

Difficultés de diagnostic et d'expertise microbiologique des infections fongiques invasives

Alexandre Alanio¹, Stéphane Bretagne (stephane.bretagne@sls.aphp.fr)^{1,2}

1/ Université Paris-Diderot, Hôpital Saint-Louis (AP-HP), Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Paris, France

2/ Centre national de référence des mycoses invasives et antifongiques, Institut Pasteur, Paris, France

Résumé / Abstract

Le diagnostic des infections fongiques invasives reste difficile malgré l'avènement de nouveaux outils. Parmi les biomarqueurs, le galactomannane sérique en criblage deux fois par semaine conserve tout son intérêt malgré la persistance de nombreux faux positifs et les faux négatifs dans les nouvelles populations à risque d'aspergillose non neutropéniques. Le $\beta(1-3)$ -D-glucane semble avoir un intérêt essentiellement dans le diagnostic de la pneumocystose. Pour la recherche d'ADN par PCR, un consensus se dégage sur l'emploi exclusif d'un format quantitatif en temps réel et sur le sérum comme échantillon clinique à privilégier en raison des facilités des étapes pré-analytiques. La recherche d'ADN et de galactomannane dans le lavage broncho-alvéolaire soulève des problèmes d'interprétation entre contamination, colonisation et maladie avérée. En parallèle, l'identification de l'espèce est une étape primordiale pour adapter le traitement antifongique. Des méthodes rapides comme la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) et le test PNA FISH (Peptide Nucleic Acid Fluorescence in Situ Hybridization) s'ajoutent aux techniques existantes pour accélérer l'identification des espèces les plus fréquentes. Pour les espèces rares responsables d'infections invasives, les méthodes de biologie moléculaires sont à encourager pour aboutir à l'identification la plus précise possible, aussi bien pour des raisons épidémiologiques que thérapeutiques.

Diagnostic and microbiological expertise difficulties for diagnosing invasive fungal infections

The diagnosis of invasive fungal infections remains difficult despite the availability of new diagnostic tools. Among the biomarkers, the biweekly screening of galactomannan remains relevant despite false positives, and false negatives in the new non-neutropenic populations at risk of invasive aspergillosis. The (1-3)- β -D-glucan seems interesting mainly for diagnosing pneumocystis pneumonia. A consensus emerges for DNA detection using PCR on the exclusive use of real-time quantitative PCR format and on the use of serum as the most suitable specimen. DNA and galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluids raises interpretative issues between contamination, colonisation and true invasive disease. Additionally, identification at the species level is crucial for adapting the antifungal treatment. Rapid methods such as MALDI-TOF spectrometry and PNA FISH (Peptide Nucleic Acid Fluorescence in Situ Hybridization) are now available in addition to existing methods to speed identification of common species. For uncommon species involved in invasive fungal infections, molecular tools should be supported to obtain optimal identification for epidemiological and therapeutic issues.

Mots-clés / Keywords

Infection fongique invasive, diagnostic, microbiologie / Invasive fungal infections, diagnosis, microbiology

Le diagnostic des infections fongiques invasives (IFI) a toujours été difficile. Il est le plus souvent porté sur un faisceau d'arguments cliniques, scannographiques et microbiologiques. La faible sensibilité des cultures ainsi que les problèmes d'interprétation entre contamination, colonisation et maladie avérée, ont motivé le développement de biomarqueurs (ADN et antigènes : galactomannane et $\beta(1-3)$ -D-glucane). Grâce aux propositions consensuelles actuelles, le même langage est utilisé pour les études cliniques et épidémiologiques [1]. Cependant, l'utilisation des tests microbiologiques inclus dans ces définitions pour la prise en charge individuelle peut conduire à des erreurs d'interprétation, en raison de leurs nombreuses limites présentées dans cette brève revue.

En parallèle, les méthodes d'identification des espèces fongiques se sont améliorées. Les récents remaniements taxonomiques permettent de mieux séparer les espèces dont la sensibilité aux antifongiques diffère. Cependant, certaines limites des méthodes phénotypiques doivent être soulignées pour éviter certaines erreurs d'identification, notamment avec des espèces rares.

