

Centre de référence mycoses

Centre hospitalier universitaire de Liège

Rapport d'activité 2014

Marie-Pierre Hayette

Rosalie Sacheli

Novembre 2015

Sommaire

1. Introduction
2. Missions spécifiques du CNR mycoses
3. Résumé des activités de 2013
 - Activités du CNR/Liège
 - Démarche qualité
 - Accréditation Belac ISO15189
 - Contrôles de qualité externe supranationaux
 - Collection
4. Bilan de 2014 pour les champignons isolés par le CNR
 - Bilan Global
 - Bilan selon l'origine du prélèvement de phanères
 - Cheveux
 - Peau
 - Ongles
 - Bilan selon l'âge des patients
5. Comparaison années 2012-2014
6. Enquêtes épidémiologiques
7. Travaux de recherche et collaborations
8. Conclusions
9. 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 culturels, 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 38-41%(2). De plus, la présence d'un nombre anormalement élevé de teignes dues à des dermatophytes anthropophiles se confirme en Belgique à l'instar de ce qui se passe dans d'autres pays européens (3-5). 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 (6).

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. Un appui à l'aide de techniques moléculaire est aussi offert comme par exemple la détection de *Pneumocystis jirovecii* ou d'*Aspergillus sp.* Enfin, 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'antifongigramme dans le cas d'infection profonde ou d'infection récidivante »
- Constitution et entretien de la collection de souches de dermatophytes (CNR Mycoses Liège)
- 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 2013

- **Activités du CNR/Liège**

Au cours de l'année 2014, 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 est l'outil n°1 qui est utilisé. Les résultats sont confirmés par séquençage moléculaire si nécessaire.

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). Deux cibles complémentaires sont disponibles à savoir la région D1-D2 de la partie LSU (28S) de l'ARNr et la bêta-tubuline. Ces autres cibles sont utilisées en cas de confirmation de l'identification d'une espèce rare ou en cas de réponse non satisfaisante après une première amplification. D'autres cibles sont actuellement à l'étude.

Le CNR Mycose a acquis en 2014 l'appareil Diversilab® (BioMérieux). Cet appareil permet une caractérisation précise du génome des champignons filamenteux (y compris les dermatophytes) et des levures. Il a été déjà utilisé afin de caractériser les souches de dermatophytes anthropophile circulant en Belgique en 2013. Il pourrait être utilisé en cas d'épidémie notamment afin de caractériser rapidement le génome de la souche circulante(5).

- **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 janvier 2015 qui a confirmé le respect de la norme ISO15189.

- 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 antifongiques et l'identification de cultures de levures/champignons filamenteux issus d'échantillons cliniques. Ces contrôles sont organisés 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 adressée 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 » (souchothèque) du CNR.

4. Bilan de 2014 pour les champignons isolés par le CNR

○ **Bilan global**

En 2014, un total de 3264 isolats fongiques ont été envoyés aux deux CNR « Mycoses » (regroupement des cas isolés de phanères à la KULeuven et au CHU de Liège) dont 3220 provenaient de phanères et 44 d'autres sites (sang, frottis d'oreille, de plaie, de vagin, expectoration, lavage broncho-alvéolaire, œil). Parmi les échantillons, 1283 (39,37%) ont été identifiés comme étant des dermatophytes, dont 239 provenant de la KUL et 1044 provenant du CHU de Liège. Parmi eux, 1166 (90,9%) isolats ont été identifiés comme faisant partie du genre *Trichophyton*, 116 comme faisant partie du genre *Microsporum* (9,04%) et 1 (0,07%) comme faisant partie du genre *Epidermophyton*. Un total de 508 isolats de levures ont également été répertoriés (tous prélèvements confondus), soit 15,6% de tous les prélèvements, dont 314 *Candida sp.* Le reste des isolats (1473 souches 45,24% de tous les prélèvements) correspond à d'autres types de champignons filamenteux (Voir **Figure 1**).

Plus précisément, parmi les dermatophytes l'espèce la plus fréquemment isolée (tous types de prélèvement confondus) est *Trichophyton rubrum* (843 isolats, 65,78% des dermatophytes), suivi du complexe *T. mentagrophytes* (242 isolats, 18,86%), *M. canis* (64 isolats, 4,9%), *M. audouinii* (43 isolats, 3,35%), *T. tonsurans* (38 isolats, 2,96%), *T. soudanense* (20 isolats, 1,55%), *T. violaceum* (19 isolats,

1,48%), *M. persicolor* (3 isolats, 0,21%), *M. gypseum* (3 isolats, 0,21%), *T. verrucosum* (2 isolats, 0,14%), *M. ferrugineum* (2 isolats, 0,14%), *M. praecox* (1 isolat, 0,07%), *E. floccosum* (1 isolat, 0,07%) et *T. phaseolioformis* (1 isolat, 0,07%). Un isolat a été identifié comme *Trichophyton spp.* sans identification précise de l'espèce. La **figure 2** représente la répartition des espèces de dermatophytes en 2014 tous prélèvements confondus.

Parmi les autres isolats envoyés au CNR, on retrouve des levures réparties en 17 espèces de *Candida sp.* (314 isolats, 61,72% des levures isolées), *Rhodotorula sp.* (105 isolats, 20,7% des levures isolées), *Trichosporon sp.* (77 isolats, 15,17%), *Geotrichum sp.* (7 isolats, 1,37 % des levures isolées) et *Saccharomyces sp* (5 isolats, 0,98% des levures isolées). La **figure 3** décrit en détail la répartition des levures analysées par le CNR mycoses.

Parmi les autres prélèvements reçus par le CNR, on retrouve, entre autres, des *Penicillium sp.* (248 isolats, 7,78% de tous les prélèvements), *Aspergillus sp.*(177 isolats, 5,55%), *Fusarium sp.* (90 isolats, 2,82%), *Scopulariopsis sp.* (84 isolats, 2,63%), *Alternaria sp.* (78 isolats, 2,44%), *Acremonium sp.* (39 isolats, 1,22%), *Cladosporium sp.* (31 isolats, 0,99%).

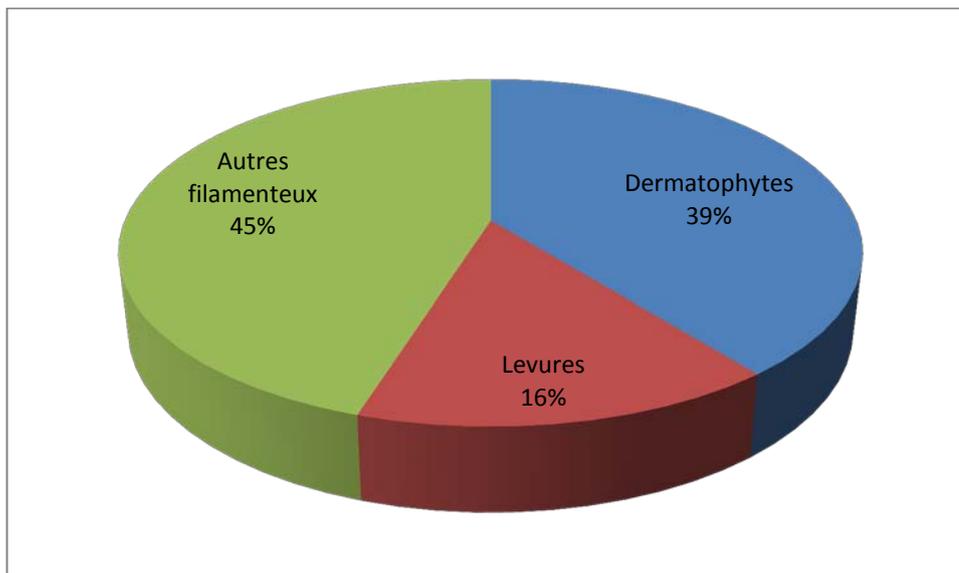


Figure 1 : Répartition des prélèvements reçus en 2014 par le CNR mycoses.

