



DIAGNOSTIC DES INFECTIONS FONGIQUES INVASIVES

Dr I.ACCOCEBERRY (Bordeaux)

Diagnostic des Infections Fongiques Invasives

I. Accoceberry

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie – CHU Bordeaux

Les infections fongiques invasives (IFI) restent associées à une morbidité et une mortalité importantes, en particulier chez les patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs (USI). Les infections fongiques les plus fréquemment rencontrées sont causées par *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* et *Pneumocystis jirovecii*. Toutefois, on constate une augmentation de la prévalence des infections causées par des espèces de *Candida non albicans*, d'*Aspergillus non fumigatus*, mais aussi par d'autres champignons filamenteux émergents comme les zygomycètes (Mucorales), les *Fusarium spp* et les *Scedosporium spp*. Cette diversité croissante des IFI et la grande hétérogénéité des patients à risque font du diagnostic un défi pour les cliniciens. Le diagnostic de ces infections a toujours été difficile. Il est le plus souvent porté sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et microbiologiques. La faible sensibilité des cultures ainsi que les problèmes d'interprétation entre contamination, colonisation et maladie avérée, ont motivé le développement de biomarqueurs (ADN et antigènes). En parallèle, les méthodes d'identification des espèces fongiques se sont considérablement améliorées.

Diagnostic mycologique conventionnel par culture [1, 2, 3, 4, 5, 6]

Le diagnostic mycologique conventionnel des IFI repose sur la triade classique : examen direct, culture et examen anatomopathologique. L'examen direct est capital car il permet d'orienter rapidement le diagnostic et éventuellement la thérapeutique. La culture (sang, sites profonds) reste la technique diagnostic de référence. Elle permet de prouver l'infection, d'isoler et d'identifier l'espèce responsable et de déterminer sa sensibilité *in vitro* aux antifongiques. Pour les tissus prélevés par biopsie l'analyse anatomo-pathologique est également primordiale pour affirmer le caractère invasif.

Pour le diagnostic des IFI à levures, notamment celui des candidoses invasives (CI), les hémocultures restent l'examen le plus accessible. Il est essentiel de les répéter en optimisant le volume de sang prélevé et en privilégiant les flacons dédiés à la recherche des agents fongiques. Pour les infections disséminées à champignons filamenteux, en particulier à *Aspergillus spp*, l'hémoculture est d'une rentabilité quasi nulle. Font exception à cette règle les infections à *Fusarium spp* et à *Scedosporium spp*, que l'on peut diagnostiquer dans près de 60% des cas par hémocultures. L'analyse du LBA est réalisée en cas de suspicion d'infection pulmonaire profonde, afin de confirmer l'origine fongique de l'infection. Les moisissures opportunistes ainsi que *Cryptococcus neoformans* et *Pneumocystis jirovecii* seront recherchés en priorité.

L'identification rapide et précise au niveau de l'espèce est indispensable pour la mise en œuvre précoce d'un antifongique adapté à l'espèce responsable de l'IFI. La spectrométrie de masse (SM) de type MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight*) s'est donc rapidement imposée comme un outil de choix. Si les méthodes conventionnelles d'identification des différents champignons microscopiques se basent sur leurs aspects phénotypiques et/ou morphologiques, la SM MALDI-TOF analyse directement leurs protéines membranaires et ribosomales. Grâce à l'expansion et au raffinement continus des bases de données, la SM MALDI-TOF est capable de différencier précisément les espèces au sein des sections et des complexes d'espèces. Elle permet d'atteindre des performances comparables à celles obtenues par l'identification moléculaire (technique de référence nécessitant parfois le séquençage de plusieurs loci spécifiques pour atteindre un tel niveau de discrimination) avec un réel gain de temps technique et de délai de rendu des résultats. L'identification directe des levures à partir des flacons d'hémoculture, est également possible.

Cependant, le diagnostic par culture manque de sensibilité et reste tardif même si le délai d'identification de l'espèce s'est considérablement réduit depuis l'introduction de la SM MALDI-TOF. De plus, les cultures de tissus ou de sites profonds sont limitées par la nécessité d'interventions invasives et leur faible sensibilité liée à la répartition inégale des organismes viables. Or, il a été clairement établi que le délai d'initiation du traitement antifongique a un impact significatif sur la mortalité. De plus en plus de données supportent le recours à un ou plusieurs biomarqueurs comme modalités diagnostiques, pour dépister ou confirmer une IFI. La standardisation de ces tests ainsi que l'amélioration et la validation d'algorithmes diagnostiques sont devenues une priorité.

