

15>18
OCTOBRE
2024

Cayenne
PRÉSENTIEL & VISIO



AgiT

Assises guyanaises
d'infectiologie et de médecine
Tropicale



MÉDECINE TROPICALE
ZONOSÉS
PATHOLOGIES VECTORIELLES
RISQUES INFECTIEUX
EMERGENCES
PRÉVENTIONS
... :)



MALINGOY



Marie-Elisabeth BOUGNOUX

*Parasitologie-Mycologie. Hôpital Necker, Paris France
Unité Biologie et Pathogénicité Fongiques, Paris*

**Actualités dans les
biomarqueurs
mycologiques**

Les biomarqueurs : outils diagnostiques les plus utilisés

diagnostic mycologique des infections fongiques invasives

Visualisation et culture du champignon

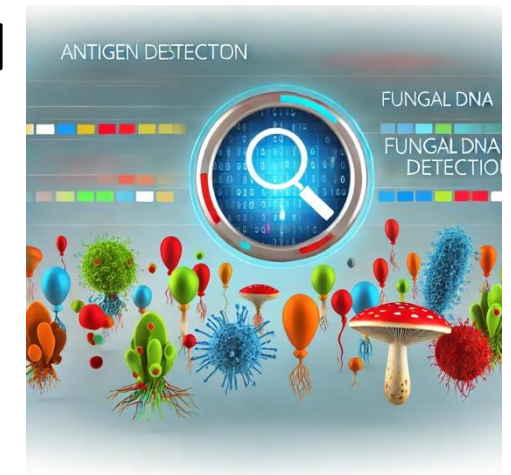
- Sang
- Prlts respiratoires
- Tissus
- Liquides et pus

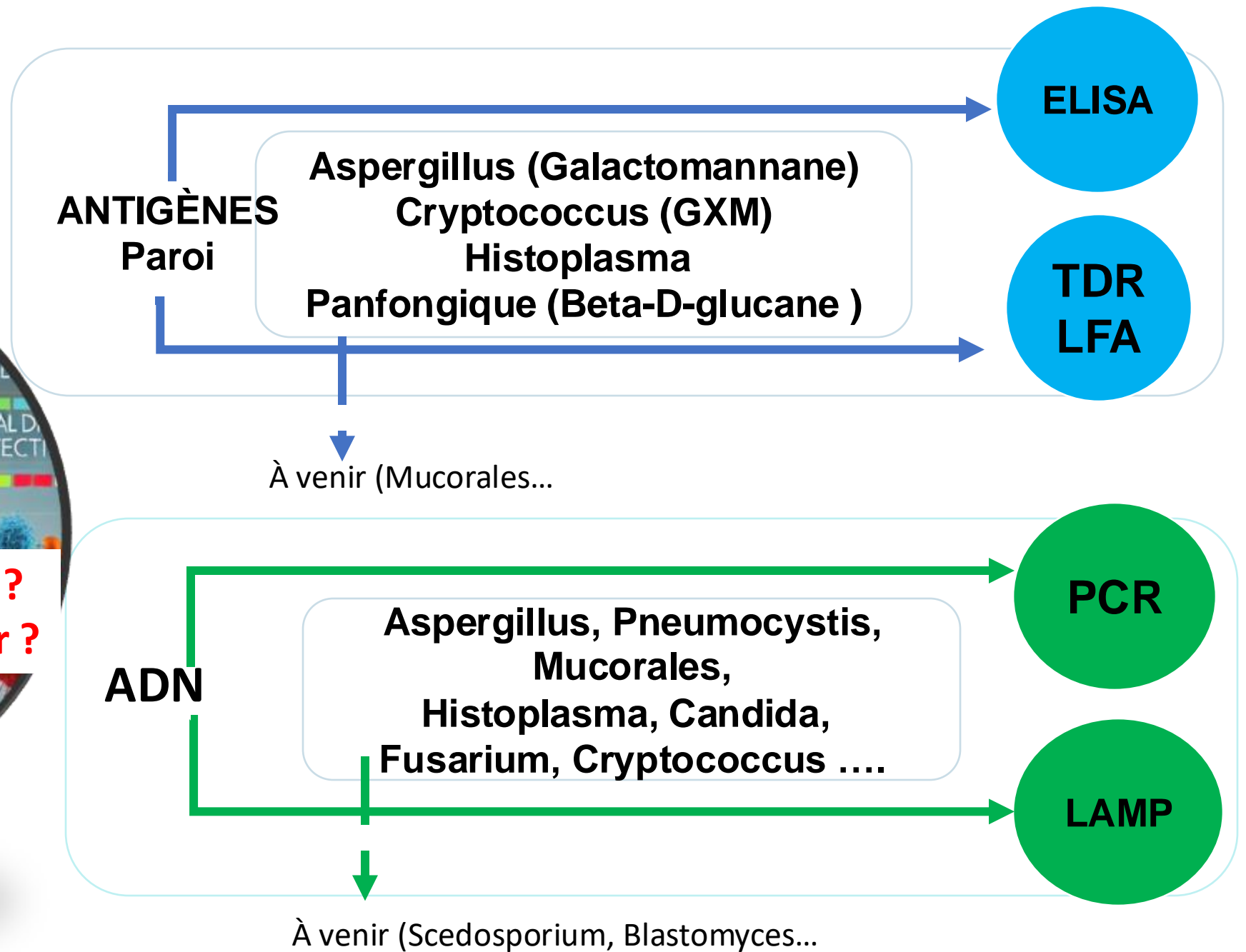


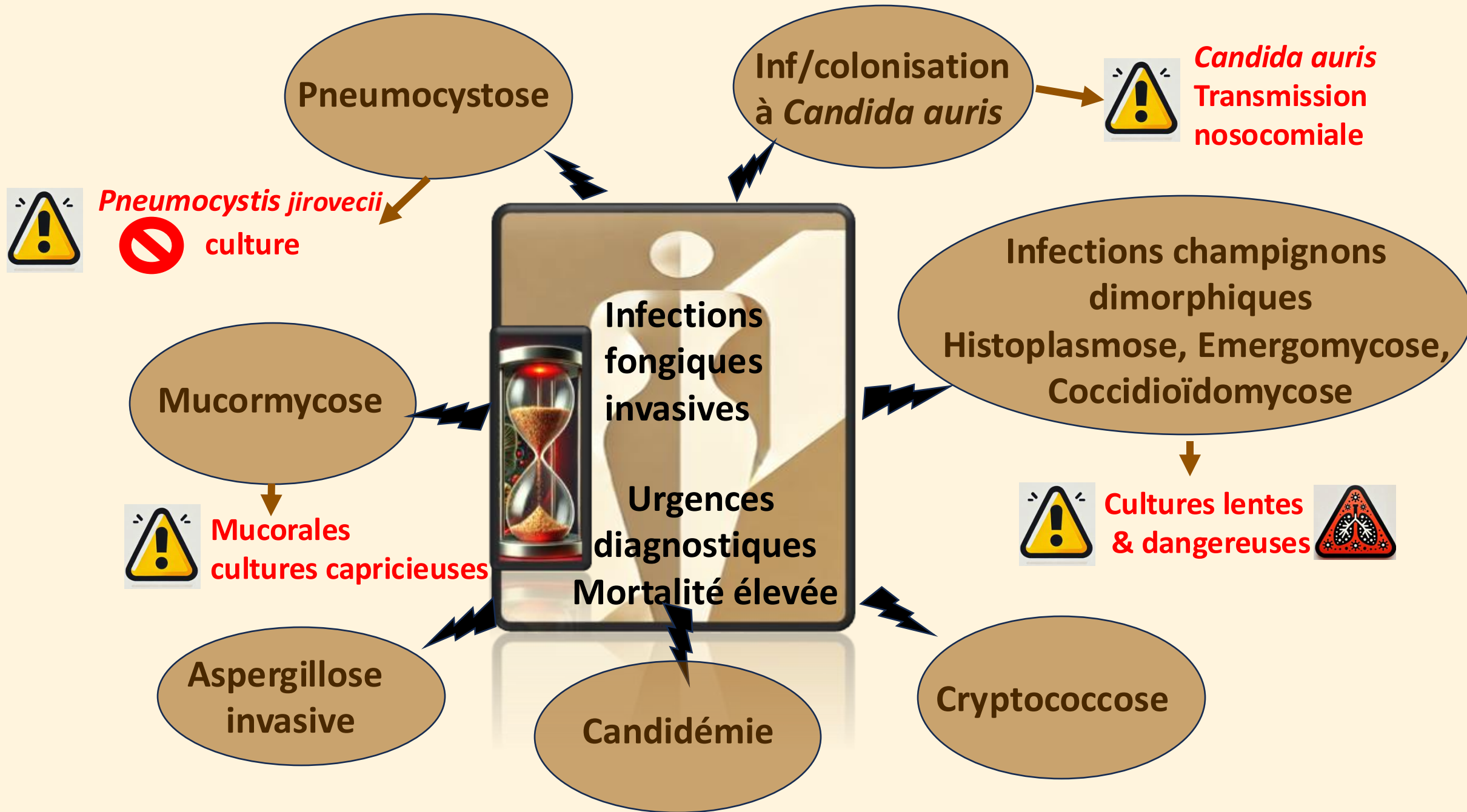
Détection de molécules fongiques : biomarqueurs

→ Antigènes et ADN

- Sang
- Prlts respiratoires
- Tissus
- Liquides et pus







Le rôle central des biomarqueurs fongiques dans le diagnostic de la **Pneumocystose**

