

Rapport 2011

Centre National de Référence des mycoses UZ Leuven - CHU Liège

CNR coordinateur (focus sur les mycoses invasives)

Prof. Katrien Lagrou	UZ Leuven Laboratoriumgeneeskunde	Herestraat 49	3000 Leuven
tél. secr. 016/347948 tél. direct 016/347098	fax 016/347931	katrien.lagrou@uzleuven.be	

CNR associé (focus sur les mycoses cutanées)

Prof. Marie-Pierre Hayette	CHU Liège - Service de Microbiologie médicale	Tour de pathologie, B35	4000 Liège
tél. secr. 04/3662439 tel. direct 04/3662454	fax 04/3662440	mphayette@chu.ulg.ac.be	

1. Résumé des principales activités de 2011

Mycoses invasives

Une surveillance nationale des *Aspergillus* a été entreprise avec comme objectif principal de déterminer la distribution des espèces et le pourcentage de résistance à la thérapie de première ligne (voriconazole).

131 isolats provenant de 117 patients de 18 centres différents ont été analysés. Tous ces isolats étaient considérés comme significativement cliniques. L'espèce principale était *Aspergillus fumigatus* (108/131) suivie par *Aspergillus flavus* (10/131). 1,9% des patients (2/103) étaient infectés par un *A. fumigatus* résistant aux médicaments antifongiques triazole. Ce résultat est comparable au pourcentage de résistance à l'azole (1,2%) qui a été déterminé lors d'une étude multicentrique (UZ Leuven) durant la période 2006-2007¹. Le pourcentage de résistance à l'azole pour les *A. fumigatus* en Belgique reste donc faible et stable, ce qui est en contradiction avec les rapports des Pays-Bas² et du Royaume-Uni³.

Références

¹Lagrou K, De Vleeschouwer J, Meersseman W, Dupont L, Verleden G, Melchers WJG, Verweij PE, Maertens J. Triazole resistance among clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. 3rd Advances Against Aspergillosis, Florida, 2008

²Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, Rijs AJ, Varga J, Samson RA, Mellado E, Donders AR, Melchers WJ, Verweij PE. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. PLoS Med (2008); 5(11): e219: 1629-1637

³Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, Laverdiere M, Arendrup MC, Perlin DS, Denning DW. Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. Emerg Infect Dis (2009); 15(7): 1068-107.

Dermatophytoses

Au total, 395 isolats fongiques ont été identifiés en provenant de la peau (n=126), des cheveux (n=14) et des ongles (n=252). Les isolats étaient identifiés au microscope et séquençage ITS pour confirmation de l'espèce spécifique et pertinente aux besoins.

Microsporium audouinii était le pathogène fongique le plus souvent cultivé à partir de cheveux et était présent dans 35% de tous les échantillons.

Les isolats cultivés à partir de squames peuvent être répartis en dermatophytes (64% de tous les isolats), levures (8%, 10 *Candida albicans* et 2 *Candida non albicans*) et autres non dermatophytes (28%). Parmi les dermatophytes, le complexe *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton rubrum* était l'espèce la plus importante avec 37 (45%) et 39 (48%) isolats respectivement.

T. rubrum (73/252) était le principal responsable d'onychomycoses.

2. Aperçu des activités

Identification des espèces par le spectromètre de masse Maldi-TOF

Identification des levures

Une évaluation critique de l'identification des levures par le 'matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry' (MALDI-TOF MS) a été réalisée.

L'identification des **levures** via le MALDI-TOF MS dépend principalement de la procédure d'extraction utilisée et de la présence des spectres de référence suffisants dans la base de données. L'influence d'autres facteurs, tels le milieu de culture, la durée et la température d'incubation, la matrice et l'appareil, est très limitée.

L'extraction classique avec de l'éthanol et de l'acide formique donne de bons résultats mais demande beaucoup de travail et de temps. Une procédure raccourcie avec application directe d'acide formique 70% donne aussi de bons résultats. Le cutoff pour l'identification avec le software Biotyper® de Bruker (Bruker Daltonics, Germany) était diminué dans différentes études jusqu'à un logscore ≥ 1.7 , avec aussi de bons résultats.

L'expérience personnelle montre que mitrailler manuellement la cible et l'augmentation des spectres de masse qui ne répondent pas aux critères strictes de la mesure automatisée conduisent cependant dans beaucoup de cas à de bonnes identifications.

