



**HAL**  
open science

**Place du sérodiagnostic dans les infections fongiques invasives à Candida. Enquête sur la prescription des sérologies Candida au CHU de Nancy et comparaison de deux kits commerciaux ELISA pour la détection des antigènes mannanes et anticorps anti-mannanes**

Cynthia Pianetti

► **To cite this version:**

Cynthia Pianetti. Place du sérodiagnostic dans les infections fongiques invasives à Candida. Enquête sur la prescription des sérologies Candida au CHU de Nancy et comparaison de deux kits commerciaux ELISA pour la détection des antigènes mannanes et anticorps anti-mannanes. Sciences pharmaceutiques. 2015. hal-01732226

**HAL Id: hal-01732226**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732226>**

Submitted on 14 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE  
2015

---

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE**  
**du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**de BIOLOGIE MEDICALE**  
Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 09 avril 2015

Par **Cynthia PIANETTI**  
né (e) le 03 août 1986

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE**  
**pour le DIPLOME D'ETAT**  
**de DOCTEUR en PHARMACIE**

---

**Place du sérodiagnostic dans les infections fongiques invasives à *Candida*.**  
**Enquête sur la prescription des sérologies *Candida* au CHU de Nancy et**  
**comparaison de deux kits commerciaux ELISA pour la détection des antigènes**  
**mannanes et anticorps anti-mannanes**

---

Membres du Jury

**Président :** Madame le Professeur FINANCE C, PU-PH, Faculté de Pharmacie Nancy  
**Juges :** Madame le Professeur MACHOUART M, PU-PH, Faculté de Médecine Nancy  
Madame le Docteur DEBOURGOGNE A, MCU-PH, Faculté de Médecine Nancy  
Madame le Docteur HENARD S, MCU-PH, Faculté de Médecine Nancy

UNIVERSITÉ DE LORRAINE  
FACULTÉ DE PHARMACIE  
Année universitaire 2014-2015

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Béatrice FAIVRE

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Conseil de la Pédagogie**

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

**Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier**

Président, Béatrice DEMORE

**Commission Prospective Facultaire**

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

**Commission de la Recherche**

Président, Raphaël DUVAL

**Responsable de la filière Officine**

**Responsables de la filière Industrie**

**Responsable de la filière Hôpital**

**Responsable Pharma Plus ENSIC**

**Responsable Pharma Plus ENSALA**

**Responsable de la Communication**

**Responsable de la Cellule de Formation Continue  
et individuelle**

**Responsable de la Commission d'agrément  
des maîtres de stage**

**Responsables des échanges internationaux**

**Responsable ERASMUS**

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Marie-Paule SAUDER

Béatrice FAIVRE

Béatrice FAIVRE

Bertrand RIHN

Mihayl VARBANOV

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Section CNU\* Discipline d'enseignement

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Chantal FINANCE	82	<i>Virologie, Immunologie</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Jean-Claude BLOCK	87	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Eau, Santé, Environnement</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

**MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique</i>

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>

ENSEIGNANTS (suite)	Section CNU*	Discipline d'enseignement
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86	Droit en Santé
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique
PROFESSEUR ASSOCIE		
Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
PROFESSEUR AGREGÉ		
Christophe COCHAUD	11	Anglais

\*Disciplines du Conseil National des Universités :

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**D'** honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**D'**e ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE  
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX  
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES  
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES  
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».



# REMERCIEMENTS

## **Au président de jury,**

Madame le Professeur C. FINANCE,  
PH-PH au laboratoire de Virologie,  
CHU de Nancy, Faculté de pharmacie, Nancy

*Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de mon jury.  
Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mes remerciements les plus sincères.*

## **A ma directrice de thèse,**

Madame le Docteur A. DEBOURGOGNE ,  
MCU-PH au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nancy, Faculté de médecine,  
Nancy

*Pour avoir accepté d'être ma directrice de thèse et m'avoir suivi et accompagné tout au long de mon travail. Pour ton investissement, ton intérêt envers ce travail, et ta patience dans sa relecture et sa correction.  
Reçois toute ma reconnaissance.*

## **Au Jury,**

Madame le Professeur M. MACHOUART,  
PU-PH au Laboratoire de Mycologie-Parasitologie  
CHU de Nancy, Faculté de médecine, Nancy

*Je suis honorée que vous fassiez partie de ce jury.  
J'apprécie votre enthousiasme à vouloir juger ce travail.  
Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et le témoignage de mes remerciements sincères  
Je vous remercie également pour votre disponibilité à faire partager la mycologie et à transmettre les connaissances au sein du laboratoire.*

## **Au Jury,**

Madame le Docteur S. HENARD,  
MCU-PH au service de Maladies Infectieuses et Tropicales  
CHU de Nancy, Faculté de Médecine, Nancy

*Vous me faites l'honneur de siéger dans ce jury de thèse en qualité de clinicien.  
Je suis reconnaissant de vous avoir dans ce jury et vous remercie de me faire partager votre regard sur mon travail.*

A Murielle ainsi qu'aux autres techniciennes de sérologie,  
Merci à vous pour votre aide précieuse dans certaines manipulations techniques.

A l'ensemble du personnel du laboratoire de Parasitologie-Mycologie,  
Pour votre accueil chaleureux et votre soutien.

A toutes les équipes qui m'ont accueillie et formée pendant ces quatre années d'internat,  
Aux techniciens qui sont devenus des amis : Céline, Corinne, Bud, Cécilia

## **A ma famille,**

A mes parents, pour votre soutien et vos encouragements durant toutes mes études.  
Papa, pour m'avoir aidé dans tous ces déménagements c'est probablement le dernier.

A ma grand-mère, un grand merci pour ton soutien inconditionnel. Finalement ce n'était pas si dur le Nord.