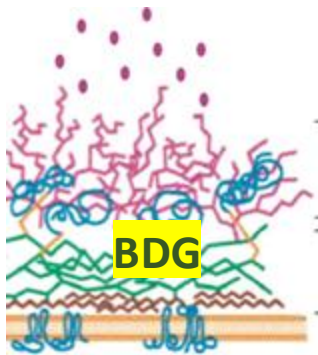


Direct / culture

→ **2 biomarqueurs**

Ag-Béta-D-gucane :
sérum

Se : 94 (90-97)
Sp : 86 (81-89)



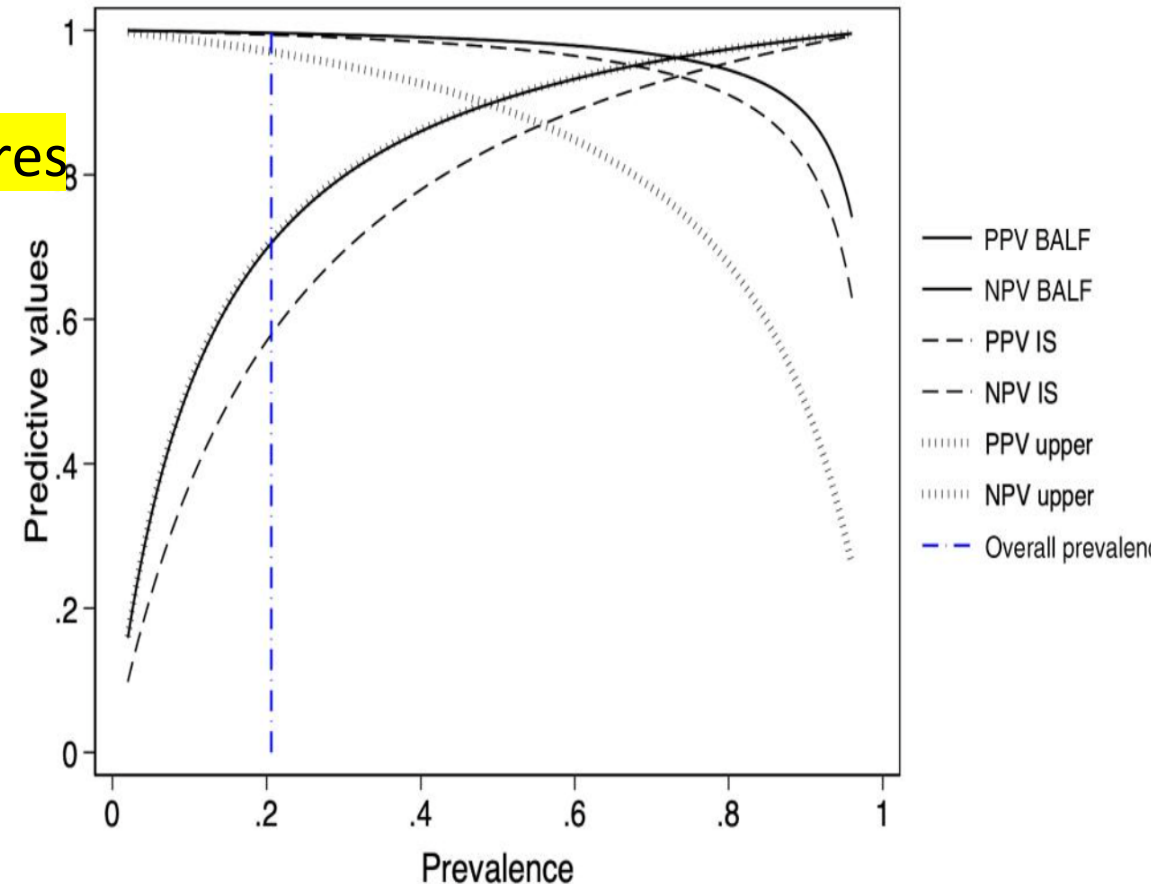
ADN-qPCR :
prélèvements respiratoires

LBA :
Se cumulée : 98,7% ; LR+ = 9,19
Sp cumulée : 89,3%

Crachat induit :
Se cumulée : 99% ; LR+ = 5,30
Sp cumulée : 81,5%

Voies respiratoires supérieures:
Se cumulée : 89,2% ; LR+ = 9,34
Sp cumulée : 90,5%

Predictive values according to sample and qPCR assay



Méta-analyses

-Karageorgopoulos et coll., CID, 2013 ; Held J et coll., CMI 2011; **Brown L. et coll, CID 2024**

Le rôle central des biomarqueurs fongiques dans le diagnostic de la Pneumocystose

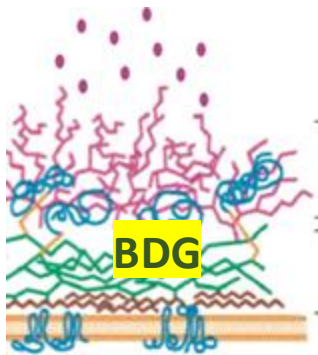


Direct / culture

→ 2 biomarqueurs

Ag-Béata-D-gucane :
sérum

Se : 94 (90-97)
Sp : 86 (81-89)



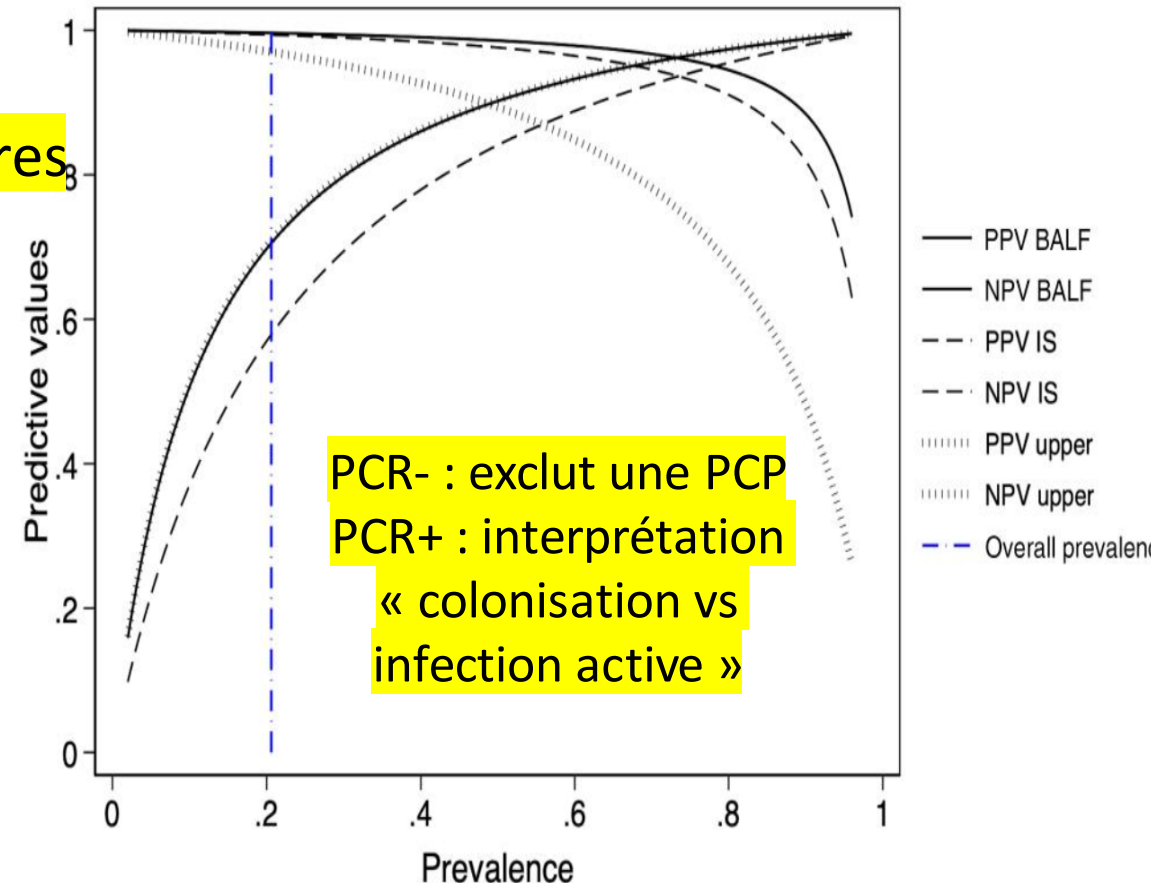
ADN-qPCR :
prélèvements respiratoires

LBA :
Se cumulée : 98,7% ; LR+ = 9,19
Sp cumulée : 89,3%

Crachat induit :
Se cumulée : 99% ; LR+ = 5,30
Sp cumulée : 81,5%

Voies respiratoires supérieures:
Se cumulée : 89,2% ; LR+ = 9,34
Sp cumulée : 90,5%

Predictive values according to sample and qPCR assay



Méta-analyses

-Karageorgopoulos et coll., CID, 2013 ; Held J et coll., CMI 2011; **Brown L. et coll, CID 2024**

Le rôle central des biomarqueurs fongiques dans le diagnostic de la Pneumocystose

→ 2 biomarqueurs

Ag-Béta-D-gucane :
sérum

Se : 94 (90-97)

Sp : 86 (81-89)

Méta-analyses

- Brown L. et coll, CID 2024
- Karageorgopoulos et coll., CID, 2013
- Held J et coll., CMI 2011