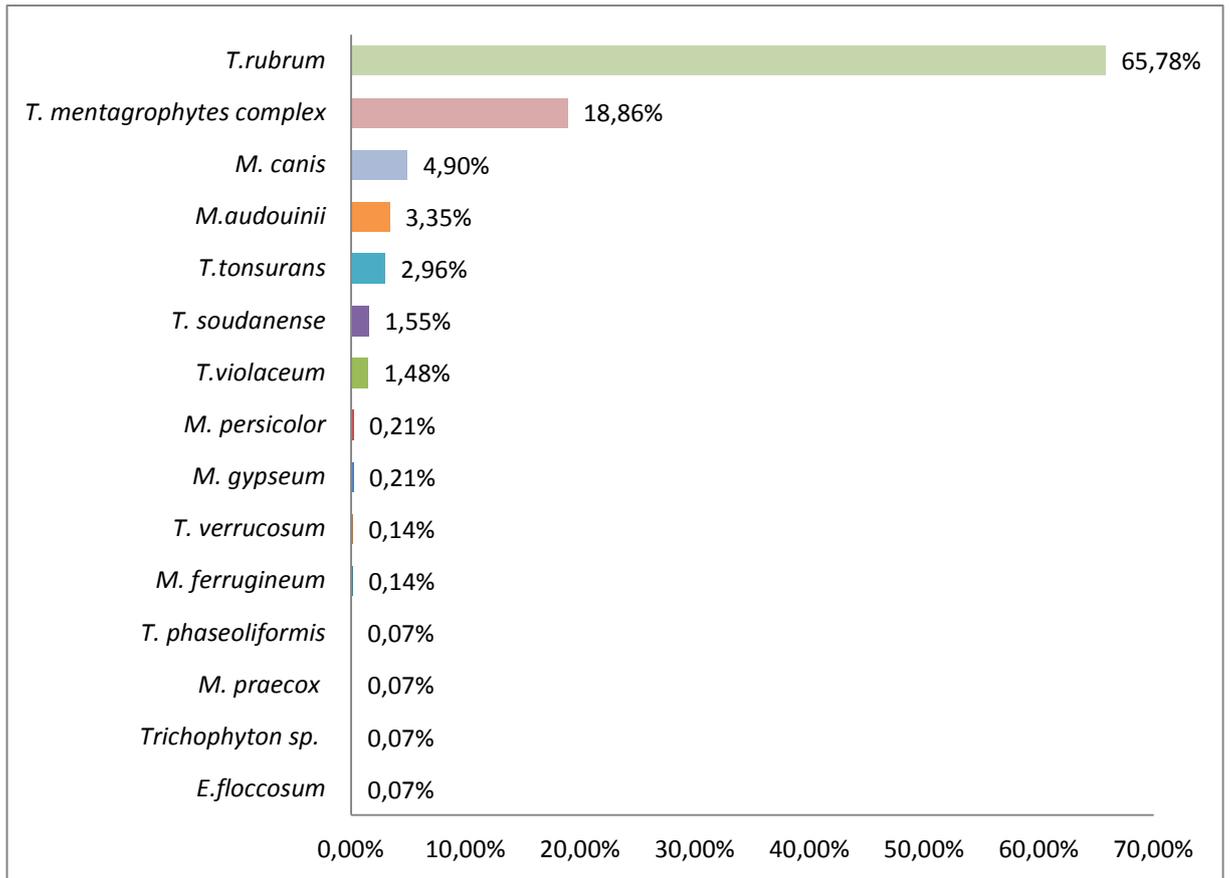


Figure 2 : Répartition des 1283 dermatophytes isolés en 2014 par les 2 CNR

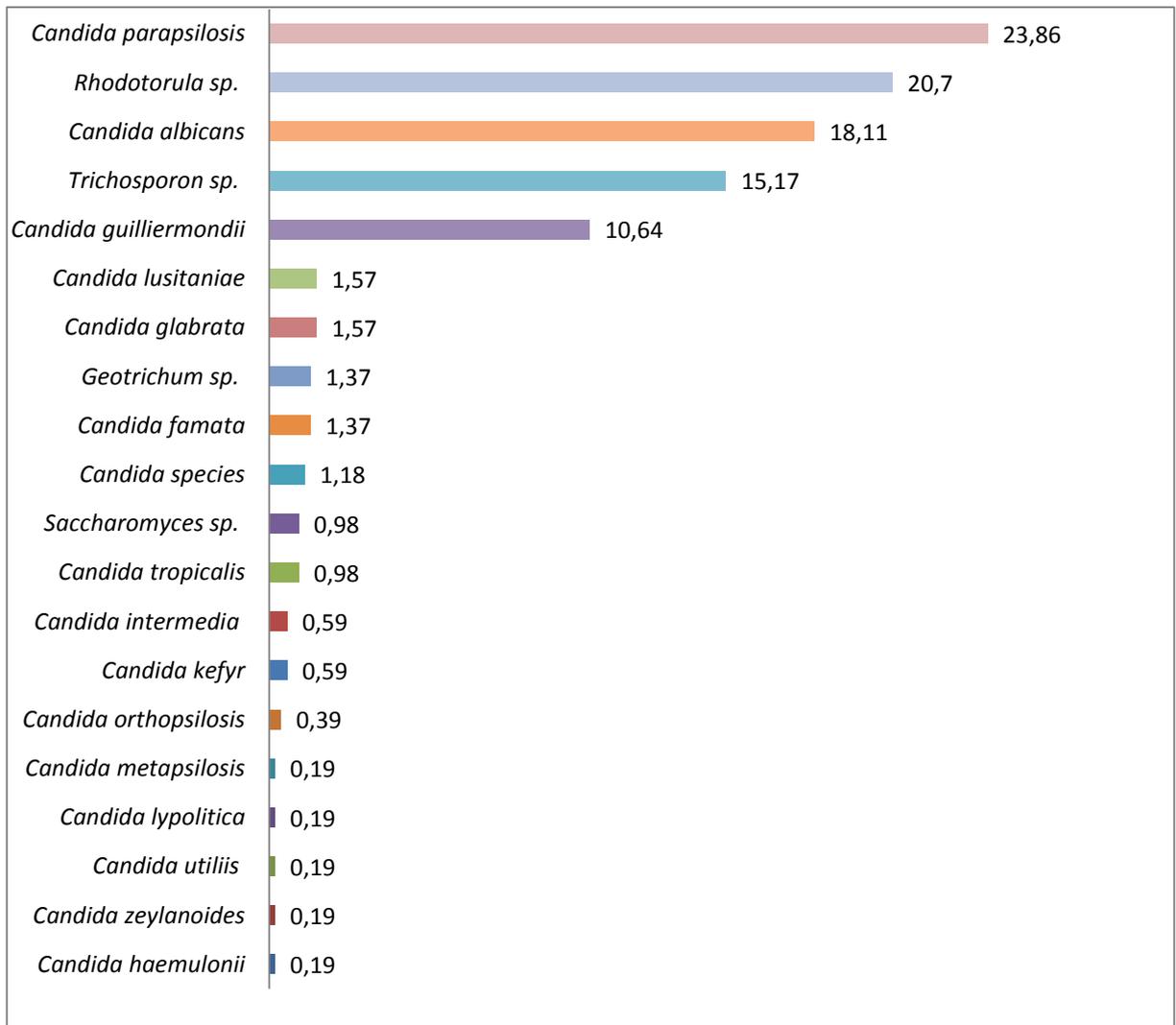


Figure 3 : Représentation graphique de la répartition des espèces de levures analysées par le CNR en 2014 (en %).

○ **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), 2266 (69,4%), provenaient d'ongles, 829 (25,4%) provenaient de squames ou biopsies de peau, 119 (3,64%) provenaient de cheveux (ou de cuir chevelu) et 44 (1,34%) provenaient d'autres sources (Voir **figure 4**).