A mon oncle Christian et ma cousine Christianny, pour les moments passés ensemble à Nancy. Ça y'est la Lorraine c'est fini ...

A Kelly et Yoann qui sont toujours présents à mes côtés.  
Ainsi que mon beau-frère Xavier pour ta gentillesse.

A Cédric, pour avoir été toujours là pour moi malgré tout. Tu m'as tant apporté. A Evelyne pour votre présence et votre réconfort, pour tous les moments passés ensemble.

**A mes amis nancéens, qui m'ont fait oublier que j'étais loin du soleil et de la mer.**

A Elise « ma poulette », pour tous nos fous rires mémorables. J'en rigole encore rien que d'y penser. J'espère qu'il y en aura plein d'autres malgré la distance.

Prends bien soin de Torix et de Ginette dans ton 88 m<sup>2</sup> rue saint Didier.

A Delphine « ma Delphoncée », une vraie amitié est née entre nous à Nancy, puis on s'est retrouvée à la Réunion. Que de bons moments partagés. On se retrouve très vite sous les tropiques pour des ptes Caïpi.

A Nassim, mon voisin mais ami avant tout, merci pour tes tisanes en peignoir du dimanche mais pas avant « quatorzweure ». Tu vas drôlement me manquer. Tu as intérêt de vite venir nous voir !

A Marie, sans toi les mots ragot et potin n'existeraient pas. Merci pour tes questions existentielles qui me donnent le sourire, pour ton soutien pour la rédaction de ma thèse. Ça y'est j'ai enfin accouché comme tu dis !

A Virginie « poufinette », parce qu'avoir refusé une tisane chez toi fut mon plus gros regret à Nancy.

A Marion, pour ta joie de vivre.

A Solenne « Buchette », à nos vacances passées ensemble.

A Vlad « la voix », pour tes sms qui ont aucun sens et grâce à toi tout l'hôpital d'enfants est au courant.

A Max, A Thibaut pour votre amitié.

A mes derniers cointernes pour m'avoir supporté ces derniers mois : Loïc, Alain

A Marie pour ta bonne humeur et ton dynamisme inépuisables. Faut que je t'emmène à l'Arq avant mon départ !

A toutes les autres belles rencontres que j'ai faites tout au long de mon internat : Hélène, Antonin, Jessie, Maxime, Delphine Michmich, Maria et Ben, Margaux et Raph, Anthony, Lucille, Dimitri, Brice.

## **A mes amis de la Réunion,**

A Djemel « ma petite cagnette »,

Parce qu'ensemble on a inventé un nouveau concept de colocation !

Je ne pourrais jamais assez te remercier pour ton accueil sur le petit caillou, ta gentillesse, pour toutes tes soirées traquenards, pour ton « je ne sais pas ce qu'il s'est passé » et les rando que tu n'as jamais faites avec moi. On va bientôt remettre ça.

A ma petite Chacha, Mi aime a ou! J'ai tellement hâte de te retrouver pour une petite session PSP.

A mes autres coloc: Elise, Antoine et Francky « ptit bizu »

Parce que la Pink House m'a vendu du rêve pendant 6 mois.

Vous avez été une famille pour moi.

A mes autres amis qui m'ont soutenu pendant mon retour hivernal à Nancy :

Mon autre cagnette Tienou, Stef, Clémence et les deux Damiens.

On se retrouve très bientôt au Tity ou ailleurs!!

Et tous ceux que j'ai oublié de citer.

Un grand merci à vous tous pour tout ce que vous m'apportez.

## SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES .....	5
LISTE DES TABLEAUX .....	7
LISTE DES ABREVIATIONS .....	9
Introduction .....	11
<b>PARTIE I : LES CANDIDOSES INVASIVES : Données de la littérature.....</b>	<b>13</b>
I. Agent pathogène.....	14
1. Historique .....	14
2. Le genre <i>Candida</i> .....	14
3. Description morphologique.....	14
4. Habitat .....	15
II. Physiopathologie des candidoses invasives .....	18
1. Modes de contamination .....	18
2. Chronologie de l'infection .....	18
3. Les facteurs de virulence du champignon .....	19
4. Facteurs de défense de l'hôte.....	20
4.1. Facteurs locaux non immunologiques .....	20
4.2. Réponse immunitaire.....	21
III. Epidémiologie des candidoses invasives.....	23
1. Épidémiologie et impact des infections invasives à <i>Candida</i> .....	23
2. Les espèces responsables de candidémies.....	25
3. Morbidité et mortalité.....	27
4. Epidémiologie des résistances fongiques .....	27
5. Facteurs de risque.....	28
IV. Tableaux cliniques des candidémies et infections systémiques .....	31
1. Manifestations cutanées .....	32
2. Endophtalmie .....	33
3. Candidoses cardiaques .....	34
4. Candidoses ostéoarticulaires .....	34
5. Candidoses du SNC.....	35
6. Candidoses pulmonaires.....	35
7. Candidoses hépatosplénique (candidose disséminée chronique).....	35

8. Candidoses rénales .....	36
9. Péritonites candidosiques .....	37
V. Méthodes de diagnostic biologique des candidoses invasives .....	37
1. Mycologie phénotypique .....	37
1.1. Prélèvement .....	37
1.2. Examen direct .....	38
1.3. Culture .....	41
1.4. Identification.....	49
2. Biologie moléculaire .....	58
2.1. Méthodes d'identification moléculaire.....	58
2.2. Diagnostic moléculaire des candidoses invasives .....	60
3. Méthodes diagnostiques indirectes.....	61
3.1. $\beta$ -D glucanes.....	61
3.2. Détection des mannanes circulants et des anticorps sériques anti-mannanes .....	63
3.3. Autres tests .....	64
4. Détermination de la sensibilité aux antifongiques .....	65
4.1. Intérêt et indications .....	65
4.2. Méthodes utilisées .....	65
4.3. Interprétation de l'antifongigramme.....	69
VI. Traitement des infections fongiques invasives.....	70
1. Les antifongiques .....	70
1.1. Molécules antifongiques utilisées.....	70
1.2. Mécanismes d'action .....	72
1.3. Spectre d'activité .....	74
2. Mesures générales de prise en charge d'une candidose invasive.....	75
3. Stratégie de prise en charge des candidoses invasives.....	76
3.1. Définitions .....	76
3.2. Recommandations françaises .....	77
3.3. Recommandations américaines .....	79
3.4. Recommandations européennes .....	81
3.5. Comparaison des recommandations américaines et européennes .....	83
3.6. Localisations particulières .....	84
4. Mécanisme de résistance des <i>Candida</i> aux antifongiques .....	85

