

Centre de référence mycoses

Centre hospitalier universitaire de Liège

Rapport d'activité 2018-2019

Rosalie Sacheli

Marie-Pierre Hayette

Juillet 2020

Sommaire

1. Introduction
2. Missions spécifiques du CNR mycoses
3. Résumé des activités de 2018-2019
 - Activités du CNR/Liège
 - Démarche qualité
 - Accréditation Belac ISO15189
 - Contrôles de qualité externe supranationaux
 - Collection
4. Bilan de 2018 pour les champignons isolés par le CNR
 - Bilan Global
 - Bilan selon l'origine du prélèvement de phanères
 - Cheveux
 - Peau
 - Ongles
5. Bilan de 2019 pour les champignons isolés par le CNR
 - Bilan Global
 - Bilan selon l'origine du prélèvement de phanères
 - Cheveux
 - Peau
 - Ongles
6. Comparaison années 2012-2019
7. Enquêtes épidémiologiques
8. Travaux de recherche et collaborations
9. Conclusions
10. Références

1. Introduction

Le CNR mycoses a pour mission l'expertise et la surveillance épidémiologique et microbiologique des mycoses superficielles et profondes. L'importance grandissante tenue par les mycoses au niveau médical est sans nul doute liée à l'incidence croissante des infections fatales causées par celles-ci chez des patients immunodéprimés durant les deux dernières décennies (1). Cette augmentation est attribuée à un accroissement du nombre de patients soumis à un traitement immunodépresseur (patients cancéreux, greffés de moelle ou d'organe), à l'intensification de ce type de traitement mais aussi à l'accroissement du nombre de patients infectés par le VIH.

Un diagnostic rapide et précis est nécessaire chez ces patients vulnérables. Dans ces cas, il est important de connaître les aspects cultureux, macroscopiques et microscopiques des agents fongiques de façon à orienter rapidement le clinicien vers une thérapeutique adaptée.

A côté des mycoses invasives, les mycoses superficielles et particulièrement les onychomycoses ont une prévalence élevée dans la population générale comme l'atteste une étude portant sur 16 pays européens qui montre une prévalence de 59% (2). De plus, les agents responsables de teignes microsporiques (touchant le cuir chevelu), peuvent se révéler contagieux et nécessiter une éviction scolaire d'où l'importance d'un diagnostic rapide et précis (3).

Le centre national de référence (CNR) a pour mission principale l'identification des champignons qui lui sont adressés de façon à confirmer un diagnostic jusqu'au niveau de l'espèce. Une confirmation ou détermination de la sensibilité *in vitro* des champignons vis-à-vis des antifongiques adaptés peut également être réalisée si nécessaire. D'autre part dans le cadre d'épidémies, les laboratoires de référence offrent une aide dans la caractérisation phénotypique et génotypique des souches impliquées.

2. Missions spécifiques du CNR Mycoses

Les missions du CNR mycoses sont les suivantes :

- « Identification des champignons filamenteux et de levures adressés par les laboratoires belges. Réalisation d'antifongogramme dans le cas d'infection profonde ou d'infection récidivante »
- Constitution et entretien de la collection de souches de dermatophytes (CNR Mycoses Liège) et de souches d'intérêt particulier
- Mise au point et développement de nouvelles méthodes de diagnostic, d'identification et de typage moléculaire des champignons, telles que les méthodes d'amplification génique et de séquençage moléculaire
- Alerte des autorités sanitaires à l'exemple de l'émergence de nouvelles résistances aux antifongiques ou de l'apparition d'une souche épidémique dans une population particulière
- Activité de conseil auprès des autorités sanitaires, des médecins et des biologistes
- Participation à des groupes d'experts à travers l'Europe
- Valorisation des travaux par des publications, articles scientifiques, guide de prescription, formation continue
- Activités de recherches et d'études en collaboration avec d'autres équipes scientifiques
- Participation à des contrôles de qualité externe

3. Résumé des activités de 2018-2019

○ Activités du CNR/Liège

Au cours de l'année 2018 et 2019, tous les aspects des missions attribuées au CNR ont été couverts, comme l'identification d'isolats de levures et champignons filamenteux, l'aide au diagnostic de mycoses rares, la détermination de la sensibilité aux antifongiques et l'amélioration de techniques de typage et d'identification moléculaire. Le CNR de Liège se focalise principalement sur l'identification des mycoses superficielles isolées de phanères.

Parmi les techniques d'identification des levures, l'identification par spectrométrie de masse (Maldi-tof) est l'outil n°1 qui est utilisé. Les résultats sont confirmés par séquençage moléculaire si nécessaire.

En 2018 et 2019, une attention particulière a été accordée à l'identification des dermatophytes par spectrométrie de masse Maldi-Tof. Un nouveau milieu de culture ID-fungi plates® de Conidia a été évalué. Une évaluation d'une version modifiée de ce milieu (contenant du cycloheximide appelé ID-fungi plates® plus) a été réalisée. Ce milieu permet la culture directe d'ongles, cheveux et peau, suivie par une identification au Maldi-Tof. Cette évaluation a fait l'objet de deux posters présentés à l'ECCMID 2019 et 2020 à Amsterdam et Paris(4, 5) et ont été publiés dans Mycoses en juillet 2020 (6).

Parmi les outils moléculaires, une approche polyphasique est utilisée. La région ciblée en premier lieu dans le cas de l'identification d'une espèce est tout ou partie de la région ITS1-5,8S-ITS2 de l'ARN ribosomique (ARNr). Trois cibles complémentaires sont disponibles à savoir la région D1-D2 de la partie LSU (28S) de l'ARNr, Ef1-alpha et la bêta-tubuline. Ces autres cibles sont utilisées en cas de nécessité de confirmation de l'identification d'une espèce rare ou en cas de réponse non satisfaisante après une première amplification.

○ Démarche de qualité

- Accréditation Belac ISO 15189

Le laboratoire de Microbiologie clinique du CHU de Liège a mis en place une démarche d'accréditation du laboratoire depuis quelques années. La mise en place du système qualité du CNR mycoses de Liège a été initiée en 2012 et l'audit d'accréditation a eu lieu en mai 2013. La démarche retenue pour mettre en conformité le CNR avec la norme ISO 15189 est fondée sur la rédaction de procédures pour chaque analyse proposée par le CNR, la création d'un dossier de validation complet pour chacune de ces techniques et un état des lieux des procédures et protocoles existants. La démarche consiste également en la mise en conformité des locaux et appareillages dédiés aux activités du CNR. La gestion du matériel permet en outre de garantir l'utilisation d'équipements fiables, appropriés aux besoins et surveillés en temps réel. La gestion des réactifs et consommables (sélection et évaluation des fournisseurs, distribution et évaluation des produits) est assurée également. L'accréditation ISO 15189 a été octroyée au CNR mycoses à la suite de l'audit BELAC de mai 2013. En 2014, toutes les procédures du CNR mycoses ont été révisées et réactualisées. Un audit de surveillance a eu lieu en juin 2016 et une seule remarque de type B concernant le CNR a été enregistrée. Cette remarque de type B a été solutionnée la semaine suivant l'audit. En octobre 2017, un autre audit de surveillance a eu lieu. Une seule non-conformité B a été soulevée. Aucune non-conformité concernant les centres de référence n'a été relevée lors de l'audit d'octobre 2018, ni lors de l'audit de 2019.

- Contrôles de qualité externe s supranationaux

Le CNR Mycoses participe à un contrôle de qualité externe tri-annuel, concernant la détermination de la sensibilité de souches de levures à différents antifongiques et l'identification de cultures de levures/champignons filamenteux issus d'échantillons cliniques. Ces contrôles sont proposés par l'UK NEQAS.

Parallèlement à cela, le CNR mycose organise et /ou participe annuellement à des « ring tests » inter-laboratoires afin de valider les analyses pour lesquelles il n'existe pas de contrôle proposé par un organisme externe.

- **Collection**

Tous les isolats cliniques de levures et de dermatophytes adressés au CNR sont systématiquement conservés et congelés à -80°C excepté les isolats de champignons contaminants, sauf intérêt particulier. La pureté des souches est préalablement vérifiée et des techniques d'identification (y compris séquençage moléculaire) et de détermination de la sensibilité aux antifongiques (selon la demande) sont réalisées préalablement à la congélation. Les souches sont référencées, étiquetées et stockées au sein de la « champithèque » du CNR.

4. Bilan de 2018 pour les champignons isolés par le CNR

○ Bilan global

En 2018, un total de 2254 isolats fongiques ont été envoyés aux deux CNR « Mycoses » (regroupement des cas isolés à la KU Leuven et au CHU de Liège). Parmi les échantillons, 1497 (66.6%) ont été identifiés comme étant des dermatophytes. Parmi eux, 1262 (83 %) isolats ont été identifiés comme faisant partie du genre *Trichophyton*, 228 (15.2 %) comme faisant partie du genre *Microsporum*, 5 comme faisant partie du genre *Nannizzia* (0.33%) et 2 (0.11%) comme faisant partie du genre *Epidermophyton*. Un total de 178 isolats de levures ont également été répertoriés (tous prélèvements confondus), soit 7.9% de tous les prélèvements. Le reste des isolats (579 souches, 25.7% de tous les prélèvements) correspond à d'autres champignons filamenteux (Voir **figure 1**).

Récemment, une reclassification des dermatophytes a été réalisée (7). Alors que *Trichophyton interdigitale* et *Arthroderma benhamiae* étaient auparavant regroupés dans le complexe *T. mentagrophytes*, ces deux espèces font désormais partie de deux « séries » différentes respectivement la série *T. mentagrophytes* et la série *T. benhamiae*. *Arthroderma benhamiae* a été de plus renommé en *Trichophyton benhamiae*. Dans la suite de ce rapport (hormis pour la comparaison 2012-2019, **point 6**), contrairement aux précédentes années, ces deux espèces seront donc considérées comme deux espèces bien distinctes. Nous distinguerons également les *T. mentagrophytes* zoophiles des *T. interdigitale*. A noter que durant l'année 2018,

une étude épidémiologique sur les teignes du cuir chevelu a été réalisée. Il a été demandé à plusieurs grands centres de Belgique de nous envoyer leurs prélèvements de teignes du cuir chevelu ce qui augmente considérablement la proportion d'agents impliqués dans la teigne comme *M. audouinii* ou encore *T. soudanense*.

Parmi les dermatophytes, l'isolat le plus fréquemment retrouvé (tous prélèvements confondus) est *T. rubrum* (826 isolats, 55,2% des dermatophytes), *M. audouinii* (166 isolats, 11,1%), suivi de *T. interdigitale* (165 isolats, 11%), *T. soudanense* (106 isolats, 7,1%), *T. tonsurans* (86 isolats, 5,74%), *M. canis* (56 isolats, 3,7%), *T. violaceum* (35 isolats, 2,34%), *T. benhamiae* (28 isolats, 1,8%), *T. mentagrophytes* (10 isolats, 0,5%), *M. ferrugineum* (4 isolats, 0,26%), *T. verrucosum* (4 isolats, 0,26%), *E. floccosum* (2 isolat, 0,13%), *N. persicolor* (3 isolats, 0,2%), *Microsporum sp.* (2 isolat 0,13%), *N. gypsea* (1 isolat, 0,07%) et *N. incurvata* (1 isolat, 0,07%).