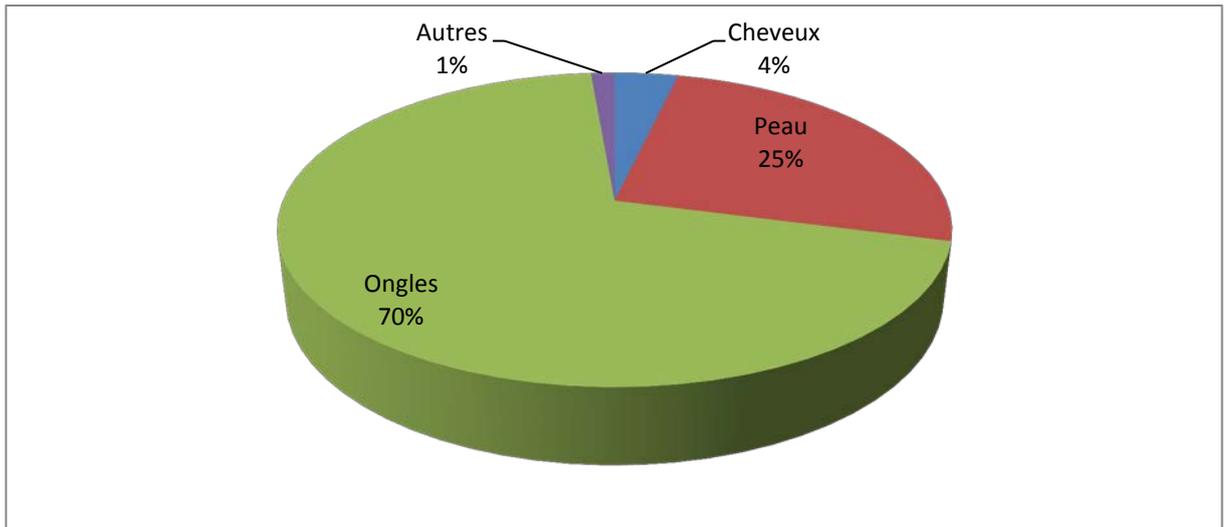


Figure 4: Répartition de l'origine des prélèvements envoyés au CNR Mycoses en 2014.

- Cheveux

Au total, 119 isolats reçus par le CNR provenaient de cheveux parmi lesquels, 80 ont été identifiés comme étant des dermatophytes se répartissant en 12 espèces. *M. audouinii* est le pathogène fongique le plus fréquent pour ce type de prélèvement et représente 30% des infections par les dermatophytes (n=24). Les autres dermatophytes identifiés sont *Trichophyton tonsurans* (n=14, 17,5%), *Microsporum canis* (n=13, 16,2%), *Trichophyton violaceum* (n=9, 11,26%), *Trichophyton soudanense* (n=8, 10%), *M. persicolor* (n=3, 3,7%) *Trichophyton mentagrophytes complex* (n=2, 2,46%), *Microsporum gypseum*(n=2, 2,46%), *M. ferrugineum* (n=2, 2,46%), *M. praececox* (n=1, 1,23%), *T. verrucosum* (n=1, 1,23%) (Voir **figure 5**). Les autres espèces cultivées étaient des champignons filamenteux non-dermatophytes, présents dans les échantillons comme contaminants ou pathogènes potentiels. Notre analyse révèle la prédominance de l'espèce *M. audouinii* comme agent causal de la teigne.

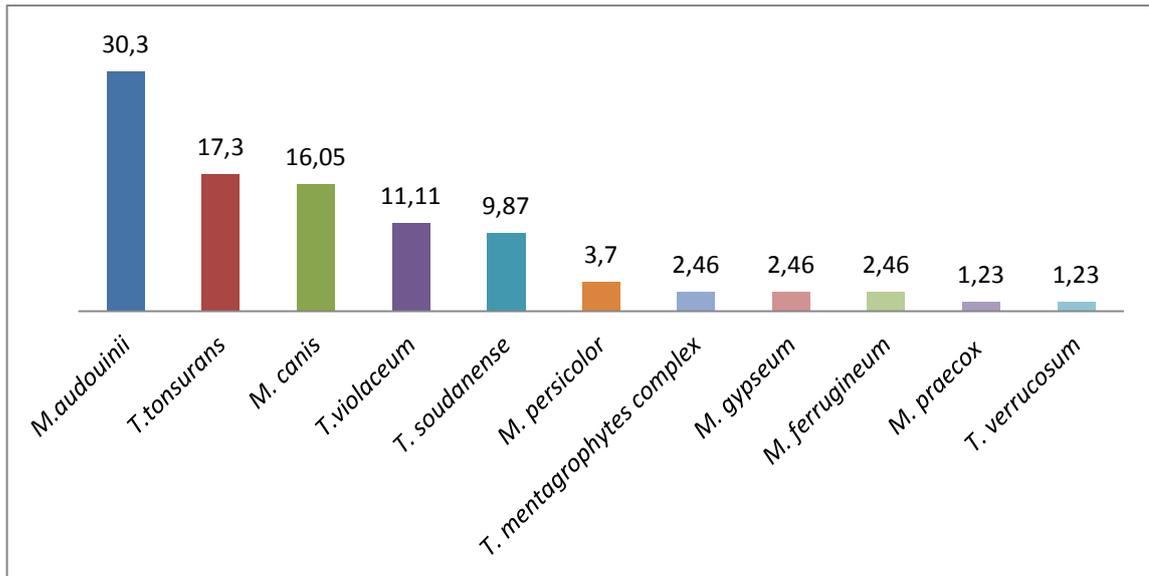


Figure 5 : Répartition des espèces de dermatophytes (en %) causant des infections du cuir chevelu en 2014

- Peau

Au total, 829 isolats cultivés à partir de squames ont été reçus. Les isolats sont répartis comme suit: dermatophytes (387 isolats, 46,72% de tous les isolats), levures (108 isolats, 13,03% de tous les isolats). Le reste des souches est réparti en différentes espèces de champignons filamenteux non-dermatophytes.

Parmi les dermatophytes, 179 isolats de *T. rubrum* ont été identifiés soit 47,6% des dermatophytes. C'est l'agent le plus fréquemment isolé dans ce type de prélèvements. Au total, 84 isolats du complexe *T. mentagrophytes* ont été isolés de prélèvements de peau (22,32%). A noter que les espèces *T. interdigitale* et *T. mentagrophytes* ont été rassemblées par facilité dans le complexe *T. mentagrophytes*. *Microsporum canis* a été retrouvé à raison de 59 souches durant l'année 2014 (15,26%). Les autres dermatophytes isolés moins fréquemment sont les suivants : 20 *T. tonsurans* (5,3%), 19 *M. audouinii* (5,05%), 14 *T. violaceum* (3,71 %), 10 *T. soudanense* (2,65%), 1 *M. gypseum* (0,26%), 1 *E. floccosum* (0,26%), (voir **figure 6** pour la distribution).

Le groupe des champignons non-dermatophytes contient les genres suivants : *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis*, *Penicillium*. Parmi ceux-ci, certains peuvent être à l'origine d'infection superficielle

et d'autres à l'origine d'infection invasive 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) et aussi en fonction de l'examen microscopique pour déterminer la présence d'un contaminant ou d'un pathogène. 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 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 le prélèvement des phanères doit être précédée par la désinfection du site avec de l'alcool à 70% (particulièrement d'application pour les ongles souvent contaminés) de façon réduire au maximum le risque de contamination.