Biomarqueurs

Candidoses invasives [1, 2, 7]

Parmi les patients atteints de CI hospitalisés en USI, les deux tiers ont une candidémie et 80% des patients non candidémiques ont une candidose intra-abdominale. Bien qu'une candidurie soit documentée chez environ 20% des patients en USI, une infection tissulaire associée ou une candidémie secondaire survient dans moins de 5% des cas. Dans le cadre des CI, de nouveaux outils diagnostiques non basés sur la culture ont été développés afin d'améliorer la précocité du diagnostic et la spécificité des modèles prédictifs cliniques. Ils permettent la détection dans le sang des composants de la paroi cellulaire fongique (mannanes, β -D-glucane), d'anticorps [anti-mannanes, anti-mycélium (CAGTA)] ou de l'ADN. Leurs performances varient quelque peu selon le type de patient, de CI, le nombre de prélèvements positifs requis, le seuil de positivité choisi.

Le (1,3)- β -D glucan (BDG) est un composant polysaccharidique majeur de la paroi de la plupart des champignons à l'exception des zygomycètes et de *Cryptococcus spp.* Il se positive très précocement au cours de l'infection et constitue un biomarqueur sensible mais non spécifique (positif dans les CI, l'aspergillose invasive et la pneumocystose). L'utilisation du BDG en complément des modèles prédictifs est incluse dans les recommandations de plusieurs sociétés savantes et le Fungitell® (Cape Cod) est approuvé par la FDA. Le seuil de positivité préconisé est de 80 pg/mL, mais plusieurs causes de fausse positivité ont été décrites : dialyse avec membrane de cellulose, infections bactériennes à Bacilles Gram-négatifs et à streptocoques, albumine, antibiotiques tels que l'amoxicilline-acide clavulanique, immunoglobulines intraveineuses. Dans 5 études menées chez des patients non neutropéniques présentant une candidémie et/ou une candidose intra-abdominale documentée (la plupart étaient des patients chirurgicaux), la sensibilité et la spécificité du BDG se situaient entre 51 et 100%, et 59 et 98,4% respectivement. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque deux tests consécutifs sont positifs. Dans 3 études, la VPN dépassait 75%. Chez les patients subissant en urgence une intervention chirurgicale pour une infection intra-abdominale, le BDG est le seul biomarqueur dont le taux sérique est corrélé avec un diagnostic de CI prouvée. La valeur diagnostique du BDG dans le contexte de la réanimation médicale, est moins convaincante, peut être en raison de la plus forte exposition aux causes de fausse positivité. En USI, un seuil de positivité du BDG de 80 pg/mL est très sensible (> 90%), mais non spécifique (30-50%) et des seuils de positivité plus élevés, de 250 pg/mL ou plus ont été proposés. Le principal avantage diagnostique du BDG est sa bonne VPN dans lorsque la prévalence de CI est faible à modérée.

L'antigène mannane, polysaccharidique de la paroi des *Candida spp* est un biomarqueur spécifique, mais peu sensible pour le diagnostic des CI et qui se positive plus tardivement que le BDG. L'utilité du CAGTA (*Candida albicans* IgG®, VIRCELL) dans le diagnostic de candidémie associée à une infection profonde a été récemment documentée, avec une spécificité et une valeur prédictive positive (VPP) de 95%.

La recherche d'ADN de levures à partir du sang pour le diagnostic des candidémies est le sujet de nombreuses publications. Une méta-analyse concernant les différentes techniques de PCR a évalué la sensibilité et la spécificité globales à 95% et 92% respectivement. Une meilleure sensibilité était retrouvée avec les gènes codant pour l'ADNr (régions 18S mais également 5,8S et 28S) et le cytochrome P450. Dans une étude conduite chez des patients atteints de CI (candidémies, candidoses profondes ou infections mixtes), la PCR sur plasma ou sérum s'est avérée plus sensible que le BDG pour le diagnostic des CI (80% vs 56%), avec une spécificité comparable (70% vs 73%). La performance des 2 tests était identique pour le diagnostic des candidémies mais la PCR était significativement plus sensible que le BDG dans les candidoses profondes (89% vs 53% vs 17% pour

