

Manifestations cliniques et diagnostic des aspergilloses invasives

Stéphane Bretagne

Hôpital Henri Mondor, Université Paris 12

Centre National de Référence Mycologie et Antifongiques



Société Tunisienne de Pathologie Infectieuse, 25 avril 2009, Tunis

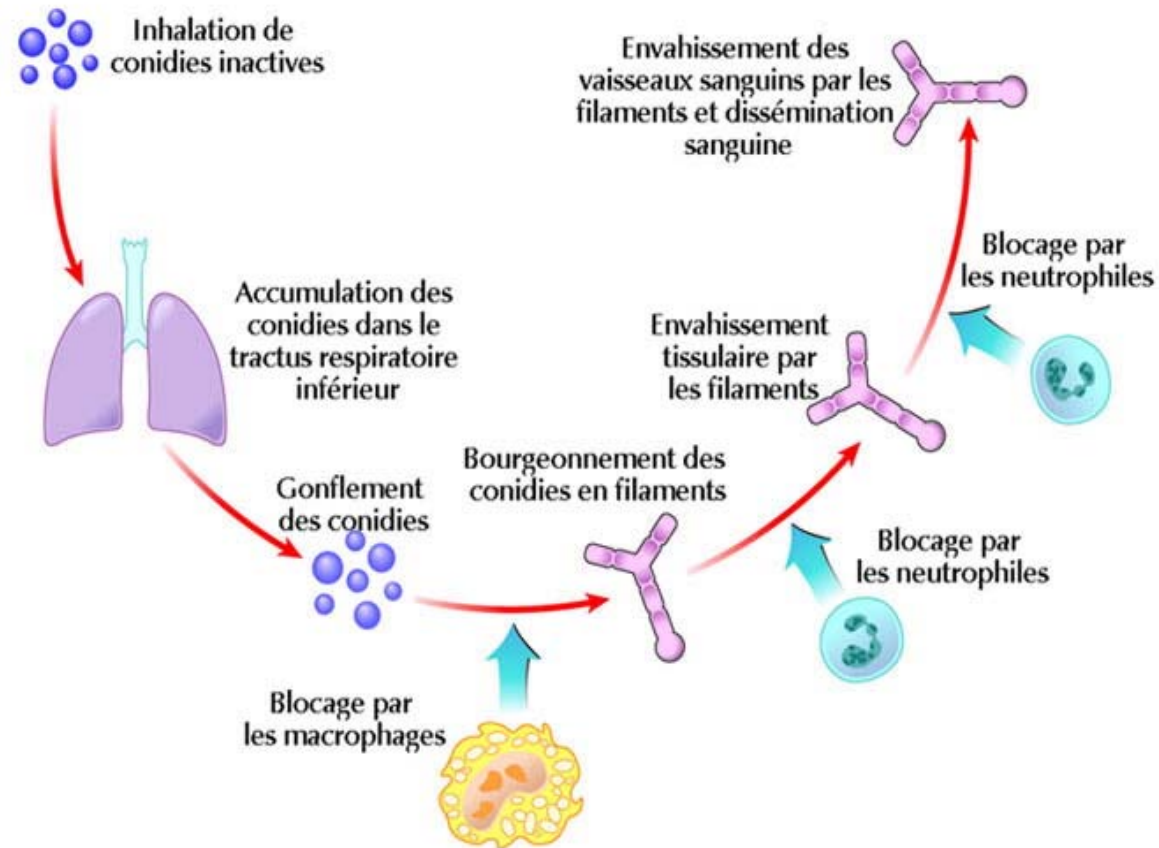
Physiopathologie

■ *Aspergillus* spp.

- Décomposition des végétaux
- Production de spores
- Infections exogènes (inhalation)
- Transmission nosocomiale aérienne
- Environ 200 espèces
- Espèces en pathologie humaine: *A. fumigatus* (80-90%), *A. flavus* (5-10%), *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus* (<5%)
- « Ready made virulence »



A. fumigatus et voies respiratoires



Wasylnka and Moore. 2003; Gil-Lamaignere, Winn et al. 2005

Où sont les Aspergilloses invasives (AI) dans les hôpitaux?

- **85% Hématologie**

- Allo: 10-15%
- LA: 5-10%
- Auto < 5%

- **10% Transplantation d'organe**

- Cœur, poumons > foie > rein

- **5% Autres**

- Stéroïdes (LED, pathologies respiratoires, réanimation ...)

Facteurs de risque

■ Neutropénie

- < 500 PNN/mm³
- > 10 jours

■ Stéroïdes

- > 0.3 mg/kg/j x > 60 j

■ Autres

- Immunosuppresseurs
- Anti-TNF

Tendances épidémiologiques

- Survenue plus tardive / greffe
- Augmentation
 - Hémopathies lymphoïdes
 - Réanimation
 - Stéroïdes comme facteurs de risque/neutropénie
- Variations
 - Pays, centres, méthodes diagnostiques
- Susceptibilité génétique (TLR4)
 - Bochud et al, NEJM, 2008

Diagnostic de l'aspergillose invasive

- Difficile
- Nombreux critères
- Collaborations

Les définitions consensuelles (EORTC/MSG) pour les infections fongiques invasives

- 3 niveaux de preuves: PROUVE, PROBABLE, possible
- Probable: 3 catégories d'arguments
 - Facteurs d'hôtes
 - Neutropénie, stéroïdes, T-cell immunosuppresseurs ...
 - Allogreffe, déficit congénital
 - Radiologiques
 - Nodules, halo, croissant, cavité
 - Microbiologiques
 - Direct ou culture + dans expectoration, LBA, sinus ...
 - Galactomannane plasma, sérum, BAL, CSF