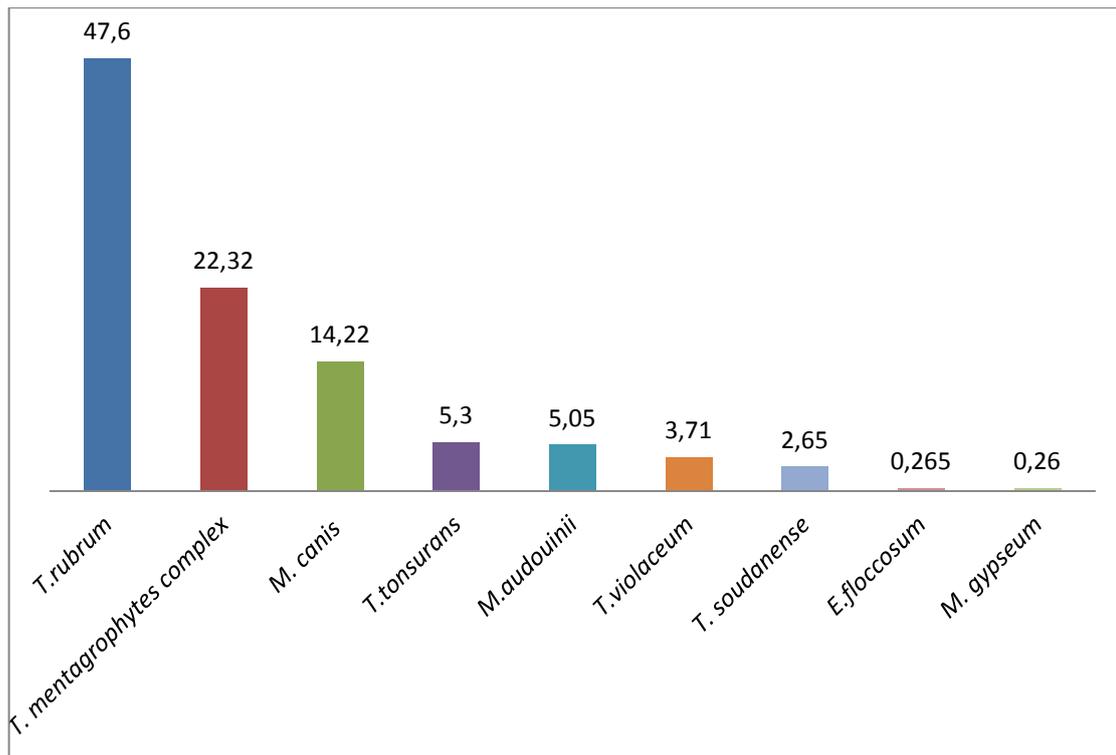


Figure 6 : Répartition des espèces de dermatophytes (en %) causant des infections de la peau en 2014.

- Ongles

La majorité des souches reçues par le CNR provenaient d'ongles (2266 isolats). Ceci a conduit à l'identification de 828 dermatophytes (36,63%), 267 levures (dont 188 *Candida sp.* répartis en 12 espèces, 79 appartenant à d'autres genres) et des champignons non-dermatophytes, considérés souvent comme contaminants ou pathogènes où l'on retrouve des genres tels que les *Alternaria*, *Scopulariopsis*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *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 sp.* 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 gênée par la croissance de tels contaminants. Dans ce cas la PCR pourrait être une alternative utile pour compléter le diagnostic.

Le groupe des dermatophytes comprend 663 *T. rubrum* et 84 *T. mentagrophytes complex* (80,64% et 10,2 % respectivement). D'autres espèces de dermatophytes ont été identifiées minoritairement à partir de prélèvements d'ongles à savoir : 45 *M. canis* (5,43%), 6 *T. tonsurans* (0,72%), 4 *T. soudanense* (0,48%), 4 *T. violaceum*, (0,48%), 3 *M. persicolor* (0,36%), 2 *M. praecox* (0,24%), 1 *M. gypseum* (0,12%) 1 *T. phaseoliformis* (0,12%) (Voir **figure 7**).

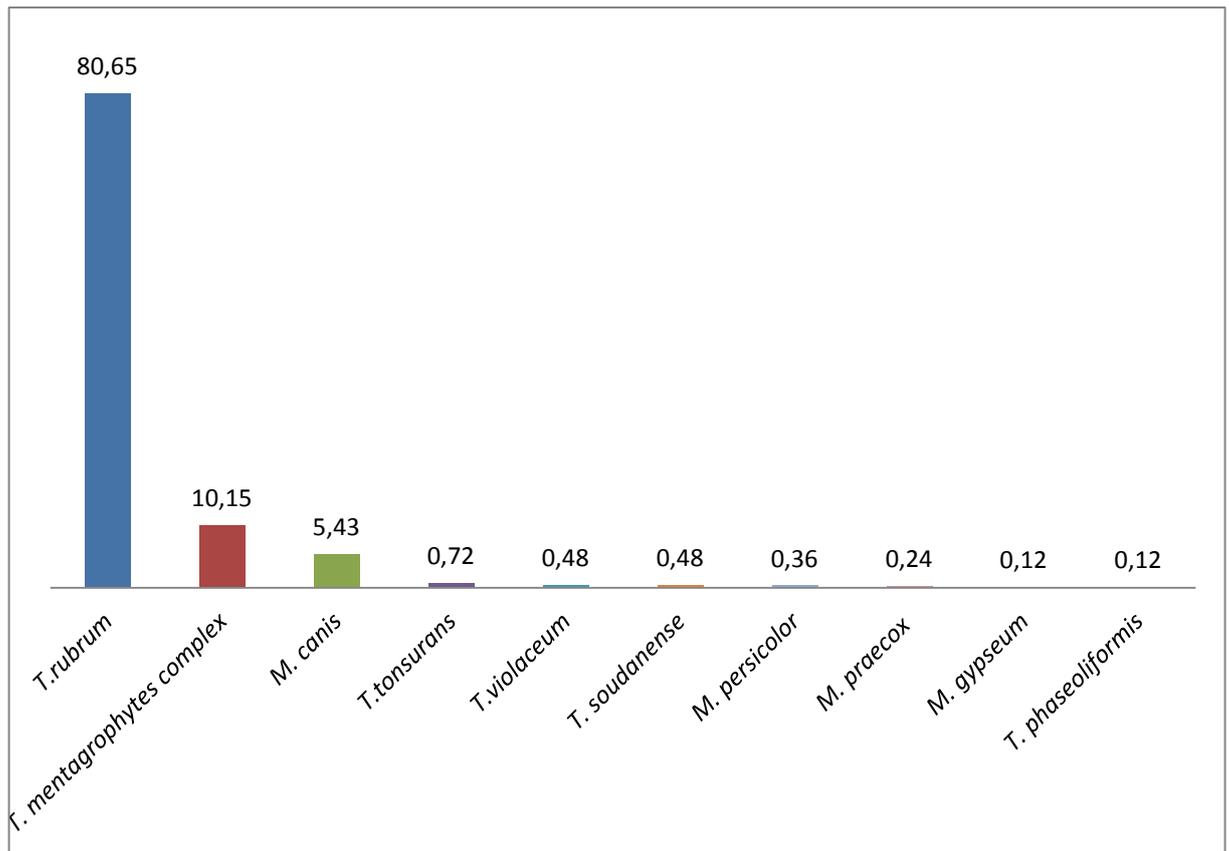


Figure 7: Répartition des espèces de dermatophytes responsables d'onychomycoses en 2014.

○ **Bilan selon l'âge des patients**

Le groupe d'âge le plus affecté par les infections à dermatophytes est le groupe des 51-70 ans et 31-50 ans (Voir **figure 8**). Dans la tranche d'âge < de 10 ans, *M. audouinii* est l'agent responsable de 37% des infections qui sont principalement des teignes du cuir chevelu (Voir répartition des espèces de dermatophytes touchant les < de 10 ans **figure 9**).