**PARTIE II : ENQUÊTE SUR LA PRESCRIPTION DES SEROLOGIES *CANDIDA* AU CHU DE NANCY ..... 86**

I.	Les objectifs de l'enquête.....	87
II.	Méthodes .....	87
III.	Résultats .....	88
	1. Données sur la prescription de sérologie <i>Candida</i> au CHU de Nancy .....	88
	2. Compte rendu de l'enquête .....	90
IV.	Discussion .....	92

**PARTIE III : PLACE DU SERODIAGNOSTIC DANS LES CANDIDOSES INVASIVES ..... 95**

I.	Contexte scientifique.....	96
II.	Objet de l'étude .....	99
III.	Matériels et méthodes.....	99
	1. Patients .....	99
	2. Méthodes .....	101
	2.1. Détection des Ag Mn par technique ELISA.....	101
	2.2. Détection des Ac anti-Mn par technique ELISA.....	109
IV.	Résultats .....	115
	1. Caractéristiques des candidémies.....	115
	1.1. Données épidémiologiques.....	115
	1.2. Données mycologiques.....	117
	2. Caractéristiques des sérums collectés .....	122
	3. Résultats des sérologies <i>Candida</i> .....	125
	3.1. Répartition des résultats de sérologies <i>Candida</i> .....	125
	3.2. Taux des Ag et Ac .....	128
	3.3. Cinétique des Ag et Ac : analyse de cas.....	130
	3.4. Relation entre les résultats des sérologies et le nombre de sérums par patient ....	141
	3.5. Précocité du diagnostic.....	141
	4. Comparaison des méthodes PLATELIA <sup>®</sup> / SERION <sup>®</sup> .....	144
	4.1. Résultats bruts .....	144
	4.2. Résultats discordants .....	145
	4.3. Performance des tests .....	146

V.	Discussion .....	148
	1. Données épidémiologiques .....	148
	2. Données mycologiques .....	149
	3. Place des hémocultures dans le diagnostic des candidoses invasives.....	151
	4. Place des sérologies <i>Candida</i> dans le diagnostic des candidoses invasives.....	153
	4.1. Sensibilité globale des tests .....	153
	4.2. Sensibilité des différentes espèces.....	156
	4.3. Cinétique des Ag et Ac dans l'infection.....	157
	4.4. Date du diagnostic des CI.....	158
	5. Comparaison du kit PLATELIA <sup>®</sup> au kit SERION <sup>®</sup> .....	159
	5.1. Performance.....	160
	5.2. Analyse des discordances .....	161
	Conclusion.....	162
	Annexe .....	164
	Bibliographie.....	166



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation des différentes morphologies de <i>C. albicans</i> .....	15
Figure 2 : Représentation schématique des différentes étapes de la candidose systémique ....	19
Figure 3 : Distribution régionale des candidémies en France métropolitaine (2001-2010).....	24
Figure 4 : Evolution des taux annuels d'incidence et de létalité des infections fongiques invasives de 2001 à 2010 .....	24
Figure 5 : Distribution des espèces de <i>Candida</i> selon les pathologies/soins médicaux d'après l'étude de l' ECMM .....	25
Figure 6 : Répartitions des principales espèces de <i>Candida</i> responsables de fongémie selon l'exposition au fluconazole, à la caspofungine ou à aucun antifongique dans les 30 jours précédents la candidémie .....	26
Figure 7 : Lésions cutanées dues à la dissémination hématogène de <i>Candida</i> .....	33
Figure 8 : Fond d'œil lors d'une endophtalmie à <i>Candida</i> .....	33
Figure 9 : Candidose hépatosplénique.....	36
Figure 10 : Examen à faible grossissement montrant des levures bourgeonnantes sans filaments.....	39
Figure 11 : Amas de blastospores sur une expectoration (coloration MGG).....	40
Figure 12 : Examen anatomo-pathologique d'une biopsie œsophagienne.....	41
Figure 13 : Mise en évidence d'une association de différentes espèces de <i>Candida</i> sur le milieu <i>Candida</i> ID2®.....	44
Figure 14 : Boîte à moustache (Box Plot) des temps de détection de croissance par espèces .	45
Figure 15 : Croissance de <i>Candida</i> et des bactéries dans les différents flacons d'hémocultures après ensemencement avec un mélange levure/bactérie .....	48
Figure 16 : Démarche diagnostique d'identification d'une levure du genre <i>Candida</i> . D'après Letscher-Bru.....	50
Figure 17 : Différents aspects morphologiques microscopiques des levures du genre <i>Candida</i> .....	52
Figure 18 : Bichrolatex albicans® .....	53
Figure 19 : Principe schématique du MALDI-TOF .....	56
Figure 20 : Représentation schématique des différentes régions de l'ADN ribosomique .....	59
Figure 21 : Principe du dosage des $\beta$ -D Glucanes .....	62
Figure 22 : Etude de la sensibilité aux antifongiques azolés fluconazole, voriconazole et posaconazole par bandelette Etest® .....	67
Figure 23 : Mécanismes d'action des antifongiques .....	73
Figure 24 : Relation entre le retard du traitement antifongique et le taux de mortalité dans les candidémies.....	75
Figure 25 : Les différentes thérapeutiques antifongiques envisagées en fonction de l'estimation du risque d'infection fongique invasive et du degré de certitude .....	77
Figure 26 : Traitement des candidoses invasives d'après la conférence de consensus commune de 2004 .....	78
Figure 27 : Services prescripteurs des sérologies <i>Candida</i> au CHU de Nancy .....	89