Un élargissement limité de la base de données Biotyper avec 26 levures bien typées a augmenté le degré d'acceptation de 72% à 88%. Avec inclusion des déterminations *in duplo*, le degré d'acceptation a augmenté de 82% à 92%. A souligner que dans 84% à 90% des identifications, un spectre de référence généré 'in house' peut être considéré comme la meilleure concordance.

L'analyse des cryptocoques via MALDI-TOF MS est empêchée par un nombre limité de spectres de référence dans la base de données Biotyper. Par l'élargissement de cette base de données avec 20 extra MSP"s (Main Spectra), les espèces *C. neoformans* et *C. gattii* peuvent être séparées de façon fiable. La différenciation entre *C. neoformans* var. *grubii* et var. *neoformans* est possible en théorie mais doit encore être évaluée sur des souches cliniques.

Identification des dermatophytes

L'identification des dermatophytes est actuellement réalisée à l'aide de recherche macroscopique et microscopique. La plupart des souches peuvent être totalement identifiées par les biologistes cliniques et les technologues de laboratoires ayant une expertise dans le domaine de la mycologie. Cependant, l'identification des dermatophytes au niveau de l'espèce exige parfois d'autres techniques à cause de la morphologie atypique de certains isolats cliniques. La sous-culture sur des milieux spécifiques et les tests biochimiques prennent beaucoup de temps. Les tests de biologie moléculaire sont plus précis. L'analyse de séquençage est pour le moment la méthode de référence pour une identification correcte de l'espèce. Cette technique est vraiment limitée aux laboratoires spécialisés où il y a un besoin de développer des méthodes faciles à réaliser. La spectrométrie de masse est actuellement de plus en plus utilisée par les laboratoires cliniques pour l'identification des bactéries et des champignons. Cette méthode est facile à réaliser directement sur des colonies fraîches qui ont poussé sur des milieux solides ou dans un milieu liquide. Le but de notre étude était d'évaluer la performance du Maldi-TOF MS Bruker pour l'identification des champignons filamenteux et surtout des dermatophytes au niveau de l'espèce.

L'étude a été réalisée en 3 étapes. Dans une première phase, l'analyse par séquençage a été réalisée sur des dermatophytes qui avaient bien été caractérisés au microscope. Dans une deuxième phase, la base de données Maldi Biotyper a été complétée avec des souches de référence et des souches sur lesquelles une analyse par séquençage avait été réalisée. Enfin, 70 isolats fongiques qui avaient été cultivés à partir d'ongles, de cheveux et de peau ont été analysés par spectrométrie de masse et les résultats ont été comparés avec l'identification provenant de l'analyse par séquençage.

La base de données Maldi Biotyper a été enrichie avec les spectres des dermatophytes de sorte que la plupart des espèces qui étaient comprises en pratique clinique ont été enregistrées. L'analyse par spectrométrie de masse a été directement réalisée sur des isolats fongiques après 2 à 3 jours de culture sur agar Sabouraud ou milieu Malt agar.

A l'heure actuelle, la concordance entre l'identification conventionnelle et la spectrométrie de masse est de 71% au niveau de l'espèce et de 80% au niveau du gène. Les résultats doivent encore être complétés avec l'identification finale des isolats sur base de l'analyse par séquençage et aussi par l'inclusion d'autres isolats. Ces résultats préliminaires sont donc prometteurs en ce qui concerne l'utilisation de la spectrométrie de masse comme méthode complémentaire pour les techniques conventionnelles d'identification pour les champignons filamenteux isolés de cheveux, peau et ongles. L'analyse d'un plus grand nombre d'isolats est nécessaire pour évaluer les caractéristiques réelles de performance de cette technique.

Autres activités

- Identification des isolats au niveau de l'espèce via microscopie, macroscopie, séquençage ITS ou séquençage beta-tubulin
- PCR (+ séquençage) pour la détection et l'identification des champignons en biopotes
- Détermination de la sensibilité des champignons filamenteux et des levures des mycoses invasives
- Surveillance des *Aspergillus*
- Surveillance des dermatophytes
- Fonction d'avis pour le traitement/diagnostic/référence des patients ayant une mycose invasive.