Ascioglu et al. Clin Infect Dis 2002
De Pauw et al Clin Infect Dis 2008

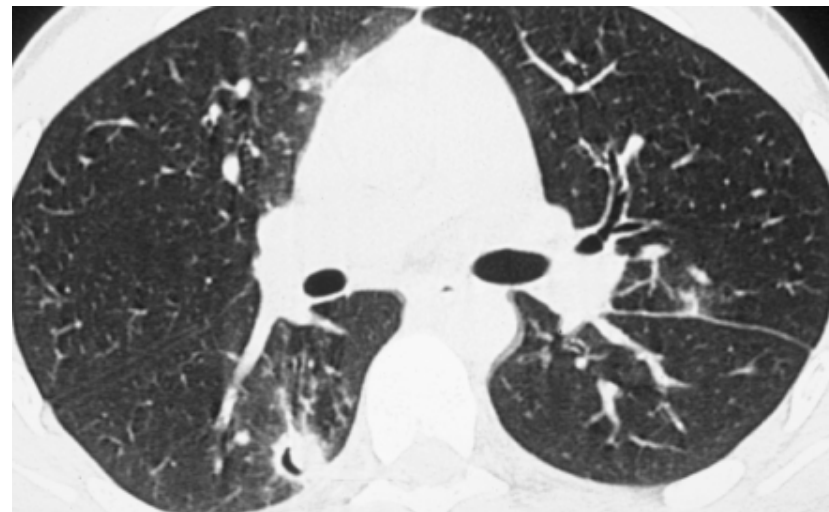
Clinique

- Nécrose
- Douleurs



Scanner

- Halo précoce
- Condensation, nécrose plus tardive



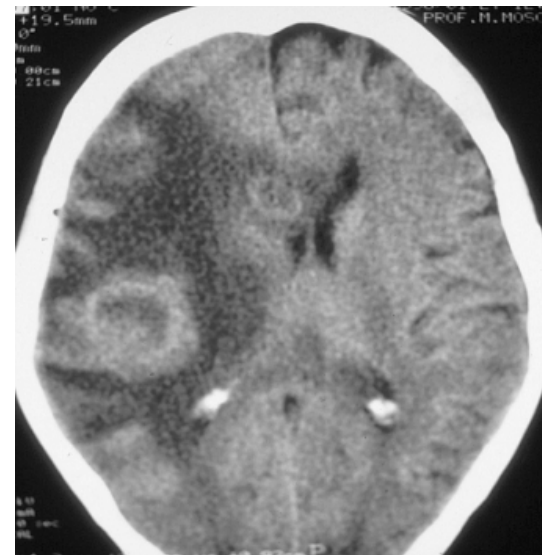
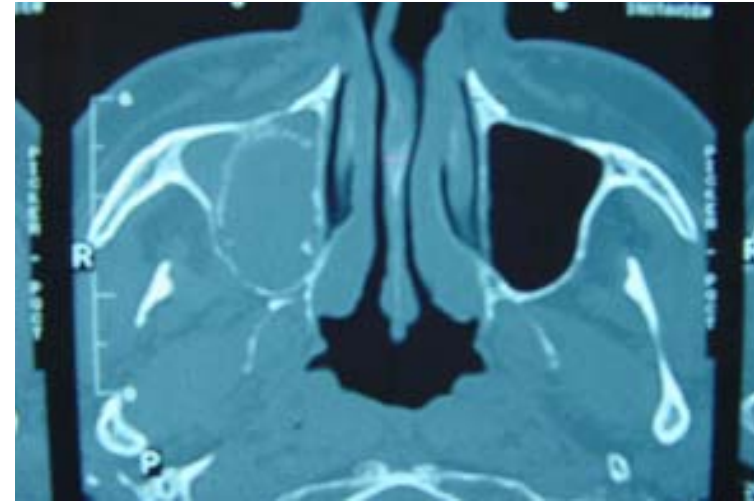
Scanner

■ Sinus

- Deuxième localisation
- Recherche +/- systématique

■ Atteinte cérébrale

- Mauvais pronostic



Arguments "microbiologiques"

- Biopsies
- LBA :
 - 50% de faux négatifs
 - Signification d'une culture positive?
- Expectoration: bonne valeur prédictive positive 82% pour les greffés de moelle
- Hémoculture: jamais (sauf *Fusarium* sp.)
- Méthode indirectes
 - Ag (galactomannane, glucane)
 - PCR

Biopsie

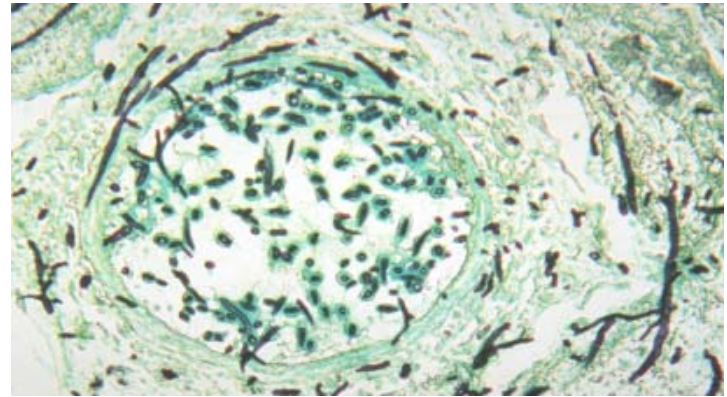
■ A: « Invasion »

- Filaments intravasculaires
- Formes indicatives de l'espèce fongique

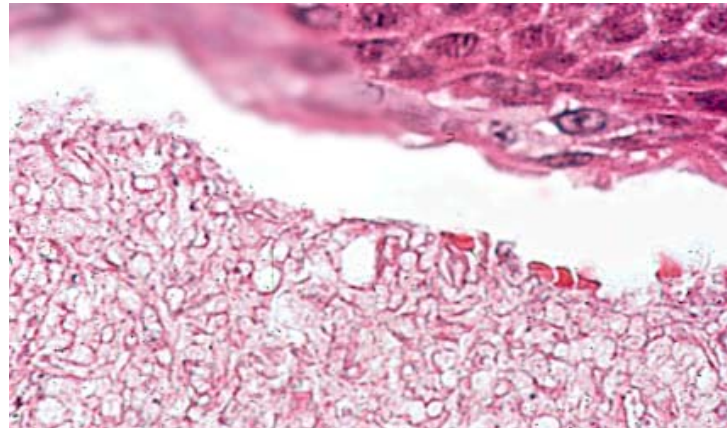
■ B: « Aspergillome »

- Absence d'invasion

A



B



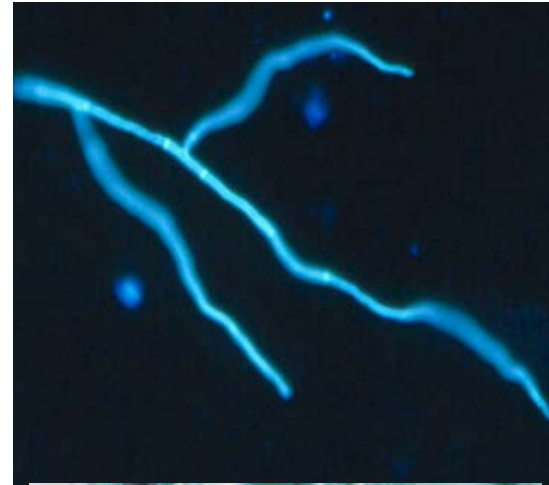
Arguments "microbiologiques"

- Biopsie
- LBA :
 - 50% de faux négatifs
 - Signification d'une culture positive?
- Expectoration: bonne valeur prédictive positive 82% pour les greffés de moelle
- Hémoculture: jamais (sauf *Fusarium* sp.)
- Méthode indirectes
 - Ag (galactomannane, glucane)
 - PCR

Examen direct des prélèvements

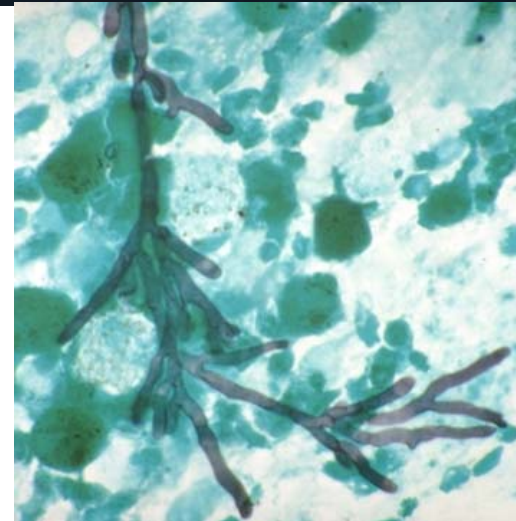
■ Fluorophores

- Facile (microscope à fluorescence)
- Rapide (<15 min)
- Diagnostic présomptif de genre



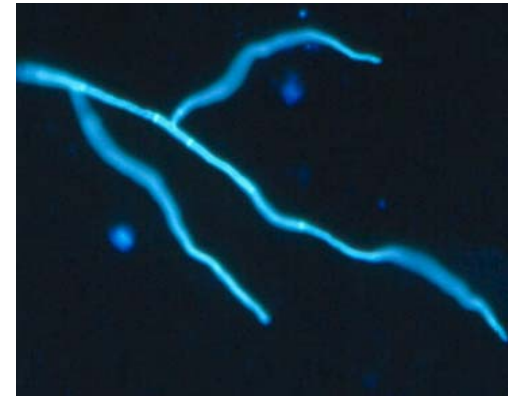
■ Anapath

- Colorations argentiques
- Mêmes renseignements



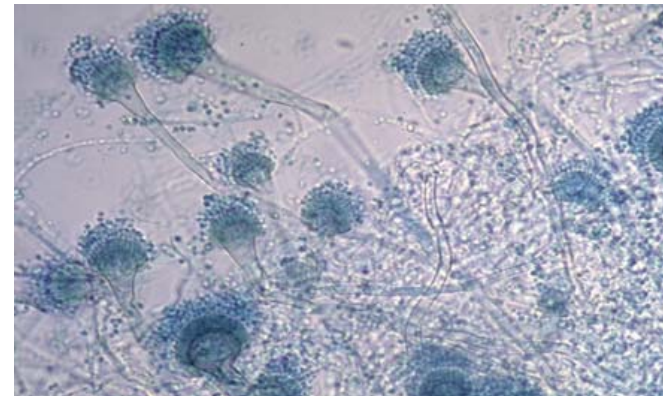
Importance de l'examen direct des prélèvements

- Fluorophores:
 - Blankophor®, Calcofluor®
- Filaments réguliers et septés
= « aspergillus »
- Filaments irréguliers non septés = « mucorales »
- Résultats en 15 minutes!



