



13

14

15

28^e nov 2019

ÉDITION

Journées d'Anesthésie
Réanimation
Chirurgicale d'Aquitaine



université
de BORDEAUX

Diagnostic des infections fongiques invasives

INSCRIPTION
INFORMATIONS



REANESTH.ORG

Anesthésistes Réanimateurs

IADE - IDE de Réanimation

Kinésithérapeutes

Session Posters

Symposiums

Ateliers

Institut des Métiers de la Santé
Xavier Arnoz (Pessac)

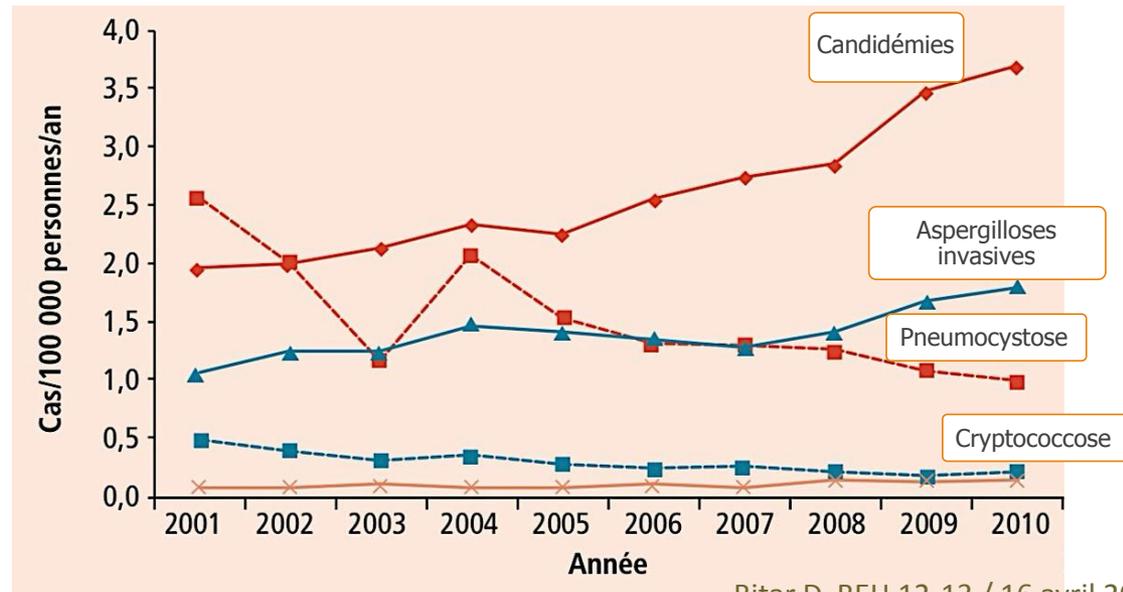


université
BORDEAUX



Isabelle Accoceberry
Laboratoire Parasitologie-Mycologie
Hôpital Pellegrin - CHU Bordeaux

Incidence des IFIs en France métropolitaine



Bitar D, BEH 12-13 / 16 avril 2013

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



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

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



ORIGINAL ARTICLE/ARTICLE ORIGINAL

An estimation of burden of serious fungal infections in France

Estimation du poids épidémiologique des infections fongiques graves en France

J.-P. Gangneux^{a,*}, M.-E. Bougnoux^b, C. Hennequin^c,
C. Godet^d, J. Chandanier^e, D.W. Denning^f, B. Dupont^b, for
the LIFE program, the Société française de mycologie médicale
SFMM-study group¹

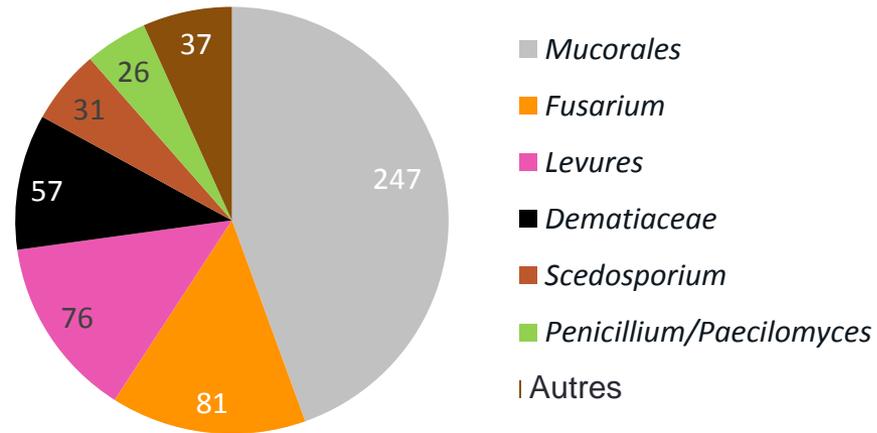
Infections (2014)	Cas/100 000	Nb cas par an
Candidémies	3,6	2370
Candidoses intra-abdominales	0,74	486
Aspergilloses invasives	1,8	1185
Pneumocystose	1	658
Cryptococcose	0,2	131
Mucormycoses	0,12	79
Total		4909

Infections (2014)	Cas/100 000	Nb cas par an
ABPA	145	95331
Asthme (sensib fongique)	189	124678
Aspergillose pulmonaire chronique	5,24	3450
Candidose oesophagienne	13,8	9075
Candidose vaginale récidivante	2220	730690
Total		963224

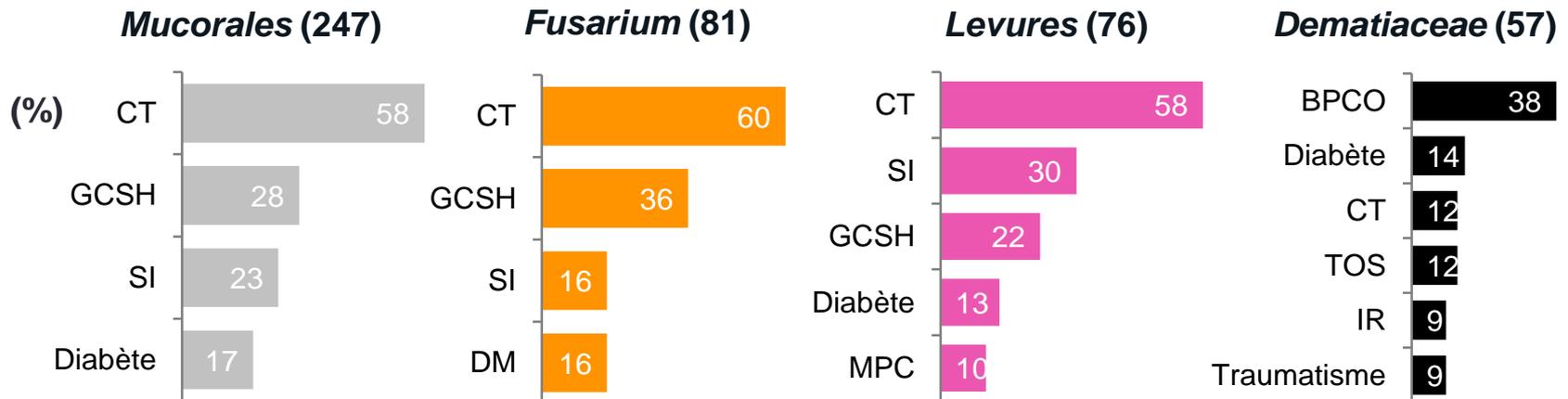
Registre Fungiscope™ des champignons émergents

Répartition des 555 cas répertoriés 2003-2017 (66 pays)

- **Mucorales** = majorité des souches répertoriées (n = 247), devant les **Fusarium spp.** (n = 81)
- Facteur de risque le plus fréquemment retrouvé pour toutes les infections = chimiothérapie



Facteurs de risque



CT : chimiothérapie ; GCSH : greffe de cellules souches hématopoïétiques ; SI : soins intensifs ; MPC : maladie pulmonaire chronique ; TOS : transplantation organe solide ; IR : insuffisance rénale ; BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive

Mycoses invasives (IFIs)

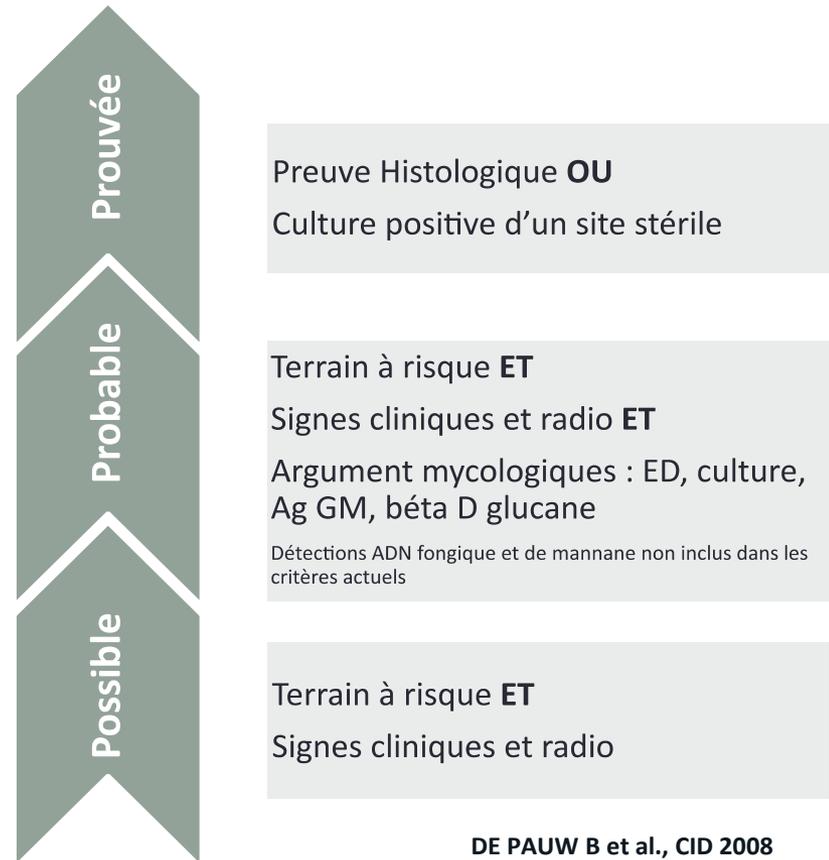
Le diagnostic des IFIs doit être:

- **Précoce** : un retard de 24-48h dans la mise sous traitement antifongique augmente la mortalité
- **Précis** : survie augmentée avec un traitement antifongique adéquat

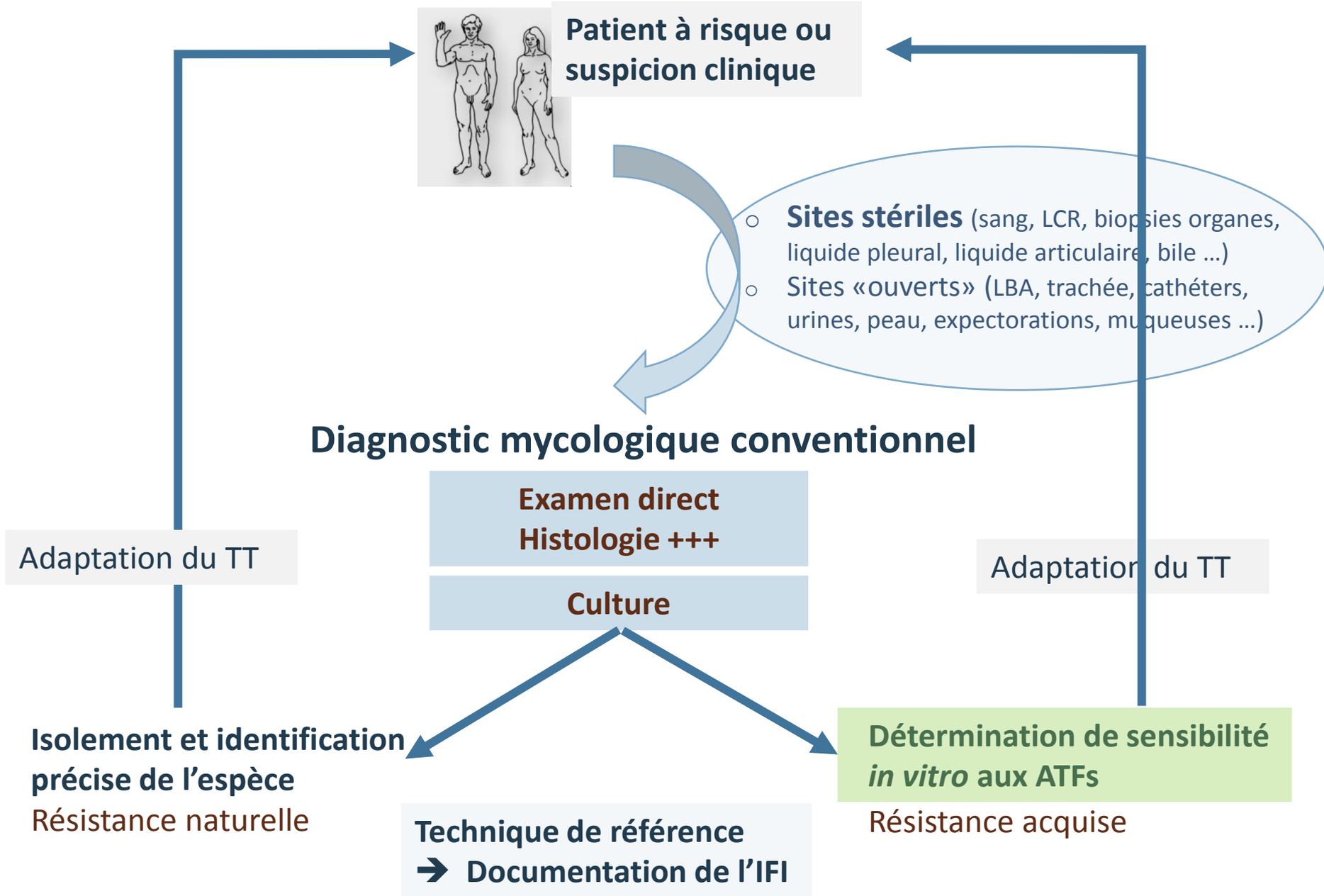
Le **diagnostic** est **difficile** et repose sur un **faisceau d'arguments** :

- Clinique
- Radiologique (imagerie médicale)
- Mycologique
- Anatomopathologique

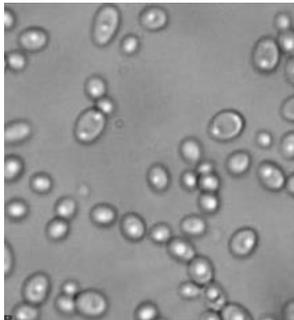
- *Candida spp*
- *C. Neoformans*
- *Autres levures (Trichosporon spp, Pichia spp, Geotrichum spp ...)*
- *Aspergillus spp*
- *Autres moisissures angio-invasives : Fusarium spp, Scedosporium spp, Zygomycètes ...*
- *Pneumocystis jirovecii*



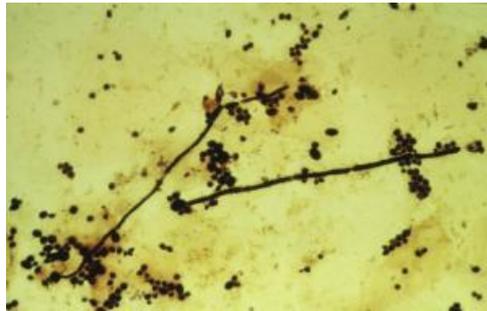
Stratégie Diagnostique des IFIs



Examen Direct



Levures



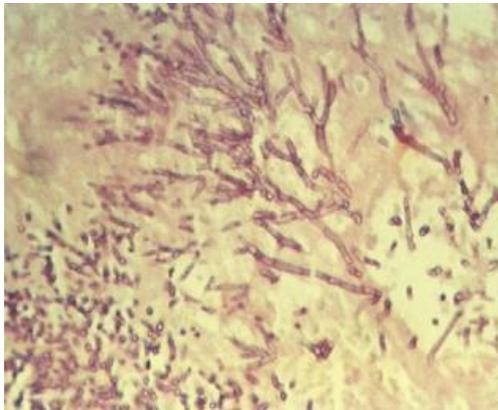
Levures et pseudofilaments
(*Candida spp*)



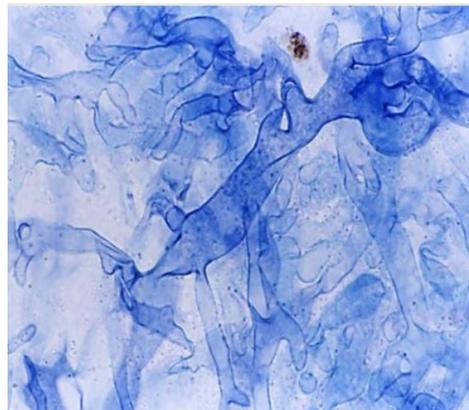
Levures encapsulées
(*Cryptococcus spp*)



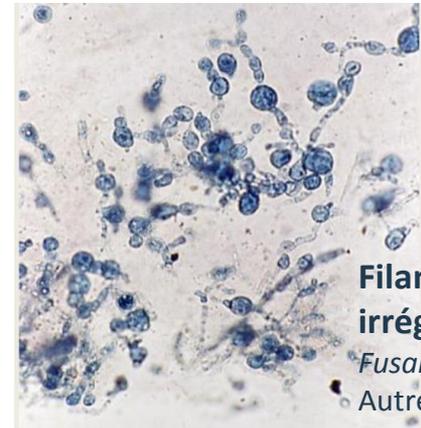
Levures et filaments
(*Blastoschizomyces capitatus*,
Trichosporon spp)



Filaments septés 2 à 5 µm
ramifications à 45°
Aspergillus spp



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

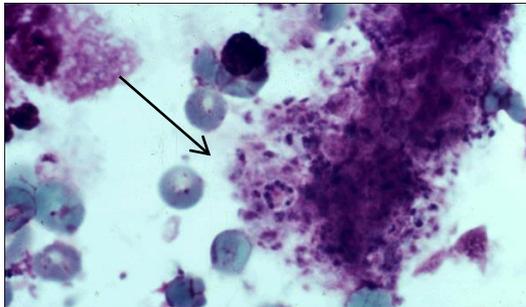


Filaments septés irréguliers vésiculeux
Fusarium sp ? Aspergillus sp ?
Autre moisissure ?

