



# OUTILS DIAGNOSTIQUES ET INFECTIONS FONGIQUES INVASIVES (IFI)

---

Dr Lilia HASSEINE – [hasseine.l@chu-nice.fr](mailto:hasseine.l@chu-nice.fr)

Service de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nice  
Université Côte d'Azur



# INTRODUCTION

**Table 1** Burden of serious fungal infections in France.  
*Poids épidémiologique des infections fongiques graves en France.*

Infection	Number of infections per underlying disorder per year					Rate/100K	Total burden
	None/other	HIV/AIDS	Respiratory	Cancer/Tx	ICU		
ABPA	–	–	95,331	–	–	145	95,331
SAFS	–	–	124,678	–	–	189	124,678
Chronic pulmonary aspergillosis	–	–	3450	–	–	5.24	3450
Invasive aspergillosis	151	17	97	800	120	1.8	1185
Mucormycosis	10	–	–	69	–	0.12	79
<i>Pneumocystis</i> pneumonia	61	449	4	144	–	1	658
Candidaemia	533	28	85	1134	590	3.6	2370
Candida peritonitis	249	–	–	–	237	0.74	486
Oesophageal candidiasis	–	9075	–	?	–	13.8	9075
Recurrent vaginal candidiasis (4 ×/year +)	730,690	–	–	–	–	2220 <sup>a</sup>	730,690
Cryptococcosis	32	76	2	21	–	0.2	131
Total burden estimated	731,726	9645	223,647	2168	947		968,143

<sup>a</sup> Rate for adult females only.

- 1 Million cas infections fongiques graves (IFI) / an
- Augmentation incidence (5,9/100000) et mortalité (27,6%)
- Mortalité hospitalière/IFI
- IFI, priorité de santé publique en France

Journal de Mycologie Médicale (2016) 26, 385–390



Available online at  
**ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
www.em-consulte.com

ORIGINAL ARTICLE/ARTICLE ORIGINAL

## An estimation of burden of serious fungal infections in France

*Estimation du poids épidémiologique des infections fongiques graves en France*

J.-P. Gangneux<sup>a,\*</sup>, M.-E. Bournoux<sup>b</sup>, C. Hennequin<sup>c</sup>,  
C. Godet<sup>d</sup>, J. Chandener<sup>e</sup>, D.W. Denning<sup>f</sup>, B. Dupont<sup>b</sup>, for  
the LIFE program, the Société française de mycologie médicale  
SFMM-study group<sup>1</sup>

# INTRODUCTION

---

## Agents infectieux

## IFI: vaste hétérogénéité

### ➤ Levures

- *Candida spp*, *Cryptococcus neoformans*

### ➤ Champignons filamenteux

- *Aspergillus spp*
- Zygomycètes
  - *Mucor*, *Rhizopus*, *Lichthemia*, *Rhizomucor*

### ➤ Autres moisissure

- CH noirs (*Alternaria...etc*), *Fusarium spp*, *Scedosporium spp*

### ➤ *Pneumocystis jiroveci*

## Patients à risque

Patients immunodéprimés (Hématologie, réanimation, Transplantés d'organes...)

# SUSPICION IFI

- Contexte clinique

- ❖ Immunodépression

- Iatrogène: Hématologie, Cancer, transplantés d'organes; maladies auto-immunes, biothérapies
- VIH et ARV

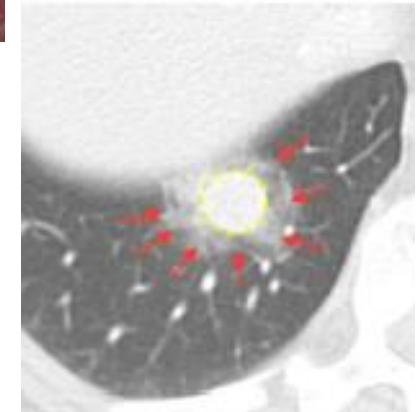
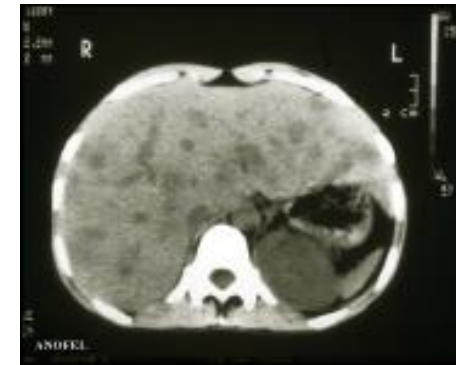
- ❖ Réanimation: médicale, chirurgicale (KT, ventilation mécanique,...)

- ❖ Autre: Diabète, porte d'entrée cutanée (traumatisme, brûlure...)

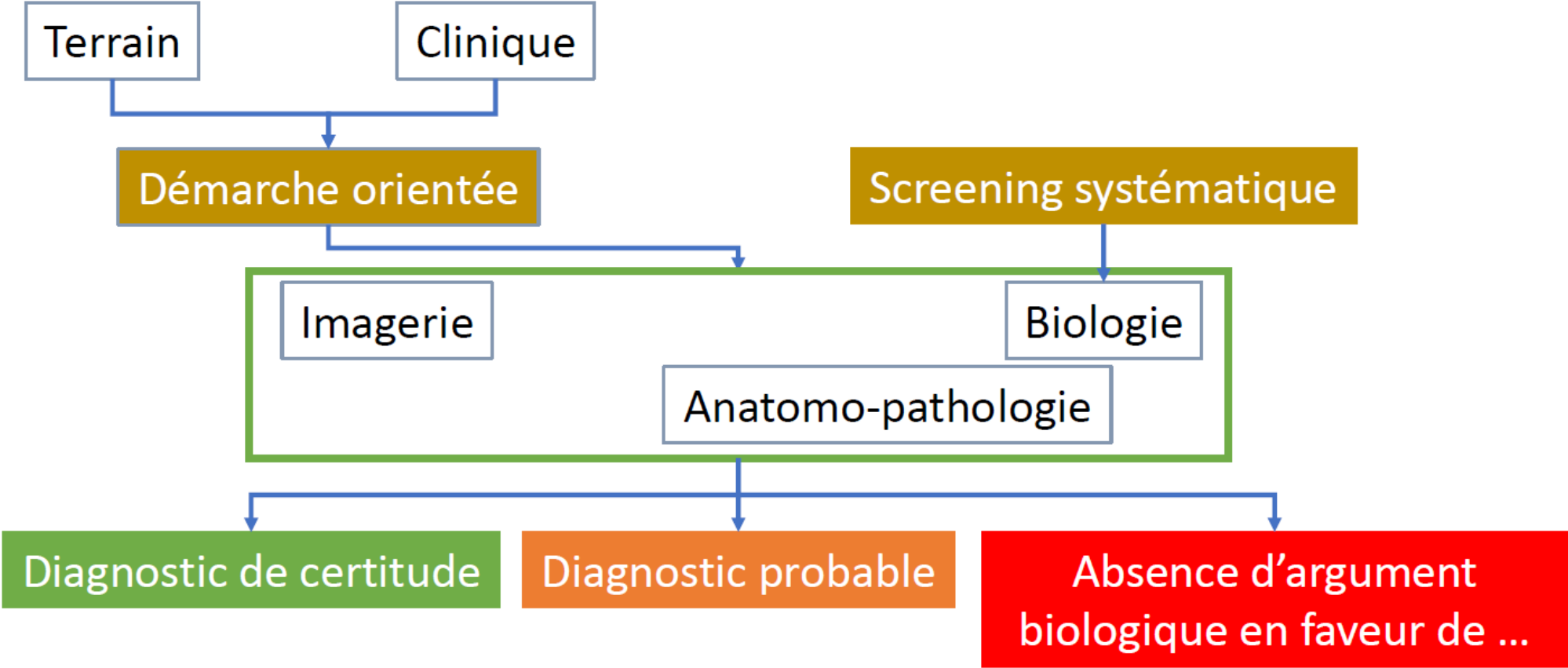
- Clinique non spécifique

mais orientation du diagnostic

- imagerie



# DEMARCHE DIAGNOSTIQUE



# CLASSIFICATION IFI

(EORTC/MSG, consensus international)  
2002, 2008, 2020

**Prouvée**

Myco ou  
anapath  
pos (pvts  
profonds  
stériles)

**probable**

Facteur  
lié à  
l'hôte

**possible**

Facteur  
lié à  
l'hôte

Critère  
clinique

Critère  
biologique

Critère  
clinique

Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, et al. 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. *Clin Infect Dis* 2020; 71: 1367–76. 4 Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. Clinical characteristics

**En 2012 AsplCU:** Blot SI and al. A clinical algorithm to diagnose invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 56–64.