Culture

- Phénotype évocateur en 48-72 heures
- Examen microscopique
 - Confirme l'espèce
- Possibilité de CMI, identification par biologie moléculaire, étude des génotypes



Identification moléculaire



- Example: Culture difficile sans fructifications
- Amplification des ITS= *Schizophyllum commune* (Macromycète vénéneux)
- Dénombrement du genre *Aspergillus* en cours
 - Section Fumigati: *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *N. pseudofischeri*, *A. viridinutans*, *A. fumigatiaffinis*, *A. udagawae*

Arguments "microbiologiques"

- Biopsies
- LBA :
 - 50% de faux négatifs
 - Signification d'une culture positive?
- Expectoration: bonne valeur prédictive positive 82% pour les greffés de moelle
- Hémoculture: jamais (sauf *Fusarium* sp.)
- Méthode indirectes
 - Ag (galactomannane, glucane)
 - PCR

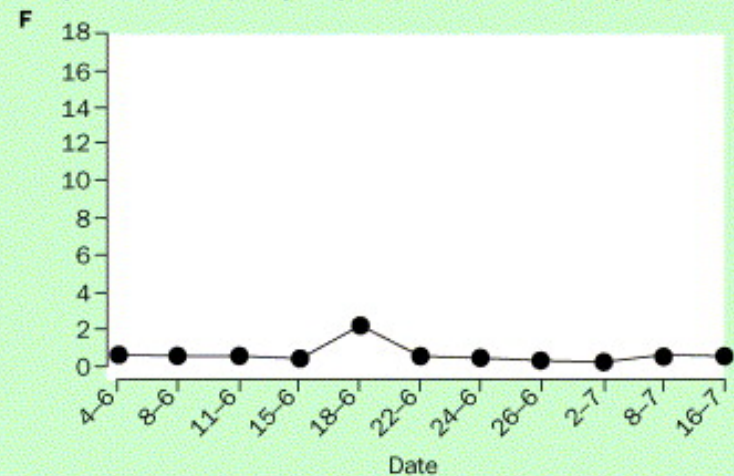
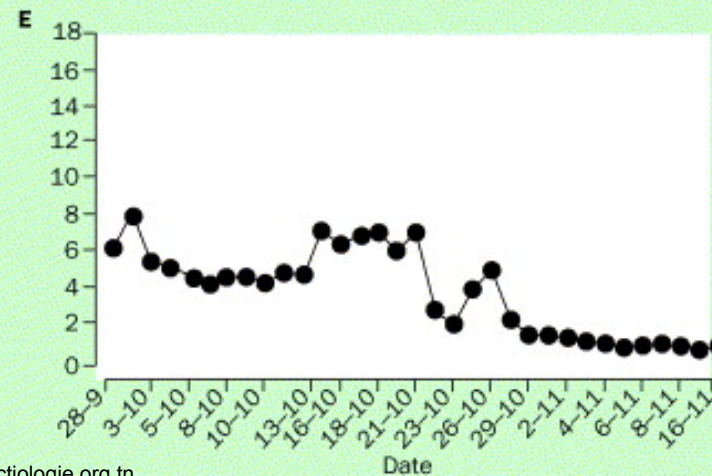
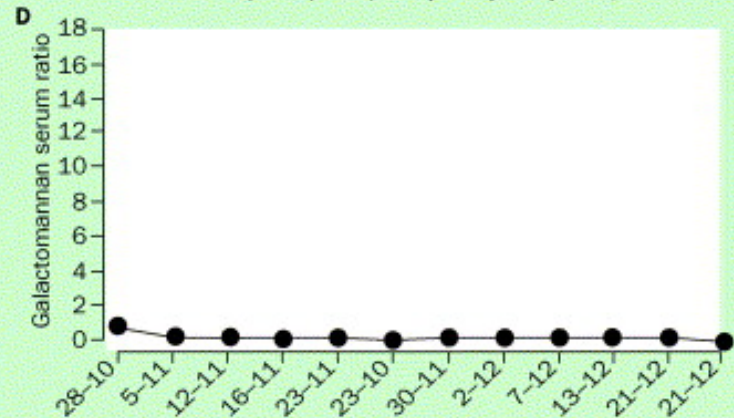
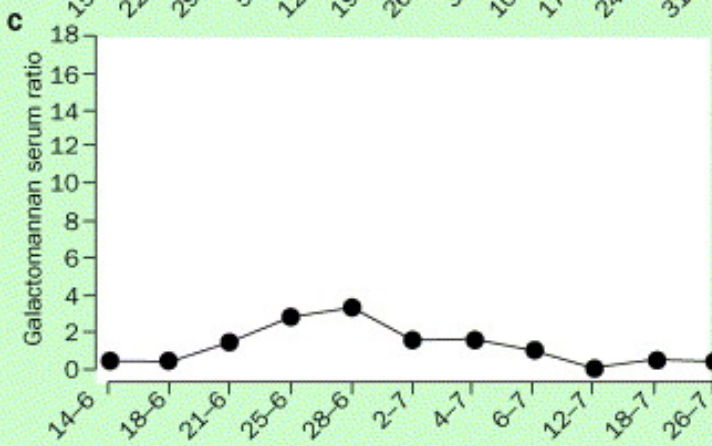
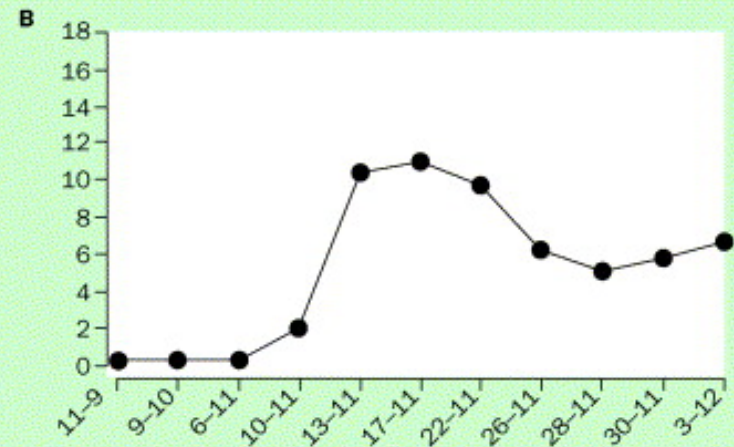
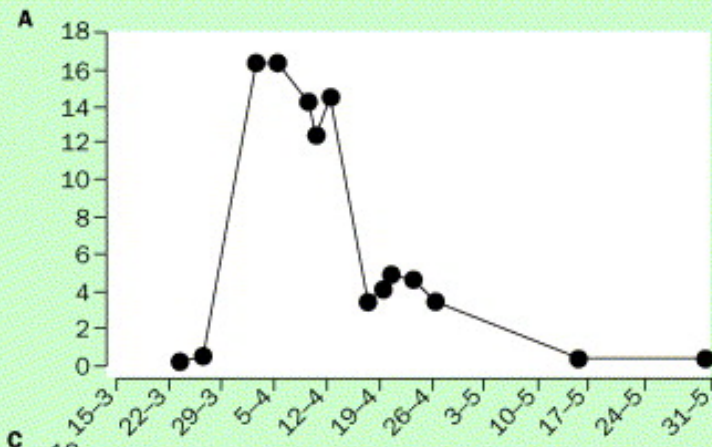
Examens sérologiques

■ Recherche d'anticorps

- Peu faite
- Immunodéprimés
- Transfusions

■ Recherche d'Antigène

- Screening
- Arguments diagnostiques (critères microbiologiques)
- Arguments évolutifs (si ↑, survie↓)