La **figure 2** représente la répartition des cas de dermatophytoses en 2018. Parmi les autres isolats envoyés au CNR, on retrouve des levures réparties en 12 espèces de *Candida sp.* (130 isolats, 72,4% des levures isolées), *Rhodotorula sp.* (30 isolats, 16,6% des levures isolées), *Trichosporon sp.* (7 isolats, 4%), *Saccharomyces sp.* (7 isolats, 4% des levures isolées) et *Geotrichum sp.* (4 isolats, 2,2% des levures isolées). Ces levures peuvent se retrouver aussi bien dans les prélèvements de phanères que dans les hémocultures ou des prélèvements vaginaux. La **figure 3** décrit en détail la répartition des levures isolées par le CNR mycoses.

Parmi les autres souches reçues par le CNR, on retrouve, entre autres, des *Penicillium sp.* (199 isolats, 8,3% de tous les prélèvements), *Aspergillus sp.* (107 isolats, 4,38%), *Fusarium sp.* (59 isolats, 2,4%), *Scopulariopsis sp.* (56 isolats, 2,28%), *Alternaria sp.* (55 isolats, 2,2%) *Cladosporium sp.* (47 isolats, 1,9%) *Acremonium sp.* (29 isolats, 1,18%).

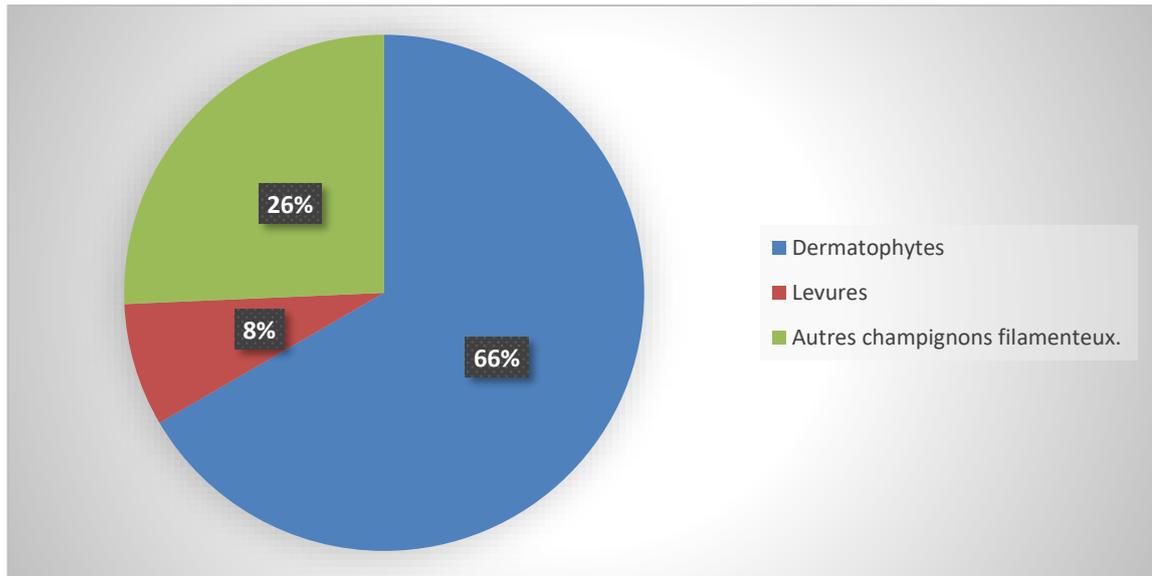


Figure 1 : Répartition des prélèvements reçus en 2018 par le CNR mycoses.

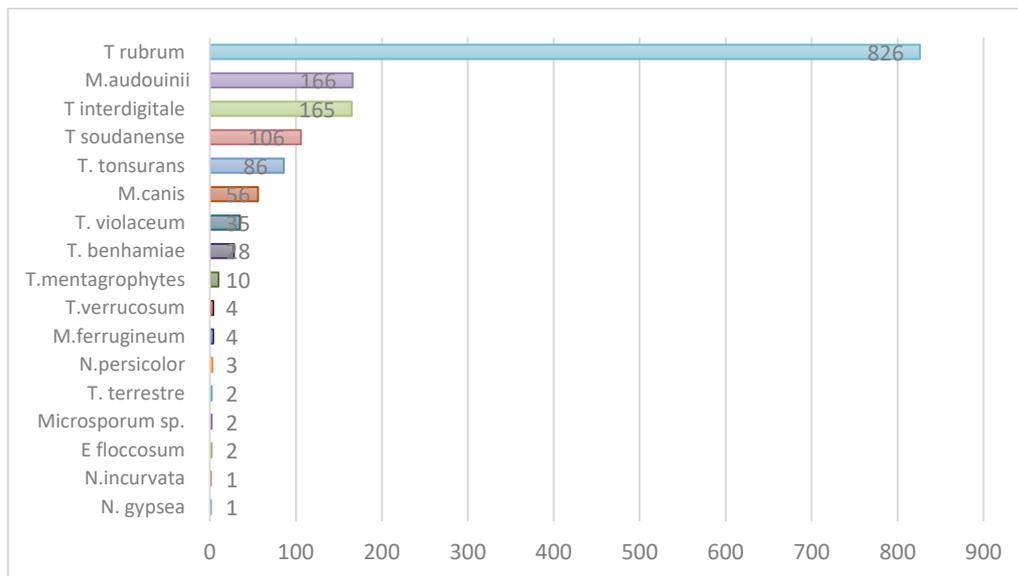


Figure 2 : Répartition des 1497 dermatophytes isolés en 2018 par les 2 CNR

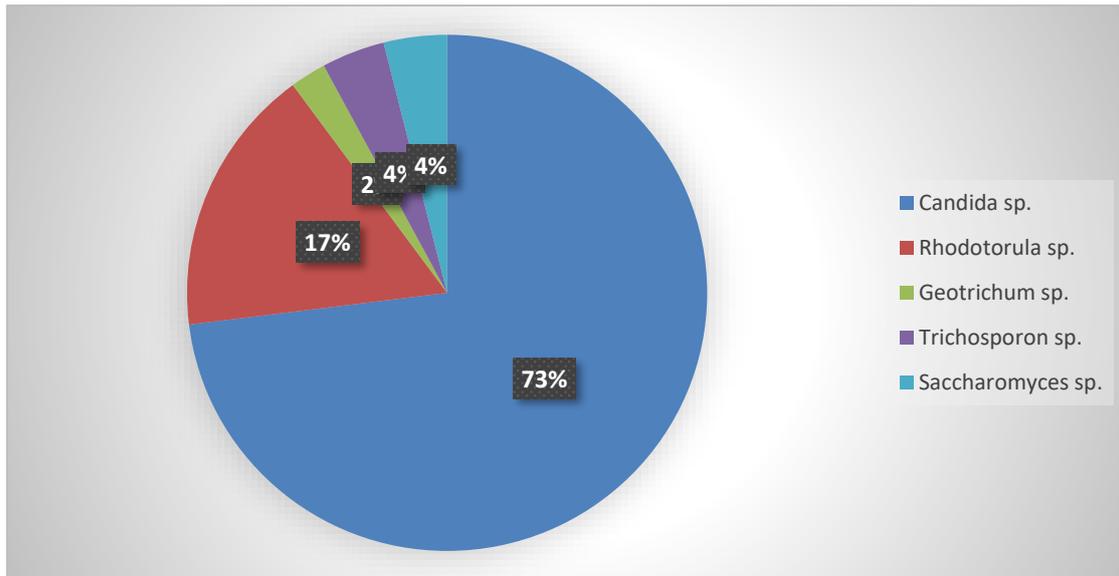


Figure 3 : Représentation graphique de la répartition des espèces de levures retrouvées dans les prélèvements reçus par le CNR en 2018.

○ **Bilan selon l'origine du prélèvement**

Parmi les isolats envoyés au CNR de Liège (et avec en sus les prélèvements de phanères du CNR de la KUL), 1330 (59,1%), provenaient d'ongles, 416 (18,48%) provenaient de squames ou biopsies de peau, 423 (18,79%) provenaient de cheveux (inclus cuir chevelu) et 84 (3,7%) provenaient d'autres sources (œil, oreille, sang, vagin, urine, expectoration), (Voir **figure 4**).

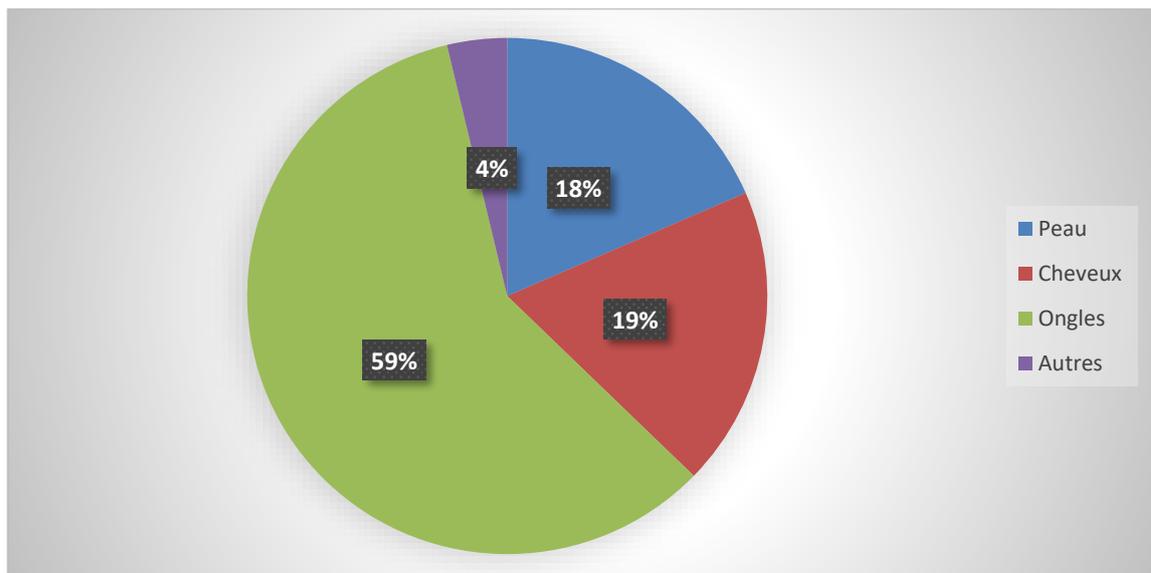


Figure 4: Répartition de l'origine des prélèvements envoyés au CNR Mycoses en 2018.