**En 2018 classification IAPA:** Schauvlieghe AFAD, and al. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *Lancet Respir Med* 2018

# CLASSIFICATION IFI

(EORTC/MSG, consensus international)  
2002, 2008, 2020

**Prouvée**

Myco ou anapath pos (pvts profonds stériles)

**probable**

Facteur lié à l'hôte

**possible**

Facteur lié à l'hôte

Critère clinique

Critère clinique

Critère biologique

➤ En 2019, plusieurs changements  
**PCR *Aspergillus***  
**T2M *Candida***  
**révision seuil GM LBA/sérum**

Algorithm to diagnose  
Am J Respir Crit Care

eghe AFAD, and al. Invasive aspergillosis in patients admitted  
to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. Lancet Respir Med 2018

# OUTILS DIAGNOSTIQUES IFI

---

**Diagnostic direct:** mise en évidence du champignon (sang, biopsies, pvts respi...etc)

- Examen direct/cytologie
  - Culture
- } +/- rapides mais peu sensibles (ED 40%, ED+culture 60-70%)  
} Spécificité variable (hémocultures, LCR, pvts broncho-pulmonaires)
- Identification précise : Spectrométrie de masse **MALDI-TOF** / techniques conventionnelles
    - Orientation thérapeutique
  - Tests de sensibilité aux antifongiques



# OUTILS DIAGNOSTIQUES IFI

---

**Diagnostic direct:** mise en évidence du champignon (sang, biopsies, pvts respi...etc)

- Examen direct/cytologie
  - Culture
- } +/- rapides mais peu sensibles (ED 40%, ED+culture 60-70%)  
} Spécificité variable (hémocultures, LCR, pvts broncho-pulmonaires)

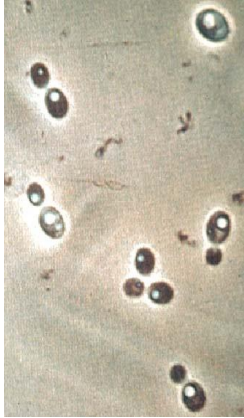
- Identification précise : Spectrométrie de masse **MALDI-TOF** / techniques conventionnelles
  - Orientation thérapeutique
- Tests de sensibilité aux antifongiques

## **Diagnostic indirect (Biomarqueurs) :**

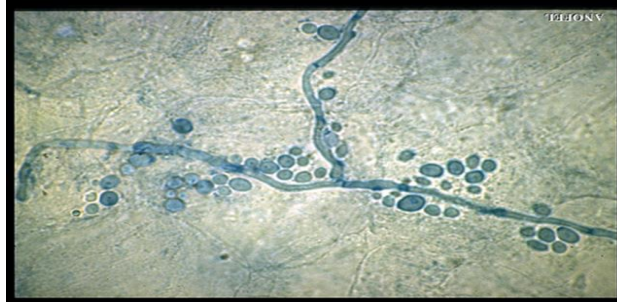
- Détection de molécules fongiques
  - Galactomananne: sérum, LBA, LCR → **Aspergillose**
  - Glycuronoxylomanne (GXM) : LCR, sérum, urines → **Cryptococcose**
  - Mannane (Ag/Ac) → **Candidoses**
  - Antigènes « panfongiques » :  **$\beta$  (1-3) D glucane**
- ADN fongiques
  - Real-time PCR

# EXAMEN DIRECT

---



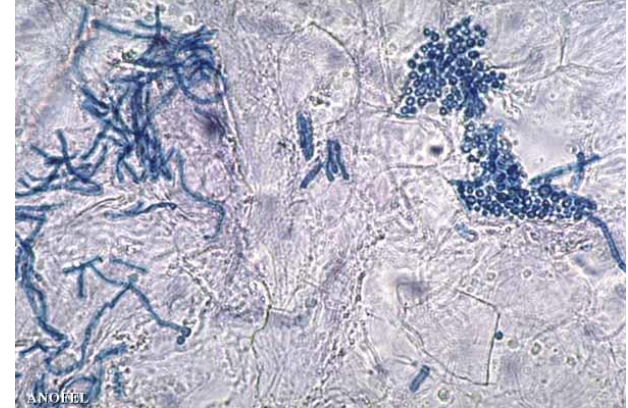
Levures



Levures et pseudofilaments  
*Candida sp*

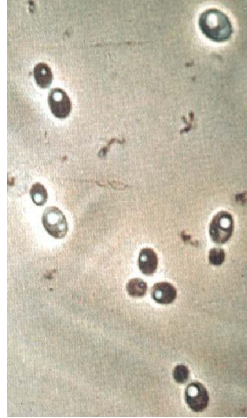


Levures encapsulées  
(*Cryptococcus spp*)

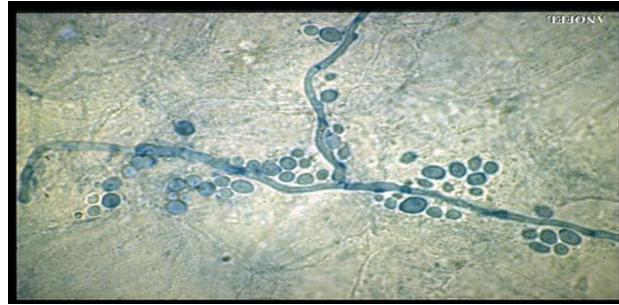


*Malassezia sp*

# EXAMEN DIRECT



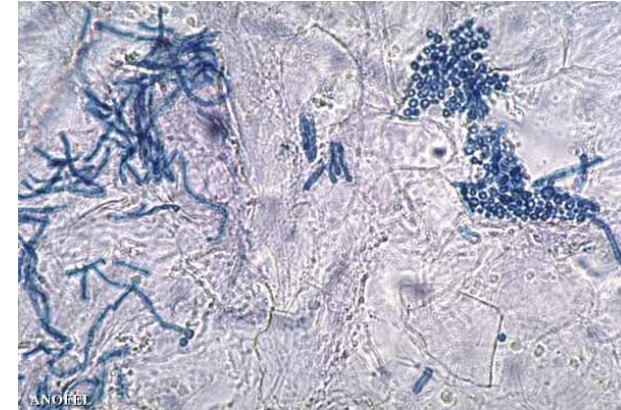
Levures



Levures et pseudofilaments  
*Candida sp*

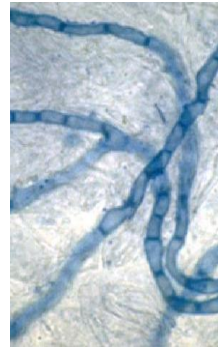
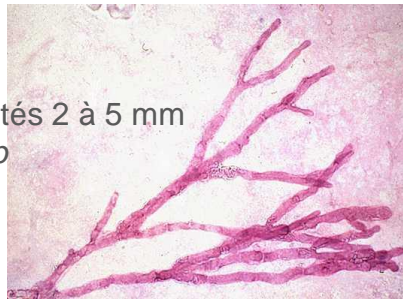


Levures encapsulées  
(*Cryptococcus spp*)

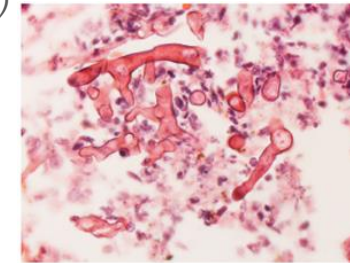


*Malassezia sp*

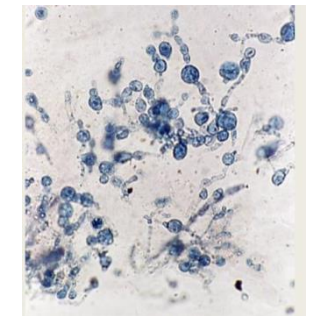
Filaments septés 2 à 5 mm  
ramifications à 45° *Aspergillus spp*



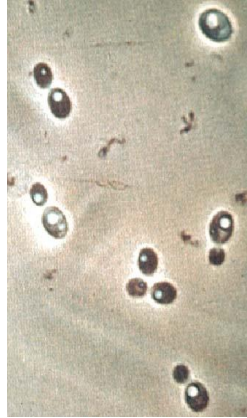
Filaments non septés 6 à 15 mm  
rubannés bifurquant à 90° Mucorales



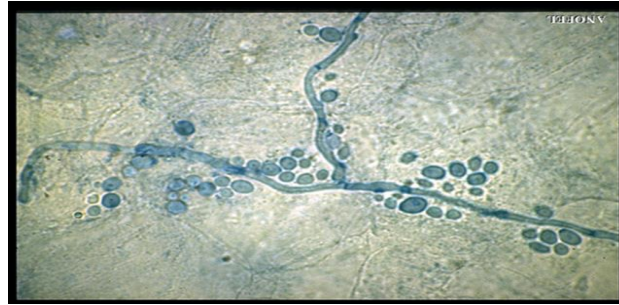
Filaments septés irréguliers  
vésiculeux  
*Aspergillus sp ?*  
*Fusarium sp ?*  
Autre moisissure ?



# EXAMEN DIRECT



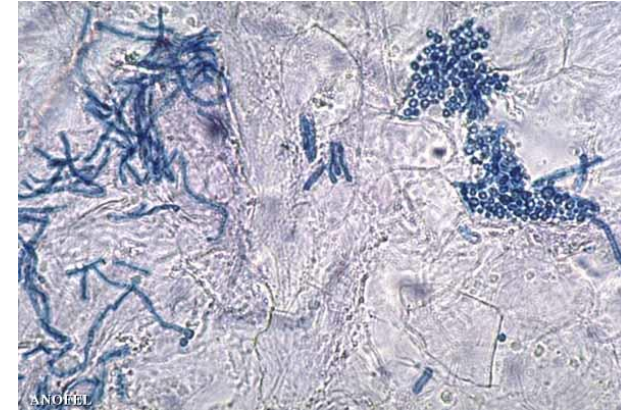
Levures



Levures et pseudofilaments  
*Candida sp*

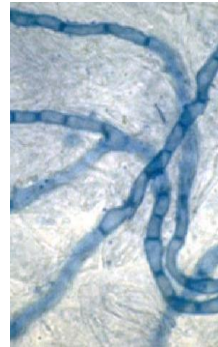
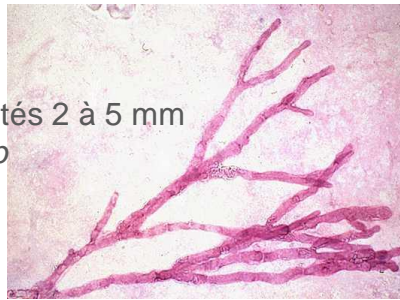


Levures encapsulées  
(*Cryptococcus spp*)

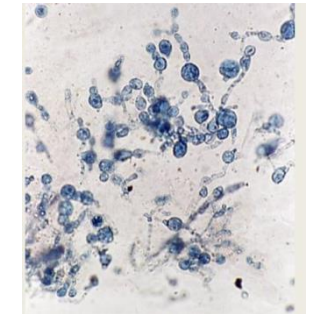
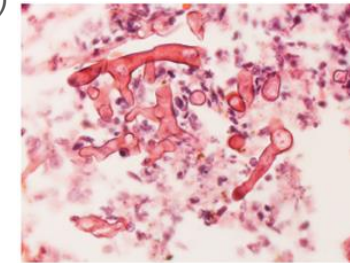


*Malassezia sp*

Filaments septés 2 à 5 mm  
ramifications à 45° *Aspergillus spp*



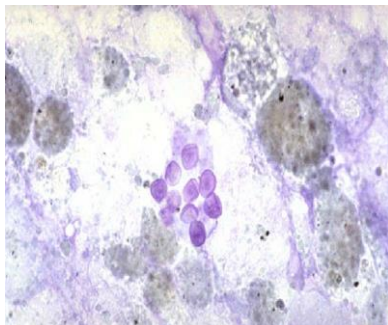
Filaments non septés 6 à 15 mm  
rubannés bifurquant à 90° Mucorales



Filaments septés irréguliers  
vésiculeux  
*Aspergillus sp ?*  
*Fusarium sp ?*  
Autre moisissure ?