Diagnostic antigénique

Galactomannane (GM)

Le GM est un sucre excrété par *Aspergillus fumigatus* durant sa croissance. Sa détection est validée pour le diagnostic des aspergilloses invasives (AI) et repose sur un test ELISA commercial unique [1]. Ces avantages sont manifestes pour la précocité du diagnostic et pour suivre l'évolution sous traitement. Il présente cependant des limites à reconsidérer pour chaque patient.

Les performances du test ELISA en hématologie, où il est recommandé comme test de criblage sur sérum deux fois par semaine pour les patients à risque d'AI [2], ont conduit de nombreuses équipes à l'utiliser dans d'autres populations. Or, en dehors des patients profondément neutropéniques ou souffrant de la maladie du greffon contre l'hôte (GVH), la prévalence de l'AI est trop faible pour qu'un test utilisé en criblage soit pertinent. De plus, sur le plan physiopathologique, le principal facteur favorisant retrouvé dans les nouvelles populations à risque d'AI (syndromes lymphoprolifératifs, transplantés d'organe solide, maladies de système, pathologies

pulmonaires chroniques) est la corticothérapie et non la neutropénie [3]. Ainsi, le développement du champignon est différent, avec une masse fongique plus faible et une diffusion systémique des métabolites réduite par la présence des leucocytes autour du champignon. On constate donc de nombreux faux négatifs dans ces populations [3]. Les prophylaxies antifongiques peuvent aussi limiter la production du GM, sans pour autant contrôler complètement le développement du champignon.

Par ailleurs, le test GM a toujours présenté un fort taux de fausse positivité, variable suivant les populations de malades [4]. Au regard du pronostic de l'AI, cette limite paraît tolérable, car il semble préférable de traiter en excès. Cependant, le risque d'effets secondaires, les interactions médicamenteuses, le coût des nouvelles molécules antifongiques et surtout les investigations inutiles semblent de moins en moins acceptables. Certains faux positifs sont dus à la non-spécificité du GM, cet antigène étant produit par de nombreux champignons non pathogènes utilisés dans l'industrie. Tout produit perfusé dans la synthèse duquel intervient un champignon, comme les pénicillines, peut

être contaminé par du GM. La seule façon de s'en prémunir est de tester ces produits pour la présence du GM à la moindre suspicion. L'hypothèse d'une absorption digestive du GM chez des patients présentant des dysfonctionnements intestinaux (enfants, GVH digestives) relève d'une explication similaire, tous les aliments ou presque contenant du GM. À noter que cette non-spécificité peut être utile au diagnostic d'autres IFI comme la pénicilliose à *Penicillium marneffeii* ou l'histoplasmosse au cours du sida. Cependant, il existe de nombreuses autres causes de fausses positivités non reliées à une production de GM par d'autres champignons. En particulier, de nombreux sérums positifs sont re-testés négatifs et considérés comme non reliés à une infection.

Depuis quelques années, des équipes ont travaillé à nouveau sur la recherche de GM dans le liquide des lavages broncho-alvéolaires (LBA) [5]. Comme les procédures du LBA varient selon les hôpitaux, que la quantité de liquide récupérée varie selon les malades, et que son rendement diagnostique est dépendant du fibroscopiste, il semble difficile d'obtenir un seuil consensuel permettant de définir une AI, bien que le fabricant ne fasse pas de différence entre sérum et LBA pour le rendu du dosage.

β(1-3)-D-glucane (BDG)

Le BDG est un polysaccharide produit en quantité par l'immense majorité des champignons, à l'exception notable des zygomycètes et des cryptocoques. Il est donc utilisé pour le diagnostic aussi bien des candidoses invasives et des AI que des pneumocystoses. L'enzyme responsable de sa synthèse est la cible des échinocandines. Le principe du test est la mesure de l'activité d'enzymes, issues de la limule, en présence de BDG. Plusieurs tests commerciaux très différents existent [2].