les hémocultures). Dans une étude plus récente incluant des patients hospitalisés en USI avec une suspicion de CI, la spécificité et la VPP d'une PCR multiplex en temps réel étaient significativement plus élevées que celles du BDG et du CATGA. Des tests commerciaux sont également sur le marché, comme la PCR multiplex Light-Cycler® Septifast Test (Roche) détectant également des bactéries et le T2 Candida (T2Biosystems) récemment approuvé par la FDA et associant PCR et résonnance magnétique. Ces 2 techniques permettent la détection des 5 principales espèces de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*). Une méta-analyse a rapporté pour le Septifast une sensibilité médiocre de 48-72% mais une spécificité de 99%. L'utilité du T2 Candida a été démontrée dans des études multicentriques récentes avec une sensibilité et une spécificité globales de 91% et 94%, un délai de positivité de 4,4 heures, une limite de détection de 1 à 3 UFC / mL et une valeur prédictive négative (VPN) estimée à 99,5% et 99% pour une prévalence de candidémie de 5% et 10% respectivement. Certains auteurs ont souligné la supériorité du T2 Candida par rapport à l'hémoculture dans le suivi de patients présentant une candidémie prouvée et ont donc suggéré que ce test pourrait s'avérer utile en dépistage chez les patients recevant un traitement antifongique empirique et pour interrompre le traitement empirique en cas de résultat négatif. Son positionnement par rapport aux outils actuels reste à préciser, le coût (300 euros/test) étant pour le moment un facteur limitant.

L'absence de standardisation des techniques et d'essais prospectifs multicentriques est toutefois un frein à l'utilisation de la PCR qui n'est pas recommandée pour le diagnostic des CI et aucun consensus ne semble se dégager à l'heure actuelle.

Le diagnostic des CI reste difficile notamment pour les localisations profondes pour lesquelles les hémocultures sont souvent négatives. Aucune des stratégies diagnostiques n'étant parfaite, il est donc nécessaire de combiner la recherche des biomarqueurs pour obtenir une fiabilité et une précocité optimales ou d'utiliser leurs excellentes VPN pour exclure la CI et justifier l'arrêt du traitement antifongique.

Cryptococcose [3]

La détection de l'antigène polysaccharidique capsulaire glucuronoxylomannane est majeure pour le diagnostic, le pronostic et le suivi des cryptococcoses, avec des performances excellentes en termes de sensibilité et de spécificité (98% et 95% respectivement) pour la quasi-totalité des tests commercialisés (ELISA, agglutination, immunochromatographie). Les liquides biologiques validés pour la détection de l'antigène sont le LCR, le sérum ou le plasma. Une recherche peut néanmoins être réalisée si besoin dans un LBA, un liquide pleural ou une humeur aqueuse.

Aspergillose pulmonaire invasive [2, 4, 7, 8]

L'antigène galactomannane (GM) est une pierre angulaire du diagnostic de l'AI, loin devant le BDG, dont la spécificité est faible en raison de sa nature panfongique. Le GM est un polymère de mannose et de galactose présent dans la paroi des *Aspergillus spp* et excrété durant la phase exponentielle de croissance du champignon. Sa détection s'effectue principalement dans le sérum et le LBA mais est également possible dans le LCR et repose sur un test commercial de type EIA (Platelia® *Aspergillus* Ag, Bio-Rad). Les performances du GM pour le diagnostic d'AI ont été évaluées dans de nombreuses études et résumées dans plusieurs méta-analyses. Une hétérogénéité importante des résultats a été observée, en fonction du type d'étude (cohortes vs cas-témoins), du type de patients (onco-hématologie vs autres), de la stratégie diagnostique (dépistage ou tests ponctuels), des critères de définition d'un test positif (seuil de positivité, nombre de tests positifs) et de la définition de l'AI (utilisation des critères de définitions EORTC-MSG et inclusion ou non des cas d'AI possibles).

Quel patient doit être testé ?

Pour une sensibilité et une spécificité données, les VPP et VPN du test dépendent de la prévalence de la maladie dans une population définie et/ou de la probabilité pré-test de l'AI chez un individu donné.

