

# Centre de référence mycoses

Centre hospitalier universitaire de Liège

Rapport d'activité 2012

M-P Hayette/R. Sacheli

Août 2013

## 1. Introduction

L'importance grandissante tenue par les mycoses au niveau médical est sans nul doute liée à l'incidence croissante d'infections fatales causées par celles-ci chez des patients immunodéprimés durant ces deux dernières décennies (1). Cette augmentation est due notamment à un accroissement du nombre de patients vulnérables face à ces infections comme le sont les patients cancéreux, les patients traités avec des thérapies immunosuppressives, les patients séropositifs pour le VIH et les patients diabétiques.

Ainsi pour ces patients, un diagnostic rapide et précis est nécessaire et il est important de connaître les aspects culturels, macroscopiques et microscopiques des agents fongiques de façon à poser un premier diagnostic et orienter rapidement vers une thérapeutique adaptée.

Par ailleurs, à côté des infections profondes, les mycoses superficielles ont également toute leur importance puisqu'elles peuvent toucher toute personne immunocompétente et peuvent pour certaines, comme les agents de teignes microsporiques, se révéler contagieuses (2).

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. Ils peuvent également confirmer ou déterminer la sensibilité *in vitro* des champignons vis-à-vis des antifongiques adaptés. D'autre part dans le cadre d'épidémies, les laboratoires de référence offrent une aide dans la caractérisation des souches impliquées dans le phénomène.

## 2. Missions spécifiques du CNR Mycoses

- Identification et étude de la sensibilité à différents antifongiques d'isolats de champignons filamenteux et de levures responsables de mycoses invasives adressées par les laboratoires belges et luxembourgeois
- Constitution et entretien de la collection de souches de dermatophytes
- Mise au point et développement de nouvelles méthodes de diagnostic, d'identification et de typage moléculaire des champignons, telles les méthodes d'amplification génique et de séquençage

- 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 2012**

#### ***3.1 Techniques***

Au cours de l'année 2012, le CNR s'est attaché à développer et renforcer les techniques d'identification moléculaire des champignons. Ainsi, plusieurs PCR ont été adaptées à partir de la littérature existante et/ou en collaboration avec le centre associé. L'amplification de la portion ITS des champignons suivie d'une réaction de séquençage moléculaire permettant une bonne identification des isolats de dermatophytes difficilement caractérisables en microscopie a été validée. Des PCR additionnelles, telles que l'amplification du domaine D1-D2 de la grande sous unité ribosomale ou encore l'amplification du gène codant pour la bêta-tubuline ont également été implémentées avec succès comme techniques complémentaires.

### **3.2 Démarche de qualité**

- Accréditation Belac ISO 15189

Le laboratoire de microbiologie 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 a été initiée en 2012 et l'audit d'accréditation a eu lieu en 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.

- Contrôles de qualité externes 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 antibiotiques et l'identification de cultures de levure/champignon filamenteux issus d'échantillons cliniques. Ces contrôles sont proposés par l'UK NEQAS.

Parallèlement à cela, le CNR mycose 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.

## **4. Liste des analyses proposées par le CNR mycoses à Liège**

- Identification phénotypique des levures et champignons filamenteux par mise en culture sur milieux spéciaux et/ou chromogènes suivie d'une identification macro/microscopique de l'espèce. Identification de l'espèce par réalisation de

tests biochimiques, assimilation/fermentation des sucres. Identification des levures par MALDI-TOF MS.

- Détermination de la sensibilité des levures aux antifongiques par la technique Sensititre YO10. Les antifongiques testés sont le fluconazole, l'itraconazole, la 5-flucytosine, l'amphotéricine B, le voriconazole, le posaconazole, la micafungine, l'anidulafungine, et la caspofungine. Une détermination de la sensibilité par E-test peut également être effectuée en complément notamment pour les filamenteux.
- Extraction d'ADN pour les levures et champignons filamenteux selon des techniques optimisées.
- Amplification par PCR et séquençage nucléotidique des régions ITS, des régions variables de la grande sous unité 28S de l'ADN ribosomique et de la bêta-tubuline pour l'identification moléculaire de tous les champignons.
- Compilation de données cliniques et épidémiologiques.