Levures et *Pneumocystis jirovecii*



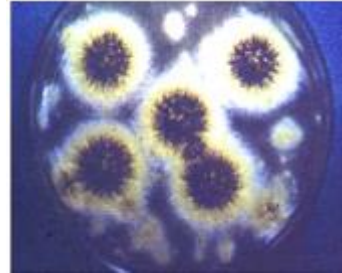
Kystes *Pneumocystis jirovecii*

# CULTURE



*A. fumigatus*  
Vert de +en+  
foncé en  
vieillissant

moisissures



levures



Levures/milieu chromogène



*Cryptococcus neoformans*

Incubation levures 5-7 jours vs 3 semaines filamenteux

PVTS respiratoires non invasifs	ECBC Crachat induit Répéter les PVTs	ED et culture <u>Sensibilité ~ 30%</u> Spécificité ?
PVTS respiratoires invasifs	LBA	ED + culture <u>Sensibilité ~ 50%</u>

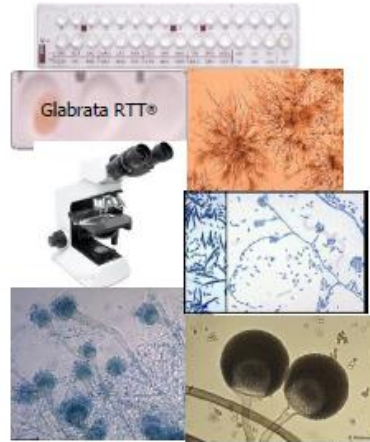
# CULTURE

Genre

Complexe d'espèce

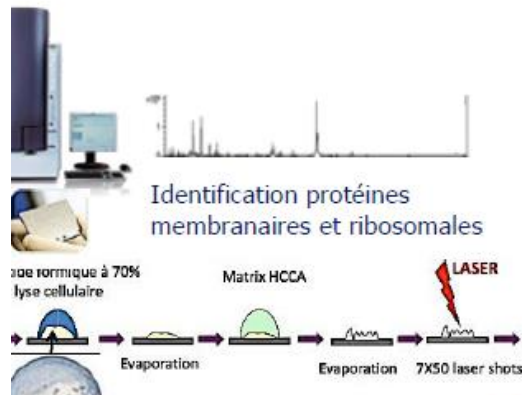
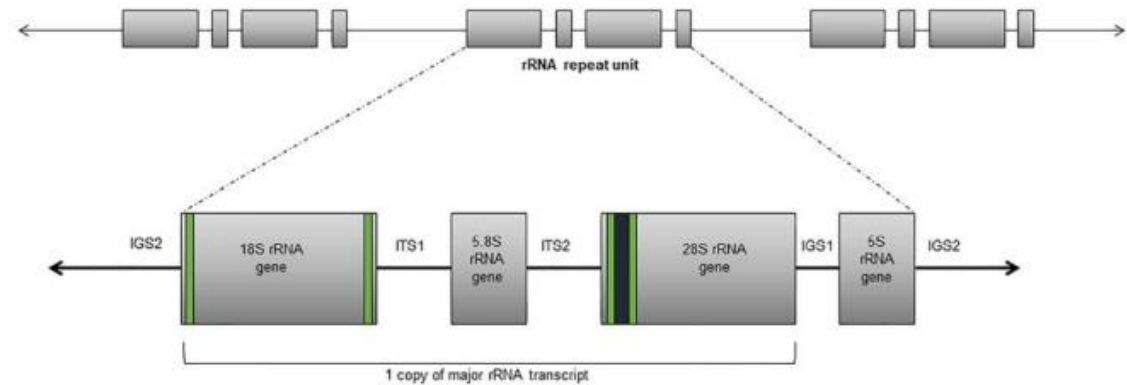
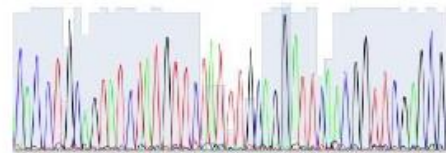
Section

Espèce



ID phénotypique conventionnelle  
métabolique +/- morphologique

Séquençage moléculaire  
(ITS ou Multilocus)  
Quelques jours



Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

# SPECTROMETRIE DE MASSE: MALDI TOF

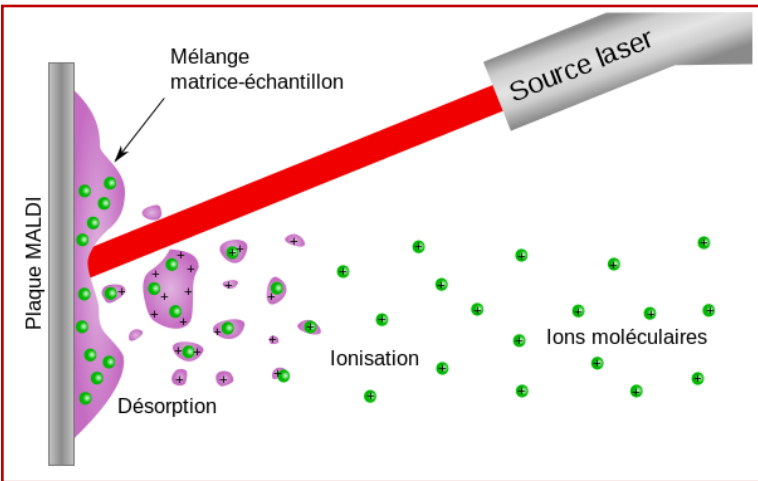
---

## *Matrix assisted laser desorption ionisation time of flight Mass Spectrometry*

- ▶ L'identification par Maldi-TOF MS revient à comparer l'empreinte proteique d'un isolat à une banque d'empreintes proteiques.
- ▶ Méthode:
  - ▶ Facile
  - ▶ Rapide
  - ▶ Plus précise que les méthodes phénotypiques classiques
- ⇒ Elle a déjà révolutionné l'identification des bactéries et des levures.
- ⇒ Elle est maintenant tout-à-fait applicable à l'identification des filamenteux

# SPECTROMETRIE DE MASSE: MALDI TOF

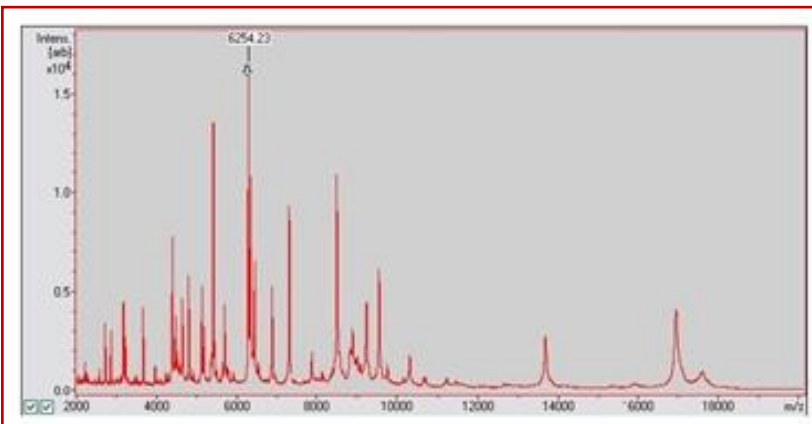
## MALDI-TOF: association de 2 principes



**MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) =** analyte+matrice= mélange cristallin irradié par un faisceau laser→désorption-ionisation.

**En pratique:** dépôt d'une colonie en fine crêpe ou de suspension sur plaque métallique–séchage–dépôt d'une matrice–séchage.

**Plusieurs protocoles:** sans extraction, extraction courte, extraction longue



**TOF (Time of flight)=**analyseur du temps de vol et transformation des ions en un courant électrique

**En pratique:** obtention d'un profil comparé à une banque de données–10 propositions avec score décroissant-satisfaisant si >2, acceptable entre 1,7 et 2 (Bruker).

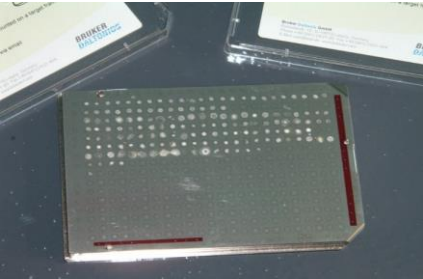


# SPECTROMETRIE DE MASSE: MALDI TOF

---



Appareil Biotyper de Bruker



Plaque de dépôt échantillon (Bruker Daltonics)

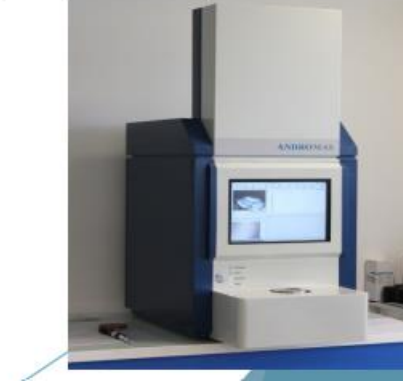
BIOMERIEUX



SHIMADZU

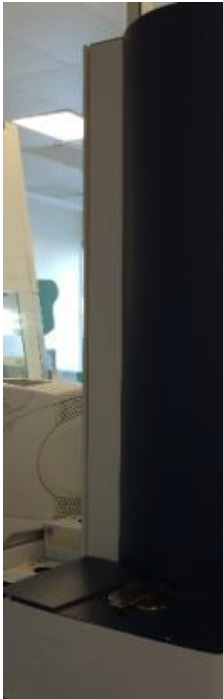


ANDROMAS



# SPECTROMETRIE DE MASSE: MALDI TOF

Organisms	Vitek MS (Avril-2017) Biomerieux	MBT-RUO (Octobre- 2017) Bruker	MBT-IVD (Octobre- 2017) Bruker	MBT-mold (Octobre- 2017) Bruker	NIH- (2013)	Online MSI (Aout 2017)
Total champignons	158	219	178	126	114	825
Total levures	87	182	177	0		207
Total Dermatophytes	18	8	0	15	4	64
Total filamenteux	53	29	1	111	110	554
Aspergillus spp	13	8	0	20	37	128
Penicillium spp	11	5	0	30	3	113
Fusarium spp	8	3	1	14	7	50
Scedosporium spp	3	1	0	2	4	11
Mucorales spp	6	2	0	9	10	31
Autres genres	12	10	0	31	49	221