- Cheveux

Au total, 423 isolats reçus par le CNR provenaient de cheveux. 393 étaient des dermatophytes. A noter que durant l'année 2018, une étude épidémiologique sur les teignes du cuir chevelu a été réalisée. Il a été demandé à plusieurs grands centres de Belgique de nous envoyer leurs prélèvements de teignes du cuir chevelu ce qui augmente considérablement la quantité de prélèvements de cheveux reçus en 2018 comparativement aux autres années. Une étude sur les teignes du cuir chevelu focalisée uniquement sur les teignes à *M.audouinii* et *T.violaceum* avait déjà été réalisée en 2013. Les dermatophytes responsables de teignes du cuir chevelu se répartissent en 10 espèces. *M. audouinii* est le pathogène fongique le plus fréquent pour ce type de prélèvement et est responsable de 38,16% des cas de teignes du cuir chevelu (n=150). Les autres dermatophytes identifiés sont *Trichophyton soudanense* (n=92, 23,41%), *Trichophyton tonsurans* (n=71, 18,08%), *Microsporum canis* (n=38, 9%), *Trichophyton violaceum* (n=26, 6,6%), *Trichophyton mentagrophytes* (n=6, 1,52%), *Trichophyton benhamiae* (n=6, 1,52%), *Microsporum incurvatum* (n=1, 0,25%), *Microsporum ferrugineum* (n=1, 0,25%), *N.persicolor* (n=1, 0,25%), et un *Microsporum sp.* (n=1, 0,25%), (Voir **figure 5**). Les autres espèces cultivées étaient des champignons filamenteux non dermatophytes, présents dans les échantillons comme contaminants. Notre analyse révèle l'importance de l'espèce *M. audouinii* comme agent causal de la teigne. En 2018, l'étude nationale sur les teignes du cuir chevelu, nous démontre que cette espèce est toujours bien majoritaire et qu'elle est suivie par d'autres espèces anthropophiles comme *T. soudanense* et *T. tonsurans*. Les espèces zoophiles comme *M. canis*, *T. mentagrophytes* ou *T. benhamiae* affectent la population belge dans une moindre mesure. L'espèce *M.audouinii* perd un peu de la vitesse comme responsable de teignes du cuir chevelu puisqu'elle passe de 66,6% des cas de teignes en 2016 à 45% en 2017 et 38% en 2018. Ceci dit le taux reste supérieur à 2014 où *M. audouinii* n'était responsable que de 30% des cas de teignes (Voir **Figure 12**).

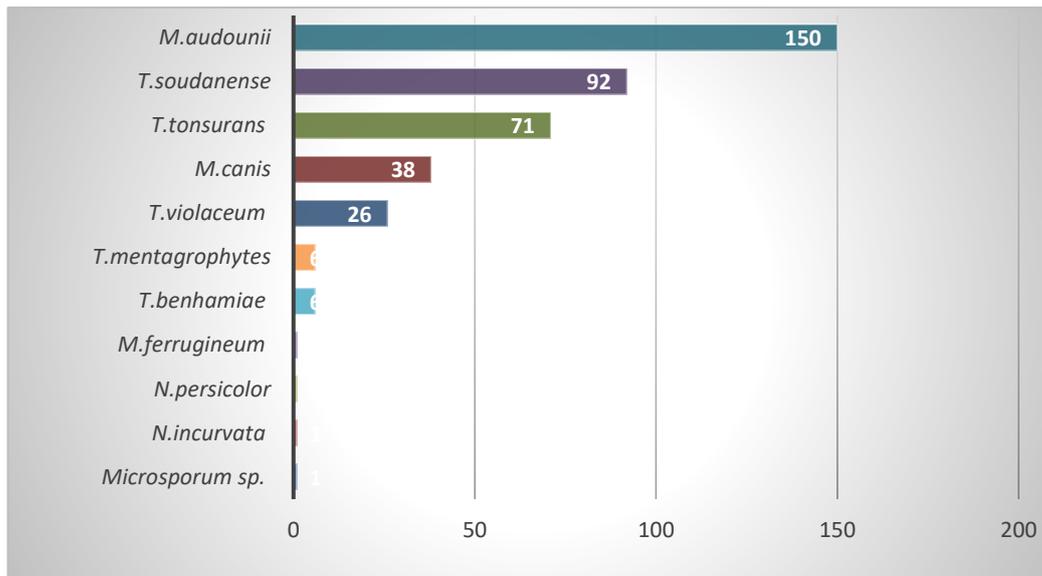


Figure 5 : Répartition des espèces de dermatophytes causant des infections du cuir chevelu en 2018

- Peau

Au total, 416 isolats cultivés à partir de squames ont été reçus. 278 (67,1%) d'entre eux étaient des dermatophytes. Parmi les dermatophytes, 145 isolats de *T. rubrum* ont été identifiés soit 52,6% des cas d'infection par un dermatophyte. Cet agent est l'agent le plus fréquemment rencontré dans ce type de prélèvements. *T. benhamiae* espèce zoophile, a été isolés de 23 prélèvements de peau (8,3%), l'espèce zoophile *T. mentagrophytes* a été isolée de 17 prélèvements (6,1%). *M. canis* a été retrouvé à raison de 16 souches durant l'année 2018 (5,7%). Il en va de même pour *M.audouinii* (16 isolats, 5,7%). *T. tonsurans* a été isolé de 15 prélèvements (5,4%). *T. soudanense* a été isolé de 13 prélèvements (4,71%) alors que *T. interdigitale* est présent dans 9 prélèvements de peau (3,2%). 8 souches de *T. verrucosum* ont été isolées (2,89%), il en va de même pour *T. violaceum* (n=8, 2,89%). 3 *M. ferrugineum*, (1,08%), 2 *E. floccosum* (0,72%), 2 *N. persicolor* (0,72%) et un *N. gypsea* (0,35%) ont également été isolés. A noter la réémergence d'espèces zoophiles dans les prélèvements de peau comme *M. canis*, *T. mentagrophytes* ou *T. benhamiae* (Voir **figure 6** pour la répartition). Cette tendance avait déjà été observée en 2017.

Le groupe des non-dermatophytes contient des genres différents tels que des *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis*, *Penicillium*. Parmi ceux-ci, certains peuvent être à l'origine d'infection chez les patients dont l'immunité est diminuée ou en cas de blessure non correctement prise en charge. Il est important de considérer chaque agent fongique en fonction du patient (patient à risque de développer une infection superficielle ou invasive en fonction de son degré d'immunodépression ou de facteurs locaux). C'est pour cela que le remplissage du formulaire mis à disposition par le CNR est essentiel dans la prise en charge de l'échantillon.

Par ailleurs, la présence de contaminants de l'environnement au moment du prélèvement ou de l'ensemencement conduit à la culture de champignons non significatifs pouvant empêcher la culture du véritable pathogène. Il est important de rappeler que la prise de squames doit être précédée par la désinfection de la peau avec de l'alcool à 70% pour réduire au maximum le risque de contamination.

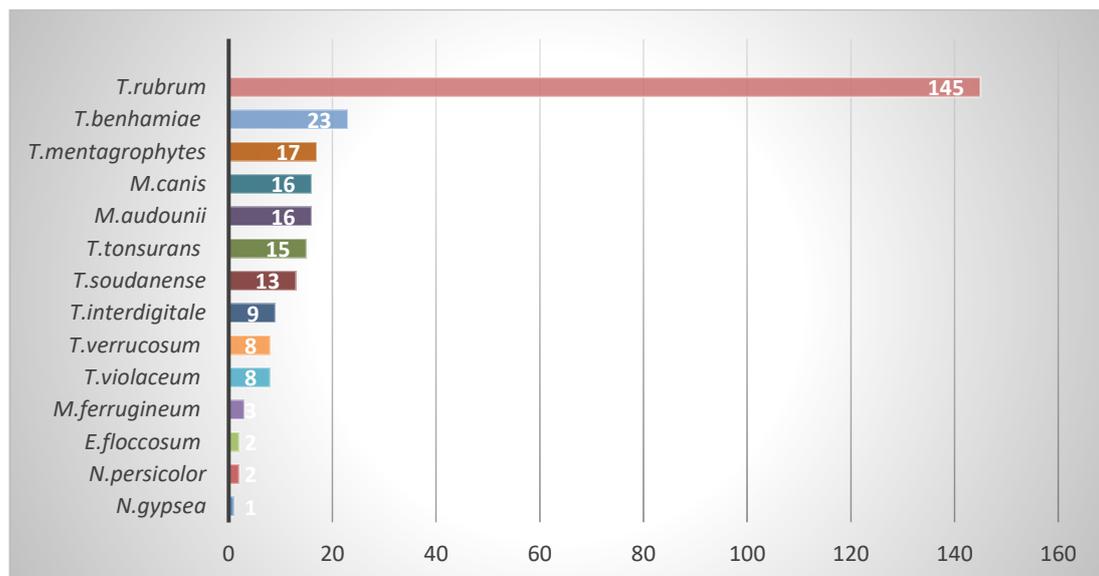


Figure 6 : Répartition des espèces de dermatophytes causant des infections de la peau en 2018.

- Ongles

La majorité des souches reçues par le CNR provenaient d'ongles (1330 isolats). Ceci a conduit à l'identification de 828 dermatophytes (62,5%), 140 levures (108 *Candida*, 32 appartenant aux genres, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Saccharomyces*,

Trichosporon) et des champignons non-dermatophytes, considérés souvent comme contaminants où l'on retrouve des genres tels que les *Alternaria*, *Scopulariopsis*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Aspergillus* ou encore *Fusarium*. Il est important de mettre l'accent sur le fait que la présence de champignons non-dermatophytes qui sont potentiellement pathogènes, tels que *Fusarium spp* ou *Scopulariopsis spp*, doit être confirmée sur base de la positivité de l'examen direct et également d'un second échantillon positif pour le même agent, avant de le juger responsable de la symptomatologie. En effet, la présence d'un dermatophyte peut être gênée par la croissance de tels contaminants.

Le groupe des dermatophytes responsables d'onychomycoses, comprend principalement 681 *T. rubrum* (82,6 %), et 142 *T. interdigitale* (17,1%) (Voir **figure 7**). A noter, la présence de deux prélèvements positifs pour *M.canis*, un pour *M. audouinii* et *T. soudanense* dans un ongle. Ces agents sont en effet habituellement responsables de teignes du cuir chevelu. Ce prélèvement a été séquencé et l'origine du prélèvement vérifié.