## 5. Collection

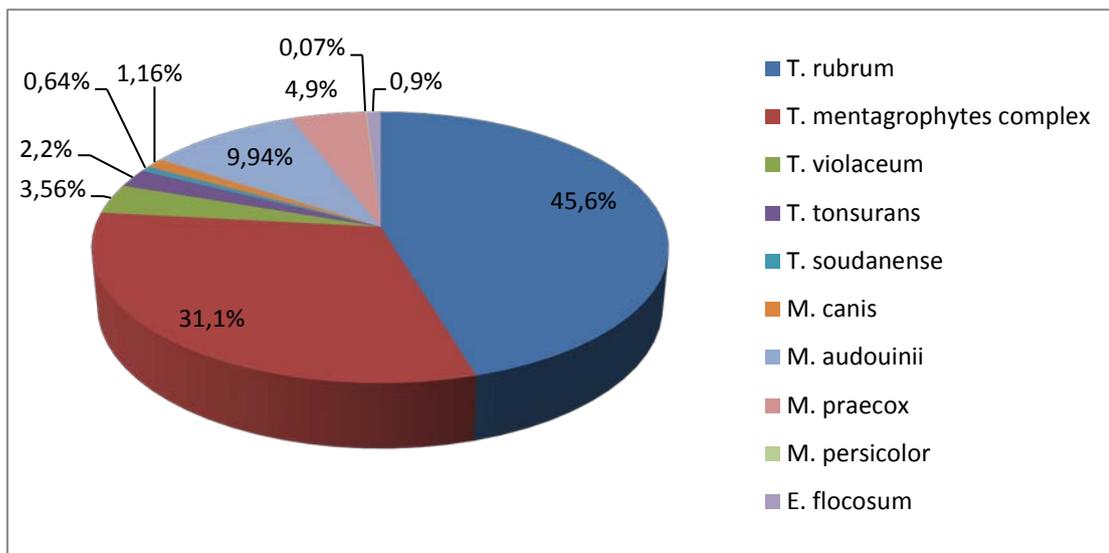
Tous les isolats cliniques de levures et de dermatophytes adressés au CNR sont systématiquement conservés et congelés à -80°C excepté les isolats de champignons contaminants. La pureté de la souche est préalablement vérifiée et des techniques d'identification et de détermination de la sensibilité aux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