Appareil Biotyper de Bruker



# SPECTROMETRIE DE MASSE: MALDI TOF

Application web

Banque et algorithmes spécifiques

Outil épidémiologique

## MSI-2

Performances de l'application d'identification en ligne par rapport au logiciel Bruker alimenté par une base Bruker ou par une base « maison ». Test à l'aide de 498 isolats cliniques provenant de 5 hôpitaux différents

% d'identification supérieur à 80% avec l'application en ligne, quelque soit l'hôpital d'origine du prélèvement

De manière générale,  
Application d'identification en ligne >  
Base maison avec logiciel Bruker >  
Base Bruker avec logiciel Bruker  
Et ce quel que soit l'hôpital d'origine

TABLE 3 Panel 2 identification results obtained with the five identification systems

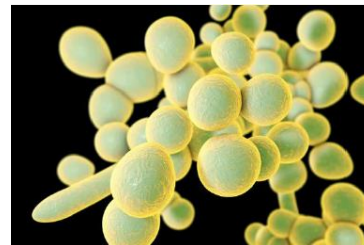
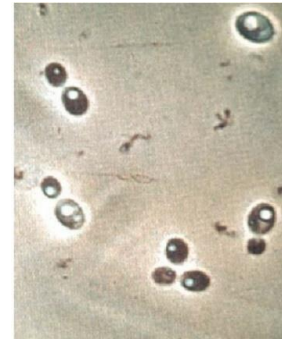
Result for panel 2 sequenced strains <sup>a</sup>	No. (%) of strains identified				
	IHEM/MRS-MSI (threshold = 20)	IHEM/MRS-MBT (threshold = 1.7)	IHEM/MRS-MBT (threshold = 2.0)	Bruker-MBT (threshold = 1.7)	Bruker-MBT (threshold = 2.0)
Correct at the species level	435 (87.35)	411 (82.53)	312 (62.65)	259 (52.01)	119 (23.9)
Correct at the genus level	26 (5.22)	34 (6.83)	12 (2.41)	41 (8.23)	9 (1.81)
False at the genus level	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Identification criteria not met	37 (7.43)	53 (10.64)	174 (34.94)	198 (39.76)	370 (74.3)

<sup>a</sup>For each database/software combination, the number (%) of strains is specified. Correct, concordant with the molecular identification at either the species or the genus level. False, discordant with the molecular identification at the genus level. Identification criteria not met, score below the defined threshold.

Laboratoire de Parasitologie  
Hôpital de la salpêtrière

# CANDIDOSES INVASIVES

- *Candida sp*: commensaux du tube digestif
- Dissémination si facteurs de risque
- Interprétation délicate
  - Péritoine
  - Prélèvements
- Hémoculture=> candidémies (Ss 50%)
- + Sites profonds stériles => Candidoses invasives
- Mortalité associée 25-40%
- Retard à l'instauration du traitement > 48 h ➔ **risque de décès par candidémie de 30%**
- Impact d'un diagnostic précoce sur la mortalité



# HEMOCULTURES

- Candidoses invasives, Cryptococcoses disséminées, Fusarioses, Scédosporioses, levures autres



**BacT/ALERT® VIRTUO®** (BioMérieux, France)  
Flacons FA aérobie Plus, FN anaérobie Plus  
(billes polymériques absorbantes)  
**Mesure du volume**  
**Gain temps détection (3h)**



**BD BACTEC™ 9240** (Becton Dickinson, USA)  
Plus Aerobic/F et Plus Anaerobic/F (résines)  
**Mycosis IC/F sélectif pour champignons**  
(ATB, agent lytique)

**Automate BD BACTEC™ avec Mycosis IC/F en Mycologie**

Incubation minimum 14 jours

**Ch. filamenteux** e.g. *Fusarium spp*

Certains **levures exigeantes** ou à croissance plus lente

***Candida glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. neoformans*,**

***Malassezia spp*,**

**Co-infection bactérie-levure** : présence d'ATB

**Automate BacT/ALERT® 3D en Bactériologie**

BacT/ALERT FA aérobie avec incubation 5 jours

majorité des *Candida spp* : 2 à 4 jours

Absorption des ATF (et ATB) par billes

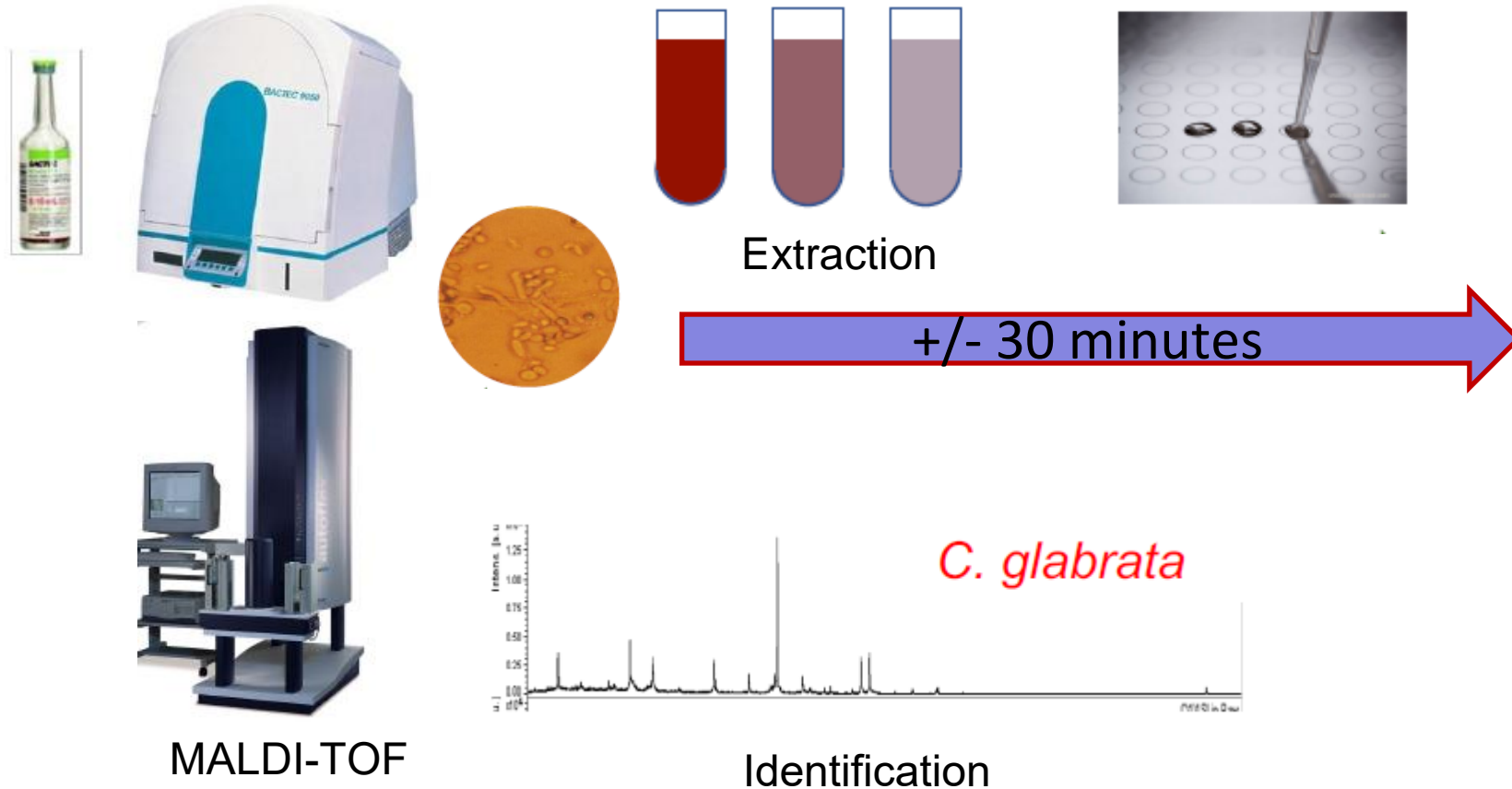
Suivi PTs sous ATF

variabilité de l'inoculum (1-100 à 1000 cfu/mL)

**Volume minimum 10 mL par flacon**

Suivi PTs sous ATF: neutralisation ATF

# MALDI TOF SUR FLACON



- MBT Sepsityper
- Techniques maison



Rendement 70-80 %  
Identification précoce

*Bidart and al JCM 2015*  
*Lagacé-Wiens Methods Mol Biol 2015*  
*Farina New microb 2015*  
*Jeddi Med Mycol 2017*

# DIAGNOSTIC CANDIDOSES INVASIVES

---

## ➤ Biomarqueurs sériques:

## ➤ **Sérologie** : performances variables



- Ag manannes-Ac antimanannes : Ss 83%, Sp 86%
- $\beta$  (1-3) D glucane: Ss (51-100%), Sp (30-98%), VPN ++
- CAGTA (Candida albicans germ tube antibody/IF Ac IgG )      Ss (53-73%), Sp (54-80%)
- **Combinaison des 2**: Recommandations sociétés savantes: VPN 95%  
(ESCMID/IDSA guidelines)

# DIAGNOSTIC CANDIDOSES INVASIVES

## ➤ Biomarqueurs sériques:

### ➤ Biologie moléculaire

- PCR in house: Ss (88-98%), Sp (88-95%), non standardisées
- PCR commercialisées: Ss (48-97%), Sp (99%)
  