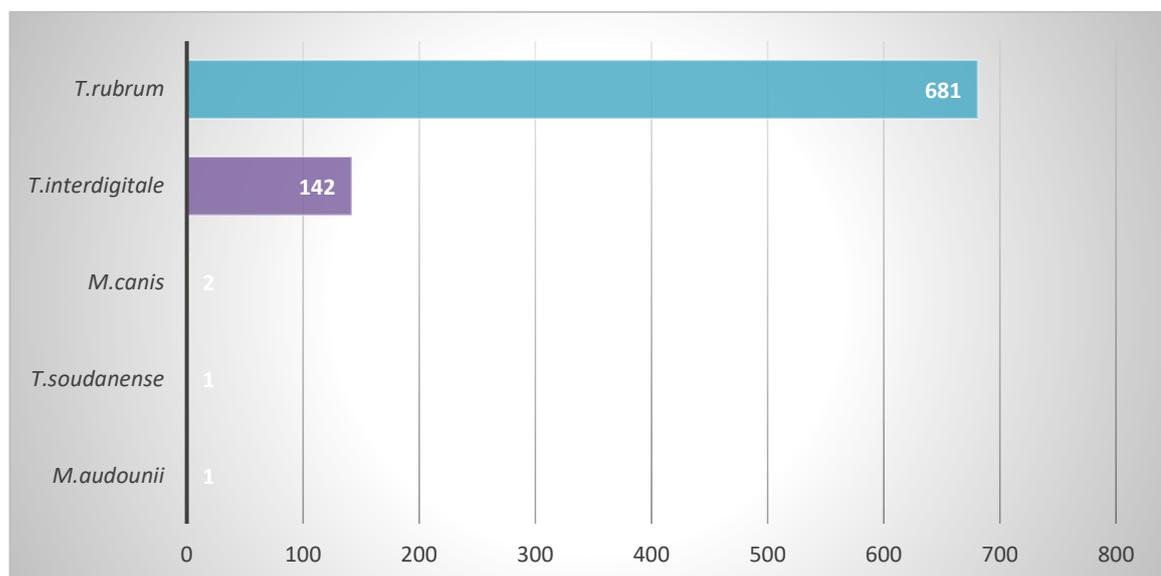


Figure 7: Répartition des espèces de dermatophytes responsables d'onychomycoses en 2018.

5. Bilan de 2019 pour les champignons isolés par le CNR

○ Bilan global

En 2019, un total de 2027 isolats fongiques ont été envoyés aux deux CNR « Mycoses » (regroupement des cas isolés de phanères isolés à la KU Leuven et au CHU de Liège). Parmi les échantillons, 1196 (59.2%) ont été identifiés comme étant des dermatophytes. Parmi eux, 1090 (91.7%) isolats ont été identifiés comme faisant partie du genre *Trichophyton*, 103 (8.6%) comme faisant partie du genre *Microsporum* et 3 faisant partie du genre *Nannizzia* (0.25%). Un total de 244 isolats de levures ont également été répertoriés (tous prélèvements confondus), soit 12.1% de tous les prélèvements. Le reste des isolats (587 souches, 29% de tous les prélèvements) correspond à d'autres champignons filamenteux.

Parmi les dermatophytes, l'isolat le plus fréquemment retrouvé (tous prélèvements confondus) est *T. rubrum* (792 isolats, 66.6 % des dermatophytes), suivi de *T. interdigitale* (136 isolats, 11.4 %), *M. audouinii* (59 isolats, 4.9%), *M. canis* (44 isolats, 3.7%), *T. mentagrophytes* (42 isolats, 3.5%), *T. tonsurans* (40 isolats, 3.3%), *T. soudanense* (38 isolats, 3.1 %), *T. benhamiae* (26 isolats, 2.2 %), *T. violaceum* (13 isolats, 1.1%), *T. verrucosum* (2 isolats, 0,16%), *Nannizzia. persicolor* (2 isolats, 0,16%), *Nannizzia fulva*. (1 isolat 0,08%) et *Trichophyton sp.* (1 isolat, 0.08%). La **figure 9** représente la répartition des cas de dermatophytoses en 2019. Parmi les autres isolats envoyés au CNR, on retrouve des levures réparties en 14 espèces de *Candida sp.* (186 isolats, 76.33% des levures isolées), *Rhodotorula sp.* (36 isolats, 14.8% des levures isolées), *Trichosporon sp.* (14 isolats, 5.74%), *Saccharomyces sp* (5 isolats, 2.1% des levures isolées), *Geotrichum sp.* (1 isolat, 0.4 % des levures isolées) autres levures (2 isolats, 0.8% des levures isolées). Ces levures peuvent se retrouver aussi bien dans les prélèvements de phanères que dans les hémocultures ou des prélèvements vaginaux. La **figure 10** décrit en détail la répartition des levures isolées par le CNR mycoses.

Parmi les autres souches reçues par le CNR, on retrouve, entre autres, des *Penicillium sp.* (125 isolats, 21.7% parmi les filamenteux non dermatophytes), *Aspergillus sp.* (113 isolats, 19.26%), *Fusarium sp.* (42 isolats, 7.2%), *Scopulariopsis sp.* (34 isolats, 5.8%), *Alternaria sp.* (32 isolats, 5.46%) *Cladosporium sp.* (11 isolats, 1.9 %) *Acremonium sp.* (7 isolats, 1,19%).

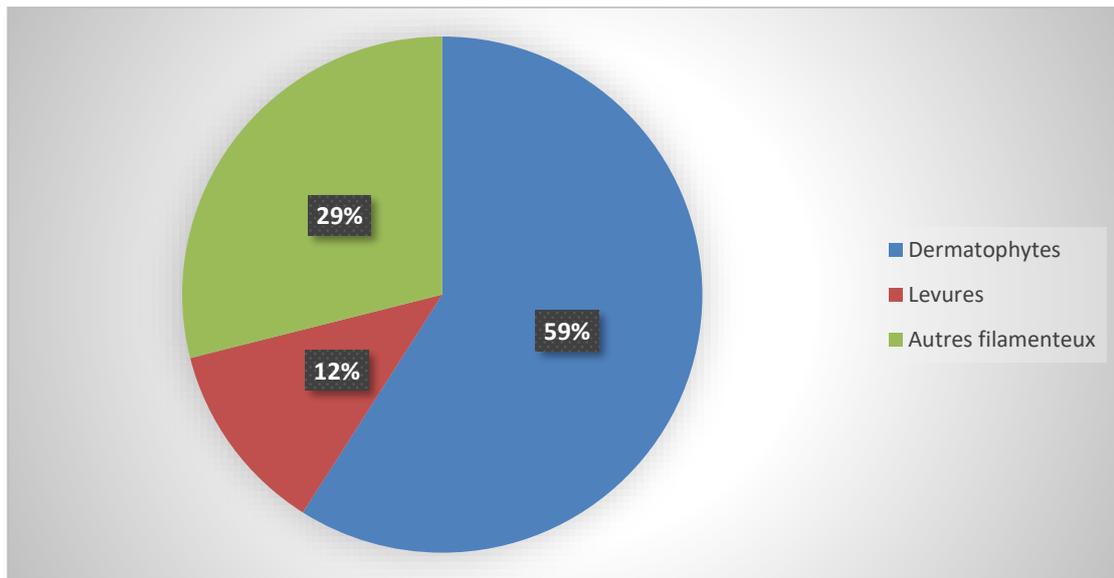


Figure 8 : Répartition des prélèvements reçus en 2019 par le CNR mycoses.

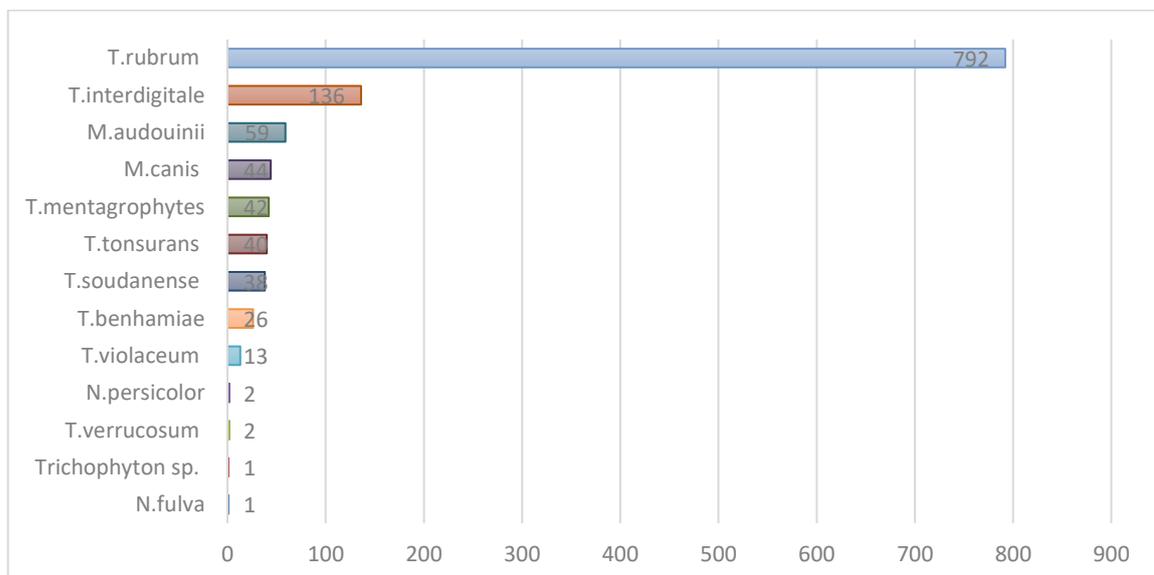


Figure 9 : Répartition des 1196 dermatophytes isolés en 2019 par les 2 CNR

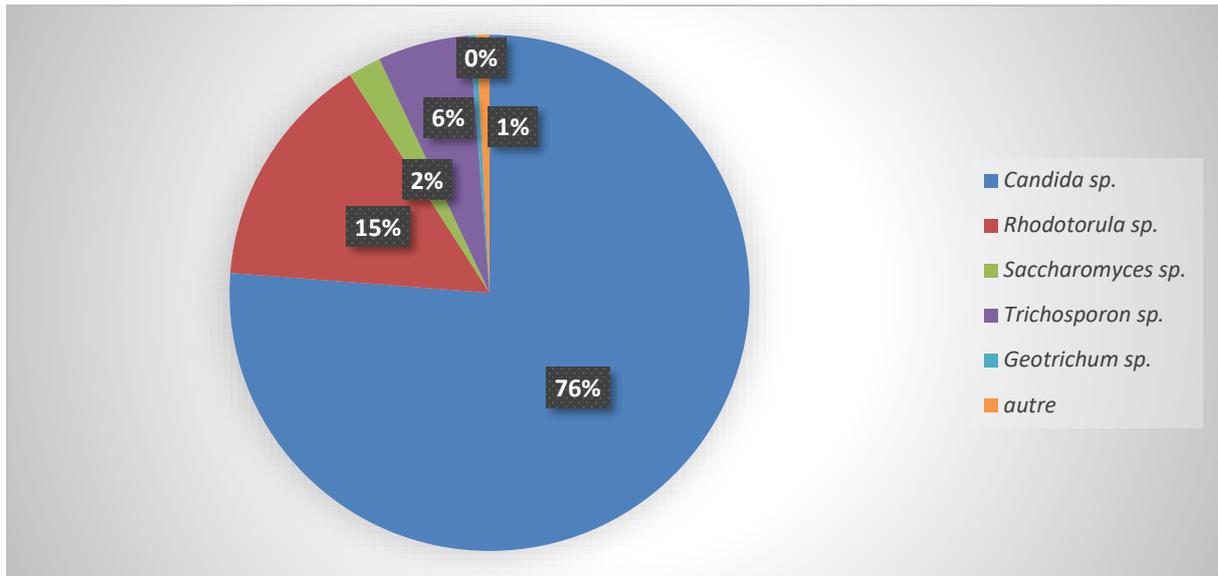


Figure 10 : Représentation graphique de la répartition des espèces de levures retrouvées dans les prélèvements reçus par le CNR en 2019.