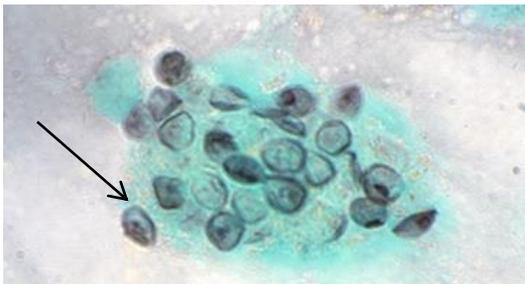
ED +++ (opportunistes)

- ✓ rapide, peu coûteux mais sensibilité < culture
- ✓ diagnostic présomptif : orientation genre et/ou espèce

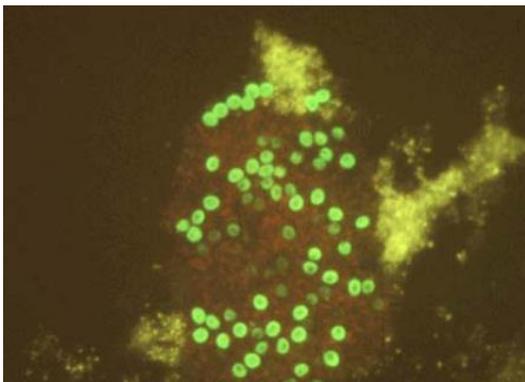
- Etat frais (Noir chorazole)
- Colorations :
 - MGG, Calcofluor (appositions-frottis)
 - Musto (imprégnation argentique)



Giemsa: trophozoïtes et prékystes



Gomori-Grocott : amas de kystes



IFI (AC monoclonaux anti glycoprotéines de membrane) Kystes

Pneumocystis jirovecii

Culture impossible

Diagnostic de certitude = mise en évidence de PJ au niveau pulmonaire

- **ED** après coloration (Giemsa, bleu de Toluidine, Calcofluor et Gomori Grocott) ou Immunofluorescence
- **LBA**, biopsie pulmonaire, aspirations bronchiques, expectorations induites

Recos : ↗ sensibilité

Giemsa (Trophozoïtes) + IFI (Kystes)

	EI	LBA
ED	35-78 %	60-92 %
IFI	43-78 %	89-98 %

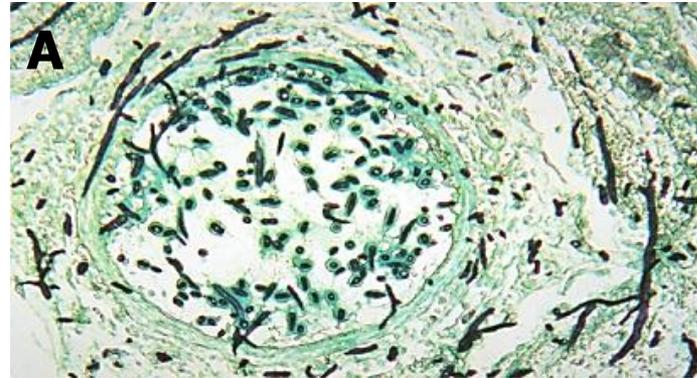
- Sensibilités poolées pour des patients VIH et non VIH
- **Sensibilité de l'ED et de l'IFI chez non-VIH : 38-53% INSUFFISANT...**

Examen anatomo-pathologique

Ex biopsie pulmonaire

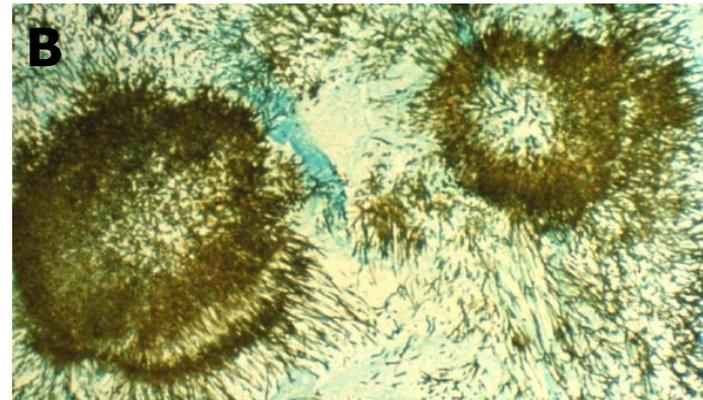
A : « Invasion »

- Filaments intravasculaires
- Formes indicatives de l'espèce fongique



B : « Aspergillome »

- Absence d'invasion



Colorations spécifiques
PAS et Gomori-Grocott (sels d'argent)

ED/ Histologie

- **Spécificité +++ sur biopsies et ponctions de site stérile**
- **Diagnostic de certitude** mais procédures invasives souvent contre-indiquées ou retardées

Hémocultures

- ✱ **Hémocultures positives** : Candidoses invasives, Cryptococcoses disséminées et autres levures, Fusarioses, Scédosporioses
- ✱ **Hémocultures « jamais » positives** : Aspergilloses et Zygomycoses



BacT/ALERT® VIRTUO® (BioMérieux, France)

- Flacons FA aérobie Plus, FN anaérobie Plus (billes polymériques absorbantes)
- **Mesure du volume**
- **Gain temps détection (3h)**



BD BACTEC™ 9240 (Becton Dickinson, USA)

- Plus Aerobic/F et Plus Anaerobic/F (résines)
- **Mycosis IC/F sélectif pour fongiques (ATB, agent lytique)**

ET

Automate BacT/ALERT® 3D en Bactériologie

- Bact/ALERT FA aérobie avec incubation 5 jours
majorité des *Candida spp* : 2 à 4 jours
- Absorption des ATFs (et ATB) par billes
Suivi PTs sous ATF

Automate BD BACTEC™ avec Mycosis IC/F en Mycologie

- Incubation minimum 14 jours
- **Ch. filamenteux** e.g. *Fusarium spp*
- Certains **levures exigeantes** ou à croissance plus lente
Candida glabrata, *C. guilliermondii*, *C. neoformans*,
Malassezia spp,
- **Co-infection bactérie-levure (20%)** : présence d'ATB

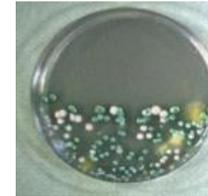
Importante variabilité de l'inoculum (1-100 à 1000 cfu/mL)
Volume minimum 10 mL par flacon !

Culture du prélèvement

Optimiser la mise en culture

Prévoir un envoi spécifique pour le laboratoire de mycologie

	Ch. filamenteux	Levures
Durée incubation	3 semaines	8 jours
Milieux	Sabouraud + ATB Malt, oatmeal agar Tubes	Sabouraud + ATB Milieux chromogéniques Boîtes de pétri
Température	30° C	30-35° C



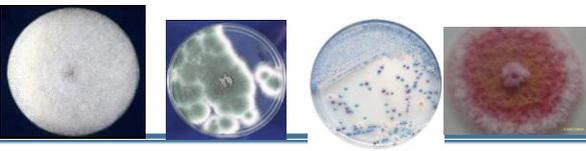
24 à 48 H

Valeur de la culture pour les moisissures

PVTS respiratoires non invasifs	ECBC Crachat induit Répéter les PVTs	ED et culture <u>Sensibilité ~ 30%</u> Spécificité ?
PVTS respiratoires invasifs	LBA	ED + culture <u>Sensibilité ~ 50%</u>
Biopsies poumon	trans-thoracique trans-bronchique	ED + culture ? Histologie vs hybridation <i>in situ</i>
Biopsies sinus		ED (sensibilité ?) ED+ : Sensibilité culture 50%

Tous les échantillons provenant de patients à haut risque d'IFI doivent être mis en culture pour la recherche d'agents fongiques.

- ✓ Valeur prédictive positive de l'urine (CI) ou des expectorations chez le granulopénique (AI)



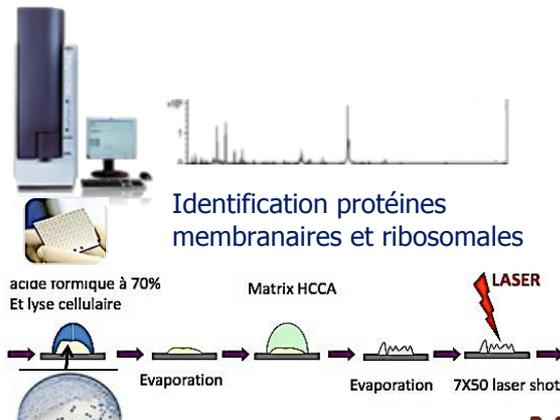
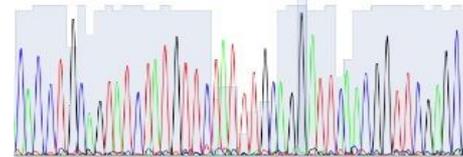
Identification

Genre

Complexe d'espèce

Section

Espèce



ID phénotypique conventionnelle
métabolique +/- morphologique

Séquençage moléculaire
(ITS ou Multilocus)

JOURS

Spectrométrie de masse
de type MALDI-TOF

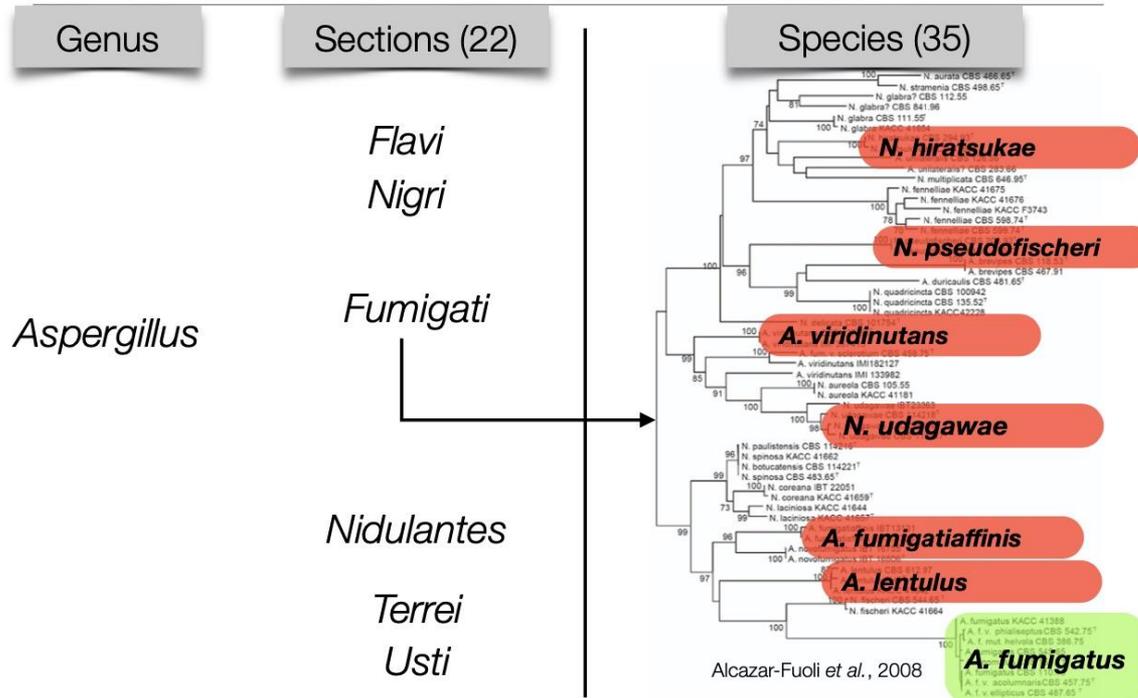
Simple, plus rapide, plus
économique, et reproductible
Robustesse des bases de données