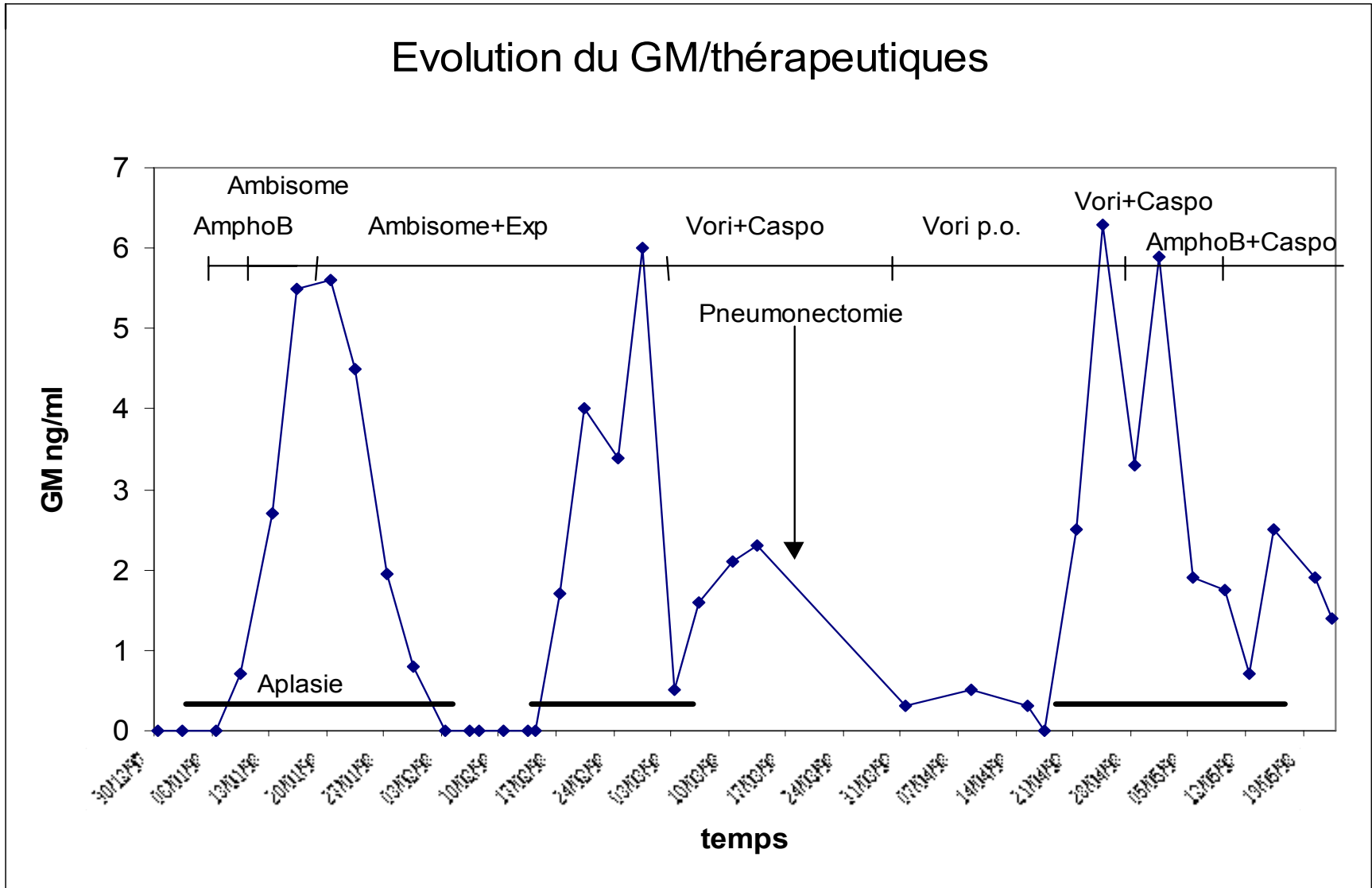


Mennink-Kersten
et al, Lancet Inf
Dis, 2004

Facteurs influençant les performances du test galactomannane

Facteurs épidémiologiques	Populations de patients étudiés Stratégies d'échantillonnage Prévalence de l'infection Définition d'un patient infecté Définition d'un résultat positif Seuil de positivité Expérience technique du laboratoire Site de l'infection Maladie sous-jacente, degré d'immunodépression
Facteurs biologiques	Environnement immédiat de la lésion aspergillaire (pH, O ₂ ...) Intensité de la neutropénie et de la corticothérapie Espèce fongique causale Structure du GM secrété Fonctions rénales et hépatiques Conservation des échantillons Prétraitement des échantillons avant analyse Traitement antifongique

Evolution du GM/thérapeutiques



GM sur autres milieux biologiques

- Liquide de LBA
- Liquide pleural
- Liquide céphalo-rachidien ...
- En général, déjà positif dans le sérum
- Absence d'arguments évolutifs dans les prélèvements non sanguins

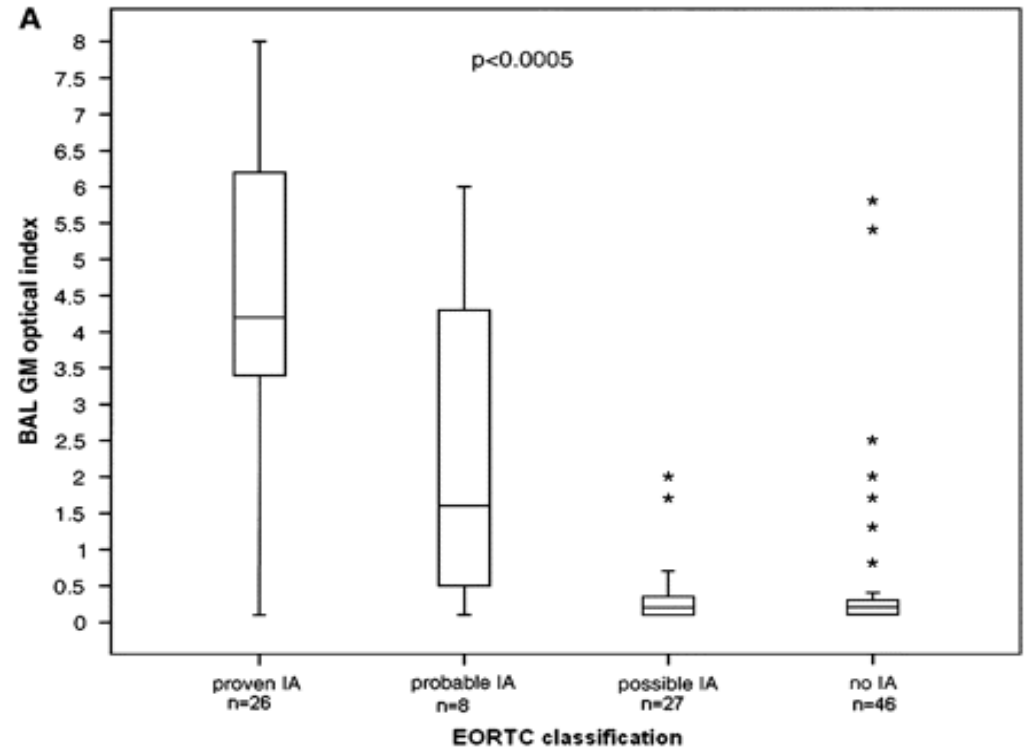
GM LBA réanimation

- Etude prospective
 - Hématologie
 - Cancer
 - SOT
 - Stéroïdes > 4 mg/j > 7 j
 - Immunosuppresseurs
 - Cirrhose Child C
 - HIV
 - Fièvre réfractaire
 - Clinique suggestive de mycose invasive
 - Nouvel infiltrat Rx

Meersseman W et al, Am J Resp Crit Care Med 2008

Résultats

- 26 prouvées à l'autopsie (69 autopsies; 4 premortem)
- GM > 0,5 pour 23/26 1er LBA
- 6 faux GM+ (13%)
 - Sensibilité: 88%
 - Spécificité: 87%
- 15/26 direct ou culture positive (58%)
- GM > 0,5 pour 42% dans sérum
- 24% absence de facteurs de risque classique
 - Cirrhosis 3
 - COPD: 2
 - Systemic disease: 4
 - Solid cancer 4



Problèmes actuels du GM

- Contamination massive de lots de piperacilline-tazobactam
- Extension de l'utilisation à d'autres populations que celles précédemment étudiées
 - Signification d'un résultat positif dans ces populations?