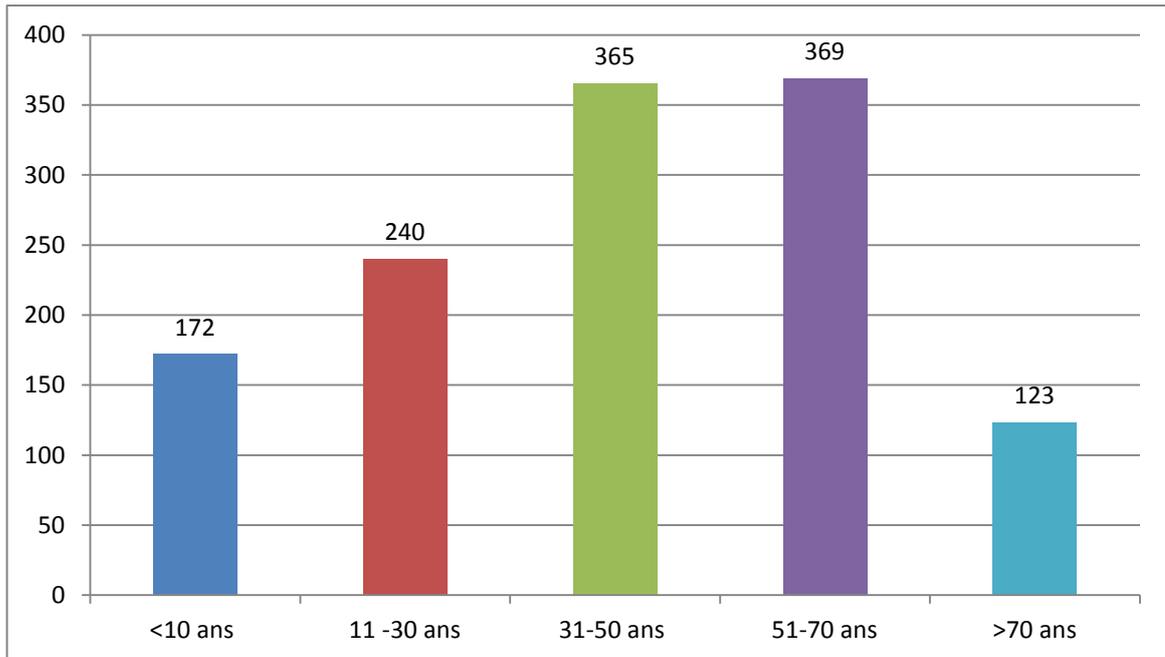


Figure 8 : Représentation graphique des groupes d'âges de patients concernés par les dermatophytoses en 2014.

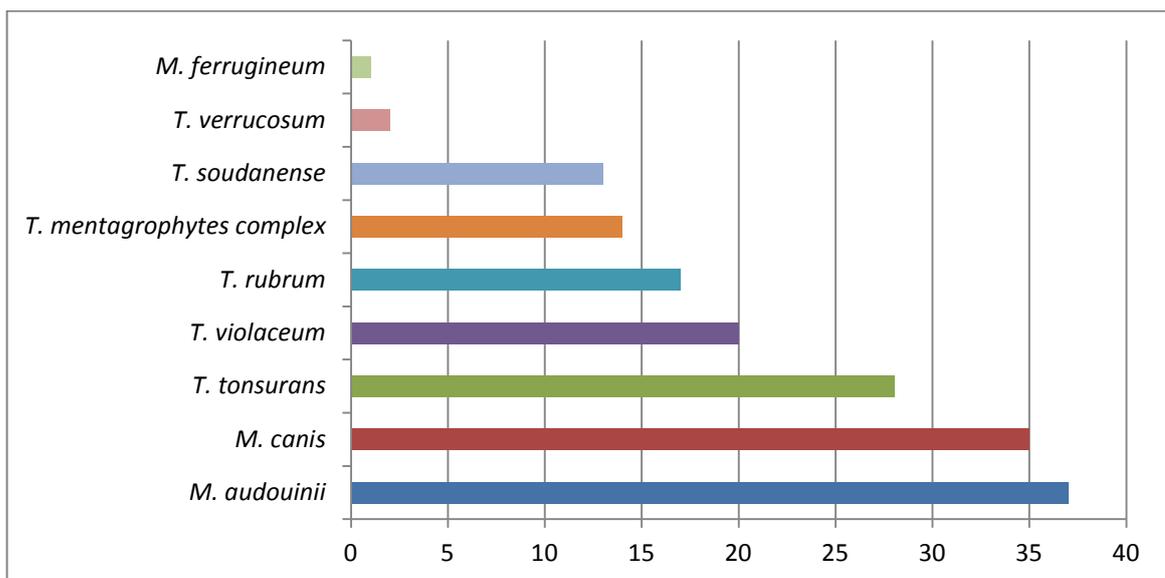


Figure 9 : Distribution des infections à dermatophytes (nombre de cas recensés) dans la catégorie d'âge des < de 10 ans en 2014 (tous prélèvements confondus).

Pour l'espèce *M. audouinii*, c'est la tranche d'âge des 4-7 ans qui est la plus touchée chez les enfants de moins de 10ans. Cette tranche d'âge représente 52% des prélèvements chez les moins de 10 ans (Voir **figure 10**).

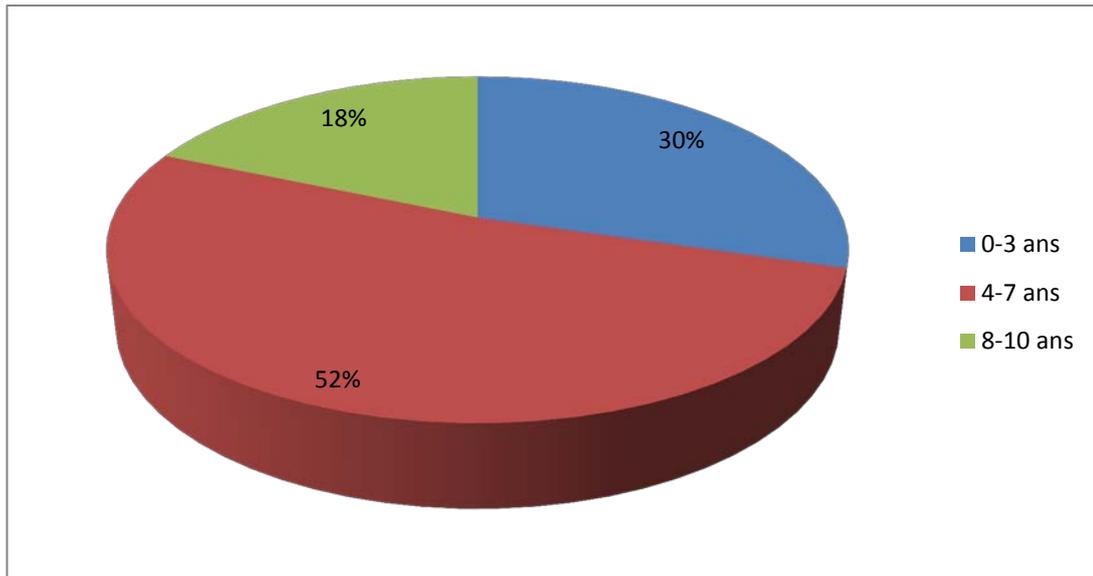


Figure 10 : Représentation des tranches d'âges concernées par les infections à *M. audouinii* chez les – de 10 ans (prélèvements de peau et cuir chevelu).

5. Comparaison années 2012-2014

En 2012, un total de 2733 prélèvements ont été traités par les CNR. En 2013, ce nombre était de 3185 (+16.5%), il est de 3264 en 2014 (+2.4% par rapport à 2013). Le nombre d'échantillons traités par le CNR est donc en augmentation constante. Parmi ces échantillons, 775 ont été identifiés comme étant des dermatophytes en 2012, 1529 en 2013 et 1283 en 2014. Comme le montre la **figure 11**, l'année 2013 a vu une recrudescence des dermatophytes isolés puisqu'ils représentent 48% des prélèvements en 2013 versus 28,4% en 2012 et 39,37% en 2014. Ceci est en partie dû aux souches envoyées par les différents laboratoires périphériques pour l'étude nationale sur les dermatophytes anthropophiles. Le taux de levures isolées est resté stable en 2014 puisque 15,6% des prélèvements étaient des levures. Ce nombre était de 15,06% en 2013 et 10,6% en 2012.