Figure 28 : Résultats de l'enquête ANOFEL sur les sérologies <i>Candida</i> dans les CHU de français .....	98
Figure 29 : Principe du dosage de l'Ag Mn par technique ELISA Sandwich .....	102
Figure 30 : Plaque de microtitration du kit SERION ELISA® antigen <i>Candida</i> après distribution de la solution d'arrêt. ....	106
Figure 31 : Principe du test ELISA indirect .....	109
Figure 32 : Répartition des services d'hospitalisation des patients à la date de la première hémoculture positive à <i>Candida</i> .....	116
Figure 33 : Répartition des espèces de <i>Candida</i> isolées à partir des flacons d'hémocultures .....	118
Figure 34 : Délai de détection de croissance des levures dans les hémocultures par espèces de <i>Candida</i> .....	119
Figure 35 : Nombre de flacons d'hémocultures retrouvés positifs pour les 39 patients .....	120
Figure 36 : Répartition du nombre total de sérums analysés en fonction de la distance avec la date de prélèvement de la première hémoculture positive (J0) .....	123
Figure 37 : Nombre de sérums collectés par patient .....	123
Figure 38 : Répartition des sérums analysés pour chaque patient en fonction de la distance avec J0 .....	124
Figure 39 : Répartition des résultats de sérologies <i>Candida</i> chez les patients de l'étude .....	125
Figure 40 : Répartition des résultats des sérologies <i>Candida</i> des sérums collectés .....	126
Figure 41 : Répartition des sérologies <i>Candida</i> pour l'ensemble des 92 sérums collectés par rapport à J0 .....	127
Figure 42 : Répartition des résultats des sérologies Ag <i>Candida</i> et Ac anti- <i>Candida</i> pour l'ensemble des 92 sérums en fonction de la distance entre le prélèvement du sérum et de la première hémoculture positive .....	128
Figure 43 : Répartition des taux d'Ag et d'Ac pour l'ensemble des 92 sérums analysés en fonction de la distance entre le sérum et la date de prélèvement de l'hémoculture positive .	129
Figure 44 : Représentation des cinétiques Ac et Ag des patients 2, 3 et 5 .....	136
Figure 45 : Représentation des cinétiques Ac et Ag des patients 6, 14 et 16 .....	137
Figure 46 : Représentation des cinétiques Ac et Ag des patients 19, 23 et 27 .....	138
Figure 47 : Représentation des cinétiques Ac et Ag des patients 28, 29 et 33 .....	139
Figure 48 : Représentation des cinétiques Ac et Ag des patients 15, 24, 32 et 34 .....	140
Figure 49 : Représentation des résultats des sérologies <i>Candida</i> Ag et Ac pour les patients 1 à 39 pour l'ensemble des sérums collectés .....	143
Figure 50 : Comparaison des résultats des dosages Ag et Ac avec le kit Biorad et Virion ...	145
Figure 51 : Analyse des résultats Ag discordants entre le kit PLATELIA® et VIRION® .....	146

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales espèces de <i>Candida</i> impliquées en pathologie humaine .....	17
Tableau 2 : Principaux facteurs de risques prédisposant au développement d'une CI .....	29
Tableau 3 : Sensibilités, spécificités, valeurs prédictives négatives et positives des différents scores de candidoses invasives .....	30
Tableau 4 : Paramètres intégrés dans le calcul du Candida score .....	31
Tableau 5 : Les différents types de candidoses .....	32
Tableau 6 : Modalités de prélèvements selon la localisation des lésions dans les mycoses profondes ou systémiques .....	38
Tableau 7 : Principaux milieux chromogéniques commercialisés pour l'identification des différentes espèces de <i>Candida</i> .....	43
Tableau 8 : Recommandations ESCMID pour le recueil des hémocultures .....	45
Tableau 9 : Caractéristiques des deux principaux automates d'hémocultures utilisés dans les laboratoires .....	46
Tableau 10 : Caractéristiques des différentes galeries commercialisées .....	54
Tableau 11 : Caractéristiques techniques comparées des méthodes de référence du CLSI et de l'EUCAST pour la détermination des CMI des levures .....	66
Tableau 12 : Antifongiques disponibles en France pour le traitement des CI .....	71
Tableau 13 : Spectre des molécules antifongiques utilisables pour le traitement des candidoses systémiques .....	74
Tableau 14 : Niveau de preuve et force des recommandations de la méthode GRADE .....	76
Tableau 15 : Recommandations thérapeutiques IDSA (2009) pour le traitement des candidémies .....	80
Tableau 16 : Recommandations thérapeutiques ESCMID (2012) pour le traitement des candidémies .....	82
Tableau 17 : Tableau comparatif des recommandations IDSA et ESCMID .....	83
Tableau 18 : Comparaison des recommandations ESCMID /IDSA pour le traitement spécifique des localisations particulières .....	84
Tableau 19 : Principales caractéristiques des différentes techniques utilisées pour la recherche des Ac <i>Candida</i> .....	98
Tableau 20 : Tableau comparatif des réactifs utilisés pour le dosage des Ag avec les deux techniques .....	103
Tableau 21 : Tableau comparatif des réactifs utilisés pour le dosage des Ac avec les deux techniques .....	110
Tableau 22 : Présentation des principaux facteurs de risque dans notre population .....	117
Tableau 23 : Délai moyen de positivité des hémocultures en jours pour chaque espèce .....	119
Tableau 24 : Résistances des souches de <i>Candida</i> de notre étude aux différents antifongiques testés au laboratoire .....	121
Tableau 25 : Résultats des sérologies et cartographies <i>Candida</i> prescrites .....	122
Tableau 26 : Répartition des résultats des sérologies en fonction du nombre de sérums par patient .....	141