Non spécificité du GM

- Produit par de nombreuses autres espèces de champignons filamenteux

Fungus

Acremonium species
Alternaria alternata
Botrytis tulipae
Cladosporium cladosporioides
Cladosporium herbarum
Cryptococcus neoformans
Fusarium oxysporum
(but not *Fusarium solani*)
Geotricum capitatum
Paecilomyces variotii
Penicillium chrysogenum
Penicillium digitatum
Penicillium marneffe
Rhodotorula rubra
Trichophyton interdigitalis
Trichophyton rubrum
Wallemia sebi
Wangiella (Exophiala) dermatitidis

Problèmes actuels du GM

- Contamination massive de lots de piperacilline-tazobactam
- Extension de l'utilisation à d'autres populations que celles précédemment étudiées
 - Signification d'un résultat positif dans ces populations?

Méta-analyse (Pfeiffer et al, CID, 2006)

Table 4. Pooled sensitivity and specificity of the galactomannan assay for diagnosis of invasive aspergillosis (IA).

Studies	Cases of proven IA				Cases of proven or probable IA			
	TP/(TP+FP)	Pooled sensitivity (95% CI)	TN/(TN+FP)	Pooled specificity (95% CI)	TP/(TP+FN)	Pooled sensitivity (95% CI)	TN/(TN+FP)	Pooled specificity (95% CI)
All	163/229	0.71 (0.68–0.74)	3601/4055	0.89 (0.88–0.90)	250/407	0.61 (0.59–0.63)	2839/3060	0.93 (0.92–0.94)
Studies limited to patients with hematological malignancy	106/152	0.70 (0.62–0.77)	2570/2808	0.92 (0.90–0.93)	177/304	0.58 (0.52–0.64)	2324/2457	0.95 (0.94–0.96)
Studies limited to patients undergoing BMT	49/60	0.82 (0.70–0.90)	722/843	0.86 (0.83–0.88)	32/49	0.65 (0.60–0.78)	17/26	0.65 (0.44–0.83)
Studies limited to solid-organ transplant recipients	2/9	0.22 (0.03–0.60)	180/215	0.84 (0.78–0.88)	9/22	0.41 (0.21–0.64)	210/247	0.85 (0.80–0.89)

Comparison of galactomannan indices in group 1 (PMN < 100/mm³) vs groups 2+3 (PMN ≥ 100/mm³) when stratifying by steroids, potentially galactomannan (GM) contaminated antibiotics use, and systemic anti-mold therapy (mean values)

Galactomannan index	Group 1 (n = 17) PNN <100	Groups 2 + 3 (n = 81) PNN ≥ 100	p value
GM index ≥ 1	8 (44.4%)	8 (9.9%)	.001 ^b
GM index ≥ 0.7	8 (44.4%)	12 (14.8%)	.009 ^b
GM index ≥ 0.5	11 (61.1%)	15 (18.52%)	.001 ^b
GM index, mean ± SD	1.71 ± 1.99	.44 ± .75	.01 ^a
Steroid administration			
Yes	4.95 ± .64	.39 ± .44	.001 ^a
No	.72 ± .79	.47 ± .88	.19 ^a
Potentially GM contaminated antibiotic(s)			
Yes	2.6. ± 2.97	.64 ± 1.11	.76 ^a
No	1.44 ± 1.66	.33 ± .41	.003 ^a
Anti-mold therapy			
Yes	.76 ± .99	.43 ± .66	.694 ^a
No	2.1 ± 2.20	.44 ± .77	.006 ^a

NOTE. Data are no (%) of episodes

^a p value of the non parametric Kruskal Wallis test

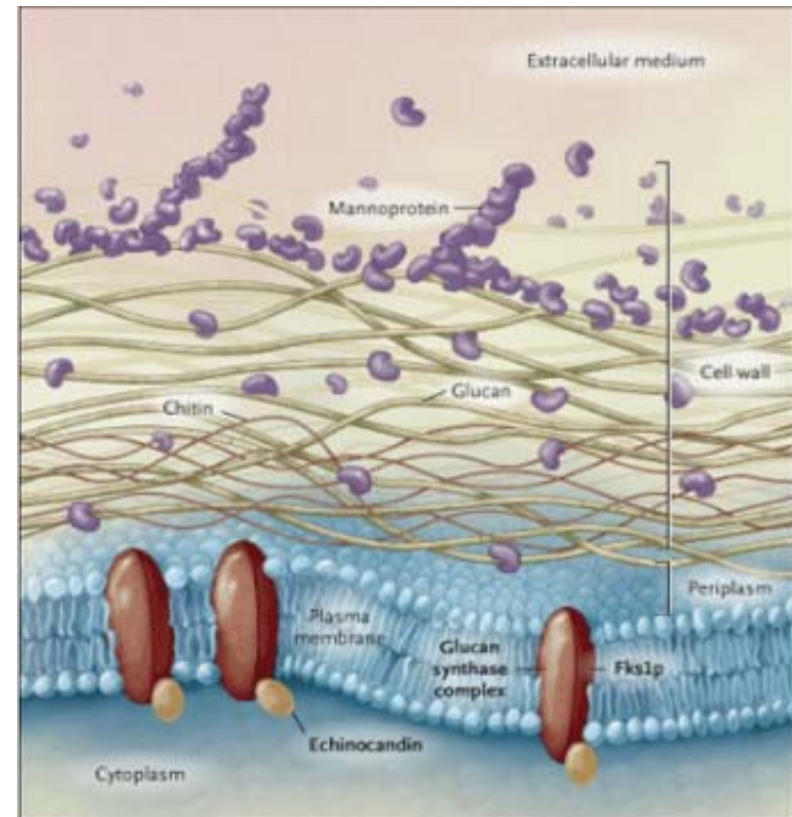
^b p value of Fischer's exact test

Problèmes actuels du GM

- Contamination massive de lots de piperacilline-tazobactam
- Extension de l'utilisation à d'autres populations que celles précédemment étudiées
 - Signification d'un résultat positif dans ces populations?
- Définition du seuil
 - Index >1.5 (fabricant)
 - 1 ng/ml pour beaucoup
 - Index 0,7 pour d'autres
 - EU: 0,5
 - **Primauté de la cinétique +++**

Glucanes

- β -glucanes : polysaccharides naturels ubiquistes dans l'environnement, composants majeurs de la paroi de certaines bactéries et de micromycètes pathogènes ou saprophytes
- Ag de paroi commun à l'immense majorité des champignons (sauf cryptocoque et zygomycètes)
 - *Candida*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Pneumocystis jirovecii*...
- Cible thérapeutique des échinocandines



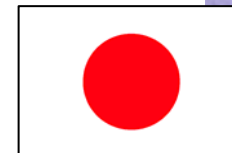
Bennet, NEJM, 2006

Détection de (1→3)-β-D-Glucane

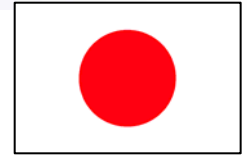
- Reconnaissance du βG ET du LPS par le système d'immunité innée de *Limulus sp*
 - Activation spécifique du facteur G du lysat d'amœbocytes (LAL)
 - Cascade enzymatique intervenant dans la coagulation du LAL
 - Détection par clivage d'un substrat chromogène