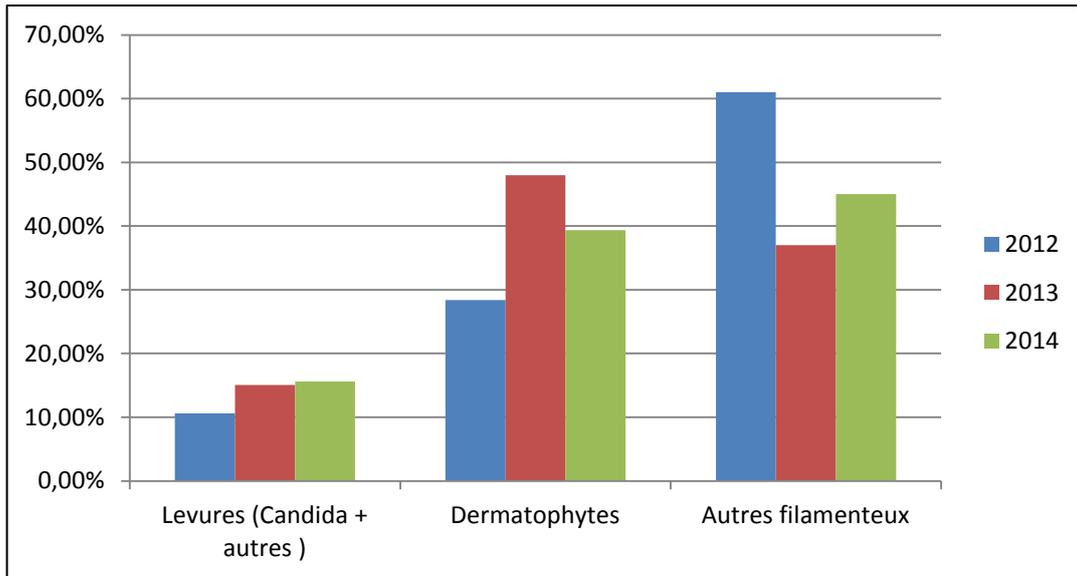


Figure 11: Répartition des espèces identifiées reçus en 2012, 2013 et 2014 aux CNR.

En ce qui concerne les dermatophytes *T. rubrum* reste le pathogène prédominant tous prélèvements confondus. On observe une augmentation du nombre de *T. rubrum* isolés en 2014 puisque cet isolat représente 65,72% des dermatophytes isolés (53,2 % en 2013, 45,6% en 2012). Par contre une diminution progressive du complexe *T. mentagrophytes* a été observée. En 2014, ils représentent 18,86% des prélèvements (19,6% en 2013, 31,1% en 2012). 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* et *T. violaceum*, ils représentaient en 2013 11,9% des prélèvements. Ce nombre est revu à la baisse en 2014 puisqu'ils représentent seulement 3,35% des prélèvements. Par contre les infections à *M. canis* suivent un accroissement lent mais constant. (1,16% en, 2012, 3,07% en 2013 et 4,96% en 2014). L'année 2013 a vu l'émergence de nouvelles espèces isolées telles que *T. verrucosum*, *T. terrestre complex*, *T. schoenleinii* et *M. gypseum*. En 2014, ces espèces sont toujours présentes à l'exception de *T. schoenleinii* et *T. terrestre complex*. On observe par contre, l'apparition de *M. ferrugineum* rarement rapporté sur le territoire belge ces dernières années (Voir **figure 12** et **Tableau 1** pour les détails).

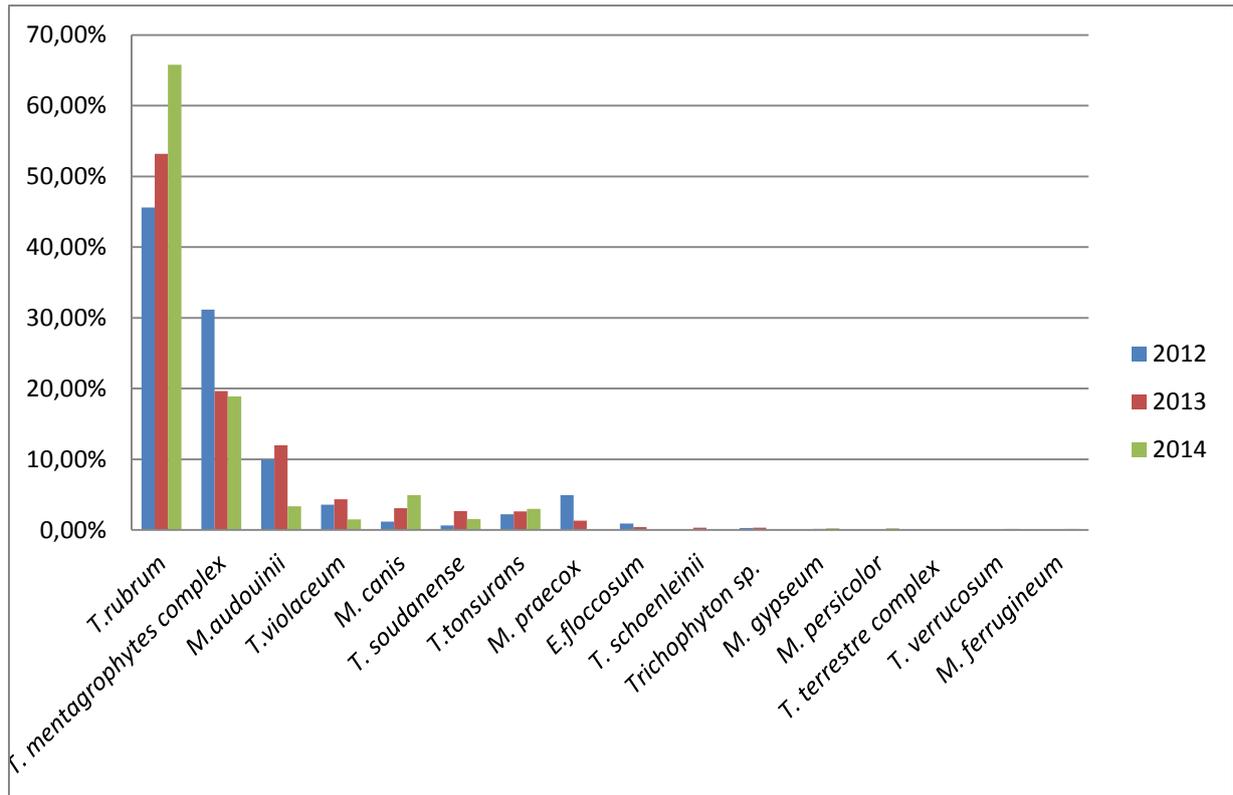


Figure 12 : Répartition des espèces de dermatophytes isolées en 2012, 2013 et 2014 par les CNR.

Espèce	2012 (%)	2013(%)	2014(%)
<i>T.rubrum</i>	351(45,60%)	812(53,20%)	843(65,78%)
<i>T. mentagrophytes complex</i>	241(31,15%)	300(19,64%)	242(18,86%)
<i>M.audouinii</i>	77(9,94%)	183(11,97%)	43(3,35%)
<i>T.violaceum</i>	27(3,56%)	66(4,32%)	19(1,48%)
<i>M. canis</i>	9(1,16%)	47(3,07%)	64(4,9%)
<i>T. soudanense</i>	5(0,64%)	41(2,68%)	20(1,55%)
<i>T.tonsurans</i>	17(2,20%)	40(2,61%)	38(2,96%)
<i>M. praecox</i>	38(4,90%)	20(1,31%)	1(0,07%)
<i>E.floccosum</i>	7(0,90%)	6(0,39%)	1(0,07%)
<i>T. schoenleinii</i>	0	5(0,33%)	0
<i>Trichophyton sp.</i>	2(0,25%)	4(0,26%)	1(0,07%)
<i>M. gypseum</i>	0	2(0,13%)	3(0,21%)
<i>M. persicolor</i>	1(0,07%)	1(0,06%)	3(0,21%)
<i>T. terrestre complex</i>	0	1(0,06%)	0
<i>T. verrucosum</i>	0	1(0,06%)	2(0,14%)
<i>M. ferrugineum</i>	0	0	2(0,14%)
TOTAL	775	1529	1283

Tableau 1 : Comparaison des pourcentages des différentes espèces de dermatophytes observées en 2012, 2013 et 2014 par les CNR.