Tableau 27 : Performance des sérologies <i>Candida</i> Ag et Ac en incluant ou pas les résultats intermédiaires pour les deux kits testés.....	146
Tableau 28 : Performance des sérologies <i>Candida</i> en combinant les 2 tests Ag et Ac en fonction des espèces de <i>Candida</i> détectées par la technique PLATELIA <sup>®</sup> ou VIRION <sup>®</sup> .....	147

## LISTE DES ABREVIATIONS

5-FC : 5-fluorocytosine  
Ac : Anticorps  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ATF : Antifongique  
Ag : Antigènes  
AmB : Amphotéricine B  
ANOFEL : Association française des enseignants et des praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie  
APACHE : Acute Physiology and Chronic Health Evaluation  
βDG : β-(1-3)-D glucanes  
CBS : CentraalBureau voor Schimmelcultures  
CI : Candidose invasive  
CBPs : Clinical Breakpoints  
CCVT : Chirurgie Cardio-Vasculaire et Thoracique  
CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute  
CLRs : C-type Lectine Receptors  
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice  
CNRMA : Centre National de Référence des Mycoses invasives et des Antifongiques  
CCVT : Chirurgie Cardio-Vasculaire et Thoracique  
DO : Densité Optique  
EC : échinocandines  
ECIL : European Conference on Infections in Leukaemia  
ECMM : European Confederation of Medical Mycology  
ESCMID : European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases  
ECV : Epidemiological Cutoff Values  
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
EORTC : European Organisation for Research and Treatment of Cancer  
ETO : Echographie Trans-Œsophagienne  
EUCAST : European committee on antimicrobial susceptibility testing  
FDA : Food and Drug Administration  
HES : Hématéine-Eosine-Safran  
HGE : Hépto-Gastro-Entérologie  
I: Intermédiaire  
IC : Index de colonisation  
IDSA : Infectious Diseases Society of America  
IFI : Immunofluorescence Indirecte  
Ig : Immunoglobuline  
IGS : Inter Genic Spacer  
IRM: Imagerie par Résonance Magnétique  
ISS: Injury Security Score  
ITS : Internal Transcribed Spacer  
IV : Intraveineuse

LAL : Leucémie Aiguë Lymphoïde  
LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde  
LBA : Lavage bronchiolo-alvéolaire  
LCR : Liquide céphalorachidien  
LNHGC :Lymphome non Hodgkinien à grandes cellules  
Ly : Lymphocytes  
MGG : May-Grünwald-Giemsa  
Mn : Mannane  
MOPS : 3-(N-morpholino)-propanesulphonic acid  
NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards  
ODL : Observatoire Des Levures  
PAC :Port à Cath  
PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns  
PAS : Acide périodique de Schiff  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PDP : Prélèvement Distal Protégé  
PMSI : Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information  
PNN : Polynucléaires neutrophiles  
PRRs : Pattern-Recognition Receptors  
RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium  
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate  
Se : Sensibilité  
SFAR : Société Française d'Anesthésie et de Réanimation  
SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquis  
SMD : Syndrome Myélodysplasique  
Sp : Spécificité  
SPILF : Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française  
SRLF : Société de Réanimation de Langue Française  
TLRs: Toll Like Receptors  
TMB : Tétraméthylbenzidine  
UA : Unité Arbitraire  
UFC : Unités formant Colonie  
USI : Unités de Soins Intensifs  
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine  
VPN : Valeur Prédictive Négative  
VPP : Valeur Prédictive Positive

## Introduction

Les infections à *Candida* sont au premier rang des infections nosocomiales fongiques (1). Les candidoses invasives (CI) représentent des complications infectieuses graves et sont encore associées à une mortalité élevée chez les patients immunodéprimés notamment, variant entre 40 et 60 % (2).

Leur diagnostic est difficile en raison des signes cliniques non spécifiques et du caractère naturel commensal de ces pathogènes. L'hémoculture est l'examen de référence (3) et l'isolement d'un *Candida* dans une seule hémoculture suffit à poser le diagnostic. Néanmoins leur faible sensibilité et leur positivité tardive au cours de l'infection sont bien connues. L'imagerie peut aider au diagnostic des candidoses hépatospléniques, mais la plupart du temps les lésions apparaissent lors de la normalisation du taux des polynucléaires neutrophiles (PNN) et celles-ci ne sont pas spécifiques des abcès candidosiques (4).

En raison de ces limites diagnostiques majeures, une CI doit être suspectée chez les patients neutropéniques devant une fièvre résistante à un traitement antibiotique à large spectre en particulier dans les services d'hémo-oncologie. Un traitement antifongique empirique est alors recommandé dans ce cadre ou encore chez les patients à haut risque en réanimation devant une fièvre inexplicée même en l'absence de neutropénie mais la toxicité, la sélection de mutants résistants et le coût sont des inconvénients considérables. L'utilisation du fluconazole en prophylaxie chez les patients à haut risque n'est généralement pas recommandée ; elle s'applique seulement chez les patients qui ont bénéficié d'une chirurgie abdominale avec des perforations gastro-intestinales répétées ou des fistules (5,6).

Dans ce contexte, il y a un grand intérêt à avoir recours à des tests biologiques complémentaires indirects plus sensibles et rapides qui permettent un diagnostic précoce de ces candidoses en vue d'un traitement rapide afin d'améliorer le pronostic de ces infections.