○ **Bilan selon l'origine du prélèvement**

Parmi les isolats envoyés au CNR de Liège (et avec en sus les prélèvements de phanères du CNR de la KUL), 1374 (68.02%), provenaient d'ongles, 401 (19.8%) provenaient de squames ou biopsies de peau, 152 (7.5%) provenaient de cheveux (inclus cuir chevelu) et 100 (7.5%) provenaient d'autres sources (œil, oreille, sang, vagin, urine, expectoration), (Voir **figure 11**).

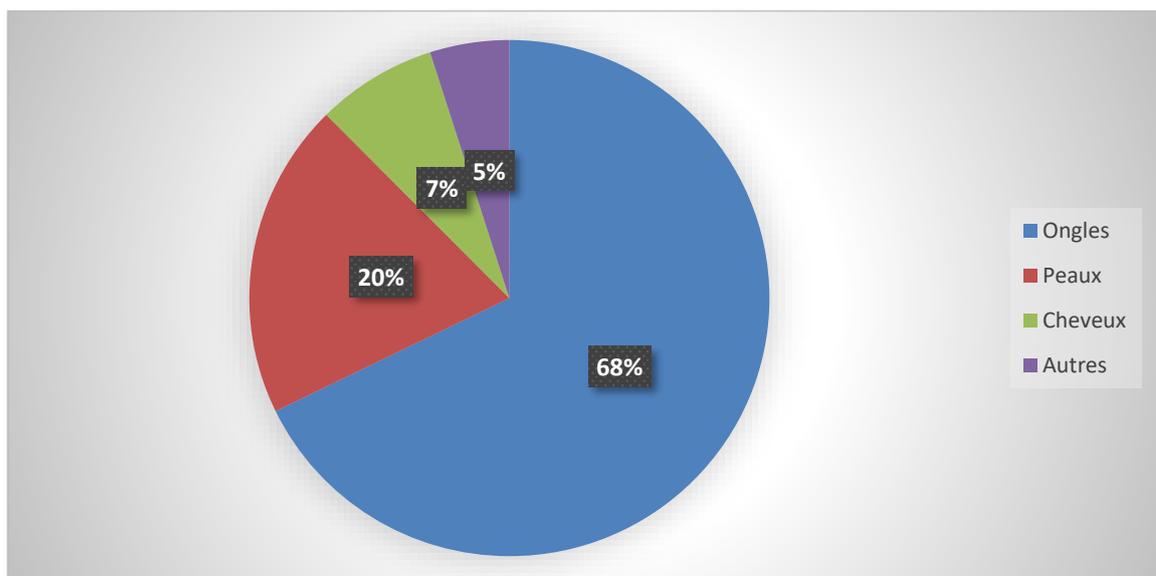


Figure 11: Répartition de l'origine des prélèvements envoyés au CNR Mycoses en 2019.

- Cheveux

Au total, 152 isolats reçus par le CNR provenaient de cheveux. 136 étaient des dermatophytes. Les dermatophytes responsables de teignes du cuir chevelu se répartissent en 8 espèces. *M. audouinii* est le pathogène fongique le plus fréquent pour ce type de prélèvement et est responsable de 30.3% des cas de teignes du cuir chevelu (n=41). Les autres dermatophytes identifiés sont *Trichophyton soudanense* (n=32, 23,5%), *Trichophyton tonsurans* (n=25, 18,4%), *Microsporum canis* (n=20, 14.7%), *Trichophyton violaceum* (n=11, 8.1%), *T. mentagrophytes* (n=3, 2.2%), *T. benhamiae* (n=3, 2.2%), *T. verrucosum* (n=1, 0.7%). (Voir **figure 12**). Les autres espèces cultivées étaient des champignons filamenteux non dermatophytes, présents dans les échantillons comme contaminants. Notre analyse révèle l'importance de l'espèce *M. audouinii* comme agent causal de la teigne. L'espèce *M. audouinii* perd un peu de la vitesse comme responsable de teignes du cuir chevelu puisqu'elle passe de 66,6% des cas de teignes en 2016 à 45% en 2017 et 38% en 2018 et 30.3% en 2019 (Voir **Figure 17**).

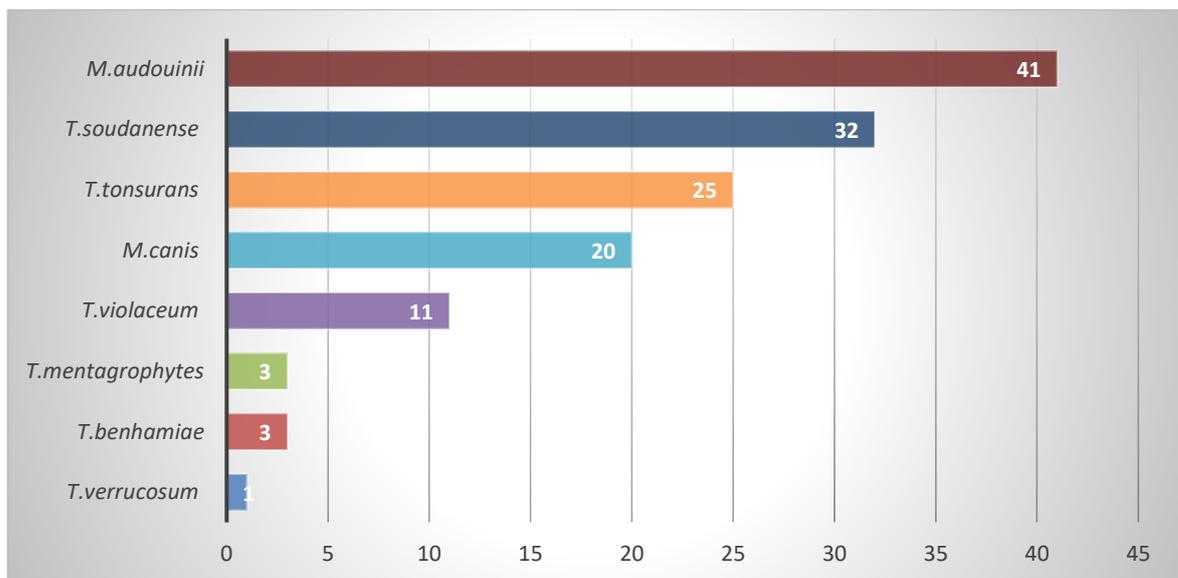


Figure 12 : Répartition des espèces de dermatophytes causant des infections du cuir chevelu en 2019

- Peau

Au total, 401 isolats cultivés à partir de squames ont été reçus. 280 (69.9%) d'entre eux étaient des dermatophytes. Parmi les dermatophytes, 151 isolats de *T. rubrum* ont été identifiés soit 54.1% des cas d'infection par un dermatophyte. Cet agent est l'agent le plus fréquemment rencontré dans ce type de prélèvements. L'espèce zoophile *T. mentagrophytes* a été isolée de 29 prélèvements (10.36 %) *T. benhamiae* espèce zoophile également, a été isolée de 23 prélèvements de peau (8,2%). *M. canis* a été retrouvé à raison de 20 souches durant l'année 2019 (7.1%). *M. audouinii* a été retrouvé au sein de 16 isolats, 5,7%. *T. tonsurans* a été isolé de 14 prélèvements (5%). *T. soudanense* a été isolé de 4 prélèvements (1.42%) alors que *T. interdigitale* est présent dans 13 prélèvements de peau (4.65%). *T. violaceum* était présent au sein de 2 souches, 0.7%). 1 souche de *T. verrucosum* a été isolée à partir de peau (0.35%), 2 *N. persicolor* (0,7%) et un *N. fulva* (0,7%) ont également été isolés. A noter la réémergence d'espèces zoophiles dans les prélèvements de peau comme *M. canis*, *T. mentagrophytes* ou *T. benhamiae* (Voir **figure 13** pour la répartition). Cette tendance avait déjà été observée en 2017 et 2018.

Le groupe des non-dermatophytes contient des genres différents tels que des *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis*, *Penicillium*. Parmi ceux-ci, certains peuvent être à l'origine d'infection chez les patients dont l'immunité est diminuée ou en cas de blessure non correctement prise en charge. Il est important de considérer chaque agent fongique en fonction du patient (patient à risque de développer une infection superficielle ou invasive en fonction de son degré d'immunodépression ou de facteurs locaux). C'est pour cela que le remplissage du formulaire mis à disposition par le CNR est essentiel dans la prise en charge de l'échantillon.

Par ailleurs, la présence de contaminants de l'environnement au moment du prélèvement ou de l'ensemencement conduit à la culture de champignons non significatifs pouvant empêcher la culture du véritable pathogène. Il est important de rappeler que la prise de squames doit être précédée par la désinfection de la peau avec de l'alcool à 70% pour réduire au maximum le risque de contamination.

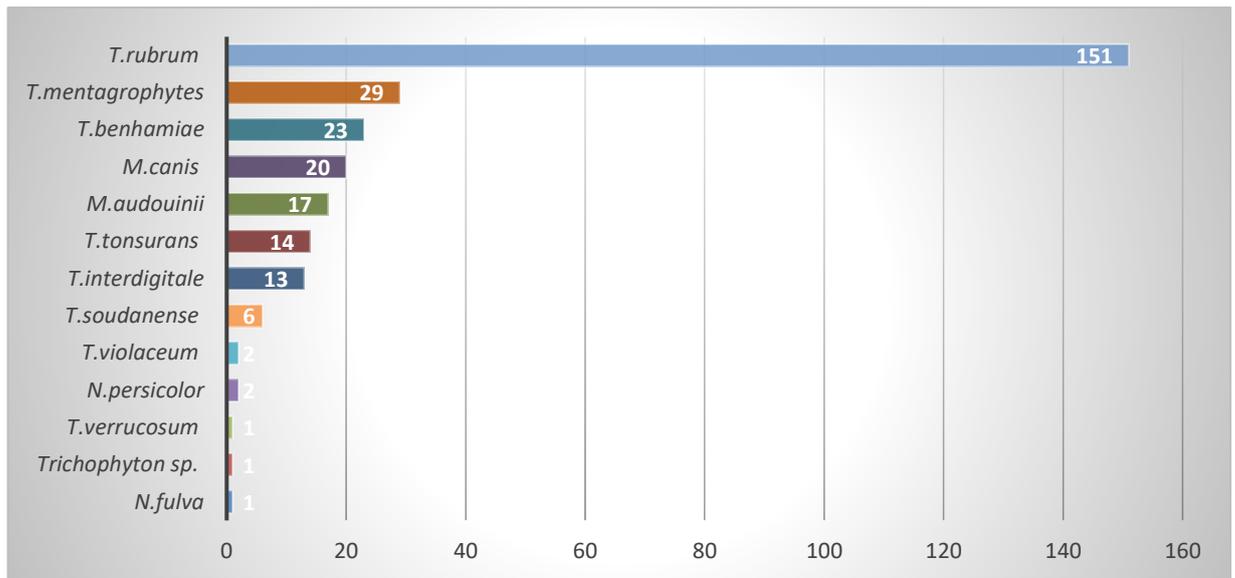


Figure 13 : Répartition des espèces de dermatophytes causant des infections de la peau en 2019.