Limulus polyphemus
Tachypleus tridentatus



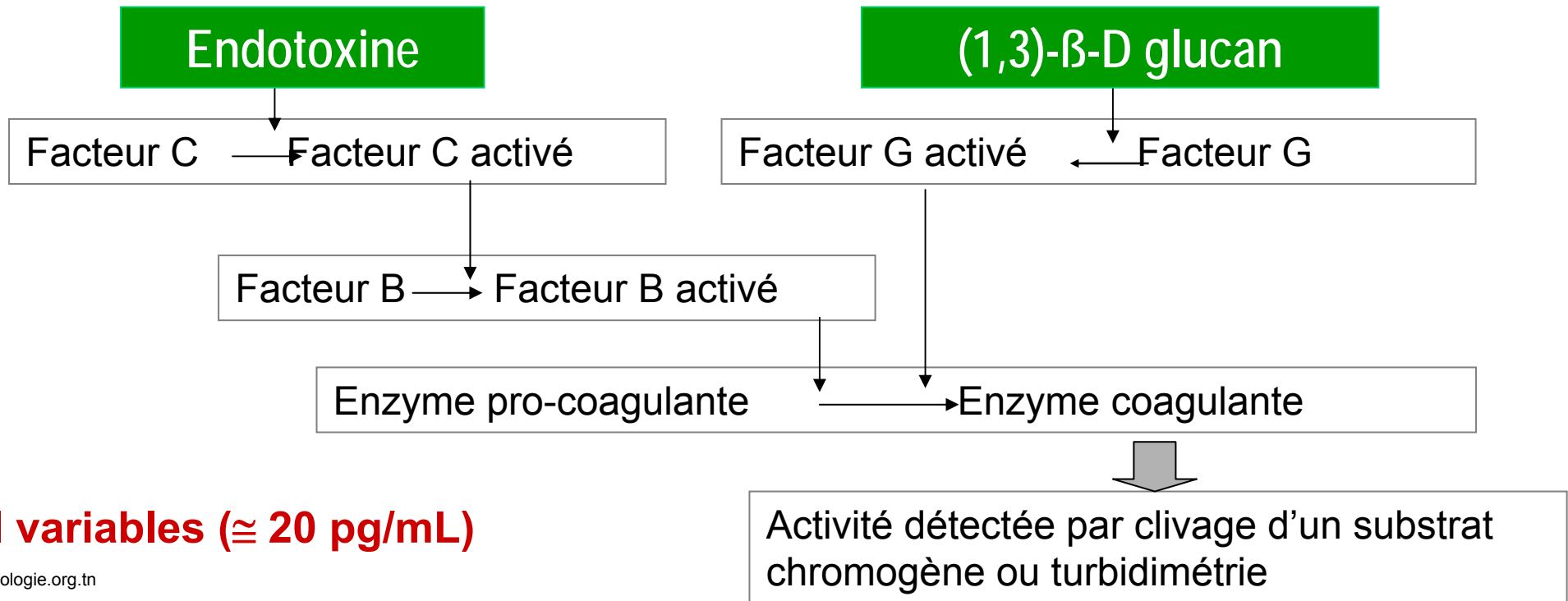
Détection : les différents tests



- **BG Test Maruha**
- **Test Wako**
- **Fungitec-G test,**
- **Fungitec-G test MK...**

Utilisation initiale pour détection d'endotoxine LPS

Tachypleus tridentatus



Seuil variables (≅ 20 pg/mL)

Détection : les différents tests



Limulus polyphemus

GlucateLL*(ACC,USA)

Seuil $\geq 60\text{pg/mL}$

Fungitell (ACC, USA)

Détection spécifique du β -glucane
(Facteur C supprimé)

Approuvé FDA 2004

(1,3)- β -D glucan

Facteur G activé \rightarrow Facteur G

Enzyme procoagulante \rightarrow Enzyme coagulante

Activité détectée par clivage d'un substrat chromogène ou turbidimétrie

Beta-D-Glucane

- Ostrosky-Zeichner *et al*, *CID* 2005: 654-9
 - Upton A *et al*, *CID* 2006, 42 : 1055-6
 - patients et contrôles non appariés, exclure contrôles sains
 - tenir compte de la prévalence des infections
- Pickering JW *et al*, *JCM* 2005: 5957-62
- Pazos *et al*, *Rev Iberoam Micol*, 2006: 209-15
- Ponton J *et al*, *CID* 2006: 263
- Smith PB *et al*, *Clin Vaccine Immunol* 2007:924-5,
- F. Persat *et al*, *J Clin Microbiol*, 2008: 1009-1013
- Senn L *et al*, *CID* 2008:878-885

Galactomannan Enzyme Immunoassay and (1,3) beta-D-Glucan in Diagnosis of Invasive Fungal Infections

- GM meilleur pour les infections à *Aspergillus* autres qu'*A. fumigatus*
- BG meilleure sensibilité que le GM pour l'Aspergillose invasive et les autres infections à champignons filamenteux

TABLE 3. Performances of GM enzyme immunoassay and BG test for patients infected with different organisms (per sample)

Test and organism	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%) ^a	NPV (%) ^a
GM enzyme immunoassay				
<i>A. fumigatus</i> (n = 69)	13	99	90	66
Non- <i>fumigatus</i> <i>Aspergillus</i> species (n = 39)	49	99	95	86
Other mold (n = 77)	6	99	83	62
BG test				
<i>A. fumigatus</i> (n = 69)	61	88	75	79
Non- <i>fumigatus</i> <i>Aspergillus</i> species (n = 39)	64	88	64	88
Other mold (n = 76)	47	88	72	72

^a PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

Conclusions (EORTC / MSG)

- Décision d'inclure la détection du 1,3- β -D-glucane dans les critères diagnostiques des IFI, à côté de celle du galactomannane aspergillaire (PCR en temps réel exclue)
- Mais expérience avec le β -G est encore très limitée, VPN élevée du β -glucane
- Sensibilité clinique *a priori* supérieure à celle du GM
- Causes de fausses positivités nombreuses mais très différentes de celles observées avec *Platelia-Aspergillus*
- Combinaison de ces deux marqueurs = compensation de leurs défauts respectifs?
- Besoins d'études complémentaires dans les différents types de mycoses invasives et dans les différentes populations de patients à haut risque (receveurs de CSH)

Causes possibles de faux positif avec le test β G

Liées à des traitements	Immunoglobulines intraveineuses Albumine Fractions plasmatiques Facteurs de la coagulation Antibiotiques : β -lactamines (pipéracilline+tazobactam) Autres (putatifs) : polysaccharides antitumoraux, chimiothérapies, radiothérapies,
Liées au matériel de soins	Hémodialyse Compresses ou autre matériel contenant du β G Nature des tubes de prélèvements et le nombre de manipulations de ces tubes
Liées à des infections bactériennes	Bacille Gram négatif Streptocoques
Liées au patient	Altérations muqueuses (chimiothérapies, irradiation) qui permettraient au β G des levures colonisant le tube digestif d'être absorbé Sérum hémolysé ou lipémique

Pickering JW et al, JCM 2005, 43 : 5957-62

PCR en microbiologie

Solutions apportées par les industriels (Amplicor® Roche)

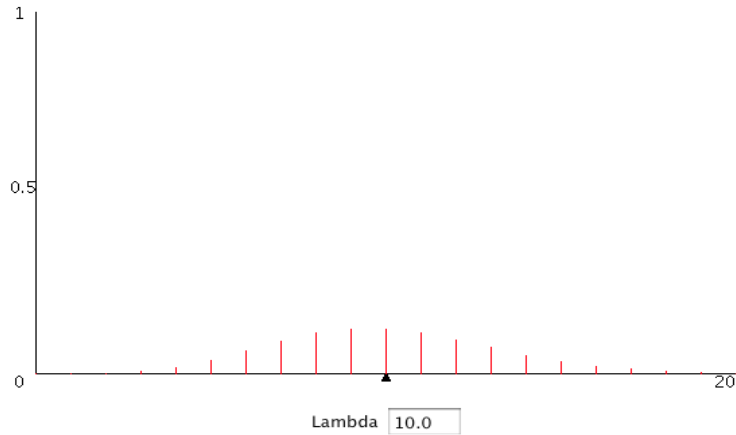
- Faux +: contaminations (un aérosol de 10^{-6} µl contient 10 copies)
 - Remplacement de la désoxythymine par le désoxyuracil (Uracil-N-Glycosylase)
- Faux -: si rendement $<2^n$ par copie => inhibiteurs
 - co-amplification d'un témoin interne à 5-20 copies dans l'échantillon à tester