Le GM sérique joue donc un rôle dans le diagnostic de routine de l'AI chez les patients atteints d'hémopathies malignes à haut risque (leucémies aiguës myéloblastiques, myélodysplasies et allogreffes de cellules souches hématopoïétiques, soit pendant la neutropénie initiale, soit au cours de la maladie du greffon contre l'hôte). Sa spécificité est satisfaisante ($\geq 90\%$) mais sa sensibilité plus faible (60% à 80%). Deux GM positifs sur deux sérums consécutifs améliore encore la spécificité (95% à 99%), avec une légère perte de sensibilité. Cependant, la sensibilité du GM sérique est nettement diminuée (40% ou moins), chez les greffés d'organes solides ou les patients non neutropéniques présentant un risque faible ou modéré d'AI, ce qui peut s'expliquer par l'angio-invasion limitée chez ces patients présentant une meilleure défense immunitaire. La détection du GM dans ces populations doit donc être déterminée sur la base d'une évaluation individuelle de la probabilité pré-test de l'AI en fonction des facteurs de l'hôte et des signes cliniques.

Quand et comment effectuer le test ?

On peut distinguer deux stratégies diagnostiques pour le GM sérique :

- (1) réalisation de tests ponctuels sur plusieurs sérums consécutifs en cas de suspicion clinique d'AI (par exemple, constatation d'anomalies radiologiques compatibles avec une AI) pour préciser le diagnostic,
- (2) dépistage systématique deux à trois fois par semaine en l'absence de signes dans les populations sélectionnées de patients à haut risque (neutropénie profonde, GVH). Dans ce dernier scénario, un test positif constitue le premier indice de la maladie et doit déclencher un bilan diagnostique plus approfondi, notamment un scanner thoracique et une bronchoscopie. Actuellement, l'utilisation

répandue d'une prophylaxie efficace contre les moisissures affecte les performances du GM sérique par la très faible probabilité pré-test d'IFI. Dans ces conditions, la stratégie de dépistage sur sérum habituellement proposée en hématologie chez les patients à haut risque d'AI semble devenir inefficace et pourrait ne plus être recommandée. Si le GM sérique est alors utilisé comme test diagnostique de confirmation dans cette population, il faudra peut-être réévaluer le seuil de positivité. Le GM sérique est également un marqueur pronostique. Une diminution ou une augmentation du taux de GM peut être le premier indicateur du succès ou de l'échec thérapeutique, respectivement. Il est donc recommandé de surveiller chaque semaine le taux de GM pendant le traitement antifongique de l'AI jusqu'à atteindre un index < 0,5.

Le GM dans le LBA est un bon marqueur diagnostique, avec une sensibilité de 85% et une spécificité de 90% à 95%, y compris chez les greffés d'organes solides (en particulier les greffés de poumon) et les patients d'USI. La sensibilité et la spécificité du GM dans le LBA étant plus élevées que celles rapportées dans le sérum, il faut systématiquement détecter le GM dans le LBA de tous les patients ayant bénéficié d'une bronchoscopie pour suspicion d'AI pulmonaire sur la base de la tomодensitométrie. Le seuil de positivité est toujours discuté, mais un index < 0,5 exclut pratiquement le diagnostic, tandis qu'un index > 3 a une VPP proche de 100%. Bien que l'aspergillose cérébrale soit une maladie rare, la détection du GM dans le LCR doit également être systématique dans ce contexte.

Les traitements par certains lots d'antibiotiques d'origine fongique (amoxicilline-acide clavulanique, ampicilline), la perfusion de solutions contenant du gluconate de sodium, les transfusions de plasma frais congelé ou de concentrés plaquettaires sur certains types de poches, la translocation digestive de GM d'origine alimentaire en cas d'altération des muqueuses peuvent être responsables de résultats faussement positifs. La production de GM n'est pas l'apanage des *Aspergillus spp*, des réactions croisées avec d'autres espèces fongiques sont décrites (*Penicillium spp*, *Fusarium spp*, *Geotrichum spp*, *Trichosporon spp* et *Histoplasma capsulatum*). Plus qu'un désavantage, cela permet d'évoquer d'autres pathologies en fonction du contexte clinique.