## 6. Bilan de 2012 pour les champignons filamenteux

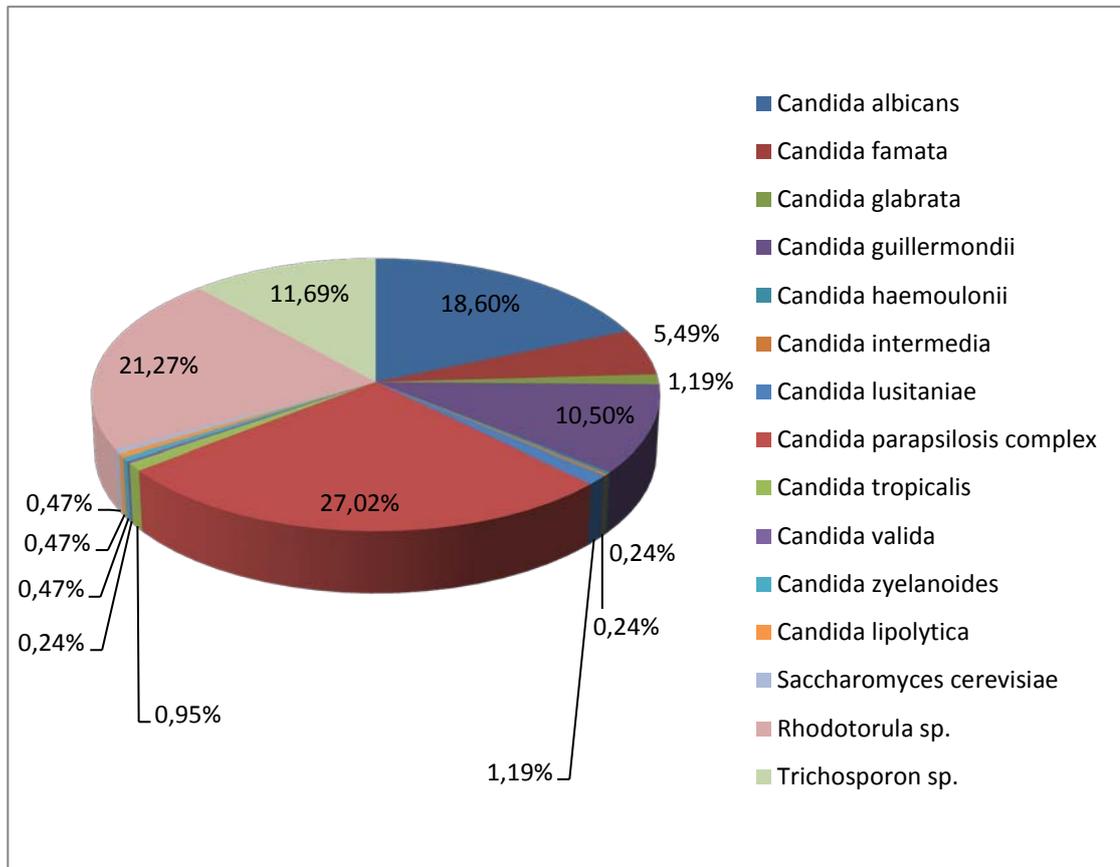
### 6.1 Bilan global

En 2012, un total de 2733 prélèvements issus de cheveux, ongles ou peau présentaient une culture fongique positive (regroupement des cas isolés à la KUL Leuven et au CHU de Liège). Parmi ces échantillons, 775 (28,4%) ont été identifiés comme étant des dermatophytes. Parmi eux, 643 isolats ont été

identifiés comme faisant partie du genre *Trichophyton*, 125 comme faisant partie du genre *Microsporum* et 7 comme faisant partie du genre *Epidermophyton*. Plus précisément, parmi les dermatophytes l'isolat le plus fréquemment retrouvé (tous prélèvements confondus) est le *T. rubrum* (351 isolats, 45,6%) suivi du *T. mentagrophytes complexe* (241 isolats, 31,15%), *M. audouinii* (77 isolats, 9,94%), *M. praecox* (38 isolats, 4,9%), *T. violaceum* (27 isolats, 3,56%), *T. tonsurans* (17 isolats, 2,2%), *M. canis* (9 isolats, 1,16%), *E. floccosum* (7 isolats, 0,9%), *T. soudanense* (5 isolats, 0,64%), et *M. persicolor* (1 isolat, 0,07%). Deux isolats (0,25%) ont été identifiés comme *Trichophyton spp.* sans identification précise de l'espèce. La figure 1 représente la répartition des cas de dermatophytose en 2012. Parmi les autres isolats envoyés au CNR, on retrouve le plus fréquemment des *Candida spp.* (291 isolats, 10,6% de tous les prélèvements repartis en 12 *candida spp.*, voir figure 2); les *Penicillium sp.* (207 isolats, 7,5%), les *Aspergillus sp.* (196 isolats, 7,1%), les *Rhodotorula sp.* (89 isolats, 3,25%), les *Fusarium sp.* (100 isolats, 3,65%), les *Scopulariopsis sp.* (75 isolats, 2,74%), les *Alternaria sp.* (58 isolats, 2,1%), les *Trichosporon sp.* (49 isolats, 1,79%), les *Cladosporium sp.* (31 isolats, 1,13%). Dans une moindre mesure, (< de 1% des prélèvements), des *Scedosporium sp.*, des *Exophiala sp.*, des *Saccharomyces cerevisiae* ou encore des *Chaetomium sp.* ont été également mis en évidence.