- Ongles

La majorité des souches reçues par le CNR provenaient d'ongles (1374 isolats). Ceci a conduit à l'identification de 695 dermatophytes (50.7%), 146 levures (107 *Candida*, 39 appartenant aux genres *Rhodotorula* et *Trichosporon*) et des champignons non-dermatophytes, considérés souvent comme contaminants où l'on retrouve des genres tels que les *Alternaria*, *Scopulariopsis*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Aspergillus* ou encore *Fusarium*. Il est important de mettre l'accent sur le fait que la présence de champignons non-dermatophytes qui sont potentiellement pathogènes, tels que *Fusarium spp* ou *Scopulariopsis spp*, doit être confirmée sur base de la positivité de l'examen direct et également d'un second échantillon positif pour le même agent, avant de le juger responsable de la symptomatologie. En effet, la présence d'un dermatophyte peut être gênée par la croissance de tels contaminants.

Le groupe des dermatophytes responsables d'onychomycoses, comprend principalement 611 *T. rubrum* (88.4%), et 82 *T. interdigitale* (11.9%) (Voir **figure 14**). A noter, la présence d'un prélèvement positif pour *M. canis* et un pour *T. tonsurans* dans un ongle. Ces agents sont en effet habituellement responsables de

teignes du cuir chevelu. Ces prélèvements ont été séquencés et l'origine du prélèvement vérifié.



Figure 14: Répartition des espèces de dermatophytes responsables d'onychomycoses en 2019.

6. Comparaison années 2012-2019

En 2012, un total de 2733 prélèvements ont été traités par les CNR. En 2013, ce nombre était de 3185, il était de 3264 en 2014, de 2563 en 2015, 2526 en 2016, 2450 en 2017, 2254 en 2018 et 2027 en 2019. Parmi ces échantillons, 775 ont été identifiés comme étant des dermatophytes en 2012 contre 1529 en 2013, 1283 en 2014, 1262 en 2015, 1399 en 2016, 1350 en 2017, 1497 en 2018 et 1196 en 2019. Comme le montre la **figure 15**, l'année 2013 a vu une recrudescence des dermatophytes isolés puisqu'ils représentent 48% des prélèvements en 2013 contre 28,4% en 2012 et 39,37% en 2014. En 2015, la proportion de dermatophytes isolés avait encore augmenté puisqu'ils représentaient 49,26% des échantillons. Cette croissance se confirme en 2016 et 2017 puisque 55% des prélèvements concernaient des dermatophytes. En 2018 et 2019, la tendance se poursuit car 66.6% des prélèvements sont des dermatophytes en 2018 et 59.2% le sont en 2019. Le taux de levures isolées est en baisse. En 2018 et 2019, elles comptent respectivement pour 7.9% et 12.1%, en 2017 elles représentaient 11,5% des prélèvements contre 15,5% en 2016 et 18% en 2015. Ce nombre était de 15,6% en 2014, 15,06% en 2013 et 10,6% en 2012. L'augmentation de la détection des

dermatophytes peut s'expliquer par l'utilisation depuis novembre 2016, de la PCR Dermagenius lorsque l'examen direct est positif et que la culture est négative ou contaminée.

En ce qui concerne les dermatophytes *T. rubrum* reste le pathogène prédominant. Le taux de *T. rubrum* isolé augmente régulièrement depuis 2012. En 2018 et 2019 cette ascension stagne un peu mais en 2018, une étude sur les teignes du cuir chevelu a été organisée par le CNR mycoses au niveau national, ce qui biaise les tendances. En 2018 et 2019, *T. rubrum* représente respectivement 55.2% et 66.6% des prélèvements. En 2017, il représentait 70,4% des isolats contre 69% en 2016, 67% en 2015, 65, 72% en 2014, 53,2 % en 2013 et 45,6% en 2012. Par contre une diminution progressive du complexe *T. mentagrophytes* a été observée depuis 2012. En 2014, ils représentaient 18,86% des prélèvements (19,6% en 2013, 31,1% en 2012). En 2015, ils ne représentaient plus que 15,94% des prélèvements. En 2016, ce complexe a été scindé selon la nouvelle classification de De Hoog et al, 2016 en *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes* et *T. benhamiae*. Pour comparaison aux années antérieures, ces espèces regroupées représentaient 15,37% des prélèvements en 2016, 15,27% en 2017. En 2018, *T. interdigitale* représentait 11% des prélèvements alors que *T. benhamiae* et *T. mentagrophytes* représentaient respectivement 1.8% et 0.5% des prélèvements reçus (13.2% des prélèvements lorsqu'on regroupe les espèces comme anciennement). En 2019, les taux sont assez similaires avec 11.4% de *T. interdigitale*, 3,5% de *T.mentagrophytes* et 2.2% de *T. benhamiae* représentant 17.1% des prélèvements lorsqu'on les regroupe. Le taux de ces espèces de l'ancien complexe *T. mentagrophytes* est donc en diminution par rapport aux années précédentes même si on note une légère augmentation de *T. benhamiae* au sein du complexe.

Le nombre de *M. audouinii* isolés en 2013 avait augmenté à la suite de l'étude épidémiologique lancée début 2013, concernant les teignes anthropophiles à *M. audouinii*, ils représentaient 11,9% des prélèvements en 2013. Ce nombre était revu à la baisse en 2014 puisqu'ils représentaient seulement 3,35% des prélèvements. En 2015, ils représentaient 6,73% des prélèvements et ce pourcentage était encore à la hausse en 2016 puisqu'ils représentaient 8,5% des prélèvements. En 2017, on a observé une brusque chute de cette espèce qui ne représente plus que 4,23% des

espèces isolées. En 2018, l'étude sur les teignes du cuir chevelu a induit une augmentation des notifications de teignes à *M.audouinii* qui représentaient 11.1% des prélèvements. En 2019, le taux de *M. audouinii* redescend à 4.9% des prélèvements soit un taux comparable à celui de 2017. Il n'y a donc pas de réelle augmentation de cette espèce dans le territoire belge ces dernières années. Les infections à *M. canis* suivaient un accroissement lent mais constant entre 2012 et 2014 (1,16% en, 2012, 3,07% en 2013, 4,96% en 2014). En 2015, le taux d'infection à *M. canis* était plutôt stationnaire avec un taux de 4,85%. En 2016, on notait une diminution de cette espèce puisque seulement 2,07% des prélèvements étaient concernés par cette espèce de dermatophyte. En 2017, un léger accroissement est noté puisque *M. canis* représente 3,1% des prélèvements. En 2018 et 2019, *M. canis* représente 3.7% des prélèvements (Voir **figure 16** et **Tableau 1** pour les détails) et est donc relativement stationnaire. A noter que *T. tonsurans* connaît également un accroissement passant de 1,93% des prélèvements en 2016 à 3,1% en 2017. En 2018 ce taux est de 5.7% (étude teigne en cause) il est de 3.3% en 2019 donc relativement stationnaire également par rapport à 2017.

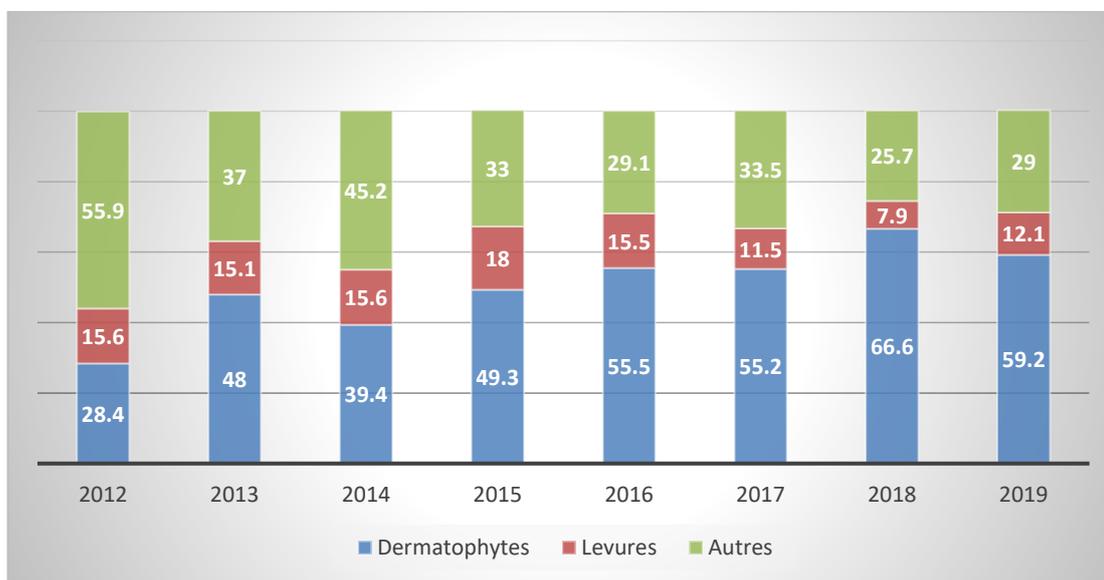


Figure 15: Répartition des différents groupes d'isolats identifiés entre 2012 et 2019.

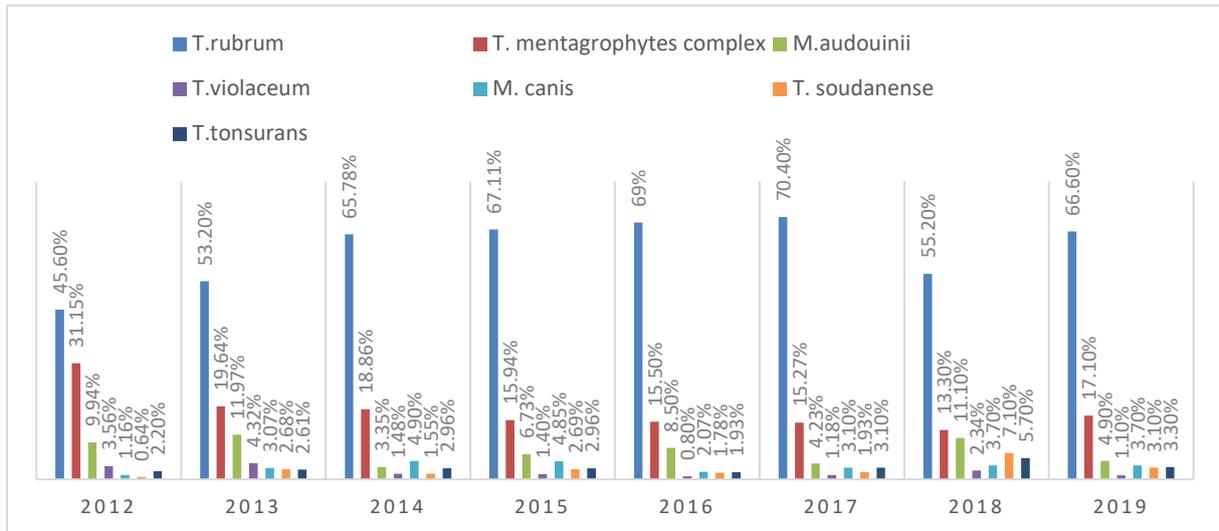


Figure 16 : Répartition des espèces de dermatophytes majoritairement isolées entre 2012 et 2019 par les CNR.