La détection de BDG a fait l'objet de plusieurs méta-analyses qui concluent à un intérêt pour les candidoses profondes, sous réserve de la prise en compte d'un fort taux de fausse positivité qui s'explique par l'origine du test [6]. En effet, celui-ci est également utilisé pour le dosage du lipopolysaccharide (LPS) bactérien. Le LPS étant présent dans de nombreux produits et les patients à risque d'IFI étant également à risque d'infection bactérienne, l'analyse d'un résultat positif nécessite l'exclusion de toutes les autres causes possibles de positivité. Pour les AI, le test BDG ne semble pas apporter d'éléments supplémentaires par rapport au GM. Pour les pneumocystoses, surtout chez les patients VIH+, le test BDG pourrait être plus sensible que la recherche du champignon dans les expectorations induites et réduire le recours au LBA chez certains patients.

Autres antigènes

D'autres antigènes ont été utilisés pour le diagnostic des IFI. La détection du mannane sérique par ELISA, en association avec la détection d'anticorps anti-mannanes, a été proposée depuis plus de 15 ans sans trouver de place définitive pour le diagnostic des candidoses invasives en réanimation [2]. Par contre, la détection d'antigène cryptococcique est majeure pour le diagnostic, le pronostic et le suivi des cryptococcoses, avec des performances excellentes en termes de sensibilité et spécificité pour la quasi-totalité des tests commercialisés.

Diagnostic par PCR

Beaucoup d'espoirs ont été mis sur la détection d'ADN d'*Aspergillus* dans les prélèvements sanguins. L'extrême hétérogénéité des tests est le principal argument justifiant la non intégration de la PCR dans les critères diagnostiques [1]. Les méthodes de PCR quantitatives (qPCR) sont les seules qui devraient être désormais utilisées. Leurs principaux avantages sont la diminution drastique du risque de faux positifs avec des produits préalablement amplifiés, principale source environnementale de faux positifs, et l'aspect quantitatif, fondamental pour contrôler le rendement de l'amplification, évitant ainsi les faux négatifs [7]. Des recommandations MIQE (*Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*) ont été proposées pour harmoniser et rationaliser les procédures analytiques [8]. L'emploi d'un contrôle interne de la réaction est devenu une obligation pour le diagnostic. Un groupe européen s'est constitué et a émis des recommandations pour le diagnostic sur sang total et sur sérum [9]. La tendance actuelle est de privilégier le sérum en raison de la simplification des étapes pré-analytiques pour l'extraction de l'ADN.

La PCR a également été testée sur le produit du LBA. Si la culture positive d'un *Aspergillus* à partir du LBA ne permet pas de répondre entre contamination, colonisation et infection, cela vaut également pour la détection d'ADN.

La recherche d'ADN de levures à partir du sang pour le diagnostic des candidémies est le sujet de nombreuses publications [10]. Sa plus-value quand l'hémoculture est positive semble minime, et son utilité comme méthode de criblage limitée par la faible prévalence des candidémies, aussi bien en hématologie qu'en réanimation.

Identification – génotypage

Un effort important a porté ces dernières années sur le démantèlement des différentes espèces fongiques. L'identification au niveau de l'espèce est indispensable pour l'adaptation du traitement antifongique. Les caractères phénotypiques classiques (cultures sur milieux chromogènes, analyse microscopique, test enzymatique ou d'agglutination rapide), sont suffisants pour les espèces les plus fréquentes, mais tendent à être supplantés par des méthodes plus rapides (voir ci-après).

Pour les espèces rares, un système de code-barres ADN basé sur les séquences ITS (séquences internes transcrites) se généralise. Le génotypage des isolats d'une espèce donnée peut être utile pour des études épidémiologiques ou des cas cliniques particuliers comme la récurrence d'une infection. Deux méthodes reproductibles et fournissant des résultats informatifs et échangeables entre laboratoires sont disponibles pour de nombreuses espèces. Il s'agit du typage par *Multilocus Sequence Typing* et l'analyse de marqueurs microsatellites. Aussi bien l'identification que le génotypage sur un nombre limité de locus seront probablement à terme dépassés par les nouvelles générations de séquenceurs à très haut débit.