MINUTES

En routine précision ID
comparable à celle du
séquençage ADN

ID au niveau de l'espèce essentielle

Indissociable de résistance primaire



- Non différenciables en microscopie
- Plusieurs espèces impliquées en clinique
- Profil de sensibilité variable aux ATFs

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

Table 3 Susceptibility of pathogenic fungi without acquired resistance mechanisms

Arendrup MC et al., BMT 2012

	Amphotericin	Echinocandins	Fluconazole	Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole	5-FC
<i>Candida</i>							
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. glabrata</i>	S	S	I-R ^a	S-I-R ^a	S-I-R ^a	S-I-R ^a	S
<i>C. krusei</i>	S	S	R	I-R	S-I-R ^a	S-I-R ^a	R
<i>C. parapsilosis</i>	S	S-I	S	S	S	S	S
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>Cryptococcus</i>	S	R	S ^b	S	S	S	S
<i>Trichosporon</i>	S-I-R	R	I-R	I-R	S	S	R
<i>Aspergillus</i>							
<i>A. fumigatus</i>	S	S	R	S	S	S	R
<i>A. terreus</i>	I-R	S	R	S	S	S	R
<i>Fusarium</i>	S	R	R	R	S-I-R	S-I-R	R
<i>S. apiospermum</i> ^c	R	R	R	R	S-I	S-I	R
<i>S. prolificans</i> ^c	R	R	R	R	I-R	I-R	R
<i>Zygomycetes</i>	S-I-R	R	R	R	R	S-I-R	R

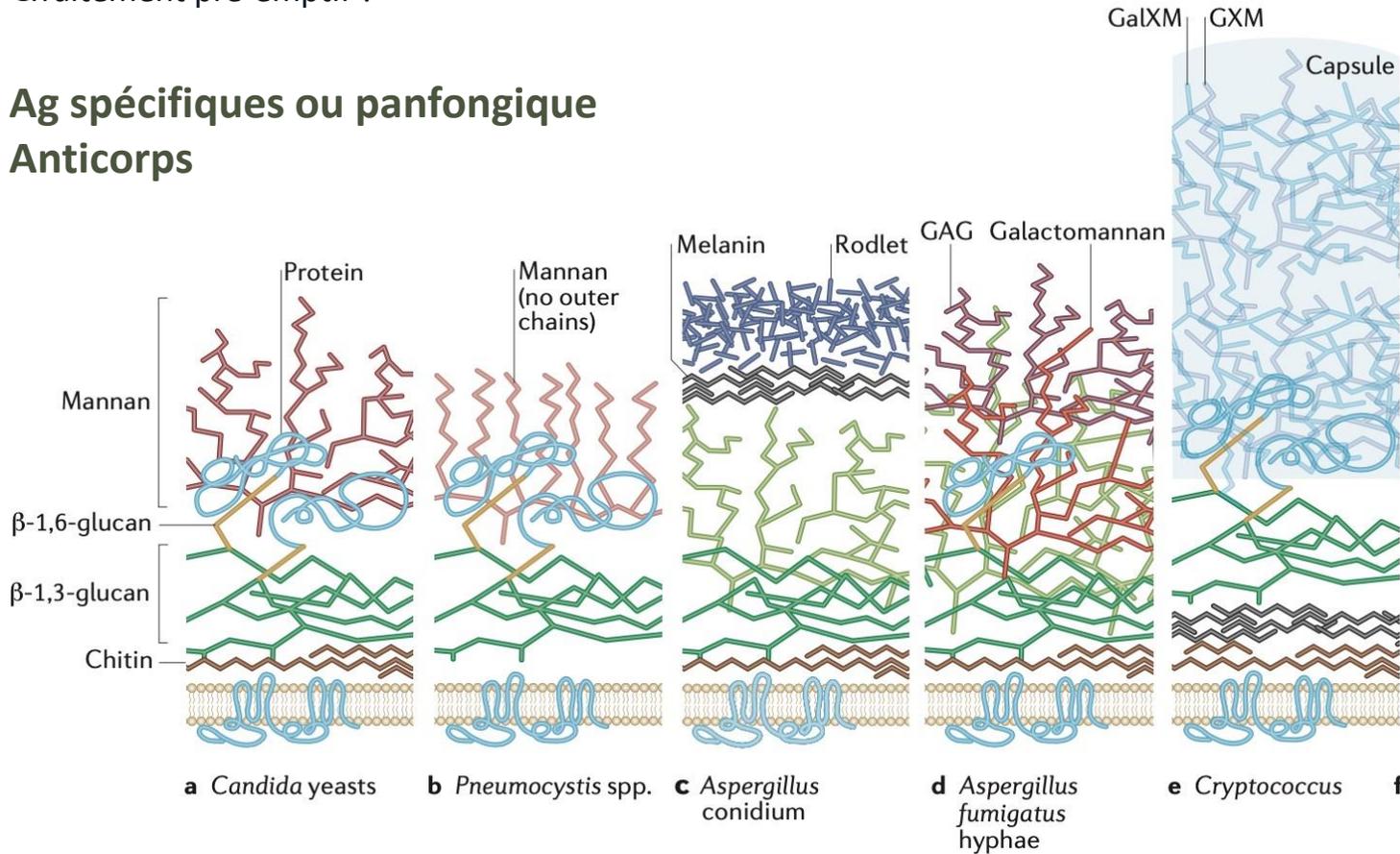
Stratégie Diagnostique des IFIs

Patient à risque ou suspicion clinique

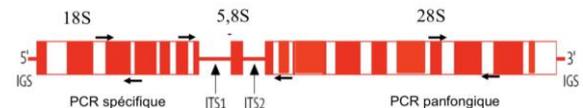
Recherche de **biomarqueurs** précoces de l'infection (**sérum, sang, LBA, LCR**)

⊗ Traitement pré-emptif ?

Ag spécifiques ou panfongique
Anticorps



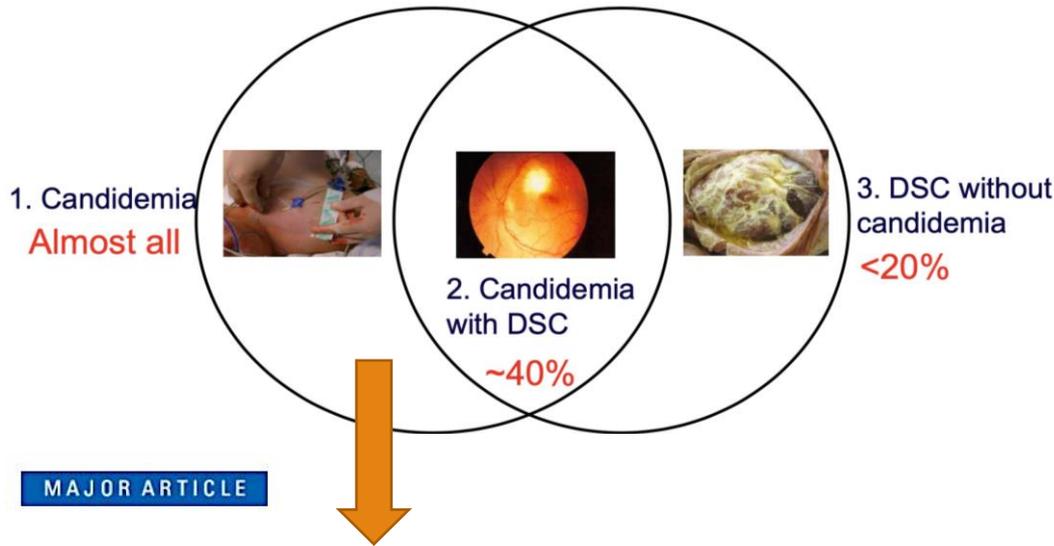
ADN fongique circulant/tissus



Candidoses Invasives

Sensibilité globale des hémocultures ~ 50%

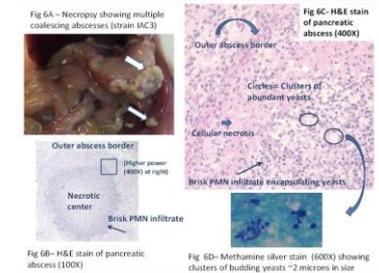
Clancy and Nguyen, CID 2013 « the missing 50% »



T2 Magnetic Resonance Assay for the Rapid Diagnosis of Candidemia in Whole Blood:
A Clinical Trial CID 2015

