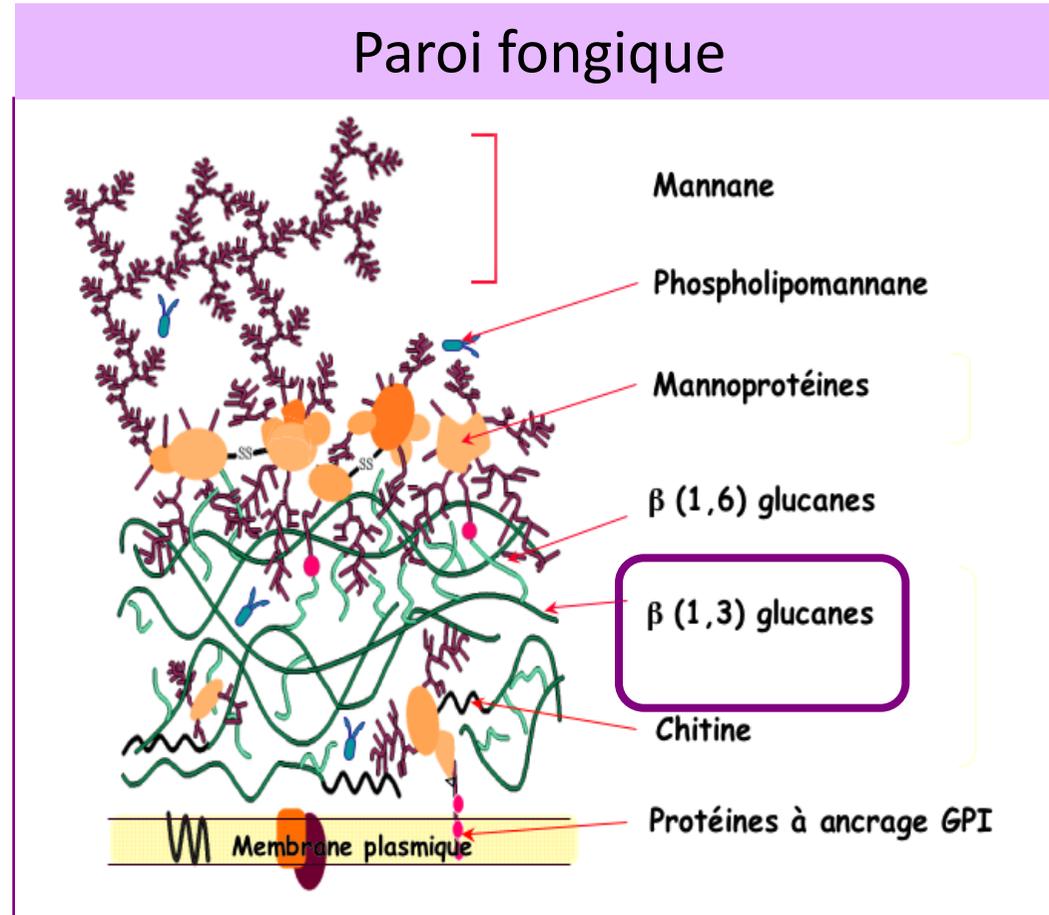


Longues chaînes de résidus glucose liées en β 1-3 et en β 1-6

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

•Test Fungitell® :

→Détection : β 1-3-D-glucanes



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

•Test Fungitell® :

→Détection : β 1-3-D-glucanes

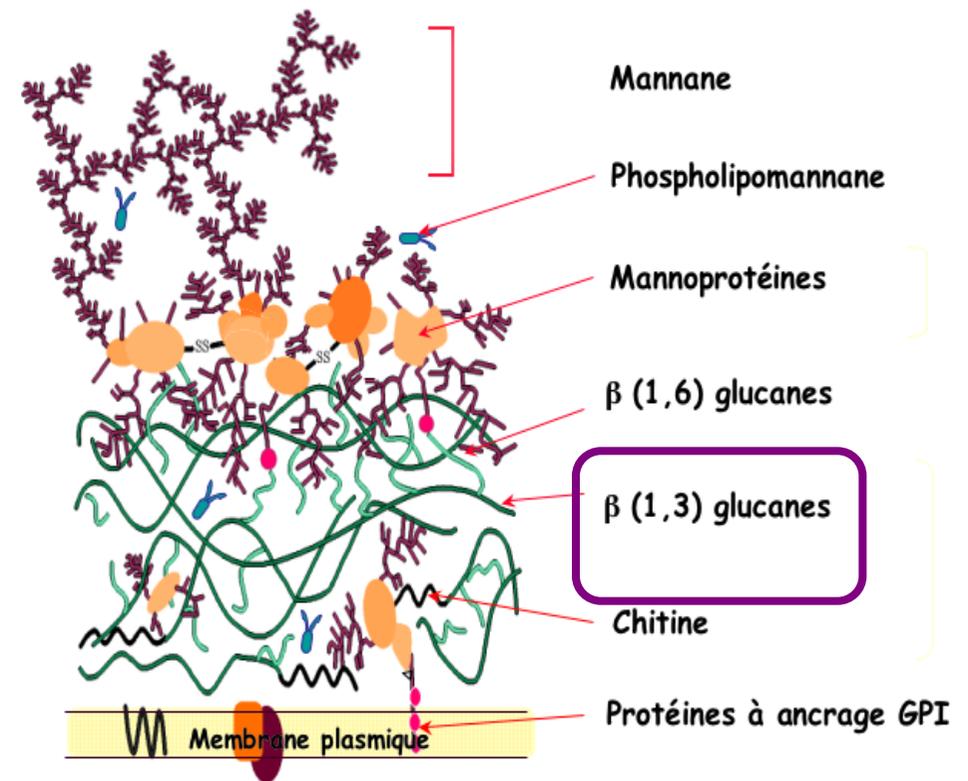
→Infections dues à :