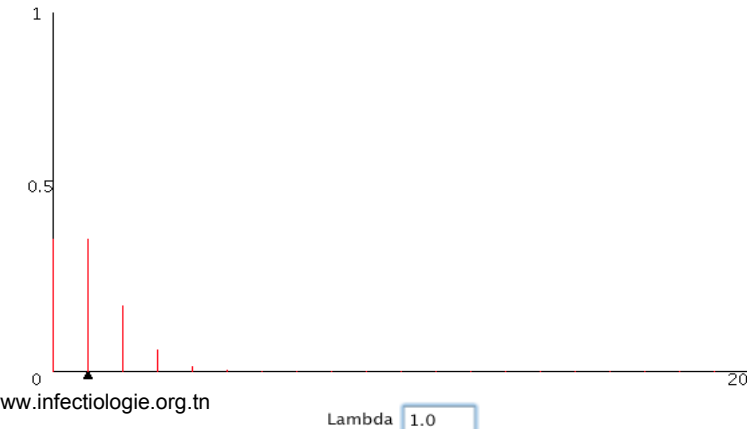
POISSON. *Beauvais*

Nombre de
copies/ μ l

% de réactions
positives



Poisson's law



10^9	100
10^8	100
10^7	100
10^6	100
10^5	100
10^4	100
10^3	100
10^2	100
10	100
1	63
0.1	9
0.01	1

ERREUR SUR LE GÉNOME

Voilà une quinzaine d'années, quand la technique de séquençage de l'ADN fut mise au point, ce fut une ruée des biologistes vers les fossiles. C'est à celui qui décrypterait le génome le plus ancien. En 1994, la revue *Science* publiait la découverte d'ADN dans un dinosaure vieux de 80 millions d'années. Peu après, un autre chercheur prétendait avoir fait parler des gènes d'un charançon emprisonné depuis 100 millions d'années dans de l'ambre. Bien mieux encore, la prestigieuse revue *Nature* relatait la découverte de bactéries vivantes – oui vivantes! – dans des cristaux de sel vieux de... 250 millions d'années. Après vérification, tous ces résultats durent partir à la poubelle! «*Les ADN retrouvés n'appartenaient pas aux fossiles, mais provenaient de contaminations extérieures!*

Ainsi, l'ADN du dinosaure s'est révélé être... celui d'un humain. Sans doute celui du paléontologue», raconte avec le sourire Ludovic Orlando, paléogénéticien à l'École normale de Lyon et auteur de «*L'anti-Jurassic Park*»*. Dès que les biologistes pri-

rent des précautions pour éviter toute pollution par du matériel génétique étranger, la quasi-totalité des fossiles se révélèrent être des coquilles vides.

Finalement, les sols gelés de Sibérie et d'Alaska, ainsi que les gisements de tourbières et d'asphaltes pauvres en oxygène, apparurent comme les seuls coffres-forts génétiques possibles. La dégradation de l'ADN s'y poursuit, mais à un rythme



Mouche de 40 millions d'années emprisonnée dans de l'ambre baltique

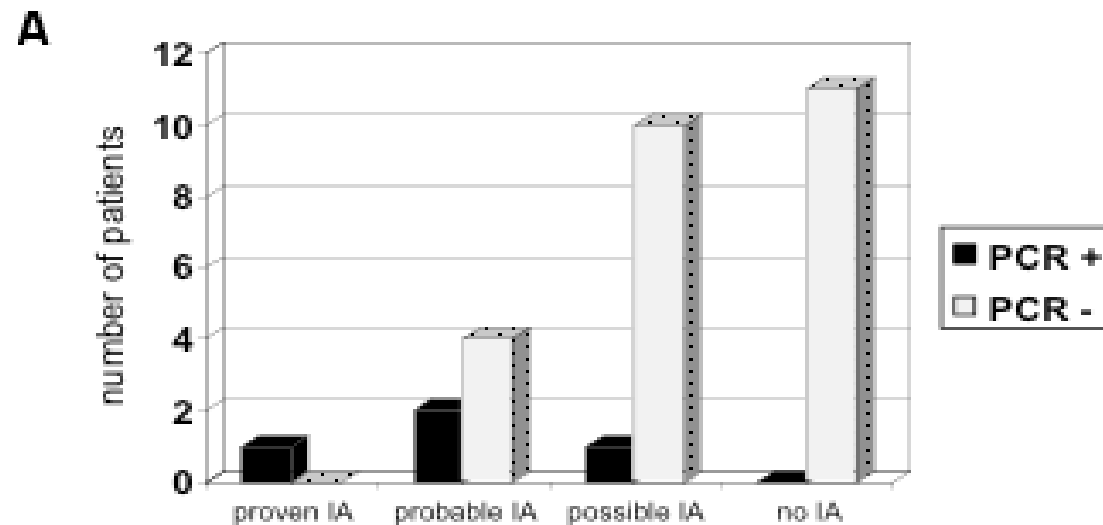
ralenti. Actuellement, le record d'ancienneté est détenu par une chaîne de 600 nucléotides appartenant à une bactérie enfouie dans le permafrost depuis 450 000 ans ■ F.L.

* «*L'anti-Jurassic Park*», de Ludovic Orlando (Bellin).

Avantages de la PCR en temps réel

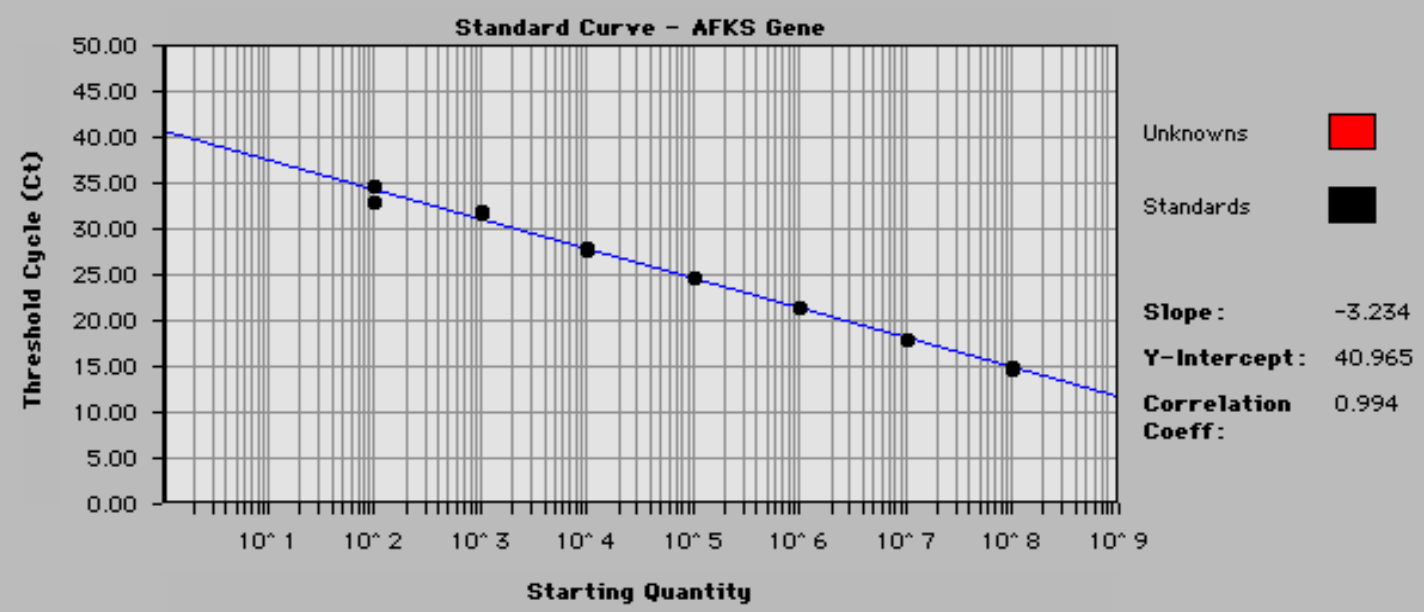
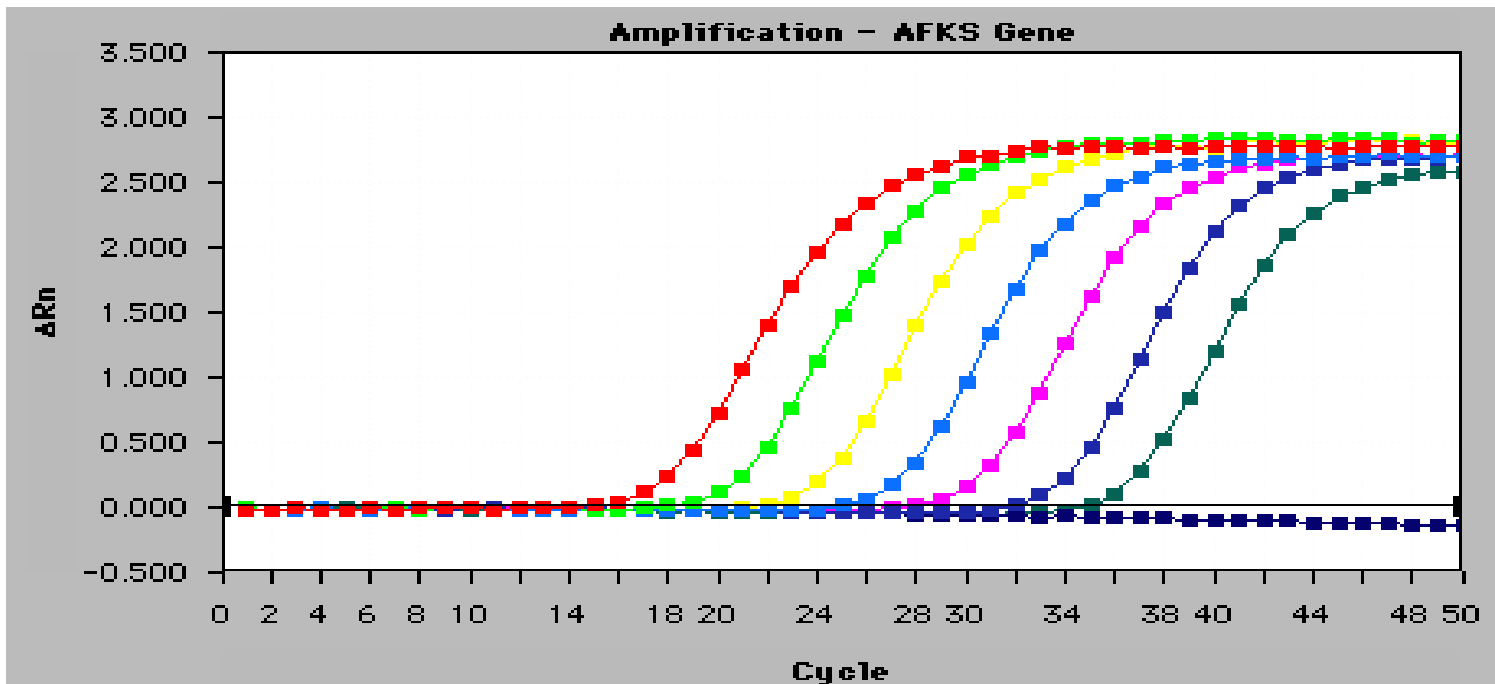
- **Double protection contre les contaminations**
 - **mécanique (lecture en temps réel)**
 - **enzymatique par l'UNG**
- **Rapide (2-3h) avec contrôle de la spécificité**
- **Quantitatif avec arguments évolutifs**