Eleftherios Mylonakis,¹ Cornelius J. Clancy,² Luis Ostrosky-Zeichner,³ Kevin W. Garey,⁴ George J. Alangaden,⁵ Jose A. Vazquez,⁶ Jeffrey S. Groeger,⁷ Marc A. Judson,⁸ Yuka-Marie Vinagro,⁹ Stephen O. Heard,¹⁰ Fainareti N. Zervou,¹ Ioannis M. Zacharioudakis,¹ Dimitrios P. Kontoyiannis,¹¹ and Peter G. Pappas¹²

Cultures d'autres sites stériles ?
Sensibilité des biopsies : 42%



Thaler Annals Int Med 1988 ; Cheng JID 2013 Cheng Infect Immun 2014



Résonance magnétique T2 couplée à la PCR (FDA 2014)

- ✳️ Totalement automatisé, pas d'extraction ADN, sang total, vol 2 à 4 mL, temps de détection 3-5 heures, limite de détection 1-3 CFU/mL
- ✳️ *C. albicans/C. tropicalis* ; *C. glabrata/C. krusei* et *C. parapsilosis*

T2MR Candida

- 2 essais cliniques, **Sensibilité ~ 90% et Spécificité ~ 98%**
 - ✧ Suivi PTs avec candidémie prouvée : T2+ 45% vs Hc+ 24% (**T2 > PTs sous ATFs**)
- 1^{ère} étude en pédiatrie pour diagnostiquer (n=15) ou exclure (n=9) candidémie vol. 2 mL, sensibilité et spécificité 100%
- **Marqueur pronostique**
 - 2 études prospectives multicentriques observationnelles, candidémies compliquées (métastases septiques et/ou mortalité imputable)
 - ✧ T2MR+ dans les 5 premiers jours TT curatif, FDR indépendant de complications (OR 36,5)
 - ✧ T2MR+ au moment de mise en œuvre TT empirique = mauvais pronostic
- Impact médico-économique :
 - ✧ Délai d'initiation d'un ATF adapté à l'espèce: **34 h vs. 6h** (P < 0.01) ; - 8 j d'hospitalisation ; Réduction de durée du TT empirique T2-/Hc- 6,7 j vs. 2,4 j (-280\$ d'ATF/patient testé)

Prevalence	Biomarqueur Bayésien?	Representative patient	PPV	NPV
0.4%		Any hospitalized patient in whom a blood culture is collected. ⁷	15%	>99.9%
1%		Patient admitted to critical care unit. ^{19,20}	31%	99.9%
2%		Patient with febrile neutropenia, baseline rate of candidaemia prior to empirical antifungal treatment. ²¹⁻²⁴	47%	99.8%
3%		Patient with sepsis, shock or >3-7 day stay in critical care unit. ^{20,25-27}	67%	99.7%
10%		Patient at increased risk of candidaemia based on clinical prediction models. ^{4,28,29}	82%	99%
20%		Neutropenic bone marrow transplant recipient or leukaemia patient not receiving antifungal prophylaxis. ³⁰⁻³³	92%	98%

Performance of *Candida* Real-time Polymerase Chain Reaction, β -D-Glucan Assay, and Blood Cultures in the Diagnosis of Invasive Candidiasis

M. Hong Nguyen,¹ Mark C. Wissel,² Ryan K. Shields,¹ Martin A. Salomoni,² Binghua Hao,¹ Ellen G. Press,¹ Ryan M. Shields,² Shaoji Cheng,¹ Dimitra Mitsani,¹ Aniket Vadnerkar,¹ Fernanda P. Silveira,¹ Steven B. Kleiboecker,² and C...

β -Glucan Antigenemia Anticipates Diagnosis of Blood Culture–Negative Intraabdominal Candidiasis

Frederic Tissot¹, Frederic Lamothe¹, Philippe M. Hauser², Christina Orasch^{1,3}, Ursula Flückiger³, Martin Siegemund⁴, Stefan Zimmerli⁵, Thierry Calandra¹, Jacques Bille², Philippe Eggimann^{6*}, Oscar Marchetti^{1*}, and the Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS)

¹Infectious Diseases Service, Department of Medicine, ²Institute of Microbiology, and ³Adult Intensive Care Service, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland; ⁴Division of Infectious Diseases and Hospital Epidemiology and ⁵Intensive Care Service, Basel University Hospital, Basel, Switzerland; and ⁶Institute for Infectious Diseases, University of Bern, Bern, Switzerland

Clinical validation of a multiplex real-time PCR assay for detection of invasive candidiasis in intensive care unit patients

J. Fortún^{1*}, Y. Meije¹, M. J. Buitrago², S. Gago², L. Bernal-Martinez², J. Pemán³, M. Pérez⁴, E. Gómez-G^o Pedrosa⁵, N. Madrid¹, V. Pintado¹, P. Martín-Dávila¹, J. Cobo¹, G. Fresco¹, S. Moreno¹ and M. Cuenca-Estrella²

¹Servicio de
²Servicio de
³Intensivista

RESEARCH

Open Access



Madrid, Spain;
niversitario y
stituto Ramón y

Contribution of *Candida* biomarkers and DNA detection for the diagnosis of invasive candidiasis in ICU patients with severe abdominal conditions

Cristóbal León^{1*}, Sergio Ruiz-Santana², Pedro Saavedra³, Carmen Castro⁴, Ana Loza¹, Ismail Zakariya⁴, Alejandro Úbeda⁵, Manuel Parra⁶, Desirée Macías¹, José Ignacio Tomás⁵, Antonio Rezusta⁷, Alejandro Rodríguez⁸, Frederic Gómez⁹, Estrella Martín-Mazuelos¹ and The Cava Trem Study Group

Diagnostic des candidoses profondes (CIA vs PTs USI à risque)

Test	Sensibilité	Spécificité	Etude
BDG	56%	73%	Nguyen et al., 2012
	65%	78%	Tissot et al., 2013
	64%	83%	Fortun et al., 2014
CAGTA	77%	57%	Léon et al., 2016
	73%	54%	Fortun et al., 2014
	61%	80%	Parra Sanchez et al., 2017
	53%	64%	Léon et al., 2016
Mn/anti-Mannane moins performants faible Sensib			Léon et al., 2016
PCR	91%	97%	Fortun et al., 2014
	80%	70%	Nguyen et al., 2012
	86%	33%	Léon et al., 2016
T2 Candida	en cours d'évaluation		

Performances ~ similaires

Supériorité de PCR

**2 échantillons positifs consécutifs

Comment utiliser les biomarqueurs ?

sensibilité > 60% et spécificité de 75% pour être utile dans la prise en charge des patients

VPP et VPN

Marqueurs bayésiens

TABLE 3 Prevalence of intra-abdominal candidiasis in different populations and anticipated PPVs and NPVs of nonculture tests^a

Prevalence (%) (reference[s])	Representative patient(s)	CAGTA and BDG ^b		PCR					
		PPV (%)	NPV (%)	Leon et al. (10) ^c		Nguyen et al. (22) ^d		Fortun et al. (9) ^e	
				PPV	NPV	PPV	NPV	PPV	NPV
5 (26, 28)	Low- to moderate-risk peritoneal dialysis patient with peritonitis	12	97.6	6	97.7	13	98.9	59	99.2
10 (27)	Patient with emergent surgery for intra-abdominal infection, patient with colonic perforation	22	95	12	95.2	24	97.7	76	98.3
20 (26, 27)	Patient with high-risk severe acute or necrotizing pancreatitis, patient with small-bowel perforation, patient with emergent surgery for nosocomial intra-abdominal infection	39	89.6	24	89.9	41	94.9	88	97.5
30 (23, 25)	Patient who has undergone high-risk GI/hepatobiliary surgery, patient with a biliary leak, patient with a gastric/duodenal perforation	53	83	35	83.7	55	91.6	93	93.8

^bSensibilité/spécificité, 65%/75%. ^cSensibilité/spécificité, 85%/33%.

^dSensibilité/spécificité, 85%/70%. ^eSensibilité/spécificité, 85%/97%.

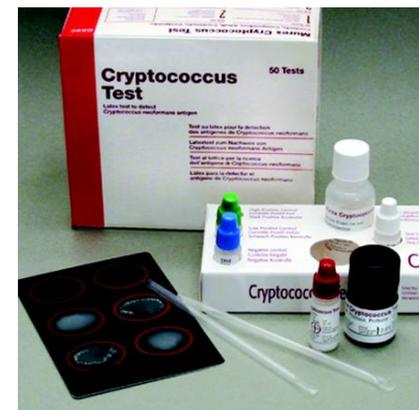
Cryptococcose

Détection de l'Ag glucurono-xylomannane capsulaire circulant

- concentration corrélée à charge fongique *in vivo*
- **Sérum - LCR** - (LBA, Liq. pleural) avec **Sensibilité 98%, Spécificité > 95%**

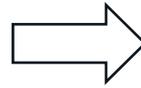
Techniques

- Immunochromatographie, ELISA
 - ✳ **Screening PTs HIV+, CD4 < 100/μL**
- Agglutination latex, **titrage de l'Ag**
 - ✳ *agglutination de particules de latex sensibilisées par des AC polyclonaux de lapin dirigés contre les polysaccharides capsulaires des 4 sérotypes*
 - ✳ Faux-positifs : facteur rhumatoïde, perfusion de macromolécules type hydroxyéthyl-amidon, infection à *Trichosporon asahii*
- VIH+ :
 - Titres élevés facteur mauvais pronostic
 - Surveillance échec thérapeutique ou rechutes (**LCR**)
- VIH-
 - Titre sérique > 512, PL obligatoire même en absence de signes neurologiques



Galactomannane (GM) sérique marqueur d'AI chez PTs d'onco-hématologie (adultes et pédiatrie)