Au cours des dernières décennies, un certain nombre de tests alternatifs à la culture ont été développés, ils reposent sur la détection d'anticorps (Ac), d'antigènes (Ag), de métabolites ou d'acides nucléiques.

La recherche d'Ag sérique de *Candida* par technique ELISA, en association avec la recherche d'Ac anti-*Candida*, a été proposée par certains auteurs depuis déjà une quinzaine d'années (7,8) sans toutefois réellement trouver sa place dans le diagnostic des CI. La sérologie *Candida* (PLATELIA<sup>®</sup>, Bio-rad) fait cependant partie des nouvelles recommandations de

2012 de l'ESCMID pour le diagnostic des candidémies (3). L'Ag recherché est un mannane (Mn), composant majeur de la paroi des *Candida*, capable de former des complexes immuns avec les Ac correspondants. Aujourd'hui, il s'agit de la technique la plus fréquemment utilisée en Europe (9).

L'objectif de notre travail est de déterminer la place des sérologies *Candida* dans le diagnostic d'une CI au sein de notre établissement.

Pour cela, dans un premier temps, une enquête sur la prescription des sérologies *Candida* au CHU de Nancy a été réalisée afin de connaître les indications et d'évaluer les besoins des cliniciens.

Dans un second temps, nous avons souhaité évaluer l'intérêt de la prescription du sérodiagnostic *Candida* au sein d'une population de patients présentant une candidose prouvée. Ainsi, la performance de la détection des Ag manannes et des Ac anti-mannanes dans le diagnostic des CI avec le kit commercial PLATELIA® (Bio-rad) reposant sur la technique ELISA a été établie. De plus, les données ont été comparées avec les résultats d'un autre kit commercialisé par SERION® (Virion) reposant sur la même technique.



# **PARTIE I**

## **LES CANDIDOSES INVASIVES :**

### **Données de la littérature**

## **I. Agent pathogène**

Les candidoses sont des affections fongiques provoquées par des levures appartenant au genre *Candida*.

### **1. Historique**

Les levures sont responsables de pathologies connues depuis l'Antiquité.

Hippocrate avait en effet déjà décrit le muguet au IV<sup>ème</sup> siècle avant J.C. mais ce n'est qu'en 1939 que Langenbeck attribua cette infection buccale caractéristique à un champignon.

En 1847, ce micro-organisme fut nommé *Oidium albicans* par Robien, puis *Monilia albicans* par Zap en 1880. Enfin en 1932, Berhout transféra cette espèce dans le genre *Candida*.

A partir de 1950, avec l'arrivée des antibiotiques et de leurs larges utilisations, le nombre de candidose ne va cesser d'augmenter (10,11).

### **2. Le genre *Candida***

Le genre *Candida* fait partie du phylum des Ascomycètes de la classe des Saccharomycètes (forme télomorphe ou sexuée). En mycologie humaine, la forme sexuée étant rarement rencontrée, le nom de la forme asexuée (anamorphe) est alors utilisé.

Ce genre comprend environ 200 espèces, mais moins d'une vingtaine d'entre elles sont fréquemment impliquées dans un processus pathologique (11).

Ce genre, le plus fréquemment isolé en pathologie humaine, est responsable de plus de 80 % des infections à levures.

Depuis 1984, le genre *Torulopsis*, qui comprenait les espèces ne formant pas de pseudofilaments a été supprimé et regroupé avec le genre *Candida* (10).

### **3. Description morphologique**

Les *Candida* sont des micromycètes (champignons microscopiques). Ces organismes eucaryotes sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) composé de spores.

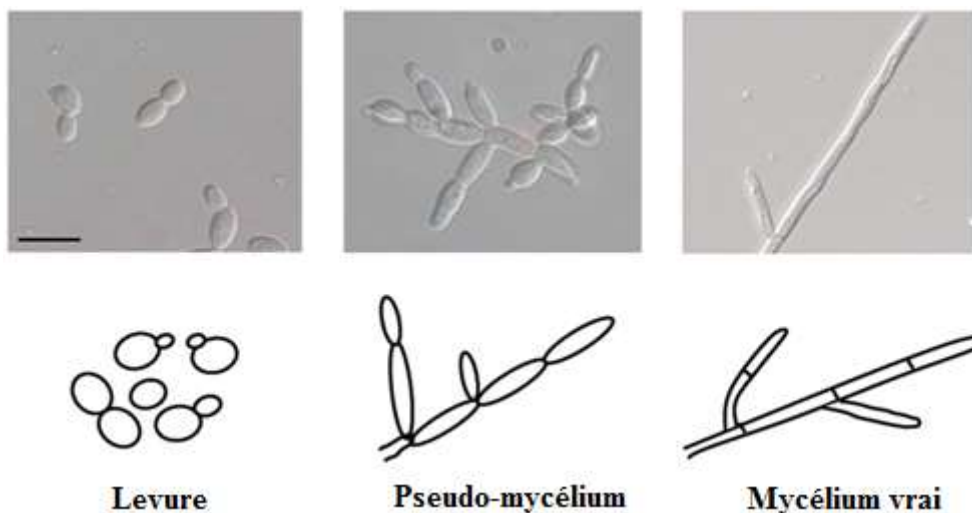
La forme levure ou blastospore est une structure unicellulaire, ronde ou ovoïde de taille variable (2 à 12 µm) se multipliant par simple bourgeonnement selon un mode de reproduction asexué de type blastique solitaire. Les levures sont non pigmentées et non capsulées.

A l'exception de *C. glabrata*, les levures du genre *Candida* peuvent produire des filaments. Deux formes filamenteuses peuvent être observées (figure 1) :

- Le pseudofilament (ou pseudo-mycélium) résulte de la formation successive de bourgeons qui s'allongent sans se détacher de la cellule mère et des bourgeons précédents. Il n'y a pas de véritable septation mais uniquement des constriction entre chaque bourgeon.
- Le mycélium vrai est une véritable forme filamenteuse cloisonnée et ramifiée. Cette structure s'observe seulement pour quelques espèces dont *C. albicans* (11).