Matrix assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF)

Depuis quelques années, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF révolutionne l'identification des microorganismes. Cette technique quantifie avec précision et en quelques secondes la masse et l'abondance des protéines comprises entre 2 000 et 15 000 Da présentes dans le produit testé. Chaque espèce fongique possédant son propre spectre, l'identification est obtenue en comparant le spectre du produit testé à une base de données [11]. Trois systèmes concurrents sont actuellement disponibles, avec des instruments, des protocoles de préparation des colonies, des bases de données et des algorithmes d'analyse qui leur sont propres (tableau). Les méthodes actuelles ne peuvent être utilisées que sur des cultures d'au moins 24 heures. Des critères simples, comme le temps de pousse, le milieu de culture utilisé pour réaliser les bases de données et la technique employée pour la préparation de la colonie, sont importants à prendre en compte. Actuellement, les échecs d'identification des champignons par MALDI-TOF sont variables suivant les laboratoires et leur recrutement, mais restent inférieurs à 20% des isolats cliniques testés [11].

L'identification des levures à partir d'hémoculture, sous réserve qu'elles ne contiennent pas de charbon, est possible après traitement pour éliminer les cellules sanguines, les protéines sériques et l'hémoglobine qui génèrent de nombreux pics interférents [11]. Parmi le potentiel futur de cette technologie, citons la détermination d'une « concentration minimale induisant un changement de profil », l'équivalent d'une concentration minimale inhibitrice quel que soit le mécanisme de résistance impliqué [12].

Tableau Comparaison des données publiées ayant permis l'évaluation des différents systèmes MALDI-TOF existants pour l'identification de différents genres fongiques / Table Comparison of published data on the evaluation of different MALDI-TOF devices for the identification of various fungal genera

Genre et groupe fongique	MicroFlex® (Brucker Daltonics Inc.)	Vitek-MS® (Biomérieux)	Andromas® (Andromas SAS)
<i>Candida</i> spp.	X	X	X
<i>Cryptococcus</i> spp.	X*		
<i>Aspergillus</i> spp.	X*	X	X
<i>Scedosporium</i> spp.	X*		
<i>Fusarium</i> spp.	X*		
Mucorales	X*		
Dermatophytes	X*	X*	X

* Évaluation d'un dispositif commercial en utilisant une base de données personnelle distincte de la base de données commerciale disponible.

Peptide Nucleic Acid Fluorescence in Situ Hybridization (PNA-FISH)

Le test PNA-FISH repose sur des sondes peptidiques fluorescentes portant les bases nucléotidiques reconnaissant les ARN ribosomiques des principales espèces de levures (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* et *Candida krusei*). Ce test est déjà utilisé dans de nombreux pays pour une identification quasi immédiate des levures à partir des hémocultures.

Conclusion

La microbiologie classique garde toute son actualité pour le diagnostic des IFI, même si des méthodes permettent déjà une identification accélérée et donc une adaptation du traitement plus rapide. Les laboratoires devraient aussi être encouragés à utiliser les méthodes moléculaires désormais facilement accessibles pour obtenir l'identification au niveau de l'espèce pour toute IFI. Pour les biomarqueurs, le GM reste incontournable pour le diagnostic précoce de l'AI en hématologie. Les autres antigènes restent pour l'instant d'intérêt plus limité, en dehors de

l'antigène cryptococcique. La détection d'ADN d'*Aspergillus* peine à trouver sa place en raison de la grande disparité des méthodes, et seule la PCR en temps réel doit maintenant être utilisée.

Références

- [1] De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. 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. Clin Infect Dis. 2008; 46(12):1813-21. Disponible à : <http://cid.oxfordjournals.org/content/46/12/1813.full.pdf>
- [2] Marchetti O, Lamothe F, Mikulska M, Viscoli C, Verweij P, Bretagne S. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. Bone Marrow Transplant. 2011;47(6): 846-54.
- [3] Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K, Lebeau B, de Monbrison F, Le Strat Y, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). Clin Microbiol Infect. 2011;17(12):1882-9.
- [4] Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2006;42(10):1417-27. Disponible à : <http://cid.oxfordjournals.org/content/42/10/1417.long>
- [5] Avni T, Levy I, Sprecher H, Yahav D, Leibovici L, Paul M. Diagnostic accuracy of PCR alone compared to galacto-

mannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a systematic review. J Clin Microbiol. 2012;50(11):3652-8.

[6] Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. Beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2011;52(6):750-70. Disponible à : <http://cid.oxfordjournals.org/content/52/6/750.full.pdf+html>

[7] Bretagne S. Advances and prospects for molecular diagnostics of fungal infections. Curr Infect Dis Rep. 2011;12(6):430-6.