Associations de tests



qRT-PCR confirme un GM positif

Millon L, et al. J Clin Microbiol, 2005



RT PCR sur fractions sanguines

Sample	Volume	DNA extraction	RT PCR format	Specificity	Reference
Whole blood/plasma	200 µl	Commercial kit (QIAamp Blood mini-kit)	TaqMan	<i>Aspergillus</i> spp (18S rRNA)	Kami M, Clin Inf Dis, 2001
Serum	200 µl	Automated (MagNa Pure)	LightCycler	<i>Aspergillus</i> mitochondrion (tRNA)	Costa C, J Clin Microbiol 2002
Whole blood	1 ml	WBCs and RBCs lysis, beads, automated (MagNa Pure)	LightCycler	<i>Aspergillus</i> spp (18S rRNA)	Loeffler L, J Clin Microbiol 2002
Whole blood	200 µl	Frozen-thawed, lyticase, High Pure PCR kit	LightCycler	<i>Aspergillus</i> spp (18S rRNA)	Pryce TM, Diag Microbiol Inf Dis, 2003
Whole blood	3-5 ml	Manual in-house (↓ phenol-chloroform)	LightCycler	<i>A. fumigatus</i> mitochondrion (cyt b)	Spiess B, J Clin Microbiol, 2003
Serum	2 ml	Beads, lysis buffer, silica beads	TaqMan	Moulds (5.8S rRNA)	Pham AS, Am J Clin Pathol, 2003
Serum	200 µl	Commercial kit (QIAamp DNA mini-kit)	TaqMan	<i>Aspergillus</i> spp (28S rRNA)	Challier S, J Clin Microbiol 2004
Whole blood	3-5 ml	WBCs and RBCs lysis, beads, automated (MagNa Pure)	LightCycler	<i>Aspergillus</i> spp and <i>Candida</i> genera ^a (18 S rRNA)	Klingspor, L, Clin Microbiol Inf, 2006
Whole blood	1 ml	WBCs and RBCs lysis, beads, automated (MagNa Pure)	TaqMan probe; LightCycler	<i>Aspergillus</i> spp (28S rRNA)	White L, Clin Inf Dis, 2006
Serum	1 ml	Automated (MagNa Pure)	TaqMan	<i>Aspergillus</i> spp (28S rRNA)	Suarez F, J Clin Microbiol, 2008

^a + 5 sets of species-specific probes

Comparaison des différents tests

Intérêt du génotypage des isolats d'*A. fumigatus*

- Différentes méthodes (microsatellites)
- Enorme polymorphisme de la population d'*A. fumigatus*
- Pas de biotope privilégié pour un génotype donné:
 - Persistance d'un génotype au cours du temps
 - Même génotype à deux endroits différents
 - => Impossibilité de dater la contamination
- Plusieurs génotypes chez patients colonisés
- Généralement un génotype chez l'immunodéprimé
- Pas de génotype pathogène

Bart-Delabesse et al, JCM 1999;, Klassen C et al, CMI 2009

Sensibilité aux antifongiques

- Etest®, alternative aux tests en milieux liquides (CLSI, EUCAST)
- Détection de mutations
 - Séquençage
 - Tests commerciaux

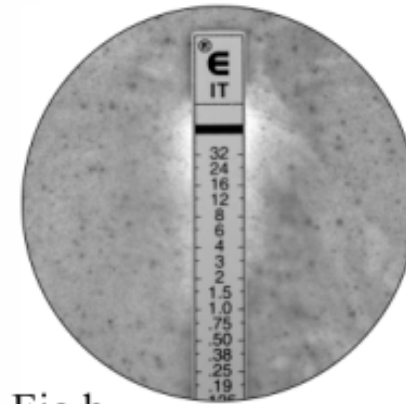


Fig b.

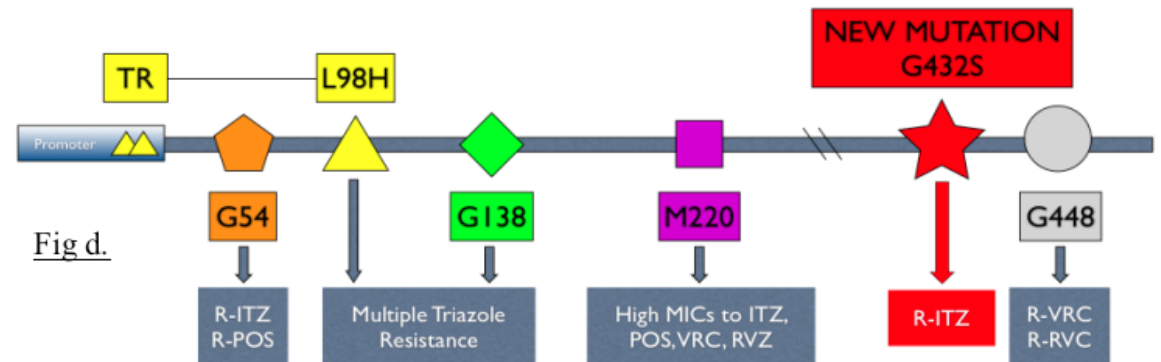


Fig d.

Conclusion

■ Tendances épidémiologiques

- Survenue plus tardive / greffe
- Hémopathies lymphoïdes
- Stéroïdes comme facteurs de risque/neutropénie

■ Diagnostic

- Critères EORTC/MSG
- Obtention de la souche (épidémiologie, résistances)