- PCR T2MR *Candida*

PCR sensible +++(2 échantillons positifs consécutifs)  
VPN++ CI/patients réanimation et chirurgie abdominale

Détection limitée/espèces principales

Coût





# DIAGNOSTIC CANDIDOSES INVASIVES

## T2MR Candida (Résonance magnétique T2/nanoparticules couplées à la PCR)

- Détection en multiplex (5 principales espèces *Candida*) sur sang
- Amplification (polymérase thermostable) et détection de particules magnétiques agglutinées

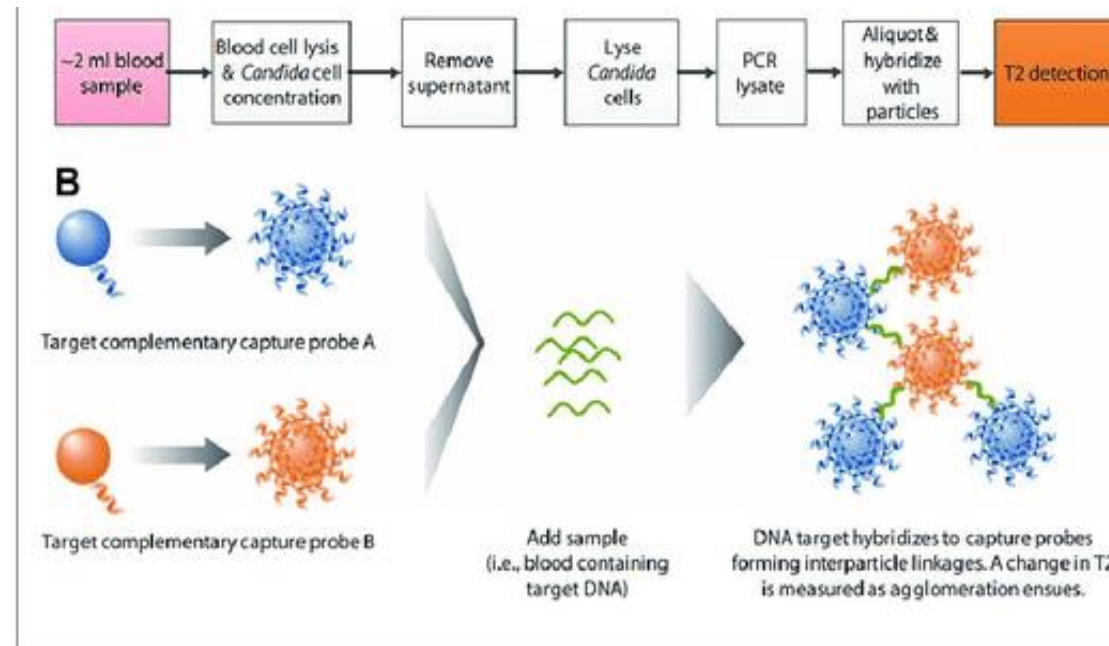
*C. albicans*

*C. glabrata*

*C. parapsilosis*

*C. tropicalis*

*C. krusei*



Agglomération spécifique des NP en présence d'amplicons  
Modification du signal T2

PCR ITS2  
Pan *Candida*

NP superparamagnétiques couplées  
À des sondes spécifiques d'espèces



# DIAGNOSTIC CANDIDOSES INVASIVES

---

## T2MR Candida (Résonance magnétique T2/nanoparticules couplées à la PCR)

### Avantages

- Sensibilité/Spécificité 91%/98%  
(LOD: 1 à 3 UFC/mL vs 100 UFC/mL en PCR)
- Gain de temps X10 vs Hémoculture => Délai rendu (3 heures)
- Détection précoce avant hémoculture
- Suivi, pronostic

#### Aspect médico-technique:

- Durées hospitalisation diminuée
- Utilisation des antifongiques, plus adaptée
- Baisse mortalité
- Moins de traitement antifongique chez les non infectés

# DIAGNOSTIC CANDIDOSES INVASIVES

---

## T2MR Candida (Résonance magnétique T2/nanoparticules couplées à la PCR)

### Avantages

- Sensibilité/Spécificité 91%/98%  
(LOD: 1 à 3 UFC/mL vs 100 à 1000 UFC/mL PCR)
  - Gain de temps X10 vs Hémoculture => Délai rendu (3 heures)
  - Détection précoce avant hémoculture
  - Suivi, pronostic
- Aspect médico-technique:
- Durées hospitalisation diminuée
  - Utilisation des antifongiques, plus adaptée
  - Baisse mortalité
  - Moins de traitement antifongique chez les non infectés

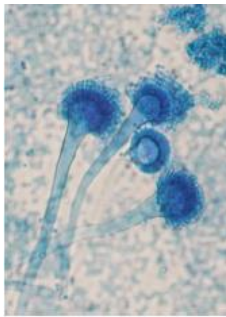
### Limites

- Ne remplace pas les hémocultures
- Sensibilité limitée  
quand mélange polymicrobien
- Pas d'antifongigramme
- Capacité limitée: 7 tiroirs
- Coût

# DIAGNOSTIC ASPERGILLOSES INVASIVES

---

- Pathogène de l'environnement
- Multiples formes cliniques
- Aspergillose invasive (AI) est la forme la plus grave => **Fréquence en Hématologie**
- Fièvre persistante, point d'appel pulmonaire=> LBA
- Biologie spécifique
  - Mycologie directe
  - Détection d'antigènes: Galactomannane, manoprotéines
  - qPCR

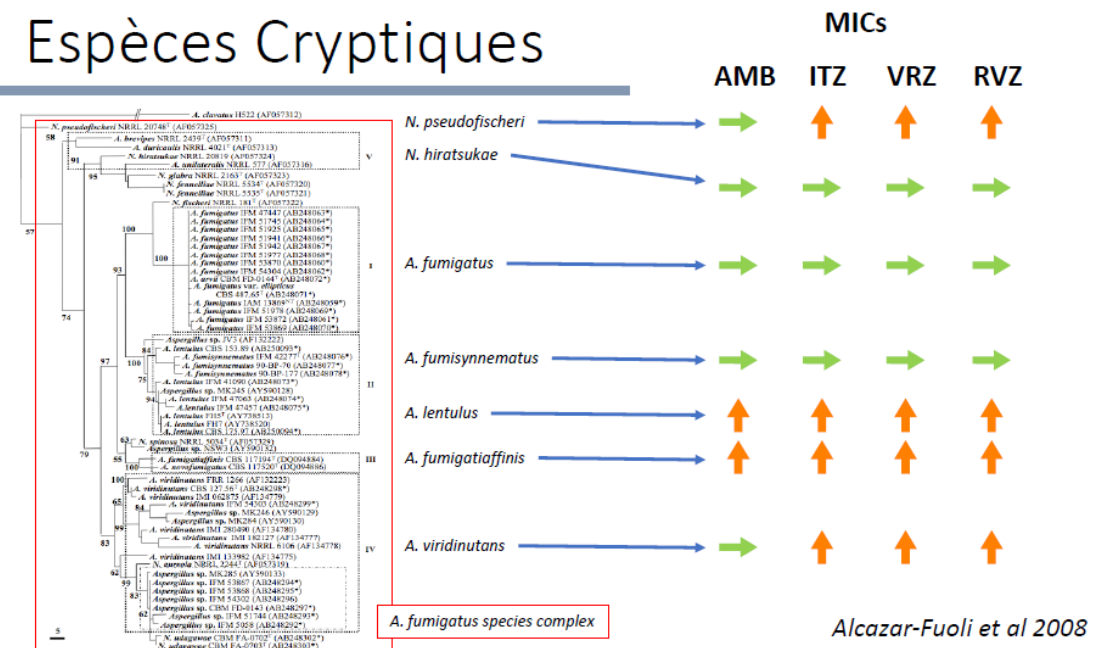


# IDENTIFICATION CULTURE ASPERGILLUS

- Non différenciables en microscopie
- Plusieurs espèces incriminées en clinique
- Profils de sensibilité variable aux antifongiques

	AMB	Azolés
<i>A. fumigatus</i>	Green	Green
<i>N. pseudofischeri</i>	Green	Red
<i>A. fumigatiaffinis</i>	Red	Green
<i>A. lentulus</i>	Red	Red
<i>A. hiratsukae</i>	Green	Green

## Espèces Cryptiques



# DIAGNOSTIC ASPERGILLOSES INVASIVES



**Faux positifs**  
Pip/tazo  
Amox/clav  
Immunoglobulines  
Poches Fresenius  
Reactions croisées  
Pénicillium/ Histoplasma  
GVH/ BMT aliments

- Ag polysaccharidiques d'*Aspergillus* non spécifique
- **Screening Hématologie**
  - Galactomannane sérique (ELISA, seuil 0,5), révision EORTC =>  
**consensus EORTC 2020: 1 ou 0,8 associé GM LBA 0.7**
- GM: sensibilité 50-90%, spécificité 81-99% AI (cancer, SOT/Hématologie)
  - Précoce
  - Intérêt des dosages cinétiques chez les neutropéniques
  - Outils pronostique de suivi d'efficacité sous traitement antifongique

*Held et al 2013, Mengoli et al 2009  
Denning ERJ and al 2016; Herbrecht J Clin Oncol 2002  
Aubry JCM 2006, White LJCM 2010, White JCM 2011  
White JCM 2015, Dannaoui JCM 2017, White CID 2015  
ALANIO Front microbiol 2017  
Cordonnier C et al., CMI (2009), Chamilos G et al., Haematologica  
(2006), Hidalgo A et al., Eur J Radiol (2009), Maertens JA et al.,  
CID (2007), Marchetti O et al., BMT (2012), Miceli MH et al., CID  
(2008), Woods G et al., Cancer (2007)*

# DIAGNOSTIC ASPERGILLOSES INVASIVES

- Ag polysaccharidiques d'*Aspergillus* non spécifique

- **Screening Hématologie**

Galactomannane sérique (ELISA, seuil 0,5), révision EORTC =>  
**consensus EORTC 2020: 1 ou 0,8 associé GM LBA 0.7**

- GM: sensibilité 50-90%, spécificité 81-99% AI (cancer, SOT/Hématologie)