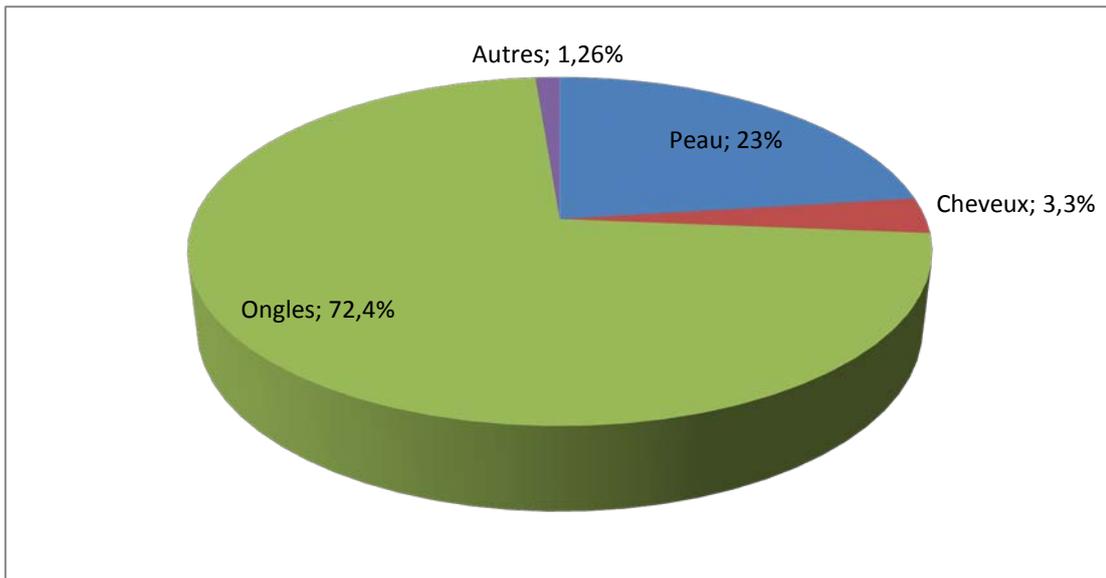
**Figure 1 :** Répartition des cas de dermatophytose issus de phanères en 2012.



**Figure 2 :** Représentation graphique de la répartition des espèces de levures retrouvées dans les prélèvements reçus par le CNR en 2012.

## 6.2 Origine du prélèvement

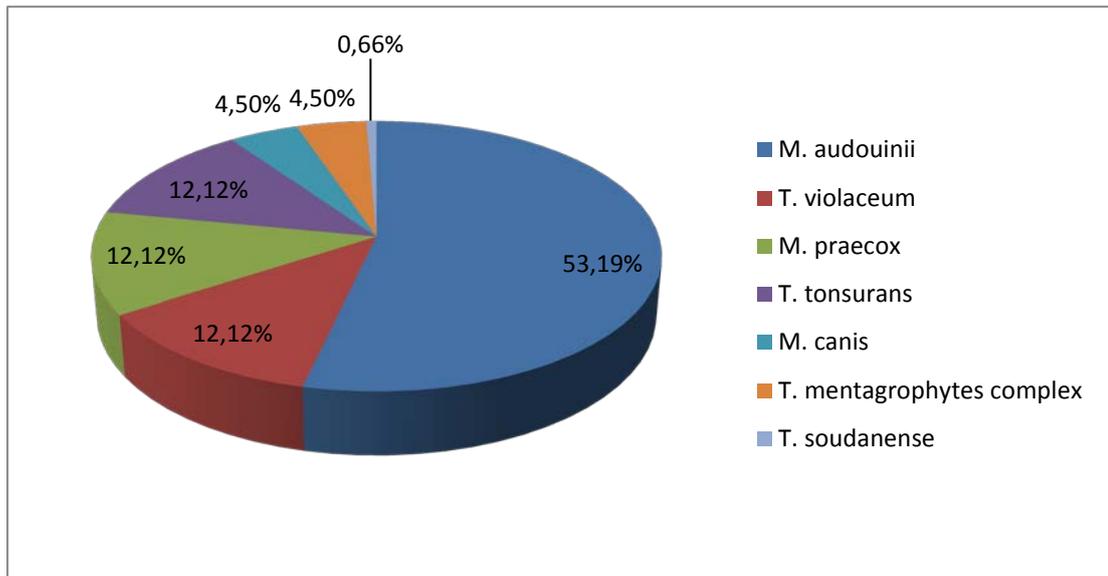
Parmi les isolats envoyés au CNR, 72,4% provenaient d'ongles, 23% provenaient de squames ou biopsies de peau, 3,3% provenaient de cheveux et 1,26% provenaient d'autres sources (Voir figure 3).