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 *Mucorales*

Paroi fongique



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

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

→ **Sa**

• Test Fungitelle

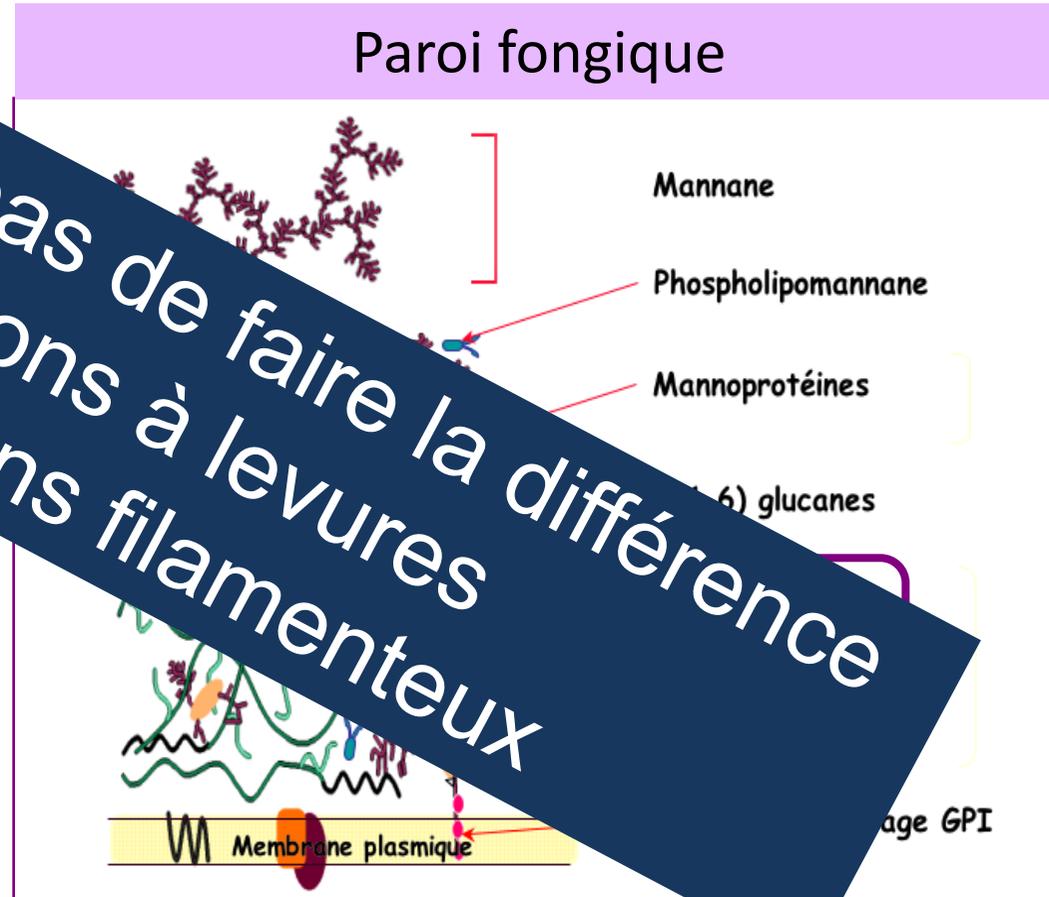
→ Détection : β 1-3-D-gluc

→ 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



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

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

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

BDG : Problème de spécificité

hypothèses faux positifs → +/- confirmées

- **Réactivités croisées avec des substances d'origine iatrogène**
 - membrane de cellulose : hémodialyse
 - compresses : chirurgie
 - Immunoglobulines IV +++
- **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

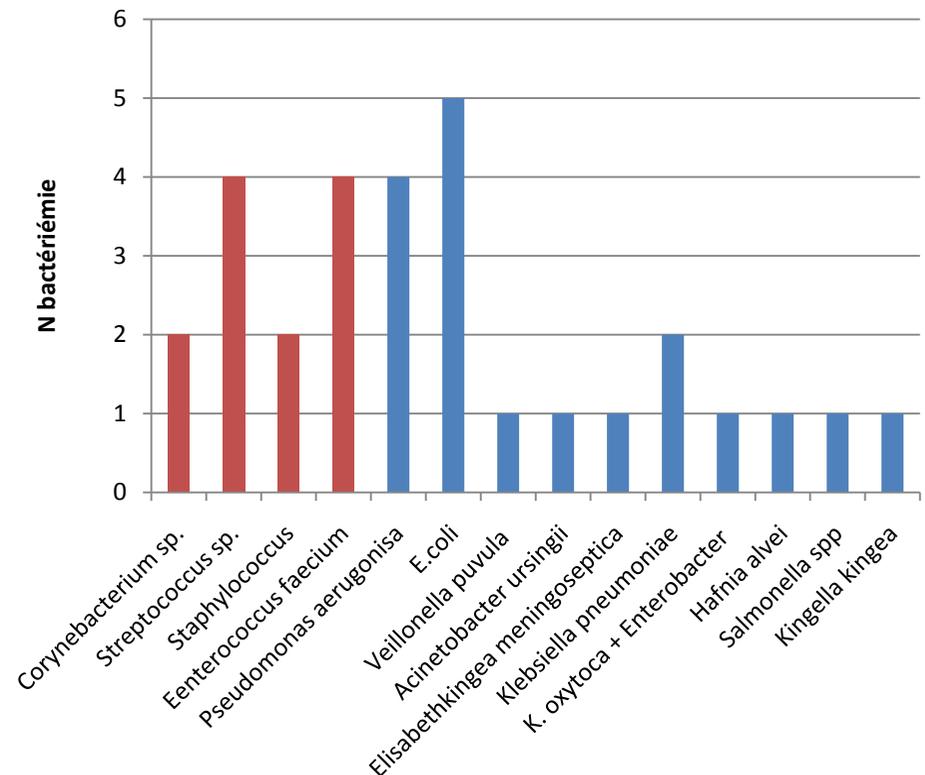
Réactions croisées Bactériémies et BDG ?

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



Desjardins A. et coll

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 BDG 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

BDG : comment le prescrire ?

Surveillance des patients à haut risque ?
: screening 1 ou 2 fois par semaine ?