3. Caractéristiques épidémiologiques

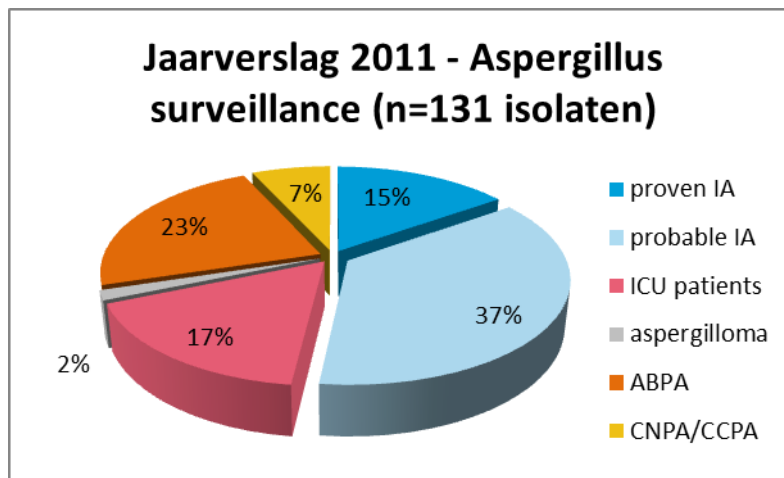
Surveillance des *Aspergillus*

La plupart des souches envoyées d'*Aspergillus* provenaient de patients ayant une aspergillose invasive probable (probable IA) suivant les critères EORTC (figure 1)⁴. Une partie importante (17%) des souches provenait de patients ayant une aspergillose invasive aiguë et cliniquement significative qui n'était pas strictement classifiable selon les critères EORTC. Il s'agissait principalement de patients aux soins intensifs qui n'avaient pas de critère d'hôte ou de critère clinique (principalement quand seulement un RX du thorax avait été réalisé et pas de CT scanning) selon les définitions EORTC. Le rapport homme-femme des patients chez qui des souches d'*Aspergillus* avaient été cultivées sont présentées à la figure 2. *A. fumigatus* était le pathogène le plus important (82%) (figure 3).

La sensibilité de tous les isolats à l'itraconazole, la voriconazole et la posaconazole a été testée selon la méthodologie CLSI. Trois des 108 isolats d'*A. fumigatus* (2,8%) étaient résistants aux azoles dont 2 isolats provenant du même patient.

Une analyse détaillée des résultats de la surveillance (incluant une détermination du mécanisme de résistance des souches résistantes aux azoles) va être réalisée.

Figure 1 : Signification clinique des souches d'*Aspergillus* envoyées



AI : aspergillose invasive, ICU : aspergillose invasive chez des patients aux soins intensifs, APBA : aspergillose allergique broncho-pulmonaire, CNPA/CCPA: aspergillose pulmonaire chronique nécrosante ou chronique cavitaire

Figure 2 : Rapport homme-femme des patients chez qui une souche d'*Aspergillus* a été cultivée

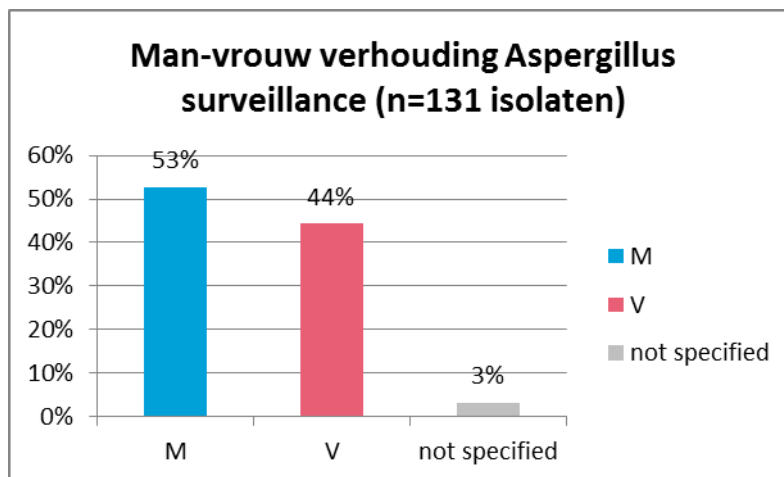
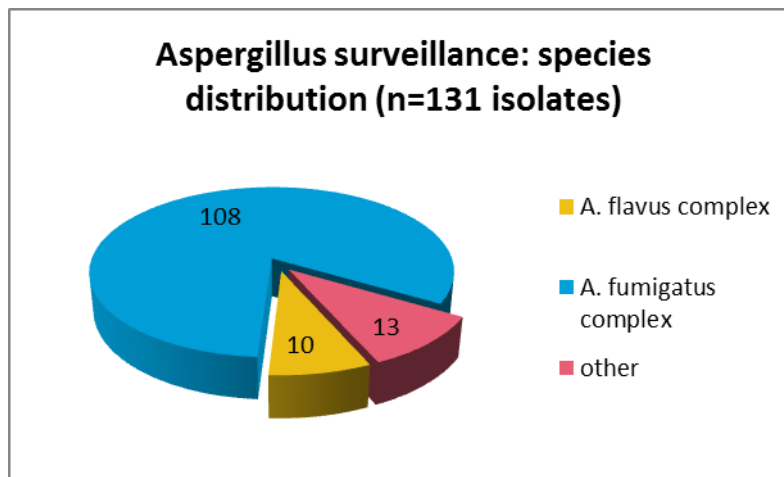