Espèce	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
<i>T. rubrum</i>	45,60%	53,20%	65,78%	67,11%	69%	70,40%	55,20%	66,60%
<i>T. mentagrophytes complex</i>	31,15%	19,64%	18,86%	15,94%	15,50%	15,27%	13,30%	17,10%
<i>M. audouinii</i>	9,94%	11,97%	3,35%	6,73%	8,50%	4,23%	11,10%	4,90%
<i>T. violaceum</i>	3,56%	4,32%	1,48%	1,40%	0,80%	1,18%	2,34%	1,10%
<i>M. canis</i>	1,16%	3,07%	4,90%	4,85%	2,07%	3,10%	3,70%	3,70%
<i>T. soudanense</i>	0,64%	2,68%	1,55%	2,69%	1,78%	1,93%	7,10%	3,10%
<i>T. tonsurans</i>	2,20%	2,61%	2,96%	2,96%	1,93%	3,10%	5,70%	3,30%
<i>M. praecox</i>	4,90%	1,31%	0,07%	0,08%	0	0	0	0
<i>E. floccosum</i>	0,90%	0,39%	0,07%	0,23%	0,14%	0,07%	0,13%	0
<i>T. schoenleinii</i>	0	0,33%	0	0	0	0	0	0
<i>Trichophyton sp.</i>	0,25%	0,33%	0,07%	0	0,14%	0,07%	0	0,08%
<i>N. gypsa</i>	0	0,13%	0,21%	0	0,07%	0	0,07%	0
<i>N. persicolor</i>	0,07%	0,06%	0,21%	0	0	0,07%	0,20%	0,16%
<i>T. terrestre complex</i>	0	0,06%	0	0	0,07%	0	0	0
<i>T. verrucosum</i>	0	0,06%	0,14%	0,23%	0,14%	0,07%	0,26%	0,16%
<i>M. ferrugineum</i>	0	0	0,14%	0	0	0,07%	0,26%	0
<i>M. racemosum</i>	0	0	0	0,08%	0	0	0	0
<i>T. megnini</i>	0	0	0	0,08%	0,14%	0	0	0
<i>T. erinacei</i>	0	0	0	0	0	0,07%	0	0
<i>N. fulva</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,08%
<i>N. incurvata</i>	0	0	0	0	0	0	0,26%	0

Tableau 1 : Comparaison des pourcentages des différentes espèces de dermatophytes observées entre 2012 et 2019 par les CNR.

En ce qui concerne les prélèvements de cheveux, la proportion de *M. audouinii* isolés diminue puisque cette espèce représentait 45% des cas de teignes en 2012, il représente respectivement 38,16% et 30,3% des prélèvements issus de cheveux en 2018 et 2019, mais reste tout de même l'agent n°1 des teignes du cuir chevelu en Belgique. Le taux de *T. soudanense* poursuit son ascension atteignant 23,4% des cas de teignes en 2018 et 23,5% en 2019. Le taux de *T. tonsurans* est également en hausse par rapport à 2016 et 2017 représentant 18% des cas de teignes du cuir chevelu en 2018 et 18,4% des cas en 2019. Le taux de *M. canis* impliqués dans les cas de teignes est stable par rapport à 2017 puisqu'il représentait 13,3% des cas de teignes en 2017 contre 9% en 2018 et 14,7% en 2019. Le taux de *T. violaceum* est relativement bas (6,6% en 2018 et 8,1% en 2019) ainsi que le

taux de *T mentagrophytes complex* (3% en 2018 et 4.4% en 2019) (voir **figure 17**).

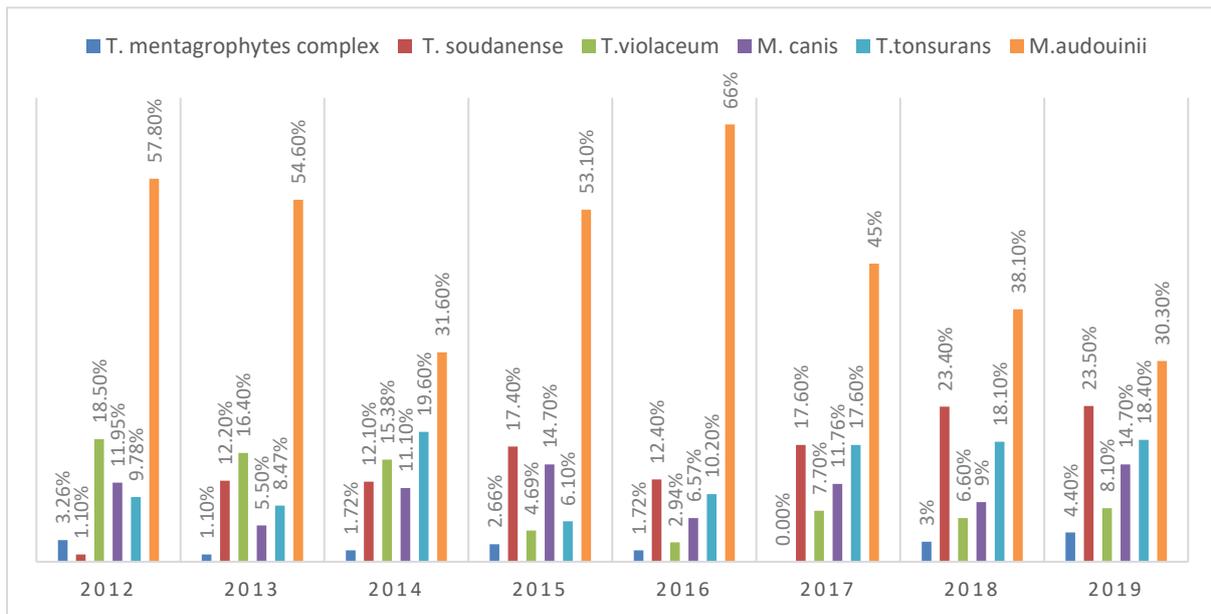


Figure 17 : Répartition des dermatophytes isolés de prélèvements de cheveux de 2012 à 2019

En ce qui concerne les prélèvements d'ongles, le taux d'infections à *T. rubrum* sont comparables aux taux enregistrés en 2016 et 2017 avec ceci dit une tendance à la hausse toujours marquée. Ce taux est de 82.6% en 2018 et 88.4% en 2019. Pour le complexe *T. mentagrophytes*, le taux est de 17.1% en 2018 et 11.9% en 2019, la tendance à la baisse se poursuit donc pour ce groupe (Voir **Figure 18**).

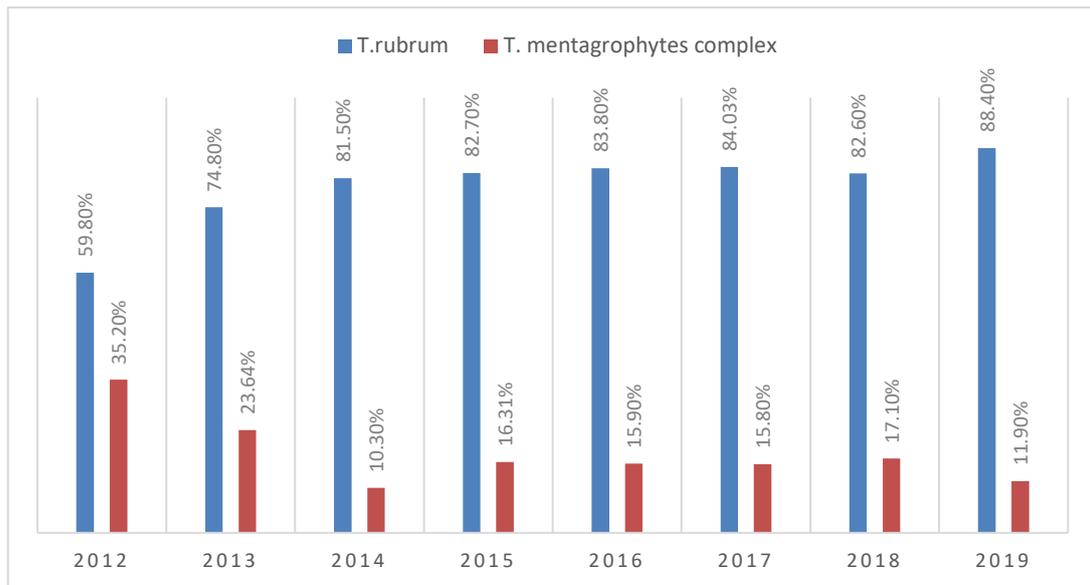


Figure 18 : Répartition des principaux dermatophytes isolés de prélèvements d'ongles de 2012 à 2019.

Pour les prélèvements de peau en 2018 et 2019, les infections à *T. rubrum* sont en légère baisse 54.1% en 2018 et 52.6% en 2019. Le complexe *T. mentagrophytes* a quant à lui augmenté pour ce type d'infections notamment dû à l'émergence d'espèces zoophiles *T. mentagrophytes* et *T. benhamiae* dans les prélèvements de peaux. L'espèce *T. mentagrophytes* représente 6.1% des prélèvements en 2018 et 10.36% en 2019 contre 2.5% en 2017, L'espèce *T. benhamiae* a été isolée à raison de 8.2% en 2018 et 8.3% contre 5.1% en 2017. Pour *M. canis* le taux d'infection par cet agent dans les prélèvements de peaux est relativement stationnaire avec 5.7% en 2018 et 7.1% en 2019. On observe un état assez stationnaire pour *T. tonsurans* et *M. audouinii* en 2018 et 2019. (Voir **Figure 19** pour la répartition).