→ **Patients d'hématologie ?**



Bone Marrow Transplantation (2012) 47, 846–854
© 2012 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0268-3369/12

www.nature.com/bmt

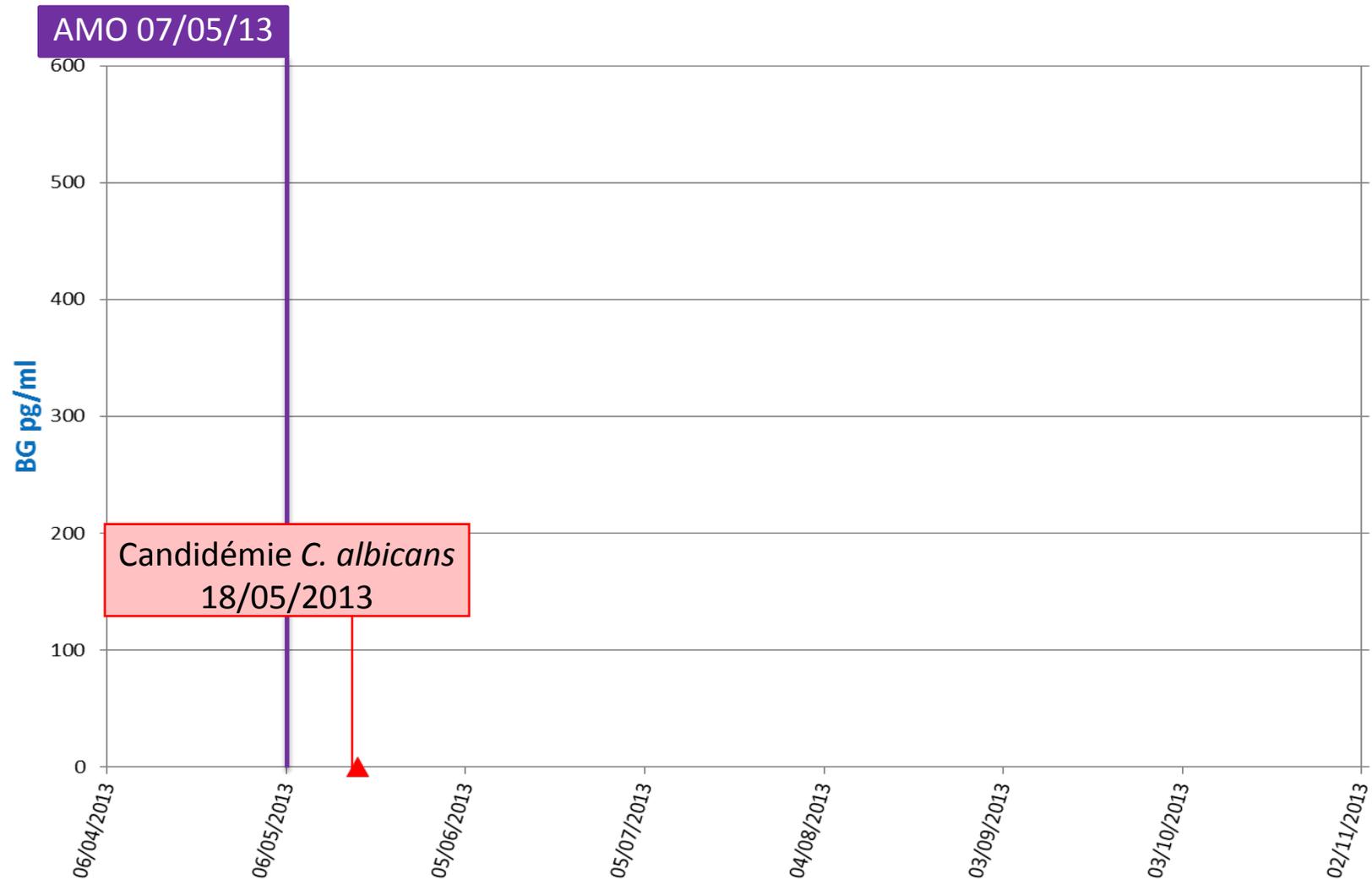
ORIGINAL ARTICLE

ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients

→ **Patients de réanimation ?**

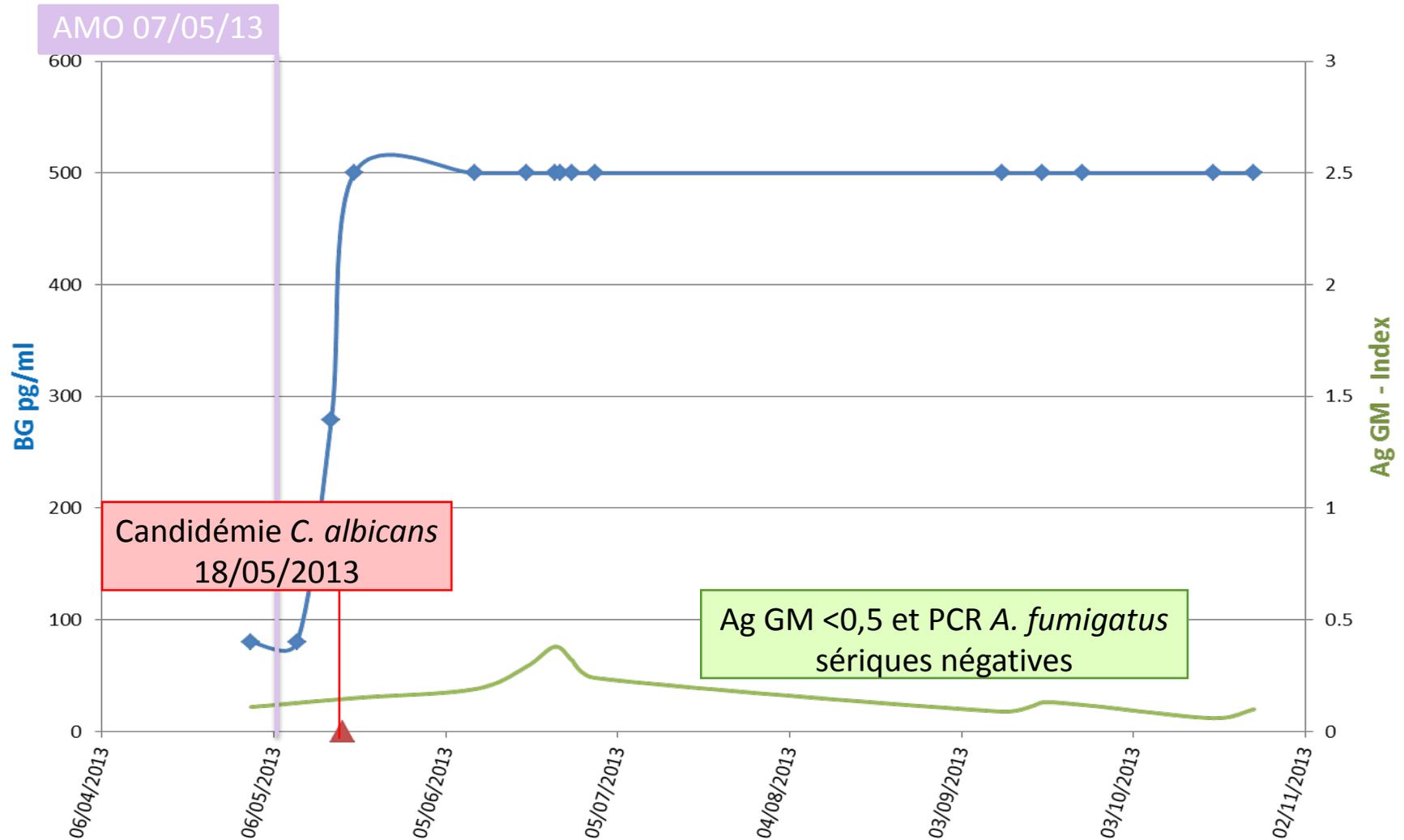
Cas : 1 patient adulte d'Hématologie