Pour les isolats issus de cheveux, on peut observer que les espèces *M. canis* et *T. tonsurans* semblent augmenter légèrement alors que la tendance est à la baisse pour *M. audouinii* qui reste tout de même l'agent étiologique prédominant pour ce type d'infections (voir **figure 13**).

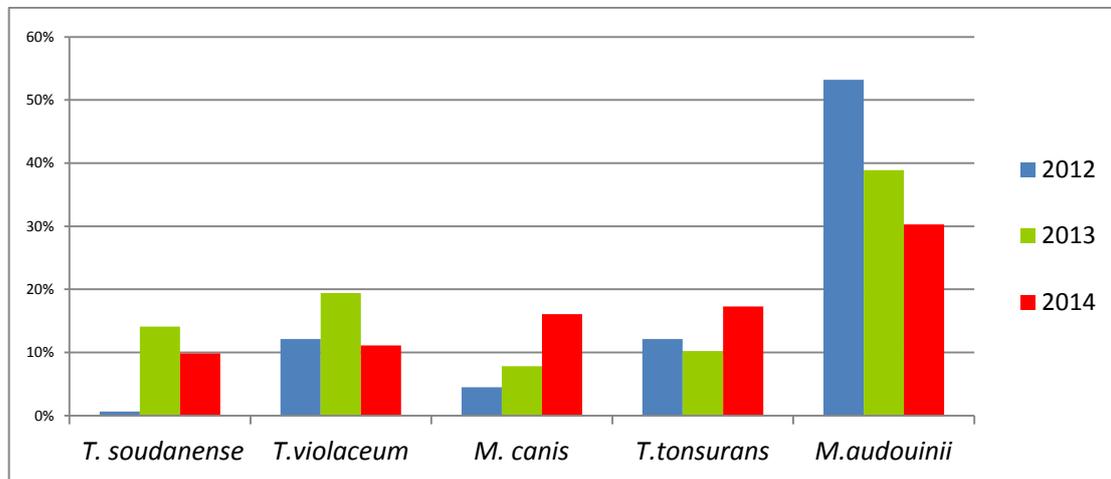


Figure 13 : Répartition des espèces de dermatophytes les plus fréquemment isolées dans les prélèvements de cheveux, pour les années 2012, 2013 et 2014.

En ce qui concerne les prélèvements d'ongles, on observe au cours des années une augmentation constante de *T. rubrum* alors que les infections à *T. mentagrophytes* sont en baisse depuis 2012 (Voir **figure 14**).

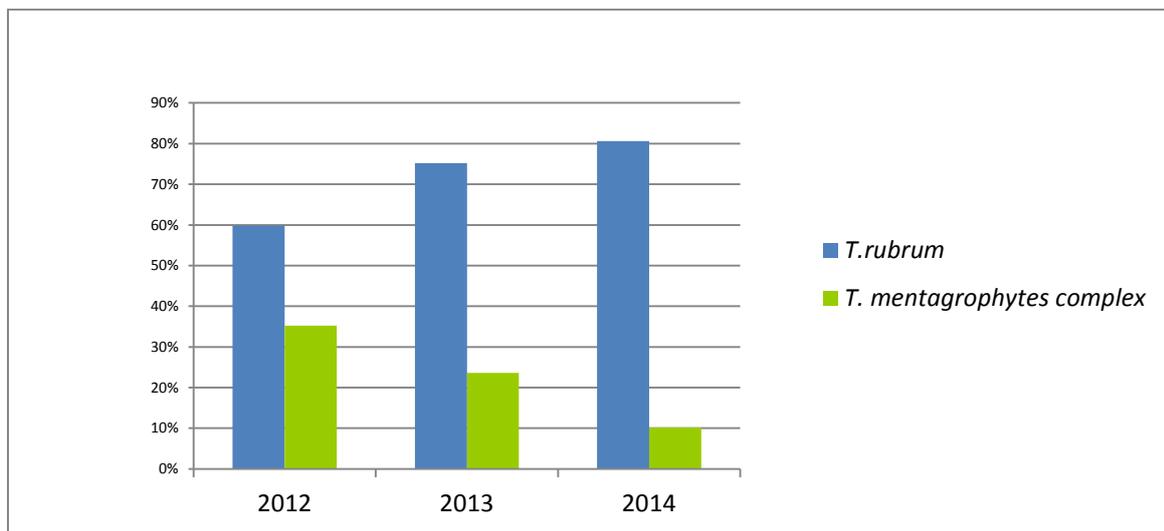


Figure 14 : Répartition des espèces de dermatophytes les plus fréquemment isolées dans les prélèvements d'ongles, pour les années 2012, 2013 et 2014.

Pour les prélèvements de peau, on observe également une augmentation de *T. rubrum* et une diminution de *T. mentagrophytes complex*. *M. canis* et *T. tonsurans* sont en hausse alors que *M. audouinii* est en baisse (Voir **Figure 15**).

La baisse de *M. audouinii* tant dans les prélèvements de cheveux que dans les prélèvements de peau s'explique en partie par l'étude épidémiologique lancée en 2012/2013 qui a généré l'envoi massif par les laboratoires extérieurs de souches de *M. audouinii* et *T. violaceum*.

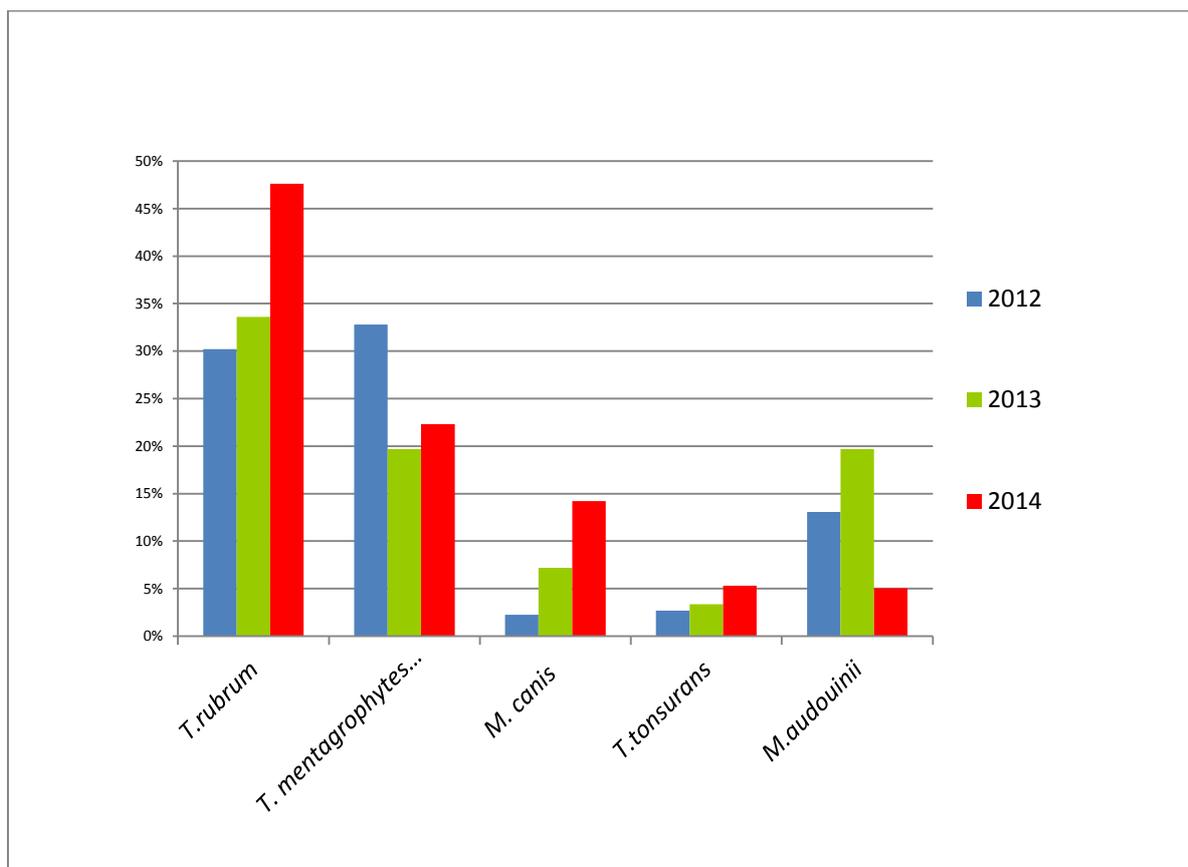


Figure 15 : Répartition des espèces de dermatophytes les plus fréquemment isolées dans les prélèvements de peau, pour les années 2012, 2013 et 2014