ADN-qPCR :

prélèvements respiratoires

LBA :

Se cumulée : 98,7% ; LR+ = 9,19

Sp cumulée : 89,3%

Crachat induit :

Se cumulée : 99% ; LR+ = 5,30

Sp cumulée : 81,5%

Voies respiratoires supérieures:

Se cumulée : 89,2% ; LR+ = 9,34

Sp cumulée : 90,5%



Disponibilité des tests

Délai de rendu des résultats

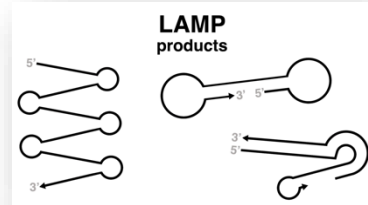


LAMP PCR

(loop-mediated isothermal amplification)

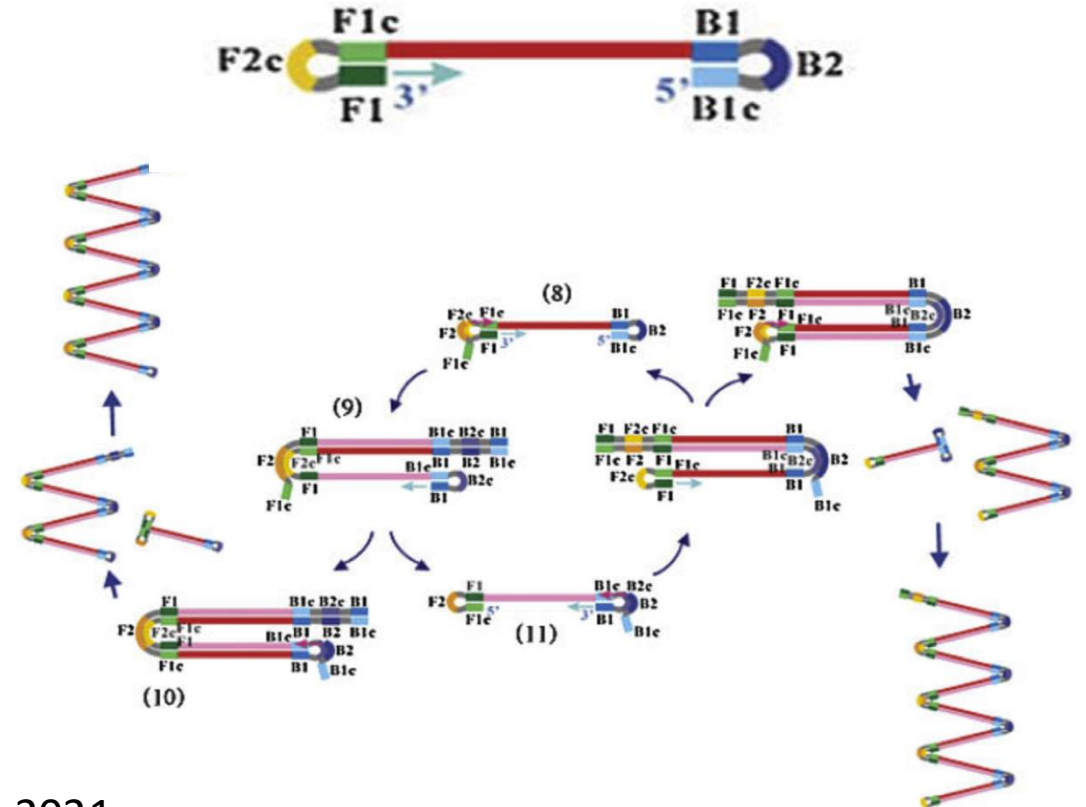
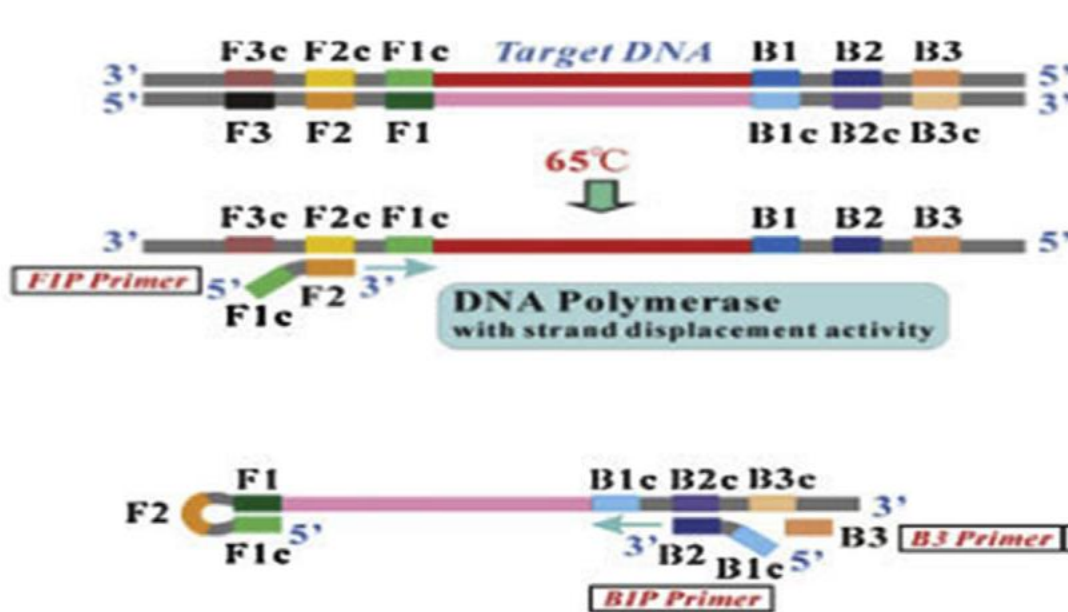
LAMP PCR

Technique d'amplification isotherme de l'ADN par boucle



- Amplification rapide
- Simplicité d'équipement
- Spécificité élevée

Principe



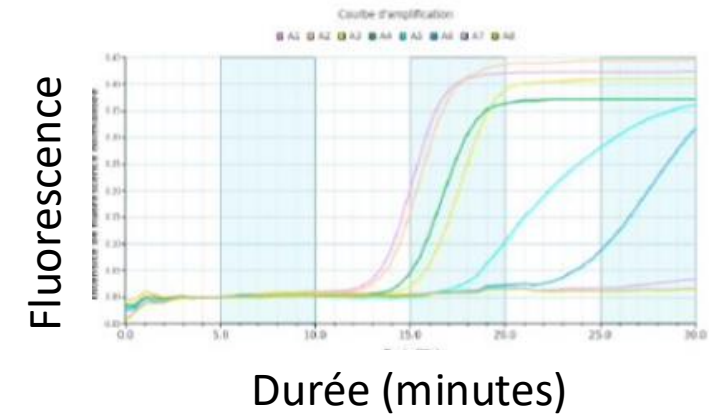
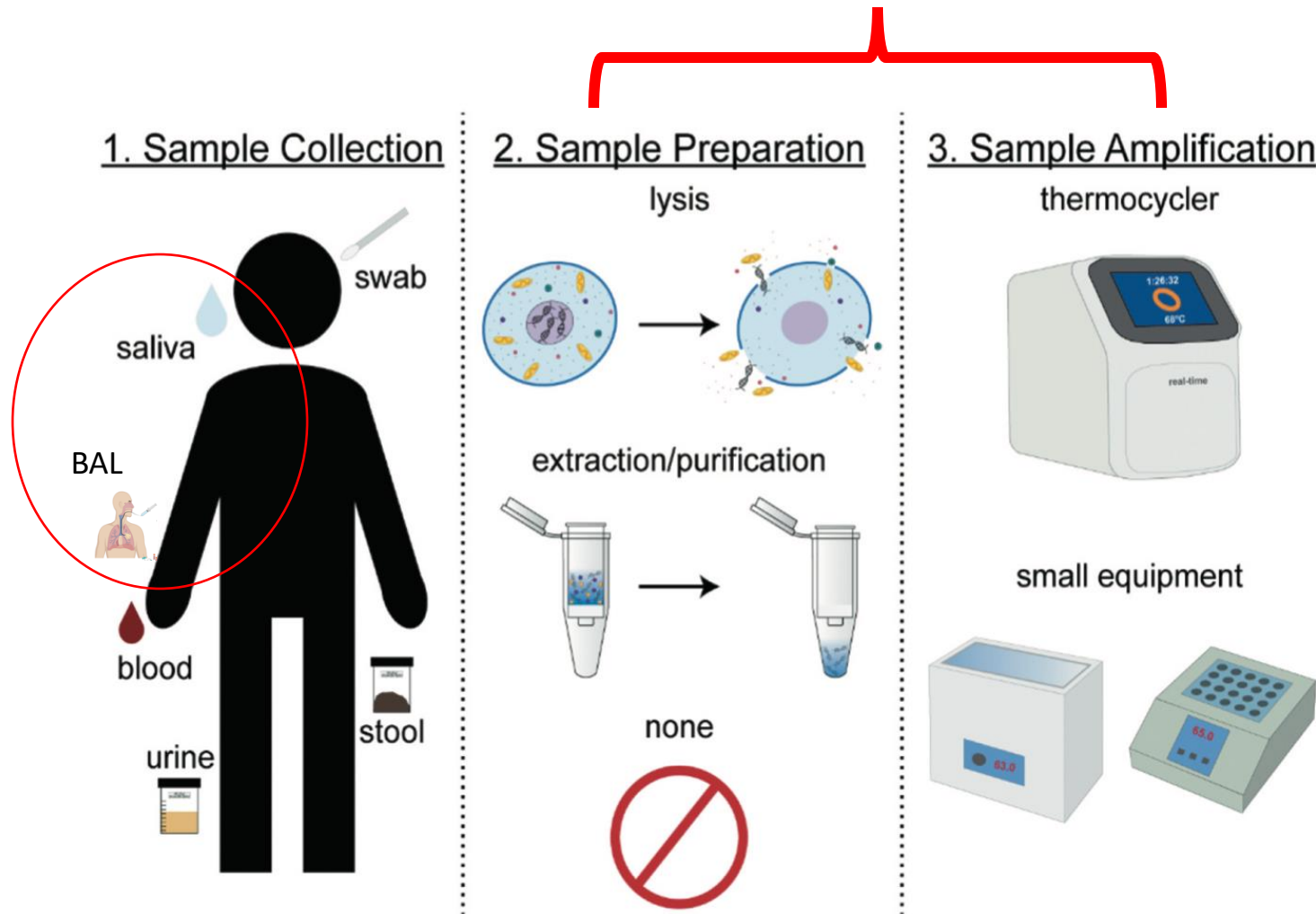
Yanmei Li et coll., Microbial Pathogenesis 2017