Suivi : 16 sérums, [J-16; J+159] après la candidémie



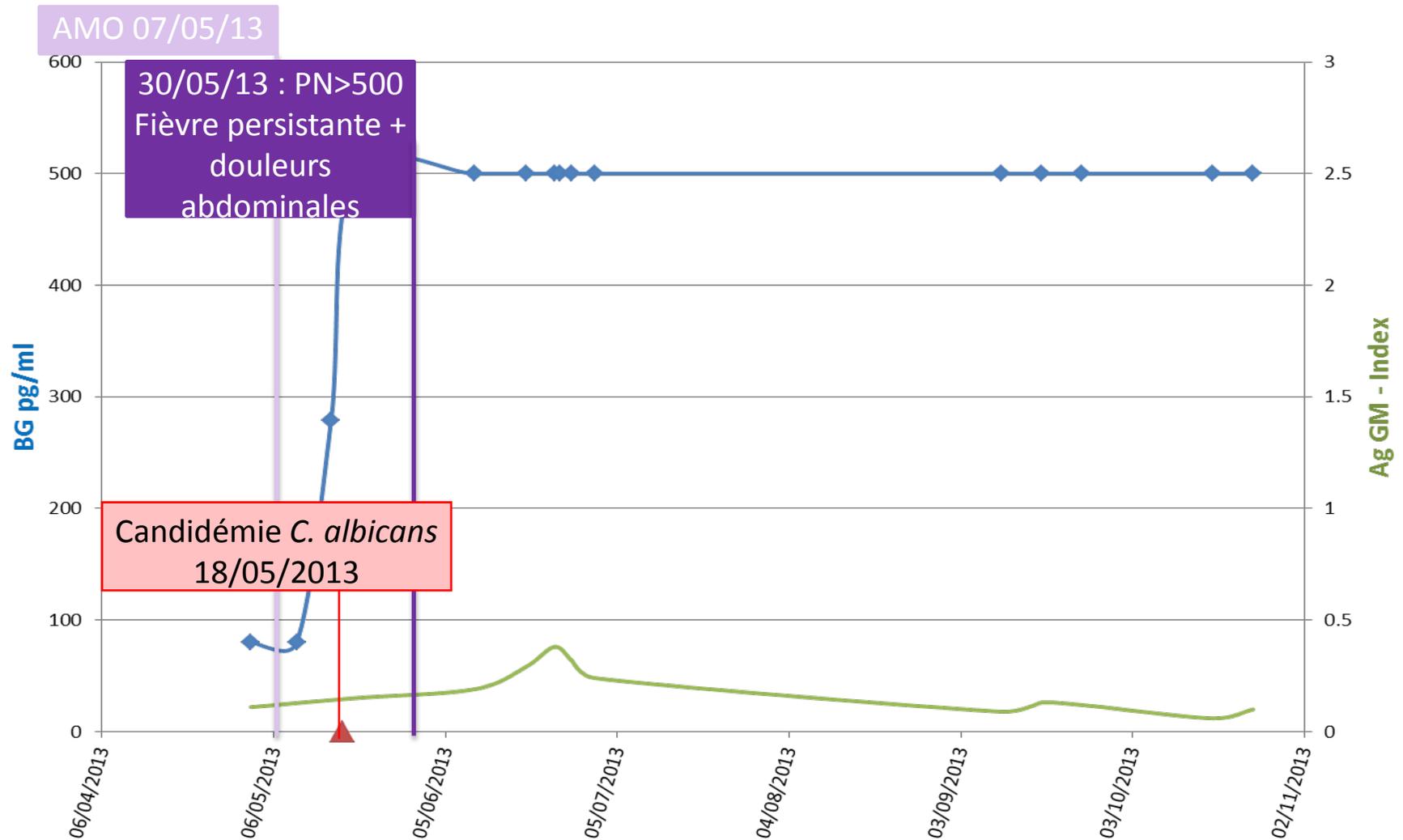
Cas : 1 patient adulte d'Hématologie

Suivi : 16 sérums, [J-16; J+159] après la candidémie



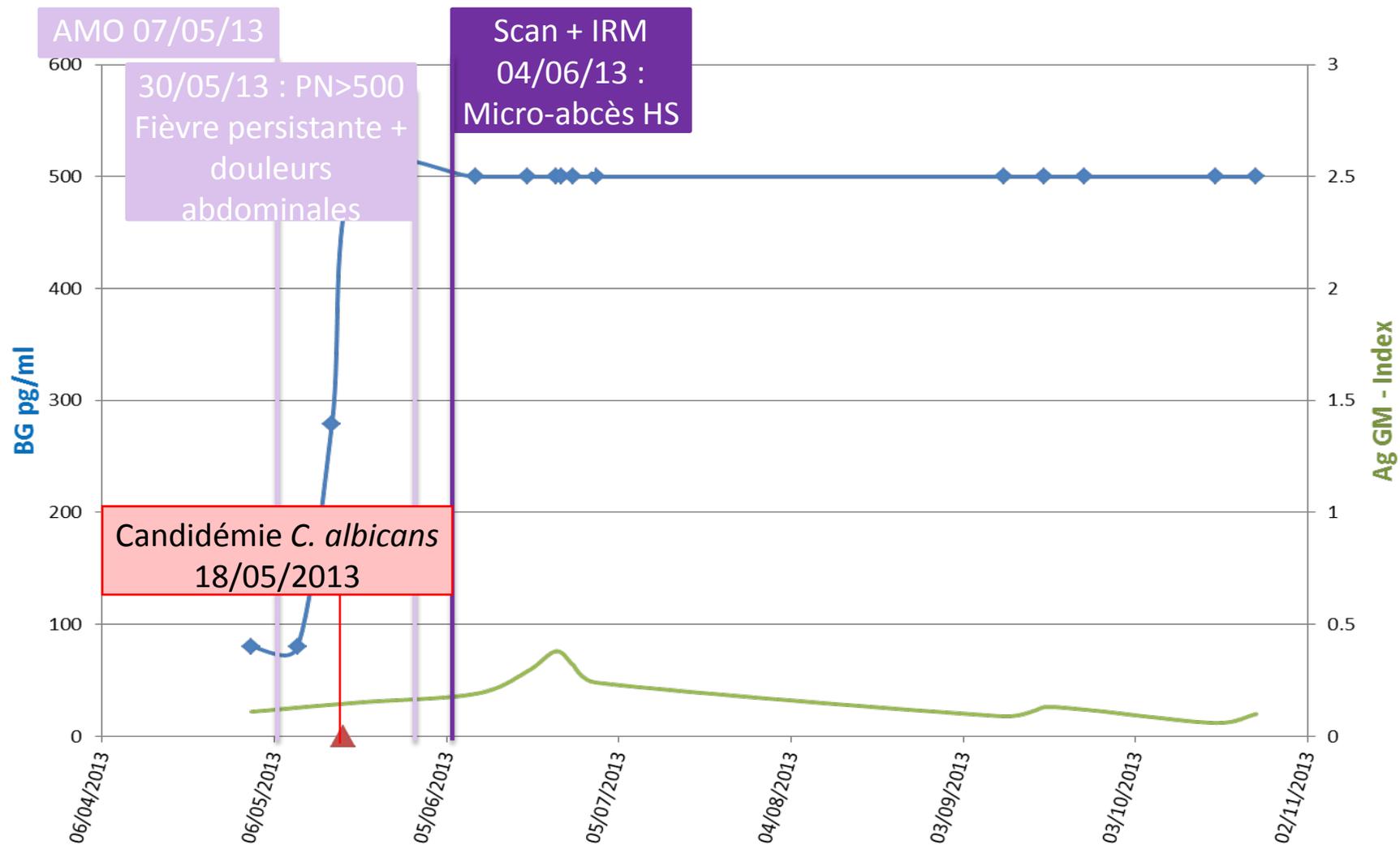
Cas : 1 patient adulte d'Hématologie

Suivi : 16 sérums, [J-16; J+159] après la candidémie



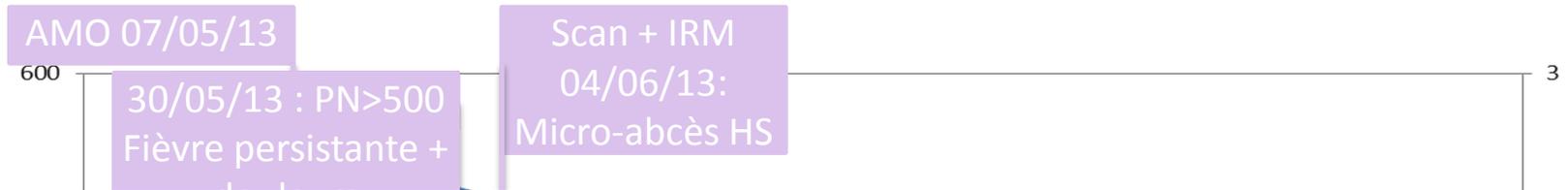
Cas : 1 patient adulte d'Hématologie

Suivi : 16 sérums, [J-16; J+159] après la candidémie