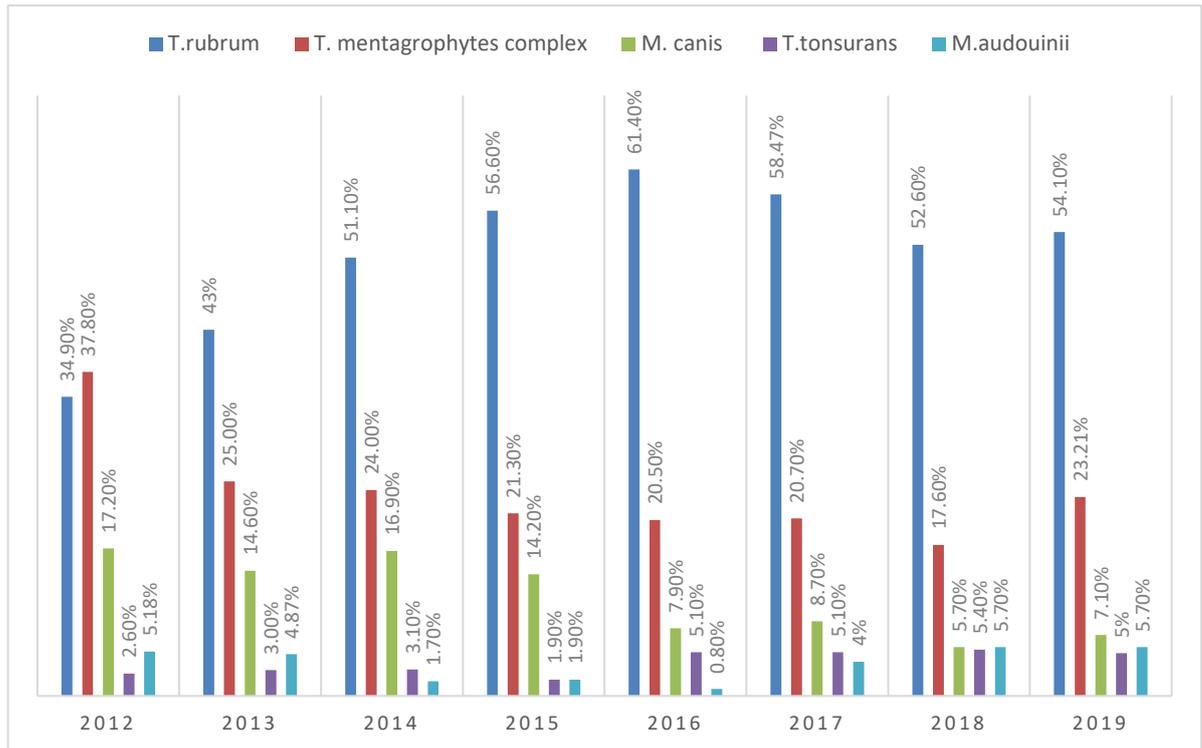


Figure 19 : Répartition des dermatophytes isolés de prélèvements de peau de 2012 à 2019

7. Enquêtes épidémiologiques

En 2018, le CNR mycoses a organisé une étude nationale sur les teignes du cuir chevelu. La collaboration des dermatologues de grands centres belges a été requise afin qu'ils nous envoient leurs cas de teignes confirmés par culture de dermatophytes positive. Ce prélèvement était accompagné d'un formulaire demandant plusieurs informations sur le patient à visée épidémiologique. Une étude précédente organisée en 2013 avait fait état d'un grand nombre de teignes anthropophiles circulant en Belgique. Le but de cette nouvelle étude étant de faire une mise à jour des données épidémiologiques afin de suivre l'évolution des espèces présentes en Belgique, proposer des mesures préventives et pouvoir les comparer aux données des autres pays européens.

Cette étude précisait l'origine géographique des populations infectées, le mode de contamination le plus probable et en cas de transmission par un animal, le type d'animal impliqué. Une étude moléculaire accompagnera ces données épidémiologiques pour caractériser les souches isolées au sein des plus grands groupes. L'analyse génomique sera réalisée par NGS (en collaboration avec des partenaires universitaires liégeois en 2020). Au total 428 cultures positives ont été récoltées et provenaient principalement de 14 laboratoires en Belgique. Les résultats de cette étude ont été présentés lors du TIMM 2019 à Nice (8). Les résultats de cette étude seront également décrits dans un article en cours de publication.

8. Travaux de recherche, collaborations et communications

a. Evaluation milieux Id Fungi Plates®

En 2018 et 2019, plusieurs études ont été menées par le centre de référence mycoses. Un nouveau milieu de culture Id-fungi plates de la firme Conidia a été évalué. Ce milieu présente la particularité d'être muni d'une membrane, ce qui permet un dépôt aisé des dermatophytes et autres champignons filamenteux (y compris les *Aspergillus*) sur la cible Maldi-Tof MS puisque ceux-ci n'adhèrent pas ou peu sur le milieu de culture. Une évaluation du rendement d'identification par Maldi-Tof a été réalisée avec plus de 80 souches de référence. Une nouvelle version

du milieu de culture contenant du cycloheximide a également été évaluée en 2019 pour le dépôt direct d'ongles, cheveux et peaux sur ce milieu, suivi d'une identification par Maldi-Tof de dermatophytes essentiellement. Les performances du milieu en termes de sensibilité et spécificité et le rendement obtenu pour l'identification ont été comparés aux méthodes actuelles. Les résultats de ces deux études sont décrits dans un article soumis dans *Mycoses* et ont été présentés à l'ECCMID 2018 et 2019 (4,5, 6).

b. Projet européen : évaluation de la sensibilité *in vitro* de dermatophytes

Un autre projet initié en 2016 par le CNR et continué en 2018 et 2019, consiste en le développement d'une méthode permettant de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de divers antifongiques vis-à-vis des dermatophytes, comme la terbinafine, l'itraconazole et l'amorolofine et le voriconazole. Diverses approches ont été testées. La première étant fondée sur la méthode de microdilution en milieu liquide décrite dans la procédure CLSI-M38, la seconde approche était fondée sur une méthode de dilution en agar. En 2018, un consensus européen géré par Maiken Arendrup (Danemark) a permis de définir une méthode de microdilution en milieu liquide pour les dermatophytes basées sur la méthode Eucast E. Def 9.3 modifiée. Les modifications incluent l'ajout de cycloheximide et chloramphenicol pour diminuer les risques de contamination, une incubation prolongée jusqu'à 7 jours, une température d'incubation de 25°C. 40 souches ont été traitées par le centre de référence et les résultats obtenus ont été comparés entre les différents centres. Les résultats de cette étude ont été publiés dans « *Journal of antimicrobial chemotherapy* ». (9)

c. PCR squalène epoxydase et screening des *T. rubrum* et *T. interdigitale*.

En 2019, toujours dans le but de détecter d'éventuelles résistances aux antifongiques, une PCR permettant de détecter une mutation au niveau de la squalène epoxydase déjà décrite comme étant responsable d'une résistance à la terbinafine chez *T. rubrum* et *T. interdigitale* (10), a été implémentée au laboratoire. Cette méthode nous a permis de définir une souche présentant un profil résistant parmi les souches récoltées lors de l'étude nationale sur les teignes du cuir chevelu de 2018. Un « screening » de la résistance à la terbinafine a été réalisée au sein des

T. rubrum et *T.interdigitale* en déposant chaque souche reçue sur une gélose contenant 0.02µg/ml de terbinafine comme décrit par Yamada et al (10).

d. Phylogénie

En 2019, le CNR s'est également intéressé à la phylogénie et en particulier au sein des espèces *T. interdigitale* et *T. mentagrophytes* ainsi que parmi les *T. soudanense* et *T. violaceum*. La combinaison du séquençage et la concaténation de trois gènes ITS, Beta-tubuline et Ef1-alpha, a permis d'obtenir un dendrogramme permettant de distinguer plus facilement ces espèces qui sont parfois impossibles à distinguer en microscopie ou par le séquençage d'un seul gène. Les résultats de cette étude ont été présentés au TIMM 2019 à Nice (11).

9. Conclusions

Les activités du CNR Mycoses ont permis de mettre en évidence que *T. rubrum*, reste dans nos régions le premier agent responsable de mycoses superficielles, tous prélèvements confondus, cet agent étant le plus souvent associé aux onychomycoses. Le complexe *T. mentagrophytes* est quant à lui fréquemment responsable de mycoses superficielles de la peau et de l'ongle. Depuis 2016, ce complexe est scindé en *T. interdigitale* et *T. benhamiae* selon la nouvelle taxonomie proposée par de Hoog et al en 2016. Concernant les infections du cuir chevelu, *M. audouinii* reste le premier responsable de ce type d'infection, ce qui était également le cas depuis 2012. L'émergence de la résistance à la terbinafine chez *T. rubrum* et *T. interdigitale* est à contrôler au sein des souches belges étant donné l'émergence de ce type de résistances dans d'autres pays européens, ce phénomène pouvant mener à des échecs thérapeutiques.

10. Références

1. Pagano L, Lumb J. Future microbial. 2011;6(9): 985-989. Update on fungal infections.
2. Burzykowski T, Molenberghs G, Abeck D, Haneke E, Hay R, Katsambas A, Roseeuw D, van de Kerkhof P, van Aelst R, Marynissen G: High prevalence of foot diseases in Europe: results of the Achilles Project. *Mycoses* 2003, 46(11-12):496-505.
3. Kelly BP. Superficial fungal infections. *Pediatr Rev.* 2012 Apr 33(4):e22-37.
4. Sacheli, R., Winandy, S., Adjetey Bahun, A., Darfouf, R., Legras, Q., Meex, C., Marechal, L., Arrese Estrada, J., & Hayette, M.-P. (2020, April). *Clinical evaluation of the ID-fungi® plates for direct identification of dermatophytes on nail, hair and skin samples by Maldi-Tof MS*. Poster session presented at 30th ECCMID, Paris, France
5. Sacheli, R., Henri, A.-S., Detollenaere, L., Meex, C., & Hayette, M.-P. (2019, April). *Evaluation of the new Conidia® medium for Maldi-Tof MS identification of filamentous fungi*. Poster session presented at 29th ECCMID.
6. Sacheli R, Henri AS, Seidel L, et al. Evaluation of the new Id-Fungi plates from Conidia for MALDI-TOF MS identification of filamentous fungi and comparison with conventional methods as identification tool for dermatophytes from nails, hair and skin samples [published online ahead of print, 2020 Aug 5]. *Mycoses*. 2020;10.1111/myc.13156. doi:10.1111/myc.13156
7. De Hoog, G. S., K. Dukik, et al. (2017). "Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes." *Mycopathologia* **182**(1-2): 5-31.
8. Sacheli, R., Menatong, X., Labarbe, C., Crützen, C., Harag, S., André, J., Evrard, S., Lagrou, K., Laffineur, K., Rousseaux, D., De Tollenaere, L., Adjetey Bahun, A., Seidel, L., & Hayette, M.-P. (2019, october). Belgian national survey on tinea capitis: epidemiology and molecular investigations. *Mycoses, supplement*.
9. Arendrup MC, Jørgensen KM, Guinea J, et al. Multicentre validation of a EUCAST method for the antifungal susceptibility testing of microconidia-forming dermatophytes. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(7):1807-1819. Doi:10.1093/jac/dkaa111
10. Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, et al. Terbinafine Resistance of Trichophyton Clinical Isolates Caused by Specific Point Mutations in the Squalene Epoxidase Gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(7):e00115-17. Published 2017 Jun 27. Doi:10.1128/AAC.00115-17
11. Sacheli, R., Tome, C., Adjetey Bahun, A., Darfouf, R., Palmeira, L., & Hayette, M.-P. (2019, October). Classification of dermatophytes by a multilocus phylogenetic approach based on Tef-1 α , beta tubulin and ITS genes. *Mycoses, Supplement*.