Moehling T et coll., Expert Review of Molecular Diagnostics 2021

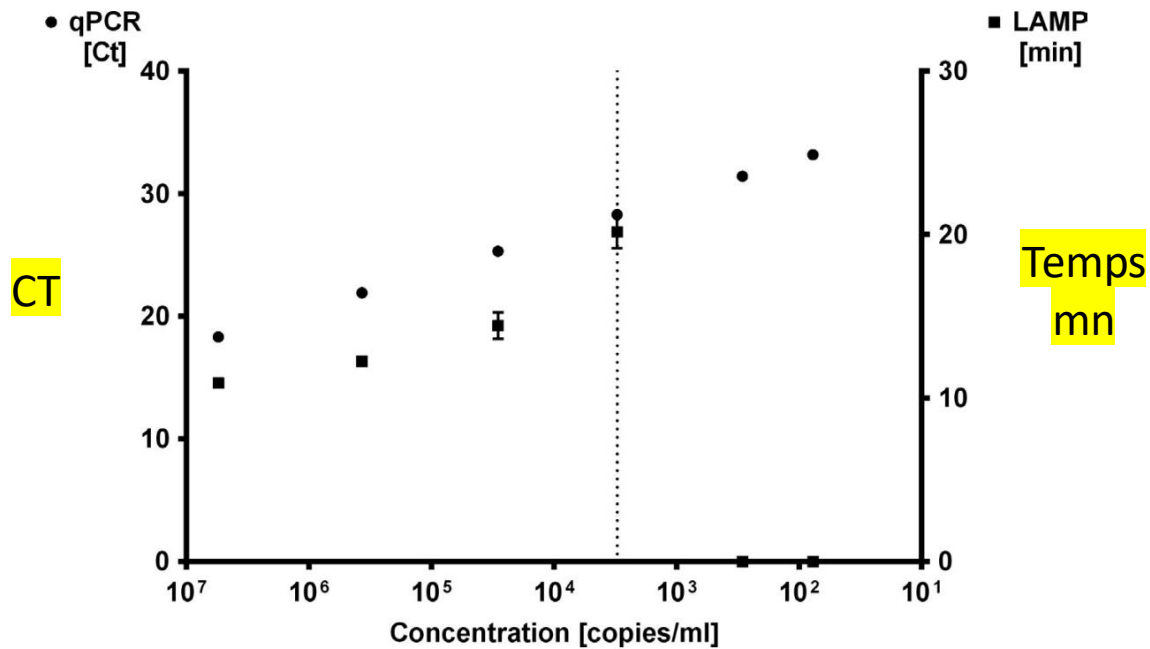
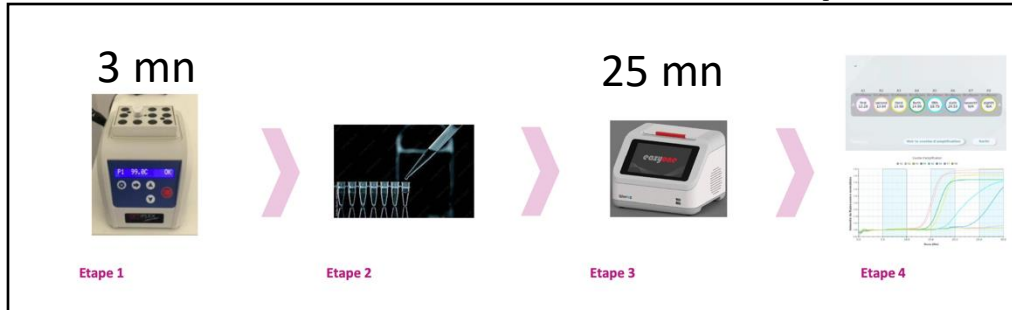
LAMP workflow

Nombreuses applications :
diagnostic du paludisme +++

30 mn



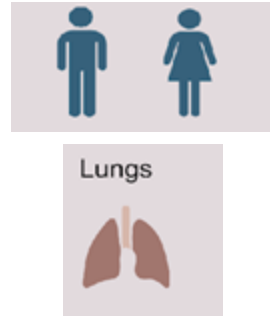
Identification rapide



LAMP :
sensibilité < qPCR spécifique
→ limite de détection de l'ADN (LOD)
: 10³ copie/mL
Sensibilité > examen direct

Premières évaluations: qPCR vs LAMP (Eazyplex® PJ)

Etude prospective



Hôpital Essen , Allemagne

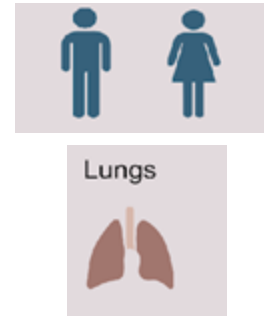
162 patients suspects PCP
162 LBA/ Asp bronchiques
41 qPCR Pneumocystis +

	qPCR		Total
	Positive	Negative	
LAMP			
Positive	27	1	28
Negative < LOD	9	0	0
Negative > LOD	5	111	125
Invalid	0	9	9
Total	41	121	162

LAMP	Se = 84%	VPP = 96%
	Sp = 99%	VPN = 96%

Scharmman U. et coll, Mycoses 2020

Etude rétrospective



Hôpital Fribourg , Allemagne

47 patients PCP
& 57 patients non PCP
104 LBA

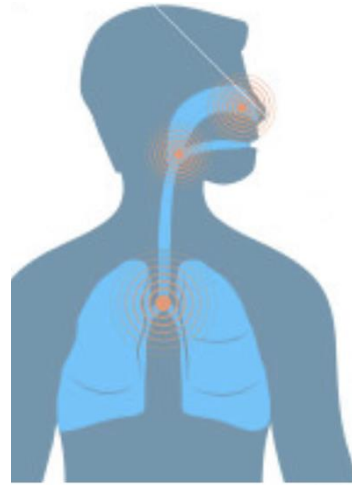
LAMP	qPCR
Se = 95,7%	Se = 95,9%
Sp = 96,5%	Sp = 96,5%

Huber T. et coll., JCM 2020

LAMP pour diagnostic rapide de la pneumonie à Pneumocystis :
une alternative aux tests d'immunofluorescence ? Ou plus !!!

Node J et coll. J Med Mycology 2024

Diagnostic mycologique de la Pneumocystose : délais de rendu des résultats des tests