**Figure 3:** Répartition de l'origine des prélèvements des cas de dermatophytose.

### 6.2.1 Cheveux

Au total, 91 des prélèvements reçus par le CNR étaient des cheveux parmi lesquels, 70,42% ont été identifiés comme étant des dermatophytes. *M. audouinii* est le pathogène fongique le plus représenté pour ce type de prélèvement et représente 53,19% des infections par les dermatophytes. Les autres dermatophytes détectés sont le *Trichophyton violaceum* (n=8, 12,12%), *Trychophyton tonsurans* (n=8, 12,12%), *Microsporum praecox* (n=8, 12,12%), *Microsporum canis* (n=3, 4,5%), *Trychophyton mentagrophytes complex* (n=3, 4,5%) et *Trychophyton soudanense* (n=1, 0,66%), (voir figure 4). 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. A noter que l'infection par *M. audouinii* touche essentiellement les jeunes enfants (Voir point 6.3).



**Figure 4 :** Répartition des espèces de dermatophytes causant des infections du cuir chevelu.

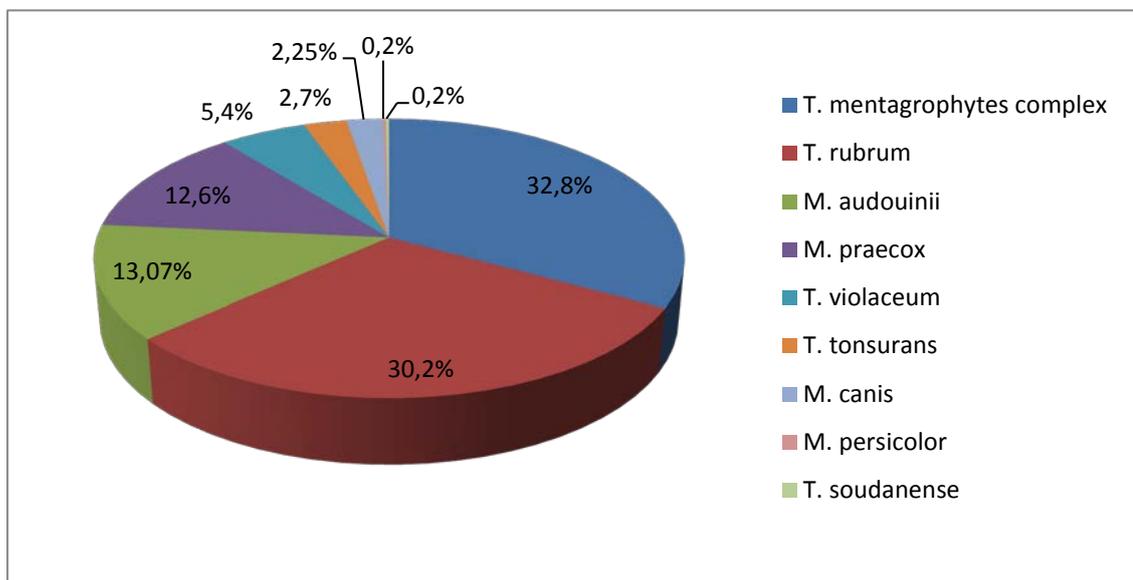
#### 6.2.2 Peau

Au total, 631 isolats ont été cultivés à partir de squames. Les isolats sont répartis comme suit: dermatophytes (35,2% de tous les isolats), levures (12,3%, 78 *Candida albicans* et non-*albicans*) et autres champignons filamenteux non dermatophytes.