La forme levure est souvent associée à un état commensal alors que les formes filamenteuses sont retrouvées de façon importante dans les situations d'infections. La capacité de *Candida albicans* à changer de morphologie participe à la virulence du pathogène lors de cette étape du processus de l'infection (12,13).

La formation de chlamydospores est particulière aux espèces *C. albicans* et *C.dubliniensis*. Il s'agit de structures arrondies de grande taille (6 à 15  $\mu\text{m}$ ) à parois épaisses qui se forment sur les filaments. Ces structures observées sur des milieux pauvres servent au diagnostic d'espèce.



**Figure 1 : Représentation des différentes morphologies de *C. albicans* (12)**

#### **4. Habitat**

Les *Candida* sont des levures ubiquitaires retrouvées dans l'environnement (sol, air), mais aussi dans certains produits alimentaires (fruits, céréales, légumes, produits laitiers...).

Introduits dans l'organisme par l'alimentation, ces levures sont présentes naturellement dans la flore intestinale de l'Homme et de nombreux mammifères ou oiseaux (14).

Chez l'homme, *Candida* colonise de nombreux sites anatomiques. L'habitat naturel et le spectre clinique des principales espèces sont présentés dans le tableau 1.

Durant leur adaptation au commensalisme, certaines espèces se sont spécialisées pour certaines localisations. Ainsi, *C. albicans* et *C. glabrata* vivent en commensaux en équilibre avec la flore bactérienne sur les muqueuses digestives et génito-urinaires de l'homme et de la femme, alors que *C. parapsilosis* et *C. famata* sont des levures commensales de la peau.

Ce sont des levures opportunistes, elles profitent d'un dysfonctionnement du système immunitaire ou d'autres facteurs favorisant pour se comporter comme pathogène et provoquer des candidoses (15,16).

**Tableau 1 : Principales espèces de *Candida* impliquées en pathologie humaine (10,16,17)**

<i>Espèce</i>	<i>Habitat</i>	<i>Manifestations cliniques</i>	<i>Particularités</i>
<i>C. albicans</i>	Tube digestif Génital/Urinaire Absente de l'environnement	Candidoses superficielles (cutanéomuqueuses, digestives et urinaires) Candidémie Candidoses systémiques	
<i>C. glabrata</i>	Tube digestif Génital/Urinaire Isolée rarement dans le milieu extérieur	Candidoses digestives, urinaires Vaginites Candidémie Candidoses systémiques	Fréquent en oncologie, chirurgie digestive Souvent résistant au fluconazole
<i>C. parapsilosis</i>	Peau (tube digestif parfois) Céréales, produits laitiers	Lésions cutanées et onyxis Infections liées aux cathéters Endocardite du toxicomane Candidémie Candidoses systémiques	Fréquent dans les candidémies du nouveau-né ou de l'enfant Résistance modérée au fluconazole et échinocandines
<i>C. tropicalis</i>	Tube digestif Voie urinaire (Revêtement cutané) Sol, eau, céréales	Candidémie Candidoses systémiques	Fréquent en oncologie Particulièrement résistante à la 5-FC
<i>C. krusei</i>	Voie digestive, respiratoire urogénitales, peau (colonisation transitoire) Sol, eau, air, produits laitiers, fruits, vin, bière	Candidémie Candidoses systémiques	Résistance naturelle au fluconazole Fréquent en oncologie
<i>C. guilliermondii</i>	Peau surtout Voies respiratoires Tube digestif (rare) Air, eau de mer Produits alimentaires	Candidémie Candidoses systémiques Mycoses cutanées (onyxis) Endocardites chez le toxicomane par voie IV	Sensibilité variable aux azolés
<i>C. kefyr</i>	Peau Muqueuses respiratoires, digestives (rare) Produits laitier fermentés	Candidémie Candidoses systémiques	Sensibilité variable aux azolés
<i>C. lusitaniae</i>	Tube digestif d'animaux	Candidémie Candidoses systémiques	Chimiothérapie Sensibilité moindre et résistance courante à l'AmB
<i>C. dubliniensis</i>	Muqueuse oro-pharyngée	Candidoses orales chez des patients infectés par le VIH Candidémie	

## II. Physiopathologie des candidoses invasives

*C. albicans* est un pathogène opportuniste. Sa pathogénicité est favorisée par l'association de facteurs liés au microorganisme et de facteurs liés au statut immunologique de l'hôte.

### 1. Modes de contamination

Les CI relèvent de deux mécanismes différents. Elles peuvent être consécutives à une contamination :

- par voie « **endogène** » le plus souvent, avec passage de levures vers le sang et les organes profonds à partir d'un foyer digestif principalement. Cet événement est favorisé par certains facteurs de risque, principalement l'immunodépression et l'antibiothérapie (les facteurs de risque sont développés dans le chapitre III) ;
- ou par voie « **exogène** » ou nosocomiale : transmission par manuportage (18) ou introduction de levures par effraction cutanée à partir des accès vasculaires (cathéters, matériels implantables ...). L'origine cutanée des candidémies est ainsi suggérée dans les infections à *C. parapsilosis* (19).