Résultats

ADN fongique

1° LAMP : 30 mn

2° PCR : 1-6 jours

Prélèvements respiratoires

Lavage rhino pharyngée

ECBC

Crachat induit

LBA

sérum

Résultats

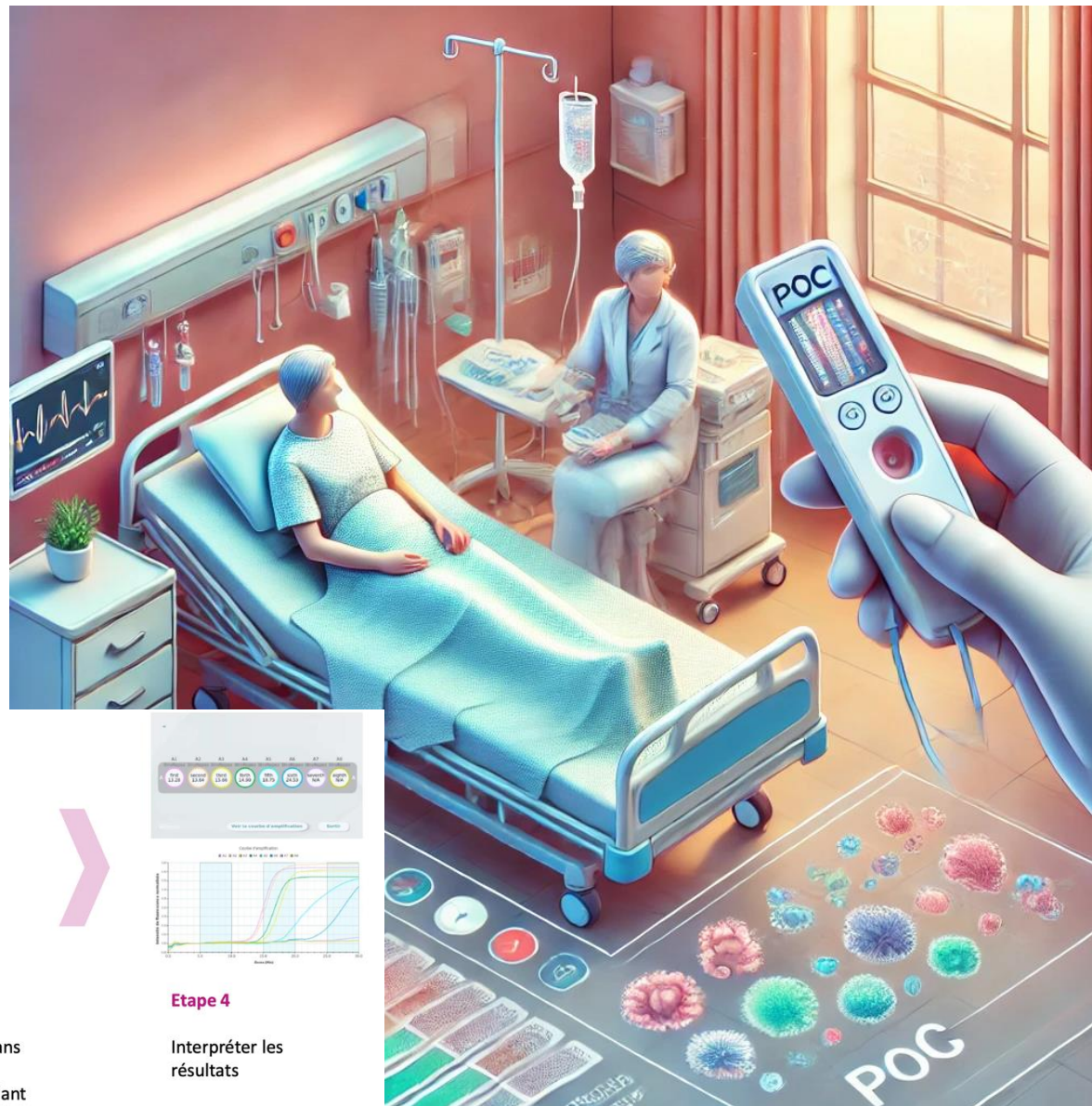
BDG sérique

1-6 jours

Fungitell

Fungitell STAT™

LAMP Utilisable en POC ?



Etape 1

Lyse de l'échantillon (3 à 5 min) → pas d'extraction !



Etape 2

Ajouter 25µl d'échantillon



Etape 3

Charger les barrettes dans l'appareil et lancer le programme correspondant

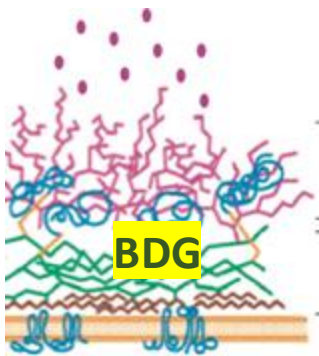


Etape 4

Interpréter les résultats

Béta-D-Glucane-sérum une aide pour le diagnostic d'infections sous cutanées chez les patients transplantés de reins

Champignons ?



Medical Mycology, 2024, 62, myae001

<https://doi.org/10.1093/mmy/mvae001>

Original Article

Advance access publication date: 16 January 2024

ISHAM
INTERNATIONAL SOCIETY FOR
HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY

OXFORD
UNIVERSITY PRESS

**Deep cutaneous mycoses in kidney transplant recipients:
Diagnostic and therapeutic challenges**

Bertin C. et coll.

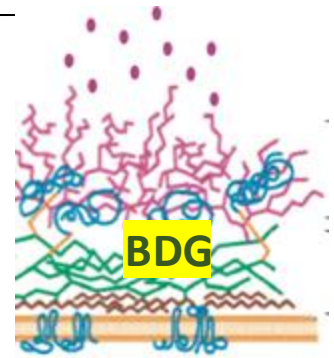
Medical Mycology 2024

20 patients transplantés/mycoses sous-cutanées

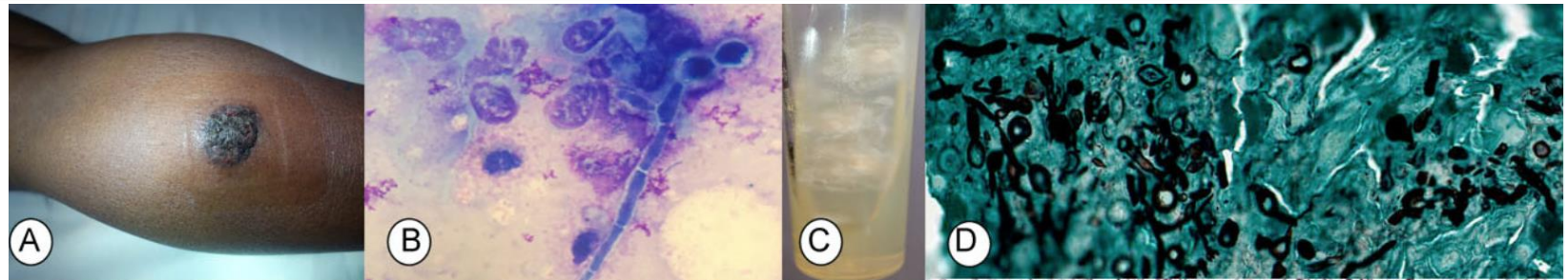
BDG sérum + = 20/20 pts

valeur médiane **BDG sérum** : 298 pg/ml (127 pg/ml -15164 pg/ml)

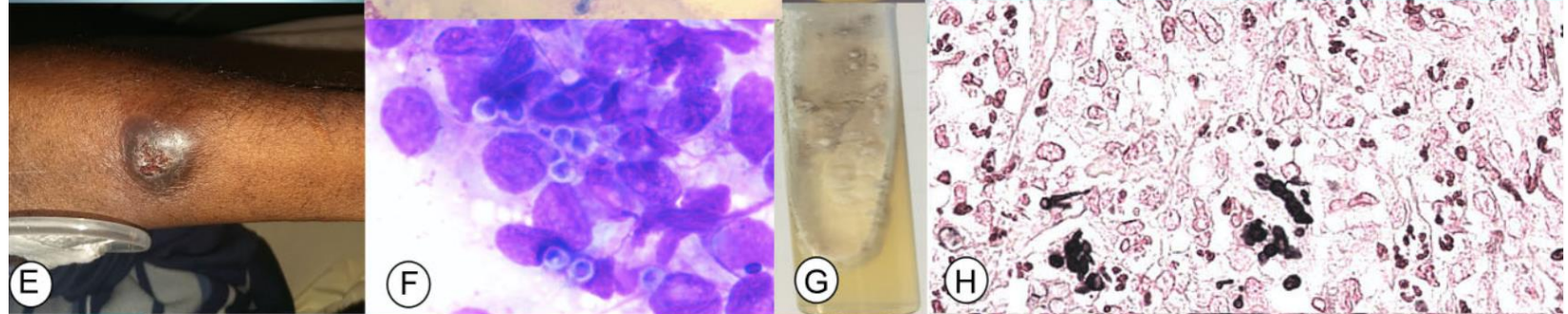
Multiple lésions : 1995 pg/ml \pm 4419 (test fungitel)



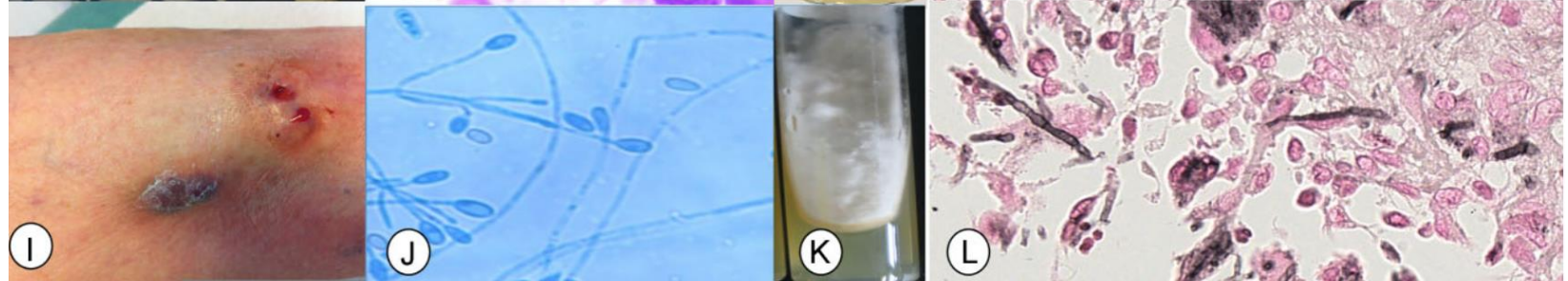
Alternaria infectoria
infection



Paecilomyces lilacinus
infection.