[8] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009;55(4):611-22.

[9] White PL, Mengoli C, Bretagne S, Cuenca-Estrella M, Finnstrom N, Klingspor L, et al. Evaluation of *Aspergillus* PCR protocols for testing serum specimens. J Clin Microbiol. 2011;49(11):3842-8.

[10] Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol. 2011;49(2):665-70; 2013;13(5):788-99.

[11] Bader O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. Proteomics. 2012 Dec 26. doi: 10.1002/pmic.201200468.

[12] Marinach C, Alanio A, Palous M, Kwasek S, Fekkar A, Brossas JY, et al. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole. Proteomics. 2009;9(20):4627-31.

Usage, impact écologique et économique des antifongiques systémiques en milieu hospitalier en France

Frédéric Grenouillet (fgrenouillet@chu-besancon.fr)^{1,6}, Thierry Hénon^{2,6}, Jean-Daniel Kaiser^{2,6}, Samuel Limat^{1,4,6}, Laurence Millon^{1,6}, Joël Leroy^{3,5,6}

1/ CHRU, Mycologie-Parasitologie, Besançon, France 2/ CHRU, Pharmacie, Besançon, France 3/ CHRU, Service des maladies infectieuses et tropicales, Besançon, France

4/ Observatoire des médicaments, des dispositifs médicaux et de l'innovation thérapeutique (Omedit) de Franche-Comté, CHRU, Besançon, France

5/ Réseau franc-comtois de lutte contre les infections nosocomiales, RFCLIN/PRIMAIR, CHRU, Besançon, France

6/ Groupe anti-infectieux, Comité de bon usage des produits de santé, CHRU, Besançon, France

Résumé / Abstract

La diversification de l'arsenal thérapeutique antifongique a été un progrès indéniable au cours des 20 dernières années et a amélioré le pronostic des infections fongiques invasives. La prise en compte des référentiels nationaux et internationaux, leur adaptation au sein de chaque centre hospitalier par des groupes multidisciplinaires dans le cadre du contrat de bon usage des produits de santé, et la réalisation régulière d'audits des prescriptions doivent permettre une optimisation des thérapeutiques. Les antifongiques systémiques représentent désormais la première dépense d'anti-infectieux à l'hôpital, devant les antibiotiques. Les contraintes économiques et les risques d'émergence de résistance plaident donc pour un usage raisonné et optimisé des antifongiques actuellement disponibles.

Use, ecological and economic impact of systemic antifungals in hospitals in France

The diversification of the antifungal armamentarium was an undeniable progress during the last 20 years and improved the prognosis of invasive fungal infections. The optimization of the therapeutic within every hospital is the result of (i) the adaptation of national and international guidelines by multidisciplinary groups within the framework on the good use of medication and (ii) prescription audits on a regular basis. Systemic antifungals are the largest hospital spending category among anti-infective agents, in front of antibiotics. The economic constraints and the risk of emergence of resistance plead for a reasoned and optimized use of available antifungal agents.

Mots-clés / Keywords

Antifongiques systémiques, dépenses hospitalières, contrat de bon usage, résistance / Systemic antifungals, hospital costs, good-practices, antifungal resistance

Introduction

Depuis deux décennies, l'incidence des infections fongiques n'a cessé de croître. Cette augmentation est, pour une grande part, liée à l'immunodépression induite par les chimiothérapies anticancéreuses, aux traitements immunosuppresseurs, dont la cortico-

thérapie à haute dose, dans les transplantations d'organes et de cellules souches hématopoïétiques ou les maladies auto-immunes, mais aussi aux progrès des techniques médicales, en particulier en réanimation. En parallèle, des espèces fongiques jusqu'alors isolées de l'environnement, essentiellement des moisissures, ont été identifiées en patho-

logie humaine. Cette émergence et cette diversification des infections fongiques se sont heureusement accompagnées de la mise à disposition de la communauté médicale de nouveaux antifongiques (voriconazole, posaconazole, échinocandines), présentant des spectres d'activité larges et des profils de tolérance améliorés, dont le service médical