LAM - LAL - MDP (neutropénie ++)
Allogreffe CSH (GVHd ++)



Angio- invasion

Selon les études : Sensibilité 50-100% et Spécificité 81-99%

Patient asymptomatique

Dépistage systématique

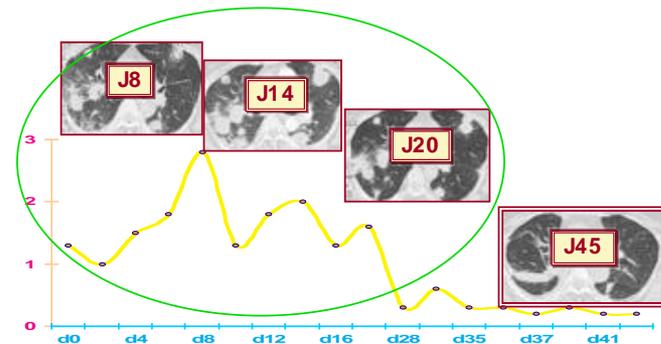
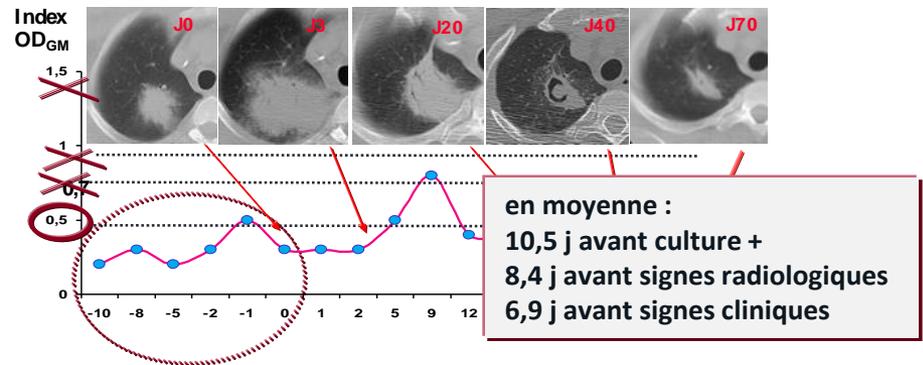
- * 2 fois/semaine
- * screening pour exclure AI (seuil faible 0,5)
- * 1 sérum $\geq 0,7$ ou 2 consécutifs $\geq 0,5$
 - ☞ AI probable
 - ☞ Scanner thoracique, fibroscopie bronchique

Patient symptomatique

Ex. anomalies CT-scan compatibles AI

- * **Dosage ponctuel pour préciser le DG**
- * **Répéter les tests**
- * **2 sérums consécutifs +**, \uparrow spécificité (de 80% – 90% à > 97%) pour diagnostic AI prouv./proba.

GM circulant DETECTABLE dès les prémices de l'AI



GM Valeur pronostique

Diminution et négativation du GM = meilleure survie
Persistance du GM associé à un échec thérapeutique
(index > 1 après initiation du traitement : mauvais pronostic)

Serum Galactomannan–Based Early Detection of Invasive Aspergillosis in Hematology Patients Receiving Effective Antimold Prophylaxis

CID 2014

Rafael F. Duarte,¹ Isabel Sánchez-Ortega,¹ Isabel Cuesta,² Montserrat Arnan,¹ Beatriz Patiño,¹ Alberto Fernández de Sevilla,¹ Carlota Gudiol,¹ Josefina Ayats,³ and Manuel Cuenca-Estrella²

¹Department of Hematology, Catalan Institute of Oncology, Hospital Duran i Reynals, Barcelona, ²Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, and ³Department of Microbiology, Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona, Spain

Faut-il continuer à surveiller le GM chez les patients à risque sous prophylaxie par posaconazole ?

262 PTs, à haut risque d'AI

(induction de LAM, HSCT, GVHD sous corticoïdes >1mg/kg/j)

Evaluable episodes ^a , No.	217	
GM test results ^b		
True positive, No. (%)	5 (2.3)	
True negative, No. (%)	182 (83.9)	
False positive, No. (%)	30 (13.8)	
False negative	. . .	
Sensitivity, %	100 ^c	70 ^d
Specificity, %	85.5 ^c	90 ^d
Scenario 1: GM screening of all cases ^e		
Negative predictive value, %	100 ^c	99.4 ^d
Positive predictive value, %	11.8 ^c	11.9 ^d
Scenario 2: Diagnosis of IFD suspicion only ^f		
Negative predictive value, %	100 ^c	70.6 ^d
Positive predictive value, %	89.6 ^c	89.7 ^d

^a GM performance when used in a preemptive fashion, including GM surveillance of asymptomatic patients (prevalence of IA: 1.9%).

^f GM performance in diagnostic-driven use for patients with a clinical suspicion of IFD (prevalence of IA: 55.5%).

Confirmation de très faible incidence d'AI < 2% chez les PTs d'hémato sous prophylaxie par posaconazole

GM sérique non fiable pour surveillance des PTs asymptomatiques

✓ Résultats toujours négatifs ou faux positifs

○ **Arrêt surveillance GM chez patients sous prophylaxie**

○ **Utilisation du GM sérique en cas de symptômes comme outil diagnostique**

GM sérique , autres populations de PTs à risque

Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline

Ullmann AJ *et al.*, CMI 2018

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE	Comment
ICU patients	To diagnose IA	GM in blood ^a	C	II	Better performance in neutropenic than in non-neutropenic patients
Solid organ recipients	To diagnose IA	GM in blood ^a	C	II	Low sensitivity, good specificity Most data for lung SOI
Any other patient	To diagnose IA	GM in blood ^a	C	II	Piperacillin/tazobactam may no longer be responsible for false-positive results according to recent studies Cross-reactivity in case of histoplasmosis, fusariosis, talaromycosis (formerly: penicilliosis) False-positive results reported due to ingestion of ice-pops, transfusions, antibiotics, Plasmalyt® infusion

**Si forte suspicion clinique
répéter les tests**

risque modéré ou faible d'AI, pas en dépistage

VPP du GM ↓ à < 20% (GM + → faux positif si suspicion clinique faible ou modérée)

Angio-invasion limitée, sensibilité faible (30%) → GM négatif ne permet pas d'exclure une AI si signes clinico-radiologiques

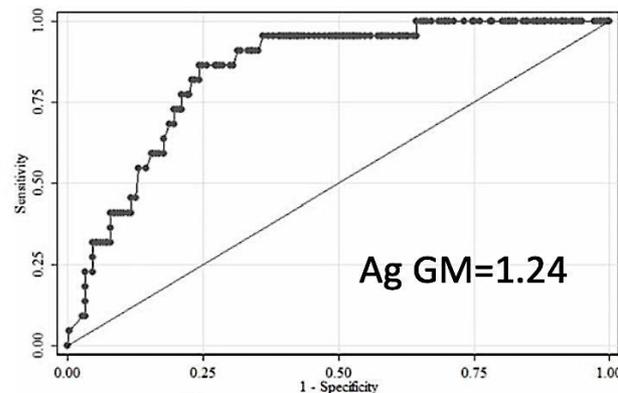
Ag GM en réanimation

23 AI de réa en Inde

Prédicteur aspergillose: Ag GM sérum >1.24

Associé au décès

Plus précoce que imagerie



Détection du GM dans LBA

Table 2. *Aspergillus* GM testing in BALs or tissue biopsies with a cutoff ≥ 1.0 .

Population (patients)	Cases	% Sensitivity	% Specificity	Ref.
Hematology	26	100	100	Becker, <i>et al.</i> Br J Haematol 2003
BMT (pts)	50	61	98	Musher, <i>et al.</i> JID 2004
Hematology	67	87	96	Marr, <i>et al.</i> JID 2004
Solid organ transplant	5	100	91	Clancy, <i>et al.</i> JCM 2007
Solid organ transplant	67	67	98	Husain, <i>et al.</i> Transplantation 2007
Non-immunosuppressed (pts)	73	100	88	Nguyen, <i>et al.</i> JCM 2007
Hematology	65	98	97	Lass-Flörl, <i>et al.</i> CID 2007
ICU (pts)	89	88	87	Meerssemann <i>et al.</i> 2008
Hematology	200	100	88	Penack, <i>et al.</i> Ann Oncol 2008

BMT: Bone marrow transplantation; ICU: Intensive care unit.

Role of galactomannan determinations in bronchoalveolar lavage fluid samples from critically ill patients with chronic obstructive pulmonary disease for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a prospective study.

	BALF GM (95%CI) (cut-off 0.8)	BALF GM (95%CI) (cut-off 0.5)	Serum GM (95%CI) (cut-off 0.5)	Isolation of <i>Aspergillus</i> from LRT (95%CI)
Sensitivity (%)	88.9 (76.8 to 101)	88.9 (76.8 to 101)	77.8 (61.8 to 93.8)	66.7 (48.6 to 84.8)
Specificity (%)	100 (100 to 100)	47.1 (27.9 to 66.3)	100 (100 to 100)	100 (100 to 100)
PPV (%)	100 (100 to 100)	47.1 (27.9 to 66.3)	100 (100 to 100)	100 (100 to 100)
NPV (%)	94.4 (85.6 to 103.2)	88.9 (76.8 to 101)	89.5 (77.7 to 101.3)	85.0 (71.3 to 98.7)
TCR (%)	96.1 (88.7 to 103.5)	61.5 (42.8 to 80.2)	92.3 (82.1 to 102.5)	88.5 (76.2 to 100.8)

For probable IPA and control patients ($n = 26$).

BALF, bronchoalveolar lavage fluid; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; GM, galactomannan; IPA, invasive pulmonary aspergillosis; LRT, lower respiratory tract; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; TCR, total consistent rate.