Scedosporium apiospermum
infection

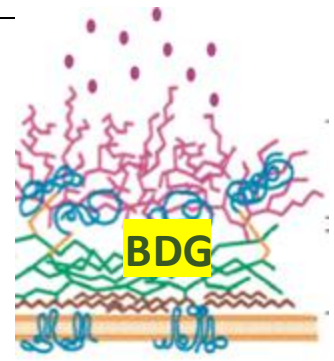


20 patients transplantés/mycoses sous-cutanées

BDG sérum + = 20/20 pts

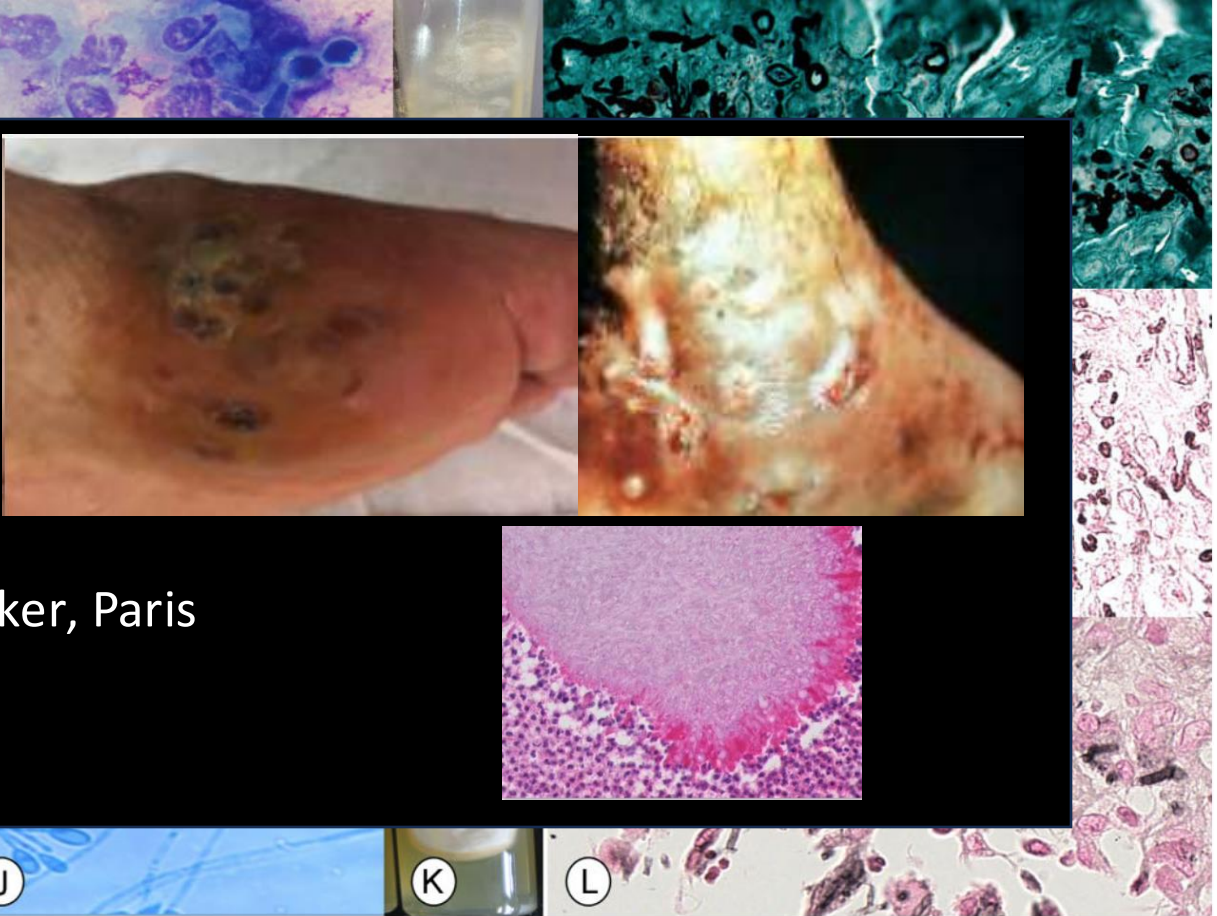
valeur médiane **BDG sérum** : 298 pg/ml (127 pg/ml -15164 pg/ml)

Multiple lésions : 1995 pg/ml \pm 4419 (test fungitel)



BDG sérum marqueur intéressant pour le diagnostic de Mycétomes fongiques

Photos : Stéphanie Leclerc-Mercier, Hôpital Necker, Paris



Intérêt de la PCR pour le dépistage de *Candida auris*



Mesures de prise en charge de patient infecté ou colonisé par *Candida auris*



HCSP [En ligne]. 2019. <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/>

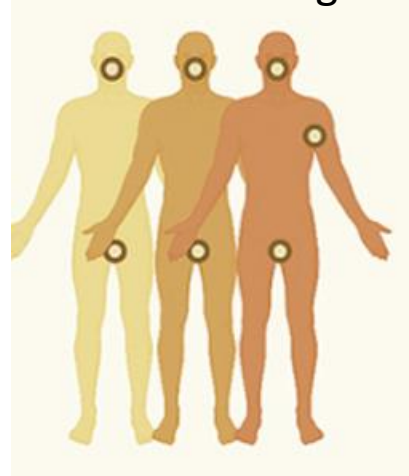
Tout patient hospitalisé à l'étranger → 12 mois précédent, doit être systématiquement dépisté

The New York Times
April 8th 2019

accueil / avis et rapports

2 écouvillons

Nez. - Aisselle+ Inguinal



1-2 jrs



PCR

~10 µl of surveillance sample



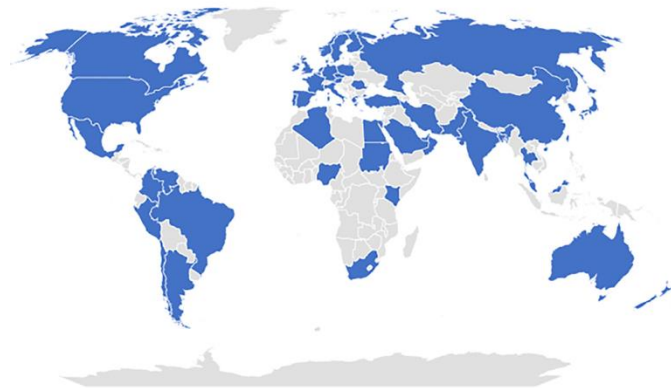
Culture

5-6 jrs

Sensibilité qPCR**C. auris* > culture
Facilité pour traiter les prélèvements
Rapidité du rendu des résultats

Dannaoui E et coll. ISHAM 2022

* Fungiplex® *Candida Auris*



Avancée diagnostique la plus remarquable en matière de marqueur fongique

Mucormycoses :

Détection d'ADN fongique

« facile et précoce »

sérum, LBA

& biospies

PCR Mucorales/ L. Millon et équipe de Besançon

Journal of Fungi 2019
MAJOR ARTICLE
Review
Molecular Strategies to Diagnose Mucormycosis
Laurence Millon^{1,2,*}, Emeline Scherer^{1,2}, Steffi Rocchi^{1,2} and Anne-Pauline Bellanger^{1,2}
¹Unit of Mycology, University Hospital, 25000 Besançon, France; ²UMR 6249 Chrono-environnement, UFR de Sciences de la Terre et de l'Environnement UMR/CNRS 6249, University of Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France
*Correspondence: laurence.millon@chu-besancon.fr; Tel: +333-70-63-23-53
Received: 18 March 2019; Published: 20 March 2019

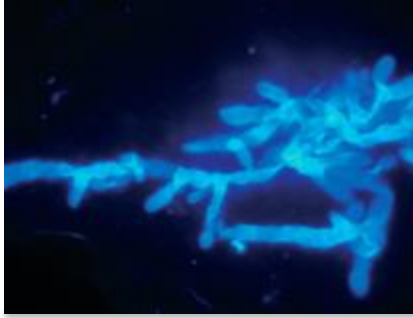
Journal of Clinical Microbiology and Infection 2016
Original article
Early diagnosis and monitoring of mucormycosis through circulating DNA in serum: retrospective (RESSIF)
L. Millon^{1,2,*}, R. Herbrecht³, V. Letscher-Bru^{10,11}, S. Cassat¹², D. Toubas^{17,18}, O. Auger¹⁹ French Mycosis Study Group

Journal of Clinical Microbiology 2018
Quantitative PCR (qPCR) Detection of Mucorales DNA in Bronchoalveolar Lavage Fluid To Diagnose Pulmonary Mucormycosis
Emeline Scherer,^{a,b} Xavier Irat^{c,d}, Anne Pauline Bellanger,^{a,b} Damien Dupont,^{a,c} Juliette Gultard,^{a,h} Frederic Gabriel,^{a,b} Sophie Cassaing,^{c,i} Eléna Charpentier,^{c,i} Sarah Guenounou,^a Murielle Cornet,¹ Françoise Botterel,² Steffi Rocchi,^{a,b} Ana Berceanu,^a Laurence Millon

BMT 2018
TECHNICAL REPORT
Development of a quantitative PCR detecting *Cunninghamella bertholletiae* to help in diagnosing this rare and aggressive mucormycosis
Anne-Pauline Bellanger^{1,2}, Ana Berceanu³, Steffi Rocchi^{1,2}, Benoît Valot¹, Jean Fontan³, Adrien Chauchet³, Nicolas Belin⁴, Emeline Scherer^{1,2}, Eric Deconinck³, Jean-Christophe Navellou⁴, Laurence Millon^{1,2}