- Précoce
- Intérêt des dosages cinétiques chez les neutropéniques
- Outils pronostique de suivi d'efficacité sous traitement antifongique

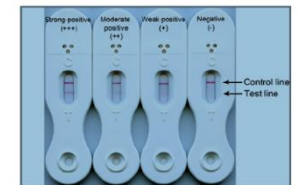
- TDR (Test de détection rapide)

*Aspergillus* (LFD): Se 61-92%, Sp 73%-92%

*Aspergillus* (LFA): Se 96%, Sp 98%



**Faux positifs**  
 Pip/tazo  
 Amox/clav  
 Immunoglobulines  
 Poches Fresenius  
 Reactions croisées  
 Pénicillium/ Histoplasma  
 GVH/ BMT aliments



*Aspergillus* lateral flow device (LFD)



Lateral Flow Assay

Held et al 2013, Mengoli et al 2009  
 Denning ERJ and al 2016; Herbrecht J Clin Oncol 2002  
 Aubry JCM 2006, White LJCM 2010, White JCM 2011  
 White JCM 2015, Dannaoui JCM 2017, White CID 2015  
 ALANIO Front microbiol 2017  
 Cordonnier C et al., CMI (2009), Chamilos G et al., Haematologica (2006), Hidalgo A et al., Eur J Radiol (2009), Maertens JA et al., CID (2007), Marchetti O et al., BMT (2012), Miceli MH et al., CID (2008), Woods G et al., Cancer (2007)

# DIAGNOSTIC ASPERGILLOSES INVASIVES

---

- Plusieurs travaux sur PCR (cibles différentes)
- qPCR: Sensibilité 77-88%; Spécificité 75-94%, Hématologie ++
- Plus performante sur plasma vs serum
- Coffrets commerciaux disponibles ( ex MYCOGENIE, ADEMTECK): Ss proche 100%, Sp 84%



# DIAGNOSTIC ASPERGILLOSES INVASIVES

---

- Plusieurs travaux sur PCR (cibles différentes)
- qPCR: Sensibilité 77-88%; Spécificité 75-94%, Hématologie ++
- Plus performante sur plasma vs serum
- Coffrets commerciaux disponibles ( ex MYCOGENIE, ADEMTECK): Ss proche 100%, Sp 84%
  
- **Combinaison GM/PCR=> Sensibilité 90-95%**
  
- Détection mutation(s) CYP51: Résistance aux azolées

Mutation fréquente TR34/L98H

Coffret Mycogénie, Aspergenius

*Held et al 2013, Mengoli et al 2009  
Denning ERJ and al 2016; Herbrecht J Clin Oncol 2002  
Aubry JCM 2006, White LJCM 2010, White JCM 2011  
White JCM 2015, Dannaoui JCM 2017, White CID 2015  
ALANIO Front microbiol 2017  
Cordonnier C et al., CMI (2009), Chamilos G et al., Haematologica  
(2006), Hidalgo A et al., Eur J Radiol (2009), Maertens JA et al.,  
CID (2007), Marchetti O et al., BMT (2012), Miceli MH et al., CID  
(2008), Woods G et al., Cancer (2007)*

# DIAGNOSTIC ASPERGILLOSES INVASIVES

---

## ■ LBA:

- GM seuil 0,5/ revision consensus EORTC 2020  
consensus EORTC 2020: 1 ou 0,7 associé GM sérum 0.8

(1 ou 0,7 associé GM sérum 0,8)

- TDR *Aspergillus* (LFD): Se 81%, Sp 100%
- qPCR performance variables selon étude  
excellentes: SS 93.7%, Sp 94.5%

API	Se (%)	Sp (%)	Ref
Hématologie	100%	100%	Becker, BJH 2003
BMT	76%	94%	Musher JCM 2004
SOT sauf poumons	100%	84%	Clancy JCM 2007
SOT poumons	67%	95%	Husain Transplantation 2007
Réanimation	88%	87%	Meersseman AJRCCM 2008

- **Combinaison GM/PCR=> SS 94%**

# DIAGNOSTIC ASPERGILLOSES INVASIVES

## ■ LBA:

- GM seuil 0,5/ revision consensus EORTC 2020  
consensus EORTC 2020: 1 ou 0,7 associé GM sérum 0.8

(1 ou 0,7 associé GM sérum 0,8)

- TDR *Aspergillus* (LFD): Se 81%, Sp 100%
- qPCR performance variables selon étude  
excellentes: SS 93.7%, Sp 94.5%

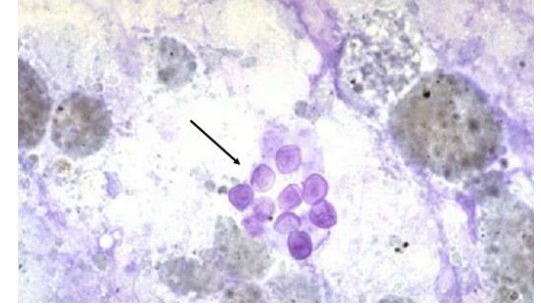
- Combinaison GM/PCR=> SS 94%

API	Se (%)	Sp (%)	Ref
Hématologie	100%	100%	Becker, BJH 2003
BMT	76%	94%	Musher JCM 2004
SOT sauf poumons	100%	84%	Clancy JCM 2007
S	<b>LCR</b>		Husain Transplantation 2007
R	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Détection systématique</b></li> <li>• sensibilité 88% et spécificité 96%</li> <li>• <b>Cut-Off</b> recommandé par l'ECIL-3 (Marchetti <i>et al.</i> 2012) = <b>1</b></li> </ul>		Meersseman AJRCCM 2008

Chong GM et al., JCM 2016

# DIAGNOSTIC PNEUMOCYSTOSE

---



- *Pneumocystis jirovecii*: Responsable d'une pneumopathie interstitielle l'augmentation de fréquence a été révélatrice de l'épidémie de SIDA

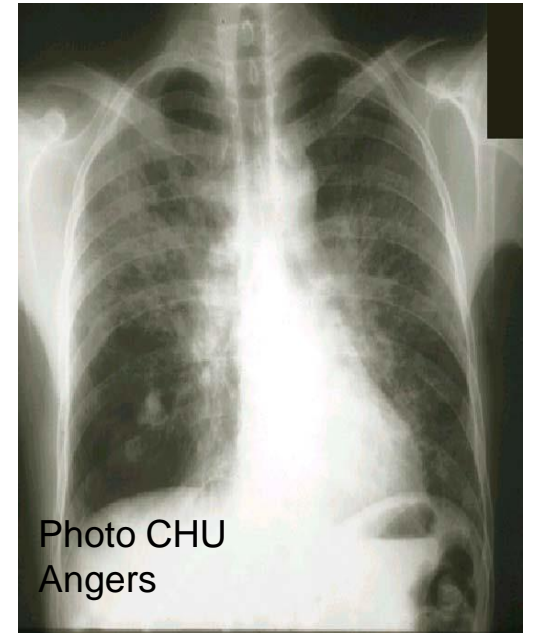


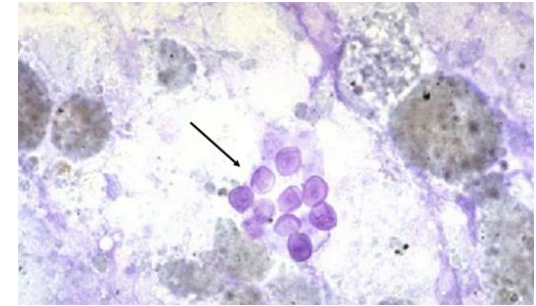
Photo CHU  
Angers

Infiltrats pulmonaires

# DIAGNOSTIC PNEUMOCYSTOSE

---

- Détection du champignon dans les prélèvements pulmonaires
- **Technique de référence:**
  - Examen microscopique (IF/colorations) sur LBA, PDP, aspiration induite
- qPCR: LBA sensibilité 98%, spécificité 91%, VPN 100%
  - ❖ Détection de charges fongiques faibles/Patients immunodéprimés non VIH
  - ❖ Plusieurs travaux: Différencier colonisation/infection sur LBA
  - ❖ Difficile de faire la différence pour les autres prélèvements
- Détection B D glucanes/LBA (taux supérieur 80-100 pg/mL avec absence d'autres IFI en faveur de pneumocystose)
- Combinaison qPCR et B D glucanes: Performance dans diagnostic de pneumocystose



# DIAGNOSTIC PNEUMOCYSTOSE



## $\beta$ -D glucane

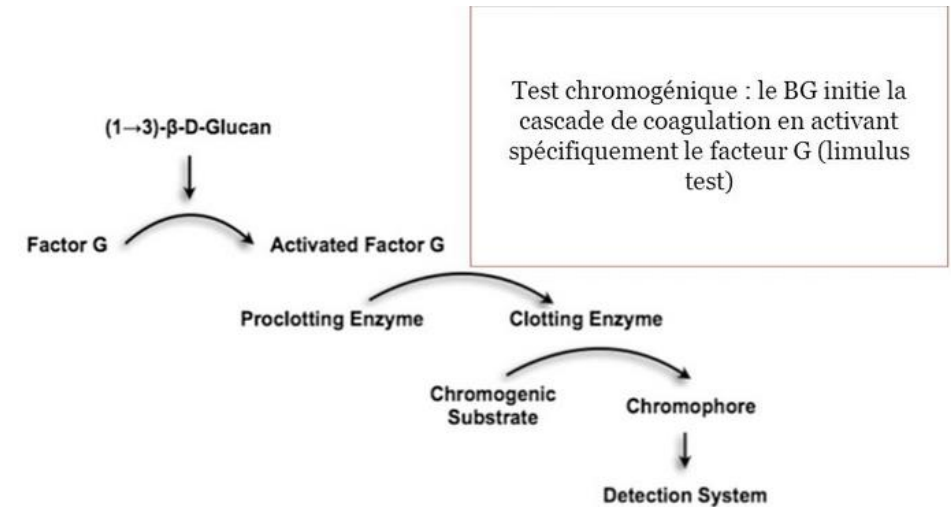
- Polysaccharides de la paroi fongique:
  - *Pneumocystis*, *Candida*, *Aspergillus*....
  - Pas Mucormycètes et *Cryptococcus*
- Détection enzymatique: tests en plaque ou unitaire
- Des méta-analyses flatteuses
- Une interprétation délicate