Figure 3 : Distribution par espèce des souches d'Aspergillus envoyées



Référence

⁴De Pauw B 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.

Dermatophytoses

1. Cheveux

Au total, 64% des échantillons étaient positifs pour des dermatophytes. *M. audouinii* était le pathogène fongique le plus important et était présent dans 35% de tous les échantillons. Les 4 autres dermatophytes détectés sont *Microsporum canis* (n=2), *Trichophyton violaceum* (n=1) et le complexe *T. mentagrophytes* (n=1). La médiane d'âge des patients était de 6 ans. Les autres espèces cultivées étaient des champignons filamenteux non dermatophytes, présents dans les échantillons comme contaminants. Nos résultats mettent l'accent sur l'importance des *M. audouinii* comme agent causal de la teigne chez les enfants en âge d'école.

2. Peau

Au total, 126 isolats ont été cultivés à partir de squames identifiés. Les isolats peuvent être répartis en dermatophytes (64% de tous les isolats), levures (8%, 10 *Candida albicans* et 2 *Candida* non *albicans*) et autres non dermatophytes (28%).

Parmi les dermatophytes, le complexe *T. mentagrophytes* et *T. rubrum* était l'espèce la plus importante avec 37 (45%) et 39 (48%) des isolats respectivement. Les autres dermatophytes étaient les suivants : 1 *Microsporum canis*, 1 *Microsporum persicolor*, 1 *Trichophyton schoenleinii*, 1 *Trichophyton soudanense* et 1 *Trichophyton tonsurans*.

Le groupe des non dermatophytes contient des genres différents tels *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis* et des champignons mycelium stériles qui n'ont pas été investigués plus loin par manque de relevance clinique. La présence de contaminants de l'environnement au moment de la prise d'échantillon conduit à la culture de champignons non pertinents où la croissance de vrais pathogènes peut être empêchée. Il est important de rappeler que la prise de squames doit être précédée par la désinfection de la peau avec de l'alcool 70% pour réduire le risque de contamination. De plus, nous voulons mettre l'accent sur l'importance du résultat de la recherche directe pour l'interprétation des résultats de la culture.

3. Ongles

La plupart des souches positives provenaient d'ongles. Ceci a conduit à l'identification de 122 dermatophytes (48%), 12 (5%) *Scopulariopsis brevicaulis*, 1 *Neoscytalidium dimitiadum*, 15 (6%) levures (réparties en 12 *Candida spp* et 3 *Trichosporum spp*) et 108 champignons non dermatophytes, la plupart considérés comme contaminants. Les dermatophytes contenaient 73 *T. rubrum* et 44 *T. mentagrophytes* complex (59% et 35% respectivement). Trois autres espèces de dermatophytes étaient 2 *T. soudanense*, 1 *T. violaceum* et 1 *T. erincae*. Le groupe des contaminants contenait 23 *Aspergillus spp*, 1 *Beauveria sp*, 2 *Chrysosporium spp*, 9 *Cladosporium spp*, 1 *Curvularia sp*, 4 *Fusarium spp*, 5 *Paecilomyces spp*, 11 *Penicillium spp* et autres champignons non pertinents. Ce groupe de non dermatophytes était bien représenté et est probablement lié à un manque de confiance des laboratoires au sujet de l'identification des espèces plus rares. Il est important de mettre l'accent sur le fait que la présence de champignons non dermatophytes qui sont potentiellement pathogènes, tels *Fusarium spp* ou *Scopulariopsis spp*, doit être confirmée sur base d'un second échantillon avant de le juger responsable de la symptomatologie parce que la présence d'un dermatophyte peut être manquée par la croissance de ce champignon. *T. rubrum* est donc le responsable le plus important d'onychomycose. D'autres études moléculaires démontreront si ces souches sont identiques ou si des différences génotypiques existent.