Détection du GM

LBA

- **Détection systématique**
GM LBA vs GM sérum plus sensible
- **Seuil optimal = 0,8-1**
- **Apport diagnostique** intéressant et ce quelque soit le terrain du patient
- Impact des ATFs sur les performances
- Faux positifs (réactions croisées avec d'autres fongiques, colonisation aspergillaire ...)

Maertens J *et al.*, CID 2009, Boonsarngsuk V *et al.*, Scan JID 2011, Wheat LJ *et al.*, Eur JCMID 2008 ; Guo *et al.* Chest 2010 ; Zou *et al.* PlosOne 2012

Exclusion	"Zone grise"	Confirmation
Négatif	Positif 0.5 - 3	Positif ≥ 3

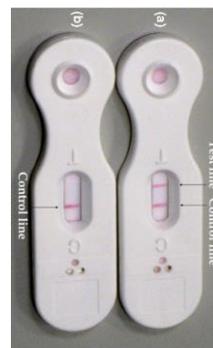
Attention à la mucormycose !

Faux pos ?

LCR

- **Détection systématique**
- sensibilité 88% et spécificité 96%
- **Cut-Off** recommandé par l'ECIL-3 (Marchetti *et al.* 2012) = **1**

Chong GM *et al.*, JCM 2016



Aspergillus lateral flow device (LFD)

- détection d'1 glycoprotéine extracellulaire sécrétée uniquement pdt phase de croissance des hyphes
- **simple et rapide (15 min)**
- **LBA** Se 86%, spé 93% (méta-analyse Pan Z *et al.*, J Med Microbiol)
- (Urine) Marr KA *et al.*, CID 2018)

Détection ADN *Aspergillus spp*

- Consortium européen EAPCRI (2006) → **Optimisation / standardisation**
 - qPCR *Aspergillus fumigatus* vs *Aspergillus spp*
 - sang total, sérum, plasma (large volume, plasma > sérum), LBA, biopsies, (LCR)
- Kits commerciaux : **AsperGenius** (PathoNostics), SeptiFast (Roche), MycAssay *Aspergillus* (Myconostica), **MycoGENIE** (Ademtech), Fungiplex *Aspergillus* (Bruker)
 - **Détection de mutation(s) CYP51A associées à la résistance aux azolés**
- Performances diagnostiques qPCR comparables à celles du GM
 - **Sensibilité 84-88%** et Spécificité 75-76% dans **sang**
 - Sensibilité 76.8-79.6% et **spécificité 93.7- 94.5% dans LBA**
 - Forte VPN et marqueur pronostique

Barnes RA et al., Med Mycol 2018 ; Lass-Flörl C Med Mycol 2019

Meilleure stratégie → combiner GM et PCR

Serum Galactomannan Versus a Combination of Galactomannan and Polymerase Chain Reaction–Based *Aspergillus* DNA Detection for Early Therapy of Invasive Aspergillosis in High-Risk Hematological Patients: A Randomized Controlled Trial

Galactomannan and PCR versus culture and histology for directing use of antifungal treatment for invasive aspergillosis in high-risk haematology patients: a randomised controlled trial

Réduction :

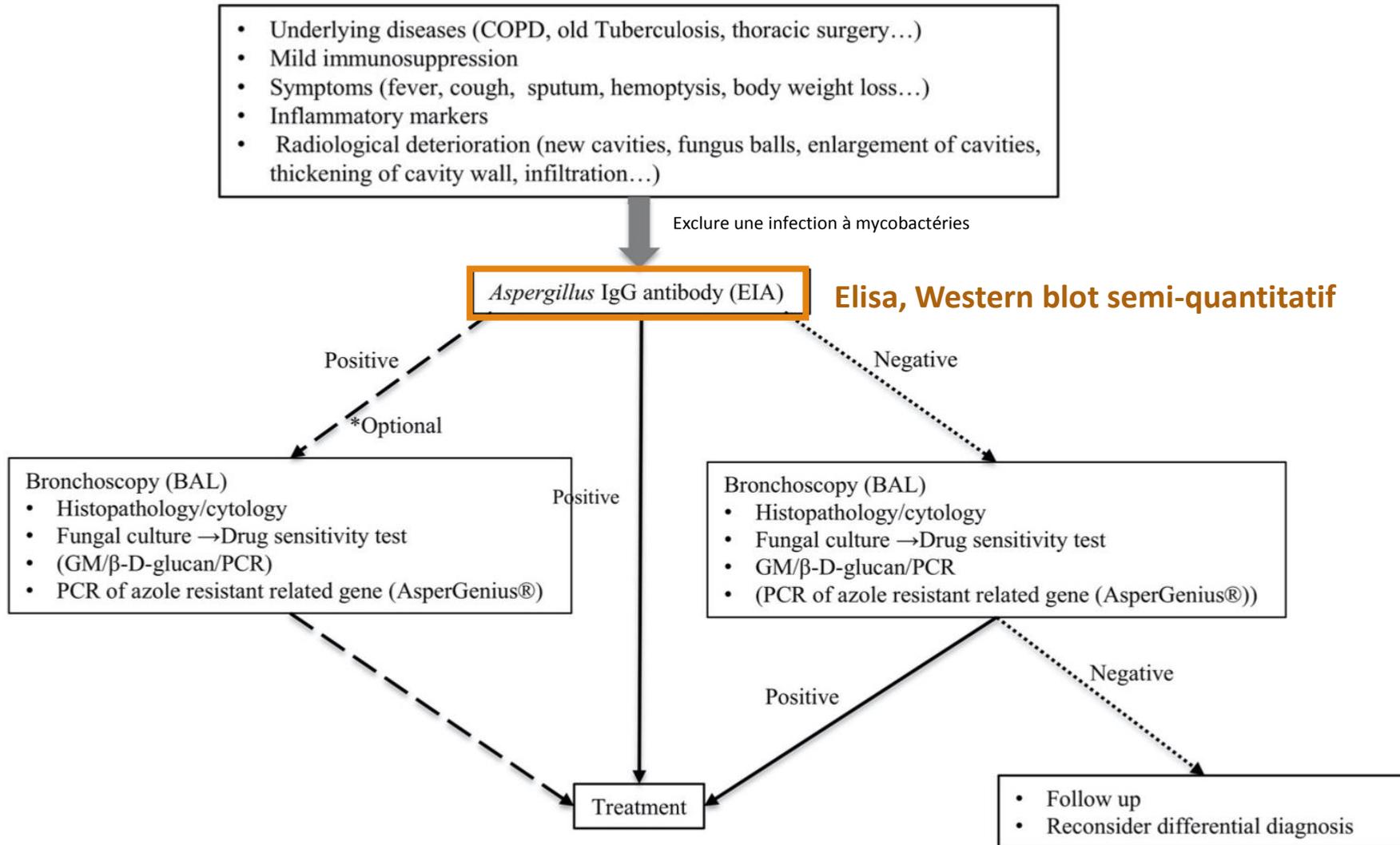
- du temps de DG
- des TT empiriques (exclusion AI, Se 99%)
- incidence des AI prouv. et prob.

Aspergillus-Specific Lateral-Flow Device and Real-Time PCR Testing of Bronchoalveolar Lavage Fluid: a Combination Biomarker Approach for Clinical Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis

Recent Advances in Diagnosing Chronic Pulmonary Aspergillosis

Front Microbiol 2018

Takahiro Takazono^{1,2*} and Koichi Izumikawa¹



| Proposed algorithm for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. BAL, bronchoalveolar lavage.

Mucormycoses

Diagnostic extrêmement difficile Pas de biomarqueurs disponibles

qPCR Diagnosis of Mucormycosis • CID 2013:56 (15 May) • e95

MAJOR ARTICLE

Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection of Circulating DNA in Serum for Early Diagnosis of Mucormycosis in Immunocompromised Patients

Laurence Millon,^{1,2} Fabrice Larosa,³ Quentin Lepiller,^{2,4} Faezeh Legrand,³ Steffi Rocchi,¹ Etienne Daguindau,³
Emeline Scherer,^{1,2} Anne-Pauline Bellanger,^{1,2} Joel Leroy,⁵ and Frederic Grenouillet^{1,2}

 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Journal of Clinical Microbiology®

MYCOLOGY



Quantitative PCR (qPCR) Detection of Mucorales DNA in Bronchoalveolar Lavage Fluid To Diagnose Pulmonary Mucormycosis

Emeline Scherer,^{a,b} Xavier Iriart,^{c,d} Anne Pauline Bellanger,^{a,b} Damien Dupont,^{e,f} Juliette Guitard,^{g,h} Frederic Gabriel,ⁱ
Sophie Cassaing,^{c,j} Eléna Charpentier,^{c,d} Sarah Guenounou,^k Murielle Cornet,^l Françoise Botterel,^m Steffi Rocchi,^{a,b}
Ana Berceanu,ⁿ Laurence Millon^{a,b}

Clinical Microbiology and Infection 22 (2016) 810.e1–810.e8

Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com



Original article

Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF)