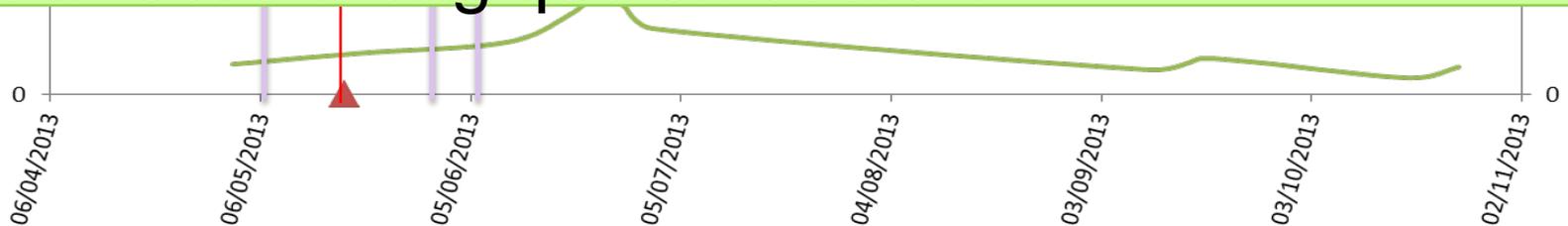
Cas 3 : 1 patient adulte d'Hématologie

Suivi : 16 sérums, [J-16; J+159] après la candidémie



Interprétation difficile lors du suivi du patient...

- 1 candidémie à J10 d'une AMO pour une adrénoleucodystrophie
- BG >500 pg/ml dès J-2
- Pas de décroissance des BG à 5 mois de la candidémie + CHS, sous traitement
- Autre infection fongique en cours ?