### 2. Chronologie de l'infection

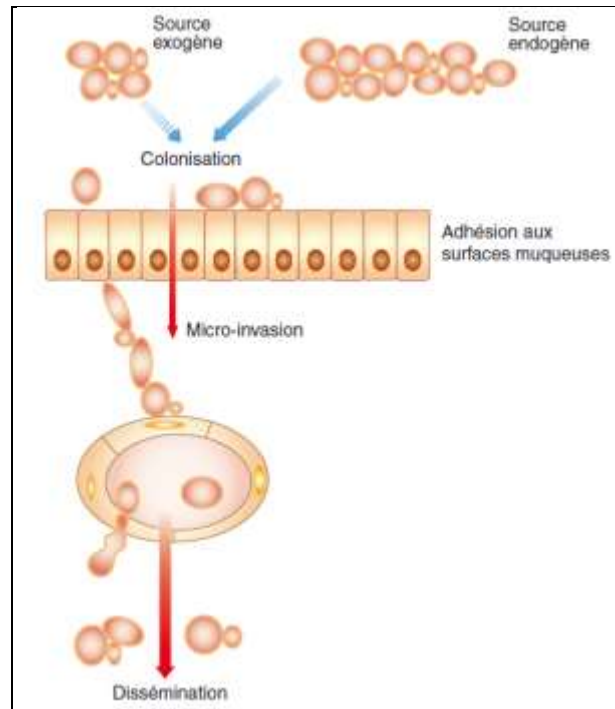
La pathogénie des CI peut se diviser en plusieurs étapes (figure 2) (20,21) :

- **La colonisation** : celle-ci est une condition préalable indispensable au développement d'une CI.

Certains *Candida* font partie de la flore endogène normale du tractus gastrointestinal et génital de l'Homme et sont présents dans 40 à 50% des cas, de façon transitoire ou permanente (22). Ces champignons sont acquis dès la naissance (transmission par la mère) et/ou au cours de la vie (contamination fécale). Les levures, en particulier *C. albicans*, sont en compétition dans le tube digestif avec la flore bactérienne de celui-ci. La colonisation est la conséquence de modifications écologiques de la flore induites par l'administration d'antibiotiques par exemple, qui entraînent la prolifération des *Candida* à la surface des muqueuses.

- **L'invasion tissulaire** : la capacité d'infiltration de l'épithélium par les *Candida* résulte d'une altération de la muqueuse (chirurgie, chimiothérapie, dispositif intravasculaire). Une infection localement invasive peut alors se développer.

- **La dissémination hématogène :** l'accès aux vaisseaux permet aux levures de disséminer à l'occasion d'une diminution de l'immunité même transitoire.
- **La phase chronique :** il existe de nombreux organes où les *Candida* peuvent se réinstaller à la suite de la phase septicémique : la rate, le foie, le rein, les os, la rétine.



**Figure 2 : Représentation schématique des différentes étapes de la candidose systémique. D'après Eggimann (18)**

### 3. Les facteurs de virulence du champignon

La pathogénicité de *C. albicans* vient de sa capacité à modifier son phénotype (*phenotypic switching*) afin de s'adapter à son environnement, ce qui constitue un facteur de virulence en soi (23). Il possède ainsi une grande variabilité génétique qui s'accompagne d'une variabilité morphologique et fonctionnelle.

Les *Candida* peuvent exprimer des facteurs de virulence pour favoriser la colonisation et l'invasion (24) :

- **Morphogénèse (filamentation) :**

Certains *Candida* possèdent la faculté de différenciation réversible entre la forme levure bourgeonnante ronde et la forme filamenteuse (13). Son aptitude à produire des filaments est induite par certains facteurs environnementaux (température : 37°C, pH neutre, sérum...)

(25). Les deux formes sont associées au pouvoir pathogène. La forme levure peut disséminer facilement par le sang tandis que la forme hyphale facilite l'invasion des tissus et l'échappement à la phagocytose. En effet, les tubes germinatifs adhèrent davantage que les levures à de nombreux substrats et sont doués d'un pouvoir de pénétration des tissus plus importants.

- **Capacité d'adhérence :**

L'adhérence est un pré-requis à l'invasion et au développement de l'infection. Des adhésines pariétales comme les Als (Agglutinin like sequences) (26) permettent l'interaction avec des récepteurs ou substrats de l'hôte aux différentes étapes de l'infection. Ces sont essentiellement des mannoprotéines et elles jouent un rôle dans l'adhérence et l'endocytose de *C. albicans* avec les épithéliums (*colonisation*), les endothéliums (*angio-invasion*) et les protéines de la matrice extracellulaire (*invasion tissulaire*).

L'adhérence peut aussi se faire par la formation d'un biofilm sur le matériel étranger (cathéters, prothèses). *C. albicans* est l'espèce fongique la plus fréquemment responsable (27). La formation du biofilm a des conséquences importantes sur la sensibilité aux antifongiques et la résistance contre les défenses de l'organisme. Elle peut par ailleurs entraîner un dysfonctionnement des dispositifs et constituer un réservoir de *Candida* pour une infection.

- **Sécrétion de molécules actives :**

Des enzymes hydrolytiques (aspartyl protéinases, phospholipases B et lipases) participent à la dégradation des tissus (24).

## **4. Facteurs de défense de l'hôte**

### **4.1. Facteurs locaux non immunologiques**

La barrière cutané-muqueuse constitue la première ligne de défense contre les agressions des pathogènes. Lorsque l'intégrité physique de cette barrière est rompue (plaie, cathéter, brûlures, mucites liées à la chimiothérapie, ...), elle constitue une porte d'entrée et favorise la colonisation fongique de *Candida*.

La flore commensale bactérienne et divers facteurs environnementaux (pH, clairance mucociliaire, ...) participent aussi à cette défense non spécifique (15).



## 4.2. Réponse immunitaire

### 4.2.1. Réaction immune non spécifique

L'immunité innée est le mécanisme protecteur prédominant contre les candidoses disséminées. Elle fait intervenir principalement les PNN, les cellules dendritiques, les monocytes et macrophages et passe par une réponse inflammatoire.

L'activation de la réponse immunitaire non spécifique est initiée par la reconnaissance de structures conservées spécifiques de *C