Clinical Infectious Diseases 2022
MAJOR ARTICLE
Evaluation of Serum Mucorales Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Diagnosis of Mucormycoses: The MODIMUCOR Prospective Trial
Laurence Millon,^{1,2} Denis Caillot,³ Ana Berceanu,^{4,5} Stéphane Bretagne,^{6,7} Fanny Lantermet,^{8,9} Florent Morio,^{10,11} Valérie Letscher-Bru,¹² Frédéric Dalle,^{13,14} Blandine Denis,¹⁵ Alexandre Alanio,^{16,17} David Boutolle,¹⁸ Marie-Elisabeth Bougnoux,^{19,20} Françoise Botterel,^{21,22} Taieb Chouaki,²³ Amandine Charbonnier,²⁴ Florence Ader,²⁵ Damien Dupont,²⁶ Anne-Pauline Bellanger,²⁷ Steffi Rocchi,²⁸ Emeline Scherer,²⁹ Houssni Gbaguidi-Heure,³⁰ and Reul Herbrecht³¹

La charge d'ADN dans le sérum au cours des mucormycoses est 10 à 100 fois PLUS ÉLEVÉE que celle détectée dans le sérum des patients atteints d'aspergilloses invasive



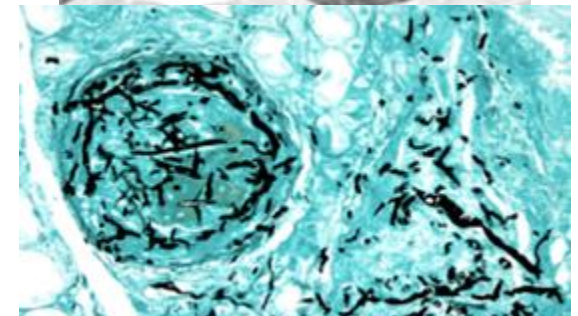
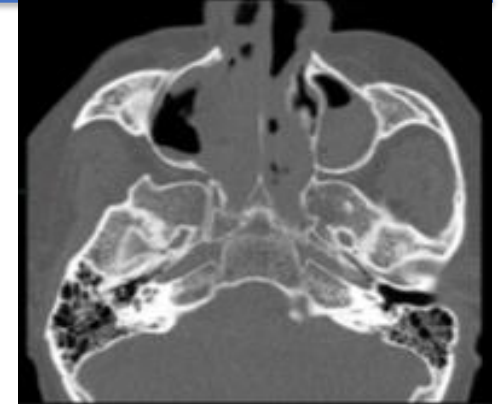
Mucormycoses

- Infections fongiques rares mais pronostic redoutable
- Contextes cliniques très différents :
 - Patients ID, diabétiques, traumatismes cutanés et grands brûlés
- Formes cliniques polymorphes :
 - Peau, rhino-cérébrale, pulmonaire ou disséminée
- Agents pathogènes nombreux

✓ **qPCR maison*** : cibles 18S rDNA : 3 qPCRs

Mucor/Rhizopus, Lichtheimia et Rhizomucor

*Sensibilité -81%- et Spécificité -92%- élevées



Plimis B et coll, M/S 2013 ; Lanternier F et coll., CID 2012 ; Lanternier F et coll., JAC 2015 ;

*Millon L et coll., CID 2013 ; Millon L et coll., CMI 2016 ; Millon L et coll., J Fungi 2019

qPCR *Mucorales* et Mucormycoses

Evaluation clinique

PHRC ModiMucor : 232 pts*

*Millon L et coll., CID 2022

- **qPCR (maison) sérum*** :
- **Excellent marqueur diagnostique**
- Se: 85,2%, Sp: 89,8%
-VPP = 52,3% - VPN = 97,9%
- **Marqueur précoce :**
Culture/imagerie :
délai de positivité de qPCR :
- 4 jours **avant date de prélèvement**
mycologique positif
- 2 jours avant diagnostic radiologique

Table 1. Performance and Diagnosis Accuracy of Mucorales qPCR Determined on Cohort 1 (n = 232 patients)

		95% CI
Sensitivity	85.2%	66.3%–95.8%
Specificity	89.8%	84.8%–93.5%
Positive predictive value	52.3%	36.7%–67.5%
Negative predictive value	97.9%	94.6%–99.4%
Positive likelihood ratio	8.3	5.4–12.8
Negative likelihood ratio	.17	.07–.41

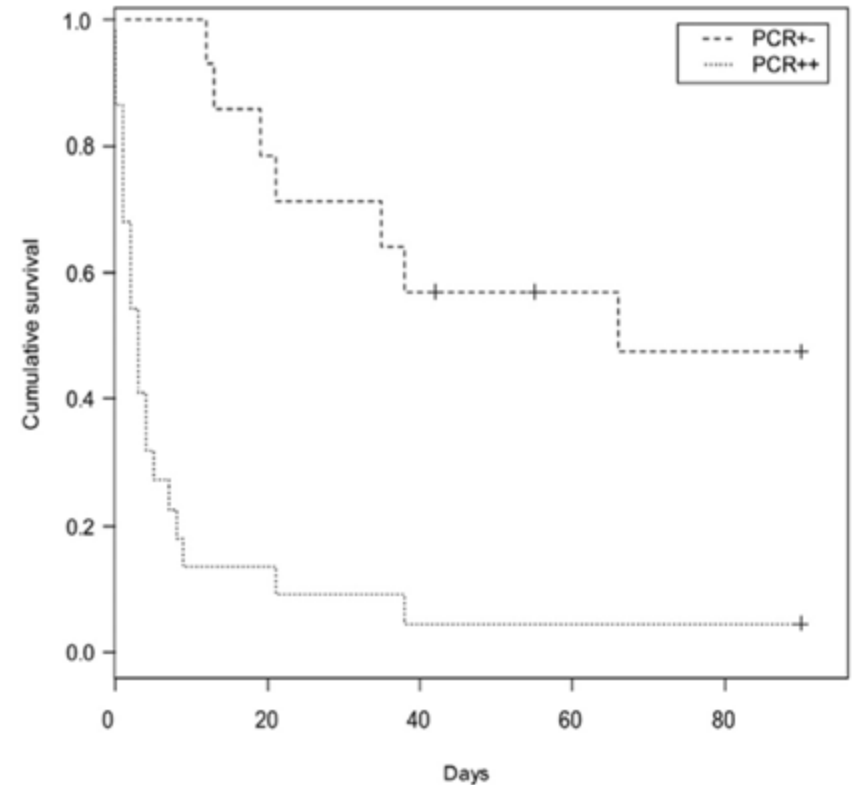
qPCR *Mucorales* et Mucormycoses

Evaluation clinique

PHRC ModiMucor : 232 pts*

*Millon L et coll., CID 2022

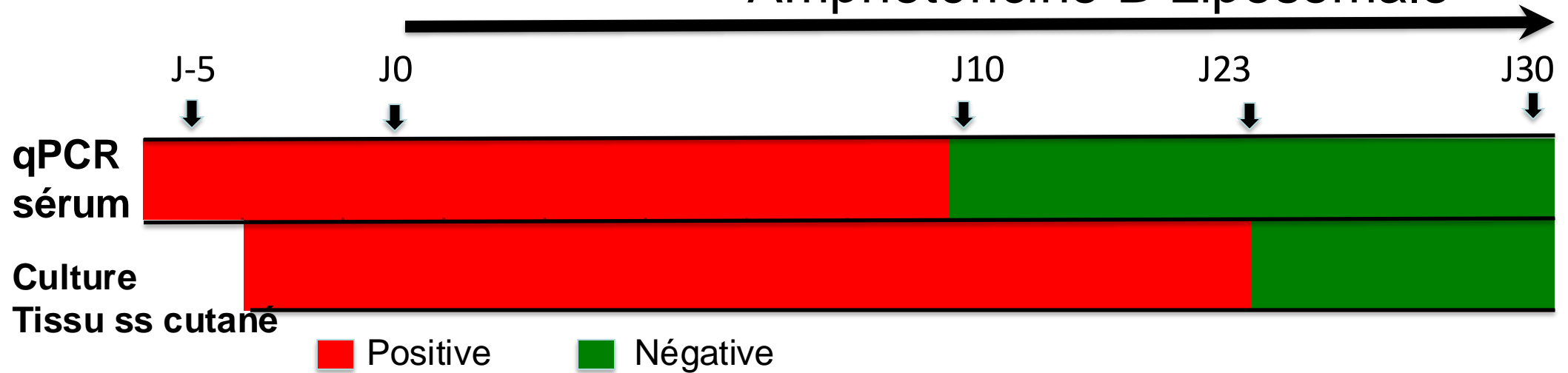
- **qPCR (maison) sérum*** : Se: 85,2%, Sp: 89,8%
- Excellent marqueur diagnostique
- Marqueur précoce :
- **Valeur pronostique et intérêt surveillance de l'ADNémie pendant le traitement curatif:**
Délai négativation après traitement à J10 (33 pts)
 - 14 pts négativation qPCR vs 19 pts qPCR +
 - mortalité à J84 (4% vs 48%) ($p < 10^{-6}$)



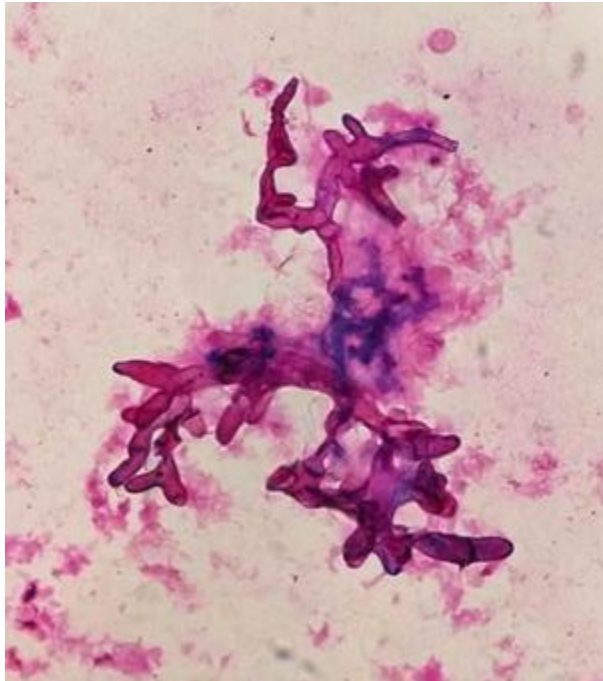
Millon L et coll., CMI 2016



Amphotéricine B Liposomale



...qPCR sérique : un marqueur essentiel pour la prise en charge des mucormycoses ?