6. Enquêtes épidémiologiques

Durant l'année 2012, le CNR Mycoses ayant noté un nombre particulièrement élevé d'infections à *M. audouinii*, une étude nationale avait été lancée en 2013 pour le recueil des souches de *M. audouinii* et *T. violaceum* et leur analyse génotypique, de façon à

comprendre l'origine de cette croissance en Belgique. Cette étude avait pour finalité de déterminer s'il existait des différences génotypiques entre des souches d'une même espèce et si un lien pouvait être établi avec une éventuelle localisation géographique ou une origine ethnique particulière. Toutes les souches de *M. audouinii* et *T. violaceum* (n=139) reçues par le CNR dans le cadre de l'étude ont été analysées génotypiquement grâce au Diversilab® (bioMérieux). Les données épidémiologiques nécessaires à l'interprétation des résultats ont également recueillies au cours de cette étude. Cependant, il nous a été très difficile d'obtenir ces données épidémiologiques et de nombreuses informations sont manquantes. Cette étude a fait l'objet d'un mémoire de Master 2 en Santé publique soutenu en juin 2014 par le Dr. Audace NKESHIMANA (7).

Sur le plan de l'analyse génotypique, une étude pilote a été effectuée sur une partie des souches de *M. audouinii* et *T. violaceum* 2012 et 2013 et les résultats ont été présentés au « 6th Trend in Medical Mycology » (TIMM) en octobre 2013 (8). Les résultats finaux de cette étude seront présentés au 7th trend in Medical Mycology en octobre 2015 (9) et sont en cours de publication.

Le CNR Mycoses de Liège a également collaboré à l'étude nationale TANSIR, concernant les candidémies. Les résultats de cette étude ont été présentés à Copenhague à l'ECCMID 2015 et seront publiés dans les mois prochains (10).

7. Travaux de recherche et collaborations

Le CNR a participé à une étude visant le développement et la validation clinique d'un test PCR en temps réel pour la détection de plusieurs espèces de dermatophytes directement à partir d'échantillons d'ongles, de peau et de cheveux. Une étude préliminaire de ce travail a été présentée à l'ECCMID 2014 (11). Une validation clinique de ce test sur les ongles sera présentée au TIMM à Lisbonne en octobre 2015(12).

Un PhD est en cours et porte sur la caractérisation biochimique et génomique des protéases de *M. audouinii* en co-tutelle avec l'Université de Tunis (Professeur Raies).

En 2014, des souches atypique de *T. mentagrophytes* a été isolée à plusieurs reprises (8 souches) essentiellement chez les jeunes adultes (tranche d'âge 20-40 ans la + concernée). Ces souches présentent généralement un aspect macroscopique

ressemblant à *M. canis* avec un pigment jaune marqué et des caractéristiques microscopiques variables rendant leur identification difficile. Ces souches atypiques proviendraient de cobayes infectés. La recrudescence de cette espèce pouvant même être responsable de tinea capitis a également été mis en évidence en Allemagne(13). Le séquençage ITS de ces souches les identifie en tant que *A. benhamiae*. Une étude préliminaire sur le Diversilab permet de mettre en évidence que ces souches atypiques forment un groupe distinct correspondant à la souche *A. benhamiae* qui se distingue par son empreinte génétique de *T. mentagrophytes var. interdigitale*.

8. Conclusions

Les activités du CNR Mycoses 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 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, mais sa prévalence diminue depuis 2012. Concernant les infections du cuir chevelu, *M. audouinii* apparaît comme étant le premier responsable de ce type d'infection, ce qui était également le cas en 2012 et 2013. Du fait de l'étude nationale, nous avons enregistré davantage de cas d'infection en 2013 (183 *M. audouinii* en 2013 contre 77 en 2012 et 43 en 2014). L'apparition de souches atypique de *T. mentagrophytes* a été observée en 2014 et une observation plus détaillée de ces souches sera réalisée à l'avenir, notamment une caractérisation génotypique par le Diversilab.

Durant l'année 2015, de nouvelles techniques de biologie moléculaire seront développées afin de pouvoir identifier plus efficacement certaines espèces de dermatophytes.

9. 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 Gray RM, Champagne C, Waghorn D, Ong E, Grabczynska SA, Morris J: Management of a Trichophyton tonsurans outbreak in a day-care center. *Pediatr Dermatol* 2015, 32(1):91-96.
- 4 Zink A, Papanagiotou V, Todorova A, Seidl HP, Niedermeier A, Ring J, Traidl-Hoffmann C: Outbreak of Microsporum audouinii in Munich--the return of infectious fungi in Germany. *Mycoses* 2014, 57(12):765-770.
- 5 Sacheli R, Dimo L, Graide H, Meex C, Descy J, Huynen P, Melin, P. Arrese Estrada J, Hayette M-P: DNA fingerprinting using Diversilab system for genotyping characterization of Microsporum audouinii and Trichophyton violaceum. In. Edited by National Center for M, vol. 56; 2013.
- 6 Kelly BP. Superficial fungal infections. *Pediatr Rev.* 2012 Apr 33(4):e22-37.
- 7 Nkeshimana A. Epidémiologie des teignes anthropophiles. Agents fongiques incriminés, facteurs de transmission, gestion en milieu scolaire. Mémoire de Master 2 en Santé publique (option épidémiologie et économie de la santé), Ulg, 2014 .
- 8 Sacheli R, Dimo L., Graide H., Meex C., Descy J., Huynen P. , Melin P. , André J., Arrese J., Hayette 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”
- 9 Sacheli R, Dekkers C., Géron B., Graide H., Darfouf R., Adjetey C., Meex C., Descy J., Huynen P. , Melin P. , André J., Arrese J., Hayette M.P. Poster communication TIMM 2015 “Epidemiological aspects and genotypic characterization of *T.violaceum* strains collected during a Belgian National survey on anthropophilic tinea”
10. Trouvé C, Blot S, Hayette M-P, Patteet S, Rodriguez-Villalobos H, Symoens F, Van Wijngaerten E, Lagrou K: Epidemiology and clinical reporting of candidaemia in Belgium : a national prospective study (TANSIR trial). In: *Epidémiologie et aspects cliniques des candidémies en Belgique: étude prospective nationale (Etude TANSIR)*. Edited by Msd; 2015.
- 11 Dingemans G., van den Bosch M., Hayette M.P., Goethel S., Rusu V., Sacheli R., Meis J, Gajetaan G., Simons G. Development of a new commercial qPCR assay to detect and differentiate dermatophyte infections of the skin, nails and hair. ECCMID, Barcelone, Mai 2014
12. Hayette MP, Graide H, Adjetey C., Arrese J., Gaajetaan G., Van tegelen D. Kampermann T., Simons G. , Dingemans G. Validation of the Dermagenius nail plus multiplex assay, a new commercial PCR assay developed for the detection and identification of dermatophyte and Candida in nails. Poster communication TIMM 2015, Lisbon Portugal.
- 13 Nenoff P, Uhrlass S, Kruger C, Erhard M, Hipler UC, Seyfarth F, Herrmann J, Wetzig T, Schroedl W, Graser Y: Trichophyton species of Arthroderma benhamiae - a new infectious agent in dermatology. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 2014, 12(7):571-581.