Récemment, un test immuno-chromatographique spécifique d'*Aspergillus spp* a été développé, Aspergillus lateral flow device (LFD). Il permet la détection d'une glycoprotéine extracellulaire sécrétée uniquement pendant la phase de croissance directement dans le sérum ou dans le LBA. Les principaux avantages de ce test sont la simplicité et la rapidité d'exécution (15 minutes). Selon une méta-analyse récente, les performances de l'Aspergillus LFD sont comparables à celles du GM, avec une sensibilité et une spécificité globale de 68% et 87% sur le sérum et de 86% et 93% sur le LBA. Les performances sur le LBA ont également été évaluées chez des patients d'USI et des transplantés d'organe solide avec une sensibilité similaire (80%–90%), mais une spécificité plus faible (80%–85%).

Malgré ces résultats très prometteurs, peu de centres utilise en routine l'*Aspergillus* LFD, qui n'a pas encore été approuvé par la FDA ou le comité EORTC-MSG.

De nombreuses techniques de PCR ciblant diverses séquences génétiques (ADNr 18S, 28S, 5.8S, ITS, ADN mitochondrial) ont été mises au point pour la détection d'ADN circulant d'*Aspergillus spp* dans le sang total, le sérum, le plasma ou le LBA. Leurs performances pour le diagnostic d'AI sont très variables d'une étude à l'autre selon la population étudiée et la nature du prélèvement testé. L'extrême hétérogénéité des tests et l'absence de standardisation ont été un frein à son expansion et son intégration dans les critères diagnostiques d'AI. Depuis 2006, un consortium européen (EAPCRI) travaille à la recherche d'un consensus technique. Ce consensus a été possible grâce à la généralisation de la PCR quantitative en temps réel (qPCR), qui réduit considérablement le risque de contamination par les amplicons environnementaux et permet une gestion quantitative de la réaction d'amplification évitant ainsi les faux négatifs. L'extraction d'ADN sur un volume de plasma ou de sérum (le plasma serait préférable) au moins égal à 1 mL, ainsi que l'utilisation de l'ADN ribosomique comme cible permettent de compenser la faible quantité d'ADN circulant et montrent des résultats particulièrement intéressants. De plus, différentes PCR multiplex en temps réel commerciales, AsperGenius (PathoNostics), SeptiFast (Roche), MycAssay *Aspergillus* (Myconostica), RenDx Fungiplex (Renishaw Diagnostics), MycoGENIE (Ademtech) validées pour le sang, le LBA et même les biopsies (MycoGENIE) sont maintenant disponibles, certaines d'entre elles (AsperGenius, MycoGENIE) permettant même la détection des mutations de résistance aux azolés chez *A. fumigatus*.

Les performances de la PCR semblent au moins aussi bonnes que celles du GM, avec une sensibilité de 84-88% dans le sang et de 76,8-79,6% dans le LBA et une spécificité de 75-76% et de 93,7-94,5%. L'absence des deux biomarqueurs (c'est-à-dire, le GM et l'ADN circulant) pourrait suffire à retarder le traitement antifongique. Comme pour le GM, on ne sait toujours pas si la PCR doit être utilisée comme test de dépistage ou comme test diagnostique de confirmation à l'ère de la prophylaxie active anti-moisissure.

Dès que la PCR a été développée pour le diagnostic de l'AI, l'intérêt d'associer la détection du GM et de l'ADN circulant a été évalué. Une méta-analyse récente a montré que l'association des deux tests suggère fortement une infection active avec une VPP de 88%. Par rapport au GM seul, un dépistage combiné de l'ADN et du GM sérique s'est avérée efficace pour réduire l'incidence de l'AI et le délai du diagnostic chez les patients d'hématologie à risque élevé. Ce fait suggère que « l'ADNémie » précède le relargage du GM fongique dans la circulation. Par conséquent, une stratégie diagnostique combinant PCR et GM semble très intéressante. L'utilisation combinée du LFD, au lieu du GM, et de la qPCR semble être une meilleure stratégie avec une sensibilité et une spécificité de 100%.

Pneumocystose [6, 9]