BG : conclusions

- → test diagnostique pan-fongique : VPN et VPP ?
- Ne permet pas de différencier le type d'IFI : levures/
champignons filamenteux !!
- 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 fongique
 - Marqueur diagnostique fongique très intéressant

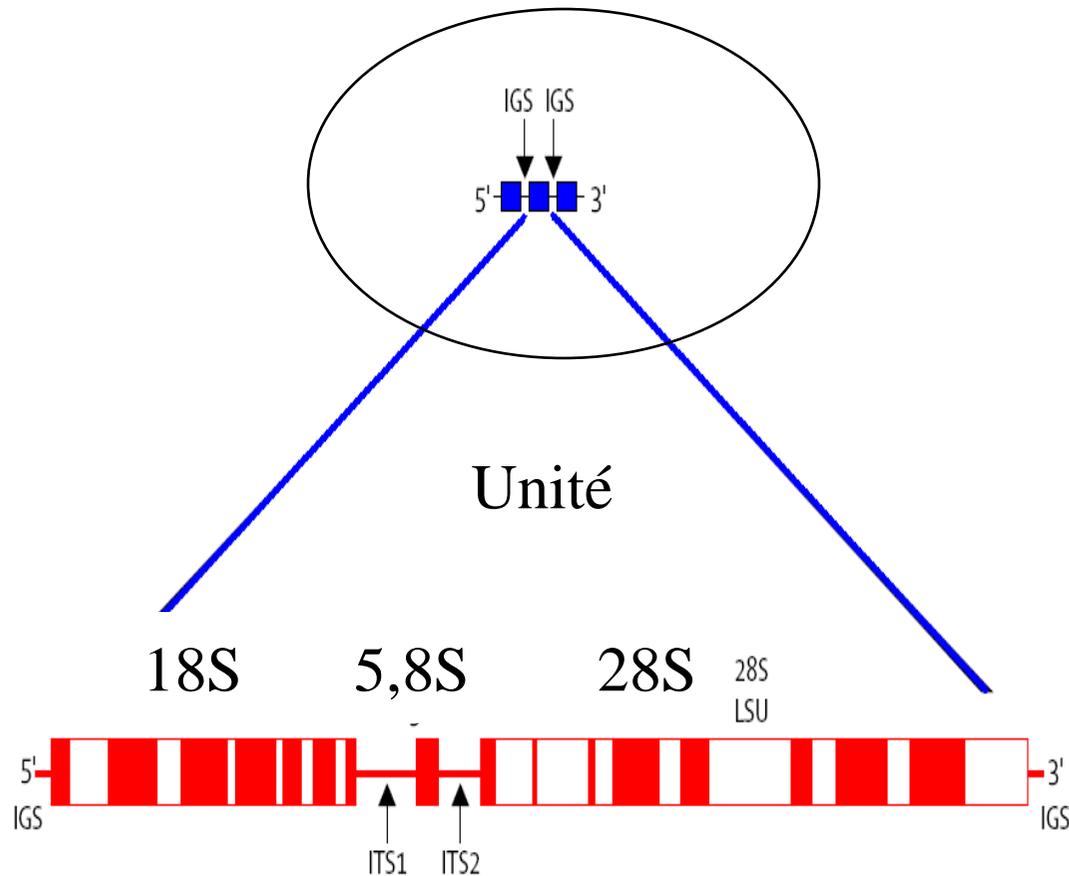
✓ Marqueurs indirects des IFI

- **Antigènes** : polysaccharides de paroi des champignons
- **ADN fongique** :
 - PCR spécifiques (Aspergillose et Mucormycose)
 - Puce à ADN (Candidose, Aspergillose et Mucormycose)

✓ Méthodes d'identification rapides et précises des champignons

- **Spectrométrie de masse de type Maldi-Tof**
- Biologie moléculaire

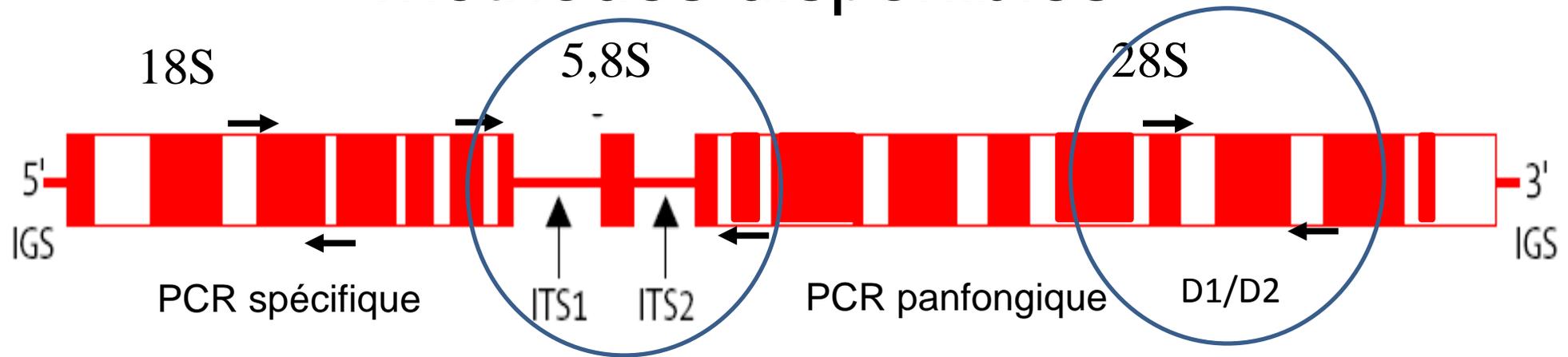
Les PCRs fongiques ciblent ADN ribosomiques



unités répétées

Sous unités
(18S; 5,8S; 28S)
régions conservées
et régions variables
spécifiques d'espèce

ADN circulant/tissu : méthodes disponibles



Plusieurs options

- **PCR panfongique** : ITS – D1/D2

PCR standard + séquençage → manque de sensibilité

- **qPCR spécifique d'espèce** : → bons résultats ms 1 espèce

Performances des PCR Aspergillaires pour le diagnostic des Aspergilloses Invasives

Résultats méta-analyse

- 16 études : 2000 – 07/2008
- screening ADN sérique de *Aspergillus* chez les patients d'hématologie
- Grande disparité des stratégies de PCR

Variable	nombre
Type d'échantillon	3
Volume testé	100 µl – 3ml
Procédure d'extraction	8
Cible amplifiée	4
Type de PCR	5

	Sensitivité	Spécificité	RV +	RV -
1 PCR +	88%	75%	3,53	0,15

Performances de la PCR pour le diagnostic des Aspergilloses Invasives

- Résultats d'une méta-analyse 16 études : 2000 – 07/2008
- screening ADN sérique de *Aspergillus* chez les patients d'hématologie
- Grande disparité des stratégies de PCR

Variable	nombre
Type d'échantillon	3
Volume testé	100 µl – 3ml
Procédure d'extraction	8
Cible amplifiée	4
Type de PCR	5

	Sensitivité	Spécificité	RV +	RV -
1 PCR +	88%	75%	3,53	0,15
2 PCR +	75%	87%	6,04	0,28