Faux positif:

immunoglobulines IV, dialyse, compresses chirurgicales, Nutrition, parentérale, colonisation digestive à *Enterococcus*, Mucite ou colite sévère

Faux négatifs:

Traitement préemptif/empirique : échinocandines



# DIAGNOSTIC PNEUMOCYSTOSE

---

## Place $\beta$ -glucane dans l'algorithme

- **Pneumocystose+++**

- Suspicion clinique (forte ou non)
- Combinaison IF ou qPCR
- Immunodéprimé VIH -

- **IFI en réanimation**

- Pneumopathie peut être
- Candidose
- Immunodéprimé VIH-

- **En hématologie:**

Sensibilité 49%- 77% selon études

- Aspergillose: *à priori* non
- Candidose: suivi thérapeutique, études contradictoires



*Guillard and al 2018*

# DIAGNOSTIC CRYPTOCOCCOSE

---

- Examen direct (encre de chine), culture moins sensible notamment chez non VIH
- Détection de l'Ag glucurono-xylo mannane **capsulaire circulant**
- Concentration corrélée à charge fongique *in vivo*

**Sérum - LCR - (LBA, Liq. pleural) avec Sensibilité 98%, Spécificité > 95%**

- Immunochromatographie, ELISA, **Screening patients HIV+, CD4 < 100/ $\mu$ L**
- Agglutination latex, **titrage de l'Ag**

*agglutination de particules de latex sensibilisées par des AC polyclonaux de lapin dirigés contre les polysaccharides capsulaires des 4 sérotypes*

VIH+ :

Titres élevés facteur mauvais pronostic

Surveillance échec thérapeutique ou rechutes (**LCR**)

VIH-

Titre sérique > 512, PL obligatoire même en absence de signes neurologiques

Faux-positifs : facteur rhumatoïde, perfusion de macromolécules type hydroxyéthyl-amidon, infection à *Trichosporon asahii*

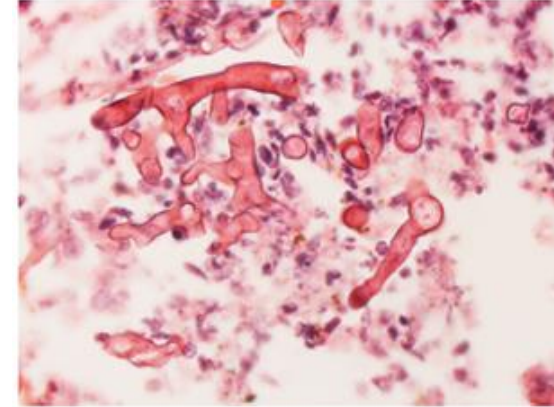




# DIAGNOSTIC ZYGOMYCOSE

---

- Forme sinusienne
  - Forme pulmonaire non spécifique
  - Diagnostic souvent fortuit, difficile, pas de biomarqueurs disponibles
  - Mycologie directe:
    - Filaments mycéliens typiques
    - Culture
    - qPCR 3 cibles: (*Lichtheimia*, *Rhizomucor* and *Mucor/Rhizopus*)
      - Sensibilité 81%, spécificité 92% ++
      - Anticipation du diagnostic: - 8 jours, 2 à 3 jours avant signes radiologiques
      - Pronostic: négativation vs taux de survie: 48% and 4%,  $p < 10^{-6}$
- survie à J84 plus élevée chez PTs avec qPCR négative**
- Kits commerciaux disponibles (Mucorgenius, PathoNostics, MycoGENIE, ADEMTECH)



# ET LE SYNDROMIQUE....?

- Fongémie

- Pulmonaire=>

Approche non quantitative

- Neurologique=>

- Sensibilité, Spécificité?

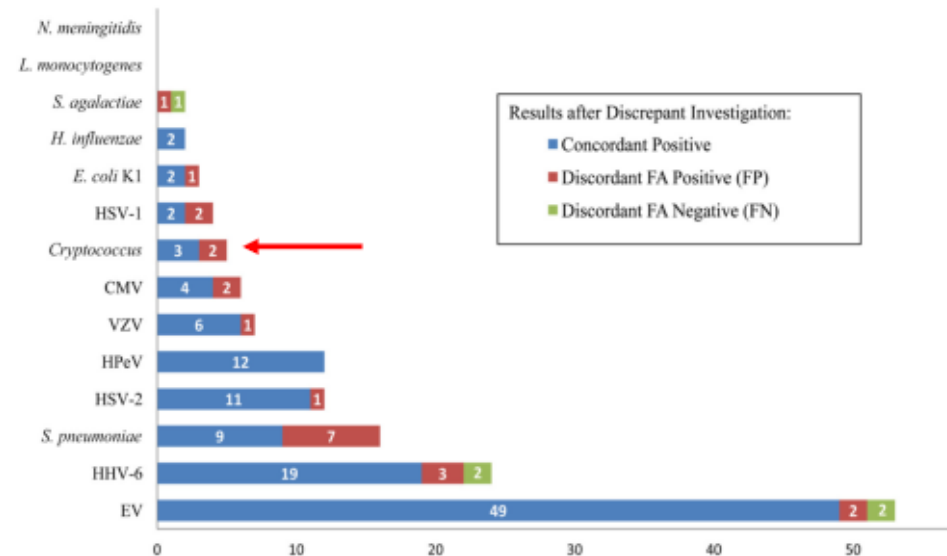
- Coût



ePlex

## Fungal Targets

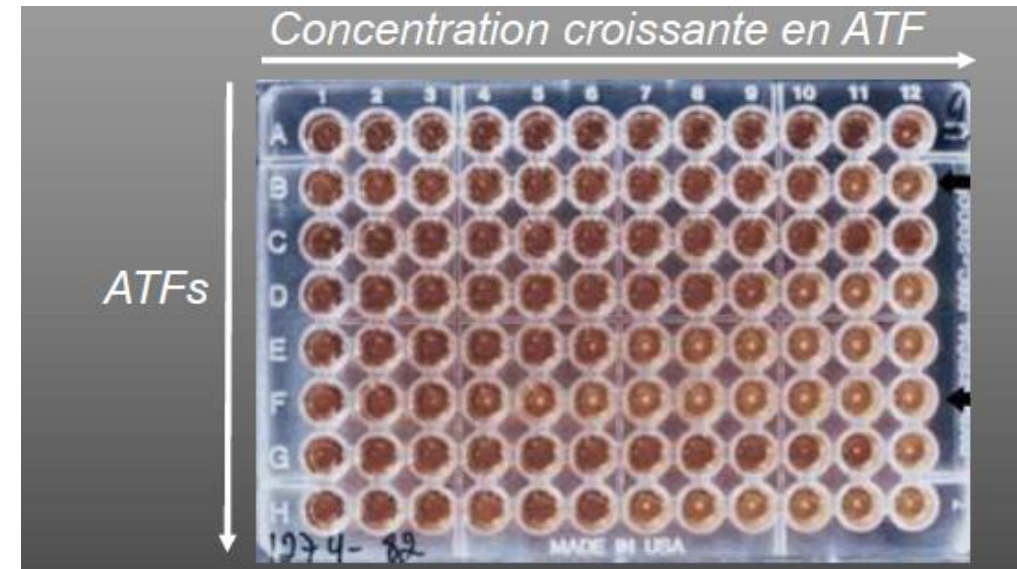
*Candida albicans*  
*Candida dubliniensis*  
*Candida famata*  
*Candida glabrata*  
*Candida guilliermondii*  
*Candida kefyr*  
*Candida krusei*  
*Candida lusitanae*  
*Candida parapsilosis*  
*Candida tropicalis*  
*Cryptococcus gattii*  
*Cryptococcus neoformans*  
*Fusarium*  
*Malassezia furfur*  
*Rhodotorula*  
*Trichosporon*



— Culture-confirmed cryptococcal meningitis not detected by Cryptococcal PCR on the Biofire meningitis/encephalitis panel  
*Chew et al 2018*

# SENSIBILITE AUX ANTIFONGIQUES

- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)
- Techniques de référence: Comités internationaux  
=> Techniques standardisées validées
- Méthodes de microdilution en milieu liquide
  - ❖ EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
  - ❖ CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)
- **Inconvénients:**
  - Longues et lourdes
  - Nécessité des poudres d'antifongiques



# SENSIBILITE AUX ANTIFONGIQUES

- Plusieurs méthodes commercialisées en France:

## Etest(AES)

Disques (Bio-Rad)

Fungitest (Bio-Rad)

ATB Fungus ATB Fungus3 (BioMérieux)

SensitreYeastOne

Colorimetric Method(Trek)

La plus utilisée: **Etest**

Mode de lecture dépend de l'ATF et champignons testés

=> Lecture 24h possible, rendu de résultat obligatoire à 48h

- **Avantages:**

rapide et simple

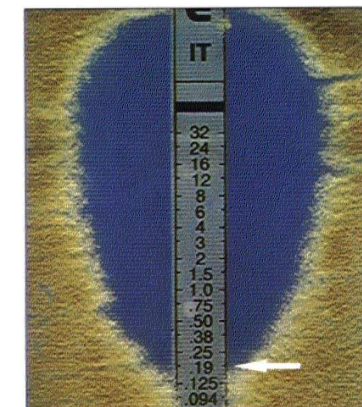
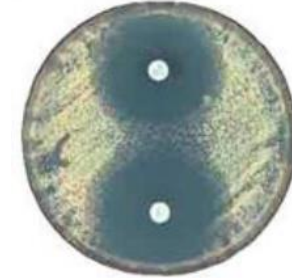
Bonne corrélation avec les méthodes de référence