La PCR est l'outil le plus sensible pour détecter *P. jirovecii*. La PCR en temps réel (qPCR), est le seul format de PCR assurant à la fois un taux faible voire nul de fausse positivité et une quantification de la charge fongique. La microscopie (immunofluorescence) est beaucoup moins sensible que la qPCR, et il est fréquent d'avoir un examen direct négatif pour des échantillons contenant de grandes quantités d'ADN, en particulier chez les patients non infectés par le VIH. En effet, le type d'immunosuppression influence la charge fongique associée à la pneumocystose (PCP). Chez les patients VIH-positif la charge fongique est beaucoup plus importante et le taux de mortalité moins élevé (17-30%) que chez les patients non infectés par le VIH chez lesquels la charge fongique est plus faible mais associée à une mortalité élevée (28 à 58%). Ceci suggère fortement que le statut immunitaire de l'hôte détermine la capacité à contrôler la PCP et la présentation clinique. La quantification de l'ADN est donc de la plus haute importance pour évaluer le risque de PCP et par conséquent, un résultat de qPCR doit fournir une quantification, qui doit être interprétée en fonction de la pathologie sous-jacente et de la présence de facteurs de risque. En France, des techniques de qPCR dites « maison » ou commerciales sont largement utilisées par les laboratoires spécialisés. Les cibles les plus fréquemment amplifiées sont des gènes multicopies tels que le MSG (major surface glycoprotein) ou le mtLSU rRNA (mitochondrial large subunit ribosomal RNA).

La quantification de l'ADN dépend fortement du type et de la qualité de l'échantillon respiratoire. Le LBA est le prélèvement essentiel pour le diagnostic de PCP puisque que c'est l'échantillon dans lequel la charge fongique est la plus importante. Il est donc désormais admis qu'une PCR négative sur un LBA de bonne qualité (défini sur la présence de cellules macrophagiques et de pneumocytes), permet d'exclure le diagnostic. La détection de *P. jirovecii* peut être réalisée dans d'autres prélèvements respiratoires tels que des biopsies pulmonaires ainsi que des prélèvements moins invasifs comme les expectorations induites ou spontanées, les aspirations nasopharyngées en particulier chez les nourrissons, des écouvillonnages nasaux et même des rinçages oropharyngés. L'absence de détection de *P. jirovecii* dans ces prélèvements n'exclut pas le diagnostic.

En raison de la sensibilité élevée de la qPCR, un résultat positif ne suffit pas à affirmer le diagnostic de PCP, de faibles charges fongiques pouvant être détectées par PCR chez des patients ne présentant pas de PCP. En l'absence de consensus, un seuil d'interprétation fondé sur l'évaluation clinico-biologique de sa propre technique de qPCR peut être proposé par le Laboratoire afin d'aider les cliniciens à faire le diagnostic différentiel entre PCP et colonisation.

Deux méta-analyses récentes qui ont évalué les performances du BDG sérique dans le diagnostic de la pneumocystose rapportent une sensibilité et une spécificité globales de 96% (92%-98%) et 84% (83%-86%). Etant donné sa forte VPN, un dosage négatif de BDG sérique présente un intérêt pour

exclure une PCP chez le patient à risque surtout lorsqu'une bronchoscopie n'est pas réalisable. Cependant, en raison de sa nature panfongique et de l'existence de faux positifs, il ne peut pas se substituer à l'examen microscopique ou à la qPCR qui doivent rester au premier plan pour confirmer un diagnostic de PCP.

Certains auteurs ont proposé de coupler BDG et qPCR afin de discriminer infection et colonisation. En effet, il a été démontré qu'il existait une corrélation entre la charge fongique détectée par qPCR dans les échantillons respiratoires et le taux de BDG dans le sérum. Cependant, lorsque des charges fongiques faibles ou intermédiaires sont détectées, des taux bas ou intermédiaires de BDG sont observés, ce qui suggère que le BDG n'a pas de valeur ajoutée pour la prise de décision clinique.

Mucormycoses [2, 4, 7, 10]

Les techniques de biologie moléculaire ont considérablement amélioré le diagnostic et la prise en charge des mucormycoses. L'amplification par PCR et le séquençage ont d'abord été utilisés pour mieux identifier les isolats issus de cultures de biopsies ou de LBA collectés chez des patients infectés, puis par la suite pour détecter et/ou identifier le champignon directement à partir des tissus infectés ou du LBA, notamment lorsque les cultures étaient négatives. Plusieurs techniques ciblant différents loci (ARNr 18S, 28S, ITS, gène FTR1, cytochrome b) ont été validées pour l'identification de Mucorales au niveau de l'espèce, y compris les espèces rares et sans caractéristiques morphologiques typiques. Cependant, cette approche diagnostique nécessite un échantillonnage invasif (biopsie, LBA), ce qui n'est pas toujours réalisable chez les patients fragilisés d'hématologie ou d'USI.