Chez les patients d'hématologie adulte → la détection d'ADN d'*A. fumigatus* est un marqueur précoce et spécifique d'AI

- Prospective, Hématologie adulte Necker 2006-2007
- 125 patients inclus (137 épisodes évalués)
 - 17 cas AI (1 prouvé, 14 probables et 2 possibles) → 8 patients allogreffés
 - Incidence AI : 11,3%
- Screening : GM : 2/ sem
- q-PCR *A. fumigatus* (28S): 1/sem /Sérum (1mL et 100 µL)

AI	qPCR		GM
	large volume	faible volume	
Sensitivité	100%	76,5	88,2
Spécificité	96,7	96,7	95,8
VPP	81	81,3	75
VPN	100	95,6	98,3

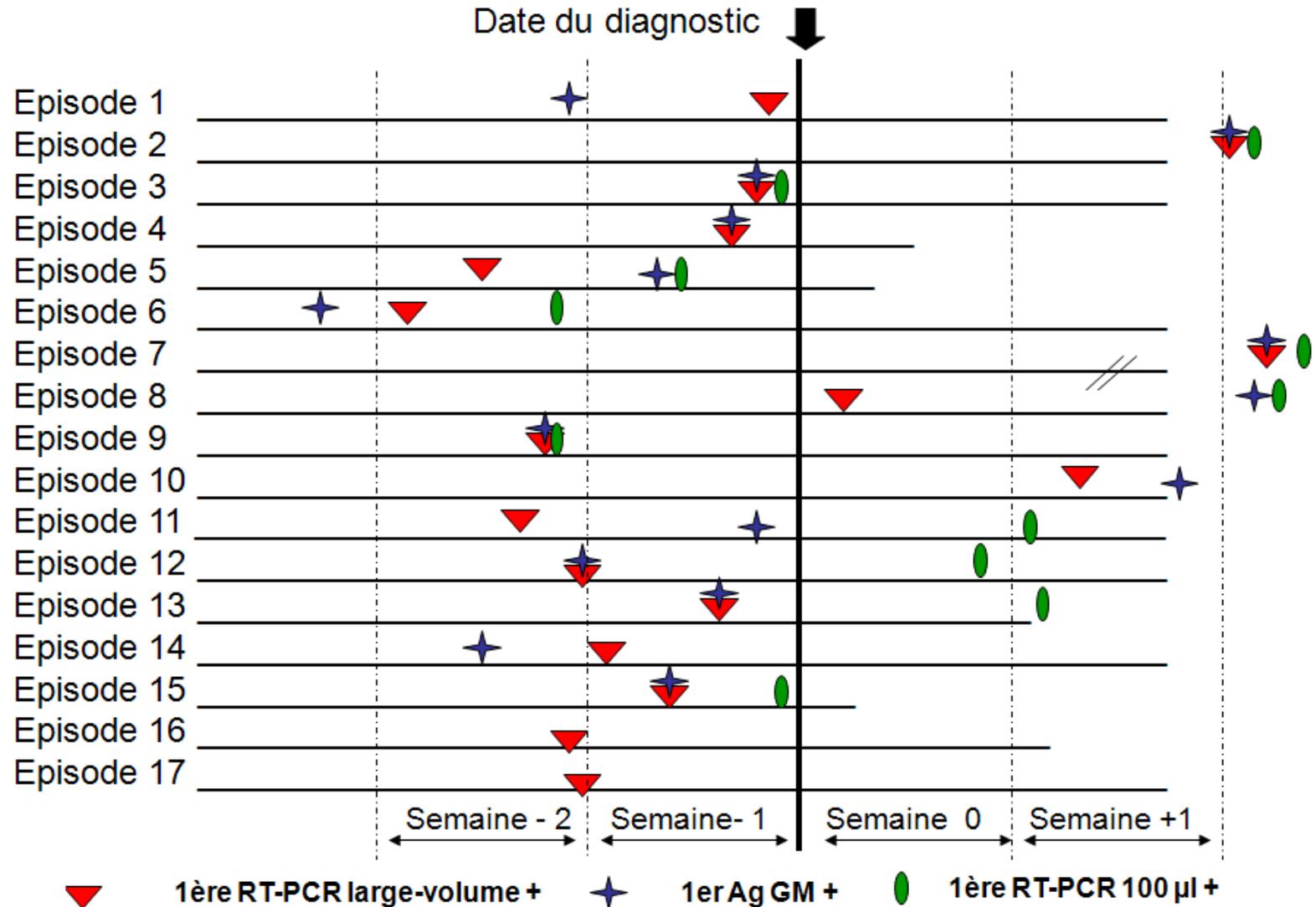
Chez les patients d'hématologie adulte → la détection d'ADN d'*A. fumigatus* est un marqueur précoce et spécifique d'AI

- Prospective, Hématologie adulte Necker 2006-2007
- 125 patients inclus (137 épisodes évalués)
 - 17 cas AI (1 prouvé, 14 probables et 2 possibles) → 8 patients allogreffés
 - Incidence AI : 11,3%
- Screening : GM : 2/ sem
- q-PCR *A. fumigatus* (28S): 1/sem /Sérum (1mL et 100 µL)

AI	qPCR		GM
	large volume	faible volume	
Sensitivité	100%	76,5	88,2
Spécificité	96,7	96,7	95,8
VPP	81	81,3	75
VPN	100	95,6	98,3

Délai de positivité de la q-PCR et du GM en fonction de la date du diagnostic d'AI chez les 17 patients

PCR + :
 → Précède le diagnostic clinique : 13/ 17 cas AI
 → Précède la détection GM: 5 cas
 concomitant : 6 cas
 → seul marqueur sérique + AI : 2 cas



Diagnostic des Mucormycoses

- Diagnostic extrêmement difficile
- Pas de marqueurs sériques disponibles

qPCR Diagnosis of Mucormycosis • CID 2013:56 (15 May) • e95

MAJOR ARTICLE

Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection of Circulating DNA in Serum for Early Diagnosis of Mucormycosis in Immunocompromised Patients

Laurence Millon,^{1,2} Fabrice Larosa,³ Quentin Lepiller,^{2,4} Faezeh Legrand,³ Steffi Rocchi,¹ Etienne Daguindau,³
Emeline Scherer,^{1,2} Anne-Pauline Bellanger,^{1,2} Joel Leroy,⁵ and Frederic Grenouillet^{1,2}

Détection d'ADN circulant dans le sérum de patients atteints de Mucormycoses ?