Parmi les dermatophytes, 73 isolats de *T. mentagrophytes complex* ont été identifiés (32,8% des dermatophytes). Cet agent est l'agent le plus fréquemment rencontré dans ce type de prélèvements. Au total, 67 isolats de *Trichophyton rubrum* (30,2% des dermatophytes) ont également été isolés. C'est une espèce également fortement représentée dans ce groupe. Les autres dermatophytes retrouvés dans ce type de prélèvement sont les suivants : 29 *Microsporium audouinii* (13,07%), 28 *Microsporium praecox* (12,6%), 12 *Trichophyton violaceum* (5,4%), 6 *Trichophyton tonsurans* (2,7%), 5 *Microsporium canis* (2,25%), 1 *Microsporium persicolor* (0,2%), et 1 *Trichophyton soudanense* (0,2%), (voir figure 5).

Le groupe des non dermatophytes contient des genres différents tels que des *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis*, *Penicillium*, *Rhodotorula*,... 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. La présence de contaminants de l'environnement au moment de la prise d'échantillon conduit à la culture de champignons non pertinents pouvant être responsables de l'inhibition du vrai 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.

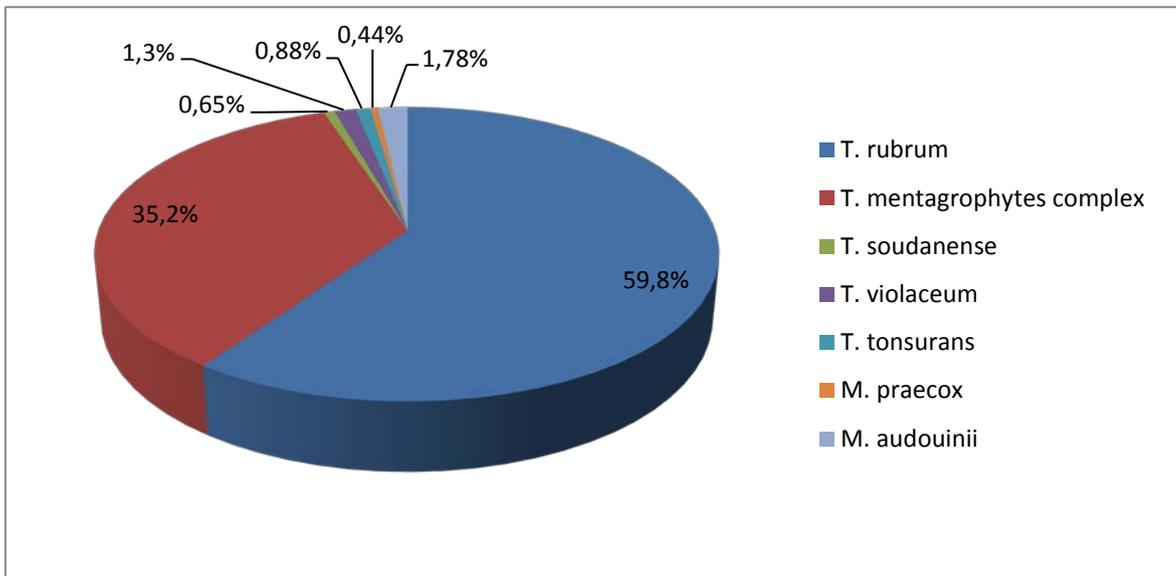


**Figure 5 :** Répartition des espèces de dermatophytes causant des infections de la peau.

### 6.2.3 Ongles

La majorité des souches positives provenaient d'ongles (1977 isolats). Ceci a conduit à l'identification de 455 dermatophytes (23%), 184 levures (9,3%) réparties en 11 espèces différentes de *Candida* et des champignons non-dermatophytes et autres levures (notamment *Trichosporon*), la plupart considérés comme contaminants ou l'on retrouve des genres tels que les *Alternaria*, *Scopularopsis*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhodotorula*. Il est important de mettre l'accent sur le fait que la présence de champignons non dermatophytes qui sont potentiellement pathogènes, tels que