L. Millon^{1,2,*}, R. Herbrecht³, F. Grenouillet^{1,2}, F. Morio^{4,5}, A. Alanio^{6,7,8,9},
V. Letscher-Bru^{10,11}, S. Cassaing¹², T. Chouaki^{13,14}, C. Kauffmann-Lacroix¹⁵, P. Poirier¹⁶,
D. Toubas^{17,18}, O. Augereau¹⁹, S. Rocchi², D. Garcia-Hermoso^{7,8}, S. Bretagne^{6,7,8,9},
French Mycosis Study Group

qPCR Mucorales : diagnostic et suivi

- **Outil diagnostique non invasif précoce → tous les patients**
- Etude nationale rétrospective 44 PTs avec différentes formes cliniques de mucormycoses (pulmonaire, rhinocérébrale, cutanée, digestive et disséminée)
 - **3 qPCR ⑨ *Rhizomucor, Lichtheimia, Mucor/Rhizopus* (+ qPCR *Cunninghamella*)**
 - **81% qPCR positive, 92% large volume**
 - qPCR positive 8 j avant DG mycologique, 2-3 j avant signes radiologiques,
 - Suivi thérapeutique (charge fongique)
 - **Valeur pronostique : survie à J84 plus élevée chez PTs avec qPCR négative (48% vs 4%)**
- PHRC national-ModiMucor 2014-A00580-47
- qPCR Mucorales sérique / plasmatique : dépistage systématique des PTs à haut risque (hémopathies malignes, grands brûlés)
- Kits commerciaux (Mucorgenius, PathoNostics ; MycoGENIE *Aspergillus-Mucorales* spp, Ademtech) à évaluer

PCR *Pneumocystis jirovecii*

Outil diagnostique le plus sensible pour détecter *P. jirovecii*

- Cibles = ARNr (mtLSUrRNA), MSG, DHPS, DHFR, HSP70, β -tubuline...
- LBA, Asp bronchique, crachat induit, ECBC, lavage rhino pharyngé, *écouv. nasal*,
- Meilleur format **qPCR** (Charge fongique dépendante du type d'ID)

Apports de la PCR

- **Diagnostic à partir de prélèvements non-invasifs (VIH+)**
 - Eviter les LBA (seul PVT permettant d'**exclure** le diagnostic de PCP **⊖qPCR négative**)
- **Amélioration de sensibilité du diagnostic chez non-VIH**
 - Charge fongiques faibles (LBA)

Enjeux de la qPCR

- **Différencier infection et colonisation**
 - Pas de critères diagnostics consensus (pas de généralisation possible des résultats)

Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients

Alanio A *et al.*, CMI 2011

Détermination d'un cut-off haut et bas

Cut-off haut :

- Sensibilité 85,7%, Spécificité 100%,
- VPP 100%, VPN 98,9%
- Supérieur cut-off haut ☹ Infection

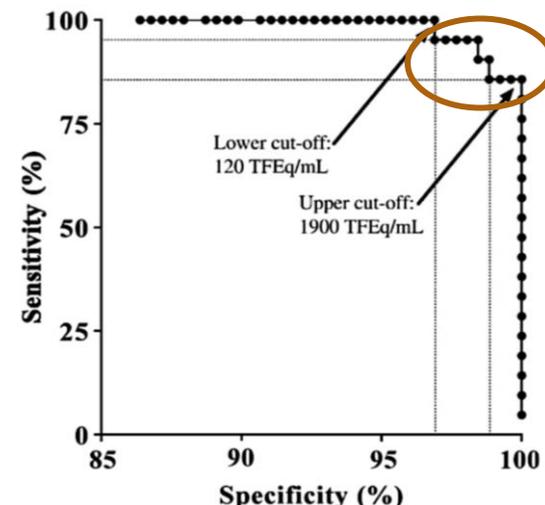
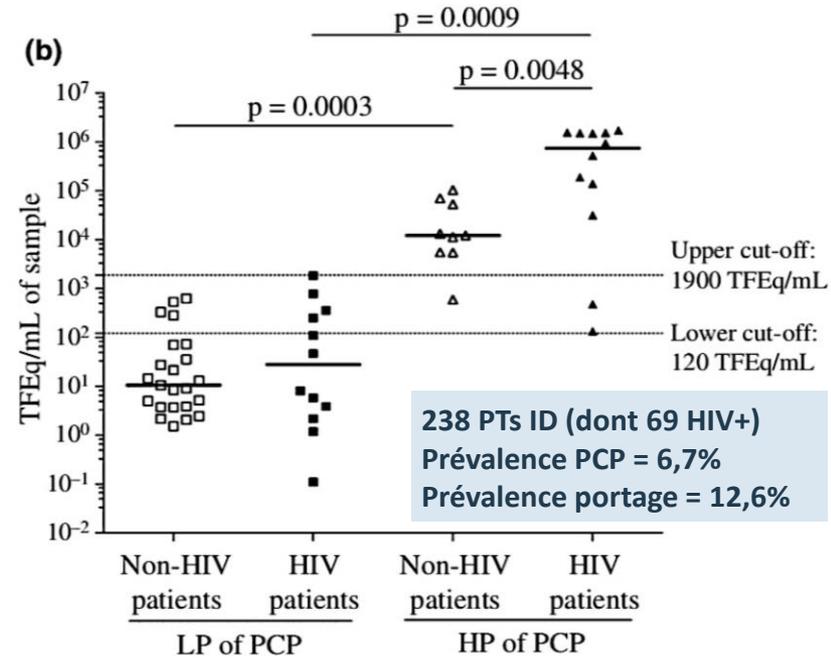
Cut-off bas :

- Sensibilité 100%, Spécificité 96%,
- VPP 72%, VPN 100%
- Inferieur cut-off bas ☹ Colonization

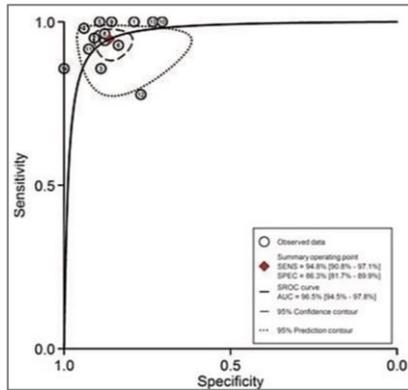
Zone grise ☹ 3,9% des PVTs

Intégrer

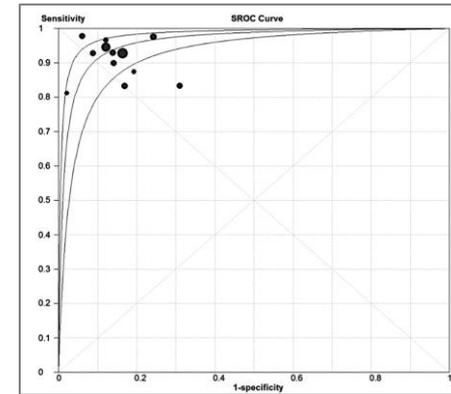
- 1) les FDR
- 2) le niveau de suspicion clinique & radiologique



Place du (1,3)- β -D-glucane dans le diagnostic PCP



Taux médian de BDG =
945 pg/mL
Taux très élevés
(X 10 seuil)



Karageorgopoulos DE *et al.*, CMI 2013

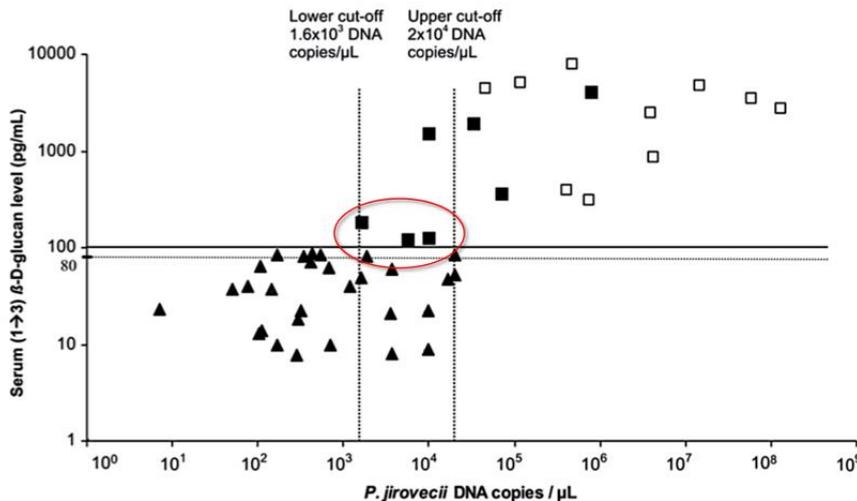
Onishi A *et al.*, JCM 2012

14 études Se 94,8 % ; Sp 86,3 % ; AUC 0,96

12 études Se 96 % ; Sp 84% ; AUC 0,96

β -D-glucane sérique **excellente sensibilité et VPN**

- ✓ screening des PTs à risque et déclencher la recherche de *PJ* quand BDG élevé
- ✓ un résultat négatif permet d'exclure une PCP



Zone grise \odot Traitement ?

Taux \sim 100 pg/mL

(Fungitell seuil positivité 80 pg/mL)

Conclusion

- Disponibilité de tests moléculaires commerciaux pour aider au diagnostic des IFIs → attrait de la PCR fongique (comparable aux tests antigéniques)
- Développement de tests moléculaires pour la détection d'espèces résistantes (ex. *Candida auris*) ou de marqueurs génétiques de résistance (ex. TR34 / L98H chez *A. fumigatus*, mutations *FKS* chez *Candida glabrata*) → pallier aux limites des techniques mycologiques conventionnelles
- Meilleure façon de diagnostiquer les IFIs :
 - Combinaison des tests diagnostiques, y compris la culture
 - Et stratification des facteurs de risque et dépistage des marqueurs génétiques de sensibilité de l'hôte (identification des PTs les plus à risque)
- Le séquençage nouvelle génération ou NGS (appliqué à l'hôte, aux PVTs de l'hôte ou à l'agent fongique) → prochaine décennie

Déclaration de liens d'intérêt avec les industries de santé en rapport avec le thème de la présentation (loi du 04/03/2002) :

 Conférencier interventions ponctuelles : MSD, Pfizer, Gilead

 Prise en charge de frais de congrès ou autres manifestations :
MSD, Pfizer, Gilead, Astellas