- Etude rétrospective
- 10 patients atteints de différentes formes cliniques de mucormycoses (cutanée, rhinocérébrale ou disséminée)
- 3 qPCRs → Mucor/Rhizopus, Lichtheimia et Rhizomucor
- Intérêt diagnostique : Pos ds le serum 9/10 pts
- Suivi thérapeutique
- Stratégie d'avenir +++

Conclusions

- PCR en temps réel bien standardisées
- Méthodes diagnostiques efficaces
 - Diagnostic des Aspergilloses → Kit commercialisé
 - Diagnostic des Mucormucoses : PHRC évaluation

✓ Marqueurs indirects des Infections Fongiques Invasives

- **Antigènes** : polysaccharides de paroi des champignons
- **ADN fongique** :

✓ Méthodes d'identification rapides et précises des champignons

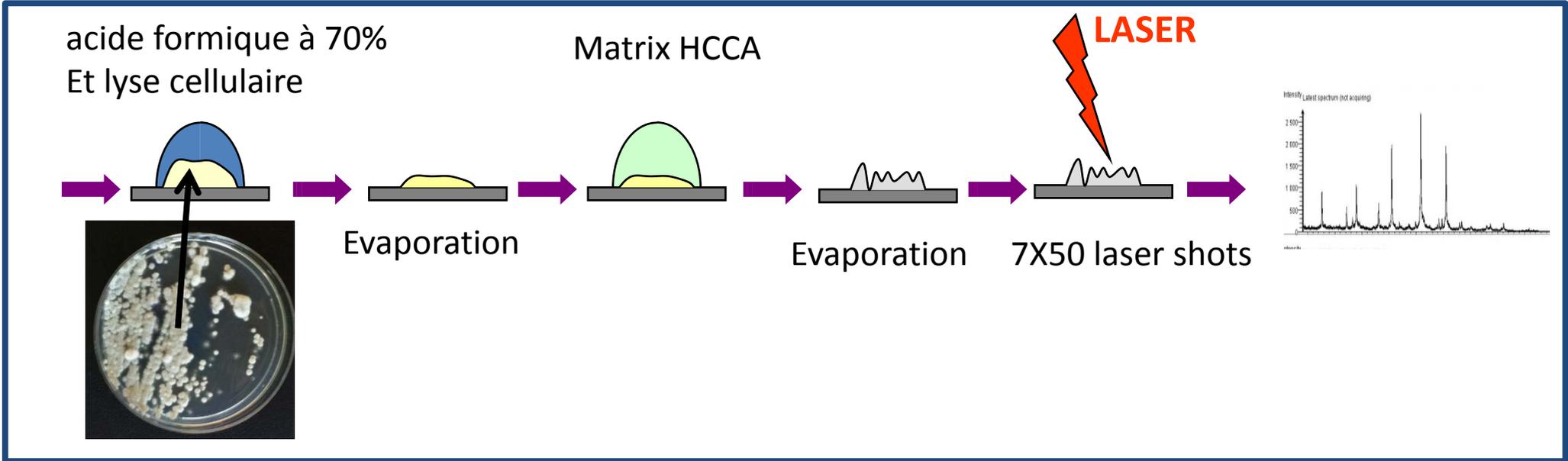
→ **Spectrométrie de masse de type Maldi-Tof**

→ Biologie moléculaire

Identification rapides et précises des champignons par spectrométrie de masse de type Maldi-Tof

→ Révolution dans le monde de la mycologie

- Standardisation de l'identification des « champignons »
- Amélioration de la précision de l'identification
- **Réduction du temps nécessaire à l'identification des « champignons »**
 - Impact clinique majeur



→ protocole expérimental simple et rapide :

→ Identification précise de l'espèce fongique en 5 min

Diagnostic mycologique conventionnel : 2 limites

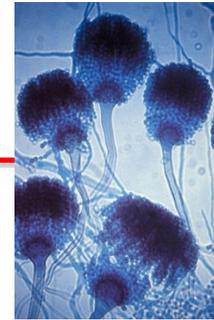
→ long et imprécis

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

3 à 7 jours

Cultures +

Aspergillus fumigatus ?

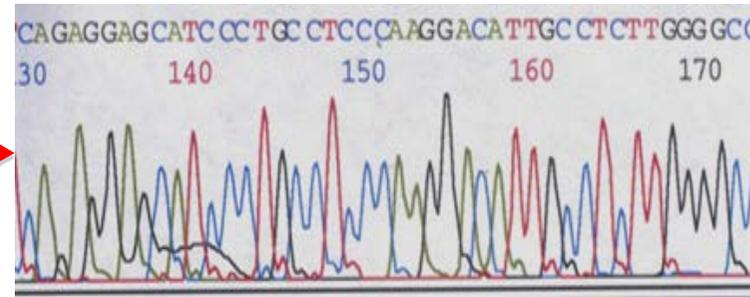


?



+ 8 jours

Identification moléculaire : diagnostic précis



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
- Améliore la prise en charge des patients en identifiant rapidement les espèces de sensibilité diminuée aux antifongiques

✓ Levures

- Permet une identification rapide et précise
- Réduire le délai d'identification des espèces à partir des hémocultures positives

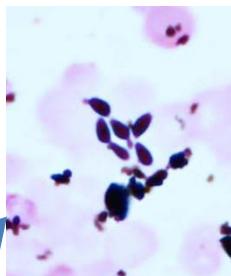
HC positive

5mn

Fongémie

15mn

Candidémie à *Candida glabrata*



Gram
Levure

Procédure MALDI-TOF-MS

extraction
10 mn

Dépôt

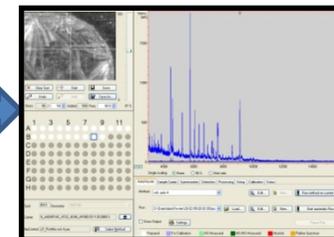
Identification de
l'espèce
MALDI-TOF-MS
= 5 mn



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

Merci de votre attention !

Déclaration de Relations Professionnelles

- Affiliation avec les sociétés :
 - ANDROMAS (Paris, France)
 - ADEMTECH (Bordeaux, France)
- Bénéficie d'un soutien à la recherche par la société Astellas Pharma France