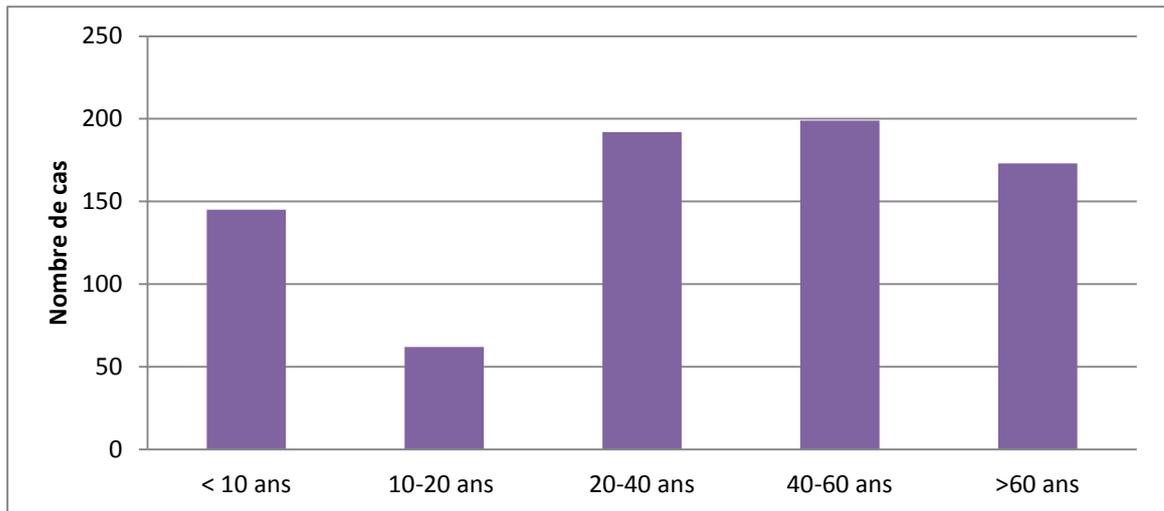
*Fusarium spp* ou *Scopulariopsis sp*, doit être confirmée sur base de la positivité de l'examen direct et également d'un second échantillon positif pour le même agent, avant de le juger responsable de la symptomatologie. En effet, la présence d'un dermatophyte peut être cachée par la croissance de tels contaminants. Le groupe des dermatophytes comprend 272 *T. rubrum* et 160 *T. mentagrophytes complex* (59,8% et 35,2% respectivement). D'autres espèces de dermatophytes ont été identifiées à partir de prélèvements d'ongles à savoir : 3 *T. soudanense* (0,65%), 6 *T. violaceum* (1,3%), 4 *T. tonsurans* (0,88%), 2 *M. praecox* (0,44%), 8 *M. audouinii* (1,78%), (voir figure 6). Face à ces observations, il apparait que *T. rubrum* reste le premier agent responsable d'onychomycose.



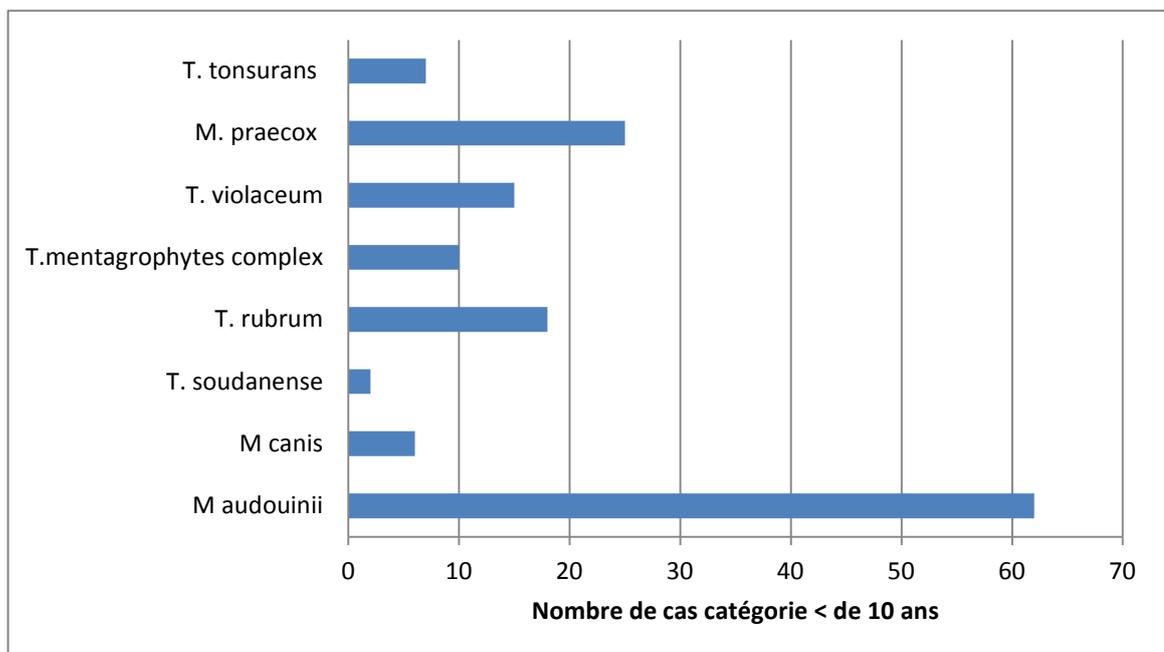
**Figure 6:** Répartition des espèces de dermatophytes responsables d'onychomycoses.