Patiente Necker, Mucormycose cutanée

F. Lanternier & M.E .Bougnoux



Kits commercialisés
performances diagnostiques < à celles de la qPCR « maison »

N = 22 patients Mucormycose
-58 prélèvements (+ qPCR
maison)

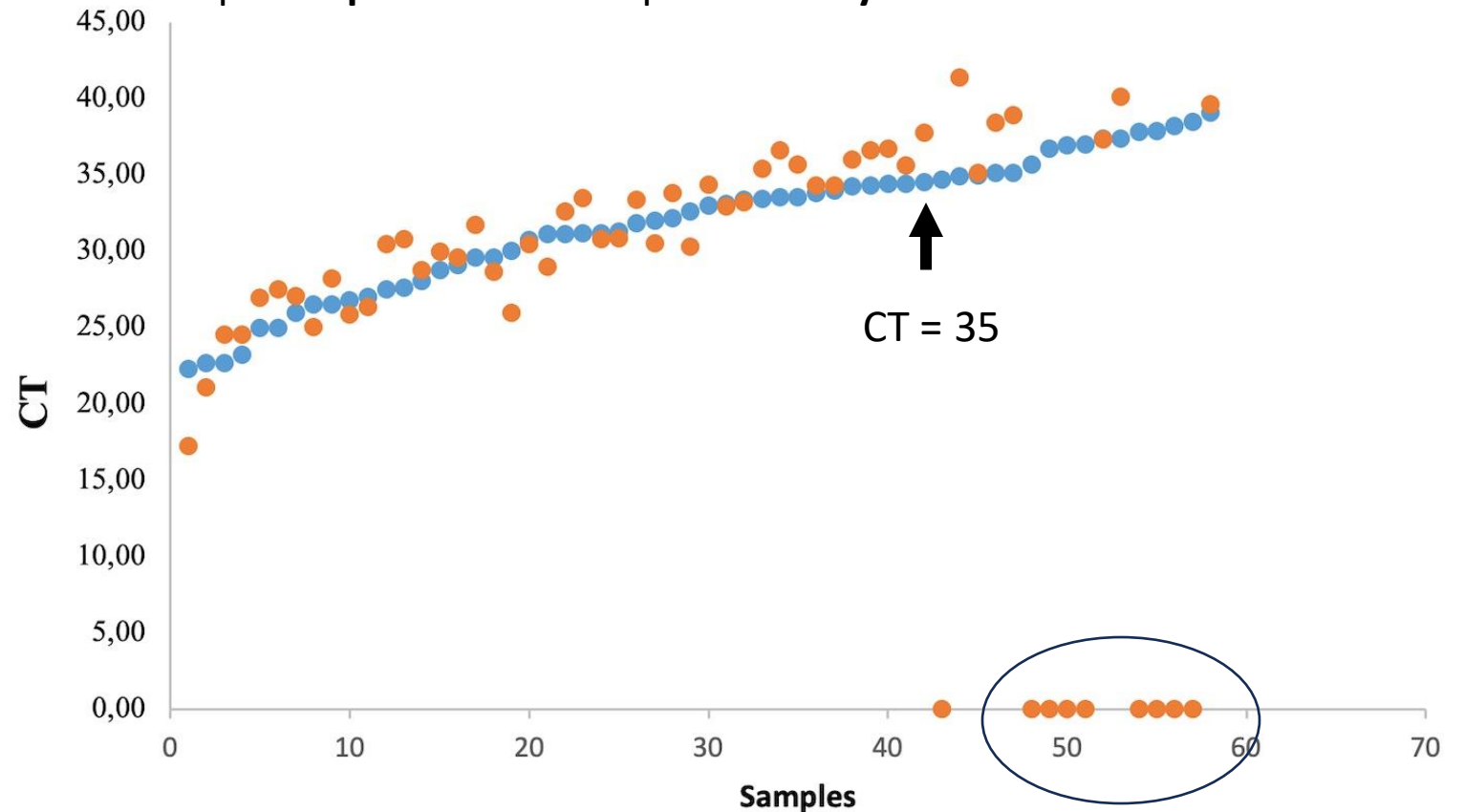
Résultats Kit PCR MycoGENIE

* **Se = 84,5 % et Sp = 100%**

* **Différence moyenne de CT :**
1,8 cycle (IQR, 0,1 - 5).

* **Coefficient moyen de
variation :**
3 % (0,1 % à 11,2 %)

Comparaison des valeurs des CT d'échantillons positifs obtenus
par la **qPCR maison** et par le kit **MycoGENIE®**.



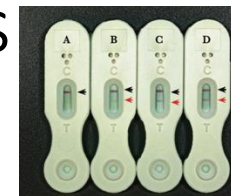
qPCR MUCORALES :

un marqueur diagnostique essentiel !

- qPCR Mucorale maison* déployée dans de nombreux labo en France → PHRC ModiMucor (L. Million)
- Confirmation des résultats PHRC ModiMucor -CID 2022
→ inclusion de la qPCR Mucorale dans les reco EORTC ...?
- récent Kits commercialisés MucorGenius[®], MycoGENIE[®] et d'autres à venir, évaluation clinique...
→ font moins bien que la qPCR maison

Accès rapide au diagnostic des infections fongiques grâce aux tests LFA/LFD (TDR)

Détection d'antigènes fongiques



- TDR : tests les plus utilisés pour le diagnostic de Cryptococcose et le diag d'Histoplasmose
- Evaluation diag Histoplasmose



352 pts inclus

LFA & EIA : urines

- **Histoplasmose** : n= 44 patients H prouvées
N= 22 pts H probable
- Controls n= 286

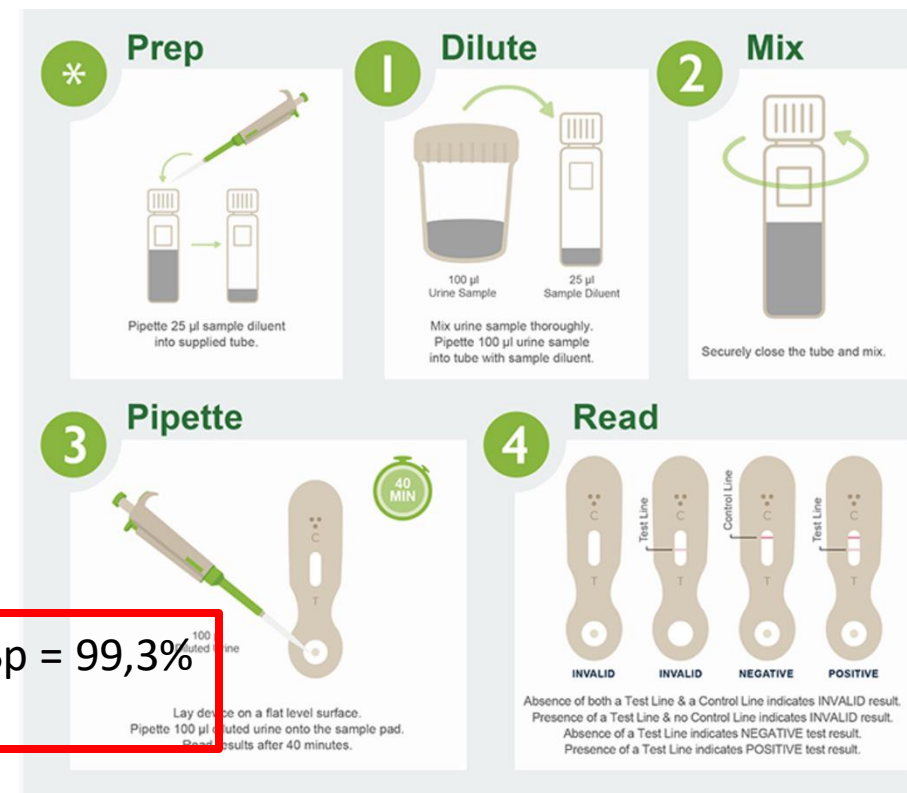
LFA vs EIA

concordance K=0,84

LFA* → Se globale = 78,8% ; Sp = 99,3%

Se cas H prouvées : = 93,2%

*Kit MiraVista





Quelques messages

- Les biomarqueurs fongiques : utilisables pour le diagnostic d'infections fongiques invasives/ disséminées ... mais pas que...
- Nouveautés en termes de standardisation permettant des évaluations cliniques → valeurs diagnostiques / bon usage de la recherche des marqueurs fongiques
- Avancées techniques notables sur les méthodes de détection permettant un accès rapide au diagnostic des infections fongiques (**LAMP/LFA** → contextes : urgence diagnostique/ disponibilité pays à faible et moyen revenus)
- Il reste encore des GAPs et un manque d'algorithmes diagnostiques établis pour les différentes infections



Merci de votre attention !