Très récemment, des techniques de qPCR pour détecter l'ADN de Mucorales dans des échantillons non invasifs, tels que le plasma ou le sérum, ont été mises au point et permettent de diagnostiquer la mucormycose à un stade précoce (8 jours avant le diagnostic mycologique et 3 jours avant l'imagerie) chez tous les patients, quel que soit leur statut clinique, et cette procédure est devenue essentielle pour une prise en charge thérapeutique optimale. Ainsi, une qPCR mise au point par l'équipe de mycologie du CHU de Besançon, consiste en la réalisation de 3 qPCR reposant sur une technologie TaqMan® qui ciblent quatre genres différents de Mucorales parmi ceux les plus fréquemment isolés en France : *Lichtheimia* (anciennement *Absidia*), *Rhizomucor*, *Rhizopus* et *Mucor*, sans distinction possible entre les deux derniers genres dont les séquences génétiques sont très proches. L'ADN peut être extrait à partir de différents prélèvements, notamment sérum et plasma, mais également LBA, biopsies, liquides biologiques divers La sensibilité de la PCR sur sérum est estimée à 81%-92%. La détection d'ADN circulant peut manquer de sensibilité chez les patients ayant une infection très localisée et lorsque le volume d'extraction est inférieur à 1 ml.

Les mucormycoses et les aspergilloses sont des affections similaires du point de vue clinique et radiologique mais dont le traitement antifongique est différent. Les techniques moléculaires permettent de distinguer les deux infections et de détecter les infections mixtes Mucorales-*Aspergillus*. De plus, les genres ou espèces de Mucorales diffèrent par leur sensibilité *in vitro*, en particulier au posaconazole et à l'isavuconazole, les CMI les plus basses étant observées pour certaines espèces de *Rhizopus*. Les techniques moléculaires peuvent donc également permettre précocement la mise en œuvre d'un traitement adapté en identifiant avec précision le genre de la mucorale en cause.

En outre, la quantité sérique d'ADN circulant peut constituer un outil de suivi en évaluant la charge fongique, qui reflète l'évolution de la mucormycose. Une qPCR sérique négative est associée à un meilleur pronostic par rapport à une qPCR qui reste positive sous traitement antifongique. Par ailleurs, plusieurs équipes suggèrent que la qPCR Mucorales sérique / plasmatique puisse être utilisée pour dépister systématiquement les patients à haut risque atteints d'hémopathies malignes et les patients gravement brûlés.

Des kits commerciaux (MycoGENIE *Aspergillus*-Mucorales spp, Ademtech ; Mucorgenius, PathoNostics) sont maintenant disponibles, mais leur performance clinique doit être évaluée. Un consortium FPCRI travaille pour améliorer la standardisation et fournir des recommandations, comme cela a été fait pour les PCR *Aspergillus*.

Références

1. Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* 2018; 56: e01909-17.
2. Colombo AL, de Almeida JN, Slavin MA, Chen S, Sorrell TC. *Candida* and invasive mould diseases in non-neutropenic critically ill patients and patients with haematological cancer. *Lancet Infect Dis* 2017; 17: e344–56.
3. Boyer Chammard T, Temfack E, Lortholary O, Alanio A. Diagnostic and therapeutic strategies in cryptococcosis: impact on outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2018; Vol. 113(7): e180050.
4. Lamoth F, Calandra T. Early diagnosis of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72 Suppl 1: i19–i28.
5. Skiada A, Lass-Flörl C, Klimko N, Ibrahim A, Roilides E, Petrikos G. Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis. *Medical Mycology*, 2018; 56, S93–S101.
6. White PL, Backx M, Barnes RA. Diagnosis and management of *Pneumocystis jirovecii* infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2017; 15(5):435-447.
7. Patterson TF, JP Donnelly. New Concepts in Diagnostics for Invasive Mycoses: Non-Culture-Based Methodologies. *J. Fungi* 2019; 5, 9.
8. Lamoth F. Galactomannan and 1,3-β-D-Glucan Testing for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J. Fungi* 2016; 2, 22.
9. Alanio A, Bretagne S. *Pneumocystis jirovecii* detection in asymptomatic patients: what does its natural history tell us? *F1000Research* 2017; 6(F1000 Faculty Rev):739.
10. Millon L, Scherer E, Rocchi S, Bellanger AP. Molecular Strategies to Diagnose Mucormycosis. *J. Fungi* 2019; 5, 24.