### 6.3 Age des patients affectés

Le groupe d'âge le plus affecté par les infections à dermatophytes est le groupe des 40-60 ans (Voir figure 7). Cependant la tranche d'âge des moins de 10 ans présente également un taux d'infection important. Dans cette tranche d'âge, *M. audouinii* est l'agent responsable de 42,9% des infections (Voir répartition figure 8).



**Figure 7 :** Représentation graphique des groupes d'âges de patients concernés par les dermatophytoses.



**Figure 8 :** Distribution des infections à dermatophytes dans la catégorie d'âge des < de 10 ans.

## 7. Conclusions et perspectives

Les activités du CNR mycose ont permis de mettre en évidence que le *T. rubrum*, reste dans nos régions le premier agent responsable de mycoses superficielles, tous prélèvements confondus. Cet agent est cependant le plus souvent associé aux onychomycoses. Le *T. mentagrophytes complex* est quant

à lui l'agent principal responsable de mycoses superficielles de la peau. Concernant les infections du cuir chevelu, *M. audouinii* apparaît comme étant le premier responsable de ce type d'infection. Durant ces dernières années, on note un accroissement du nombre d'infections à *M. audouinii* enregistrées par le CNR mycose. Les infections du cuir chevelu par *T. violaceum* sont également élevées. C'est pourquoi le CNR mycose a entrepris une étude nationale pour le recueil des souches circulantes en 2013 et leur analyse génotypique de façon à comprendre l'origine de cette croissance en Belgique. Cette étude permettra également de déterminer s'il existe des différences génotypiques entre des souches d'une même espèce et si un lien peut être établi avec une éventuelle localisation géographique ou une origine ethnique particulière. Toutes les souches de *M. audouinii* et *T. violaceum* reçues par le CNR seront analysées génotypiquement grâce au Diversilab®. Les données épidémiologiques nécessaires à l'interprétation des résultats seront également recueillies pour chaque cas d'infection par *M. audouinii* et *T. violaceum*. Une étude pilote a été effectuée sur une partie des souches de 2012 et 2013 et les résultats seront présentés au « 6th trend in Medical Mycology » (TIMM) en octobre 2013 (3). Les résultats définitifs seront présentés dans le rapport 2013 du CNR mycose.

## 8. Annexes

- Formulaire relatifs à l'étude 2013 ciblant les infections à *M. audouinii* et *T. violaceum* (Version FR et NL)

## 9. Références

1. Pagano L., Lumb J. Future microbial. 2011;6(9): 985-989. Update on fungal infections.
2. Kelly BP. Superficial fungal infections. Pediatr Rev. 2012 Apr 33(4):e22-37.
3. Sacheli R<sup>1</sup>., Dimo<sup>1</sup> L., Graide<sup>1</sup> H., Meex<sup>1</sup> C., Descy<sup>1</sup> J., Huynen<sup>1</sup> P., Melin<sup>1</sup> P., André<sup>2</sup> J., Arrese<sup>2</sup> J., Hayette<sup>1</sup> M.P. Poster communication TIMM 2013 "DNA fingerprinting using DiversiLab system for genotypic characterization of *Microsporum audouinii* and *Trichophyton violaceum* isolates in the Belgian population: preliminary study"