- **Inconvénients:**

Pas reconnue comme méthode de référence

Seuil d'interprétation pas toujours disponible

**Lecture: Expertise++**



E-test

# SENSIBILITE AUX ANTIFONGIQUES

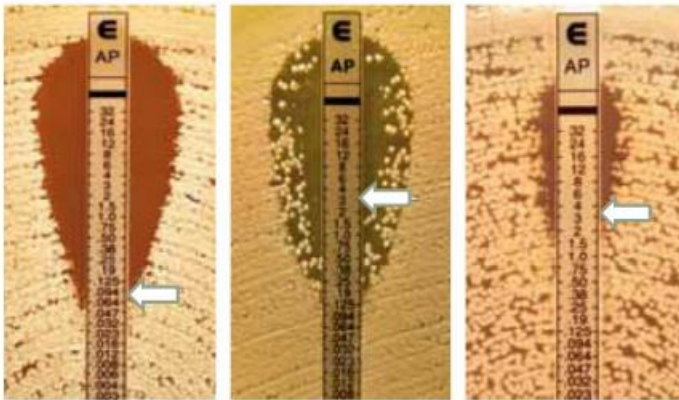
---

- Seuils d'interprétation (données microbiologiques et cliniques):  
Sensible (S), Résistant R), Intermédiaire (I)
- Binôme espèce/ATF
- Pas de réel consensus...
- Détermination des seuils cliniques de sensibilité (CB ou Clinical breakpoints)  
=> levures/*Aspergillus*
- Détermination des seuils épidémiologiques (ECOFF en Europe, ECV aux USA)
- Mise à jour de ces seuils régulièrement:  
revus à la baisse => pour certains binôme, la zone I passée en S

# SENSIBILITE AUX ANTIFONGIQUES

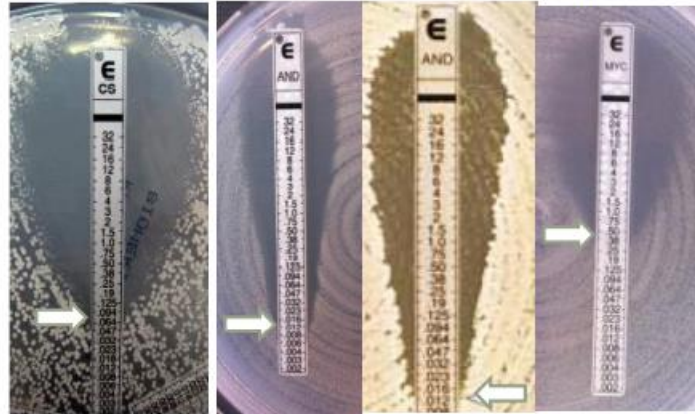
## Amphotéricine B

Tenir compte de toute colonie au **contact** de la bandelette: lecture à 100%



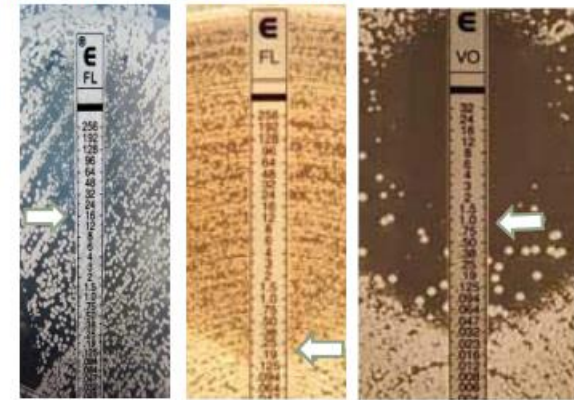
## Echinocandines

Ignorer les micro colonies **lecture à 80%**  
Si effet entonnoir: lire en bas de l'entonnoir  
Si croissance paradoxale aux CMI hautes: ignorer







## Azolés

**Effet de traine** (microcolonies) fréquent (*C. albicans* +++)  
→ Ignorer les microcolonies: **lecture à 80%**  
Tenir compte des macrocolonies



# SENSIBILITE AUX ANTIFONGIQUES

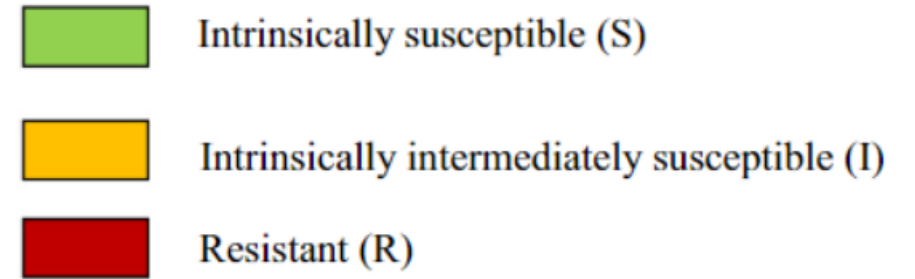
Yeasts	FLC	VRC	POS	ISA	AMB	ANI	CAS	MIC	5FC
<i>Candida albicans</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Candida glabrata</i>	Yellow	Grey	Grey	Grey	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Candida krusei</i>	Red	Grey	Grey	Grey	Green	Green	Green	Green	Red
<i>Candida tropicalis</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Candida parapsilosis</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green
<i>Candida lusitanae</i>	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green
<i>Candida guilliermondii</i>	Yellow	Grey	Grey	Grey	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Candida norvegensis</i>	Red	Grey	Grey	Grey	Green	Green	Green	Green	Red
<i>Candida inconspicua</i>	Red	Grey	Grey	Grey	Green	Green	Green	Green	Red
<i>Candida kefyr</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
<i>Candida auris</i>	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Green

-  Intrinsically susceptible (S)
-  Intrinsically intermediately susceptible (I)
-  Resistant (R)
-  There is insufficient evidence that this species is a good target for the compound in question

Footnotes: coloring is based on established EUCAST clinical breakpoints when available, and on clinical experience when breakpoints are not yet established.  
 FLC: fluconazole; VRC: voriconazole; POS: posaconazole; ISA: isavuconazole; AMB: amphotericin B; ANI: anidulafungin; CAS: caspofungin; MIC: micafungin; 5FC: flucytosine.

# SENSIBILITE AUX ANTIFONGIQUES

Yeasts	FLC	VRC	POS	ISA	AMB	ANI	CAS	MIC	5FC
<i>Candida albicans</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Candida glabrata</i>	Yellow	Grey	Grey	Grey	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Candida krusei</i>	Red	Grey	Grey	Grey	Green	Green	Green	Green	Red
<i>Candida tropicalis</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Candida parapsilosis</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green
<i>Candida lusitanae</i>	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green
<i>Candida guilliermondii</i>	Yellow	Grey	Grey	Grey	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Candida norvegensis</i>	Red	Grey	Grey	Grey	Green	Green	Green	Green	Red
<i>Candida inconspicua</i>	Red	Grey	Grey	Grey	Green	Green	Green	Green	Red
<i>Candida kefyr</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
<i>Candida auris</i>	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Green



	Azolés	AMB
<i>A. fumigatus</i>	<span style="display: inline-block; width: 20px; height: 15px; background-color: #90EE90; border: 1px solid black;"></span>	<span style="display: inline-block; width: 20px; height: 15px; background-color: #90EE90; border: 1px solid black;"></span>
<i>A. lentulus</i>	<span style="display: inline-block; width: 20px; height: 15px; background-color: #FF0000; border: 1px solid black;"></span>	<span style="display: inline-block; width: 20px; height: 15px; background-color: #FF0000; border: 1px solid black;"></span>
<i>A. fumigatiaffinis</i>	<span style="display: inline-block; width: 20px; height: 15px; background-color: #90EE90; border: 1px solid black;"></span>	<span style="display: inline-block; width: 20px; height: 15px; background-color: #FF0000; border: 1px solid black;"></span>
<i>A. viridinutans</i>	<span style="display: inline-block; width: 20px; height: 15px; background-color: #FF0000; border: 1px solid black;"></span>	<span style="display: inline-block; width: 20px; height: 15px; background-color: #90EE90; border: 1px solid black;"></span>
<i>A. hiratsukae</i>	<span style="display: inline-block; width: 20px; height: 15px; background-color: #90EE90; border: 1px solid black;"></span>	<span style="display: inline-block; width: 20px; height: 15px; background-color: #90EE90; border: 1px solid black;"></span>

Footnotes: coloring is based on established EUCAST clinical breakpoints when available, and on clinical experience when breakpoints are not available. FLC: fluconazole; VRC: voriconazole; POS: posaconazole; ISA: isavuconazole; AMB: amphotericin B; ANI: anidulafungin; CAS: caspofungin.



# SENSIBILITE AUX ANTIFONGIQUES

---

- A ne pas faire de façon systématique
- Isolement d'une souche d'un site normalement stérile
- Suspicion d'un échec thérapeutique
- Infection invasive
- Visée épidémiologique

# TAKE-HOME TO MESSAGES

---

- Application plus importante des méthodes de PCR à la détection d'ADN fongique
  - Excellentes performances analytiques et cliniques
  - Détection des mutations=> espèces résistantes
  - Pathogènes environnementaux ou commensaux/ exigences de qualité
- Positionnement dans les algorithmes diagnostiques
- Diagnostic des IFI performant: Combinaison des tests

# TAKE-HOME TO MESSAGES

---

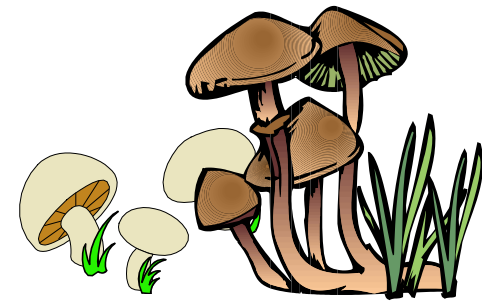
- Techniques innovantes
  - T2MR CANDIDA
  - Syndromique
- A long terme, Séquençage nouvelle génération NGS

.....

# TAKE-HOME TO MESSAGES

---

Un besoin accru d'expertise biologique  
Une collaboration clinico-biologique essentielle



# OUTILS DIAGNOSTIQUES ET INFECTIONS FONGIQUES INVASIVES (IFI)

---

Dr Lilia HASSEINE – [hasseine.l@chu-nice.fr](mailto:hasseine.l@chu-nice.fr)

Service de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nice  
Université Côte d'Azur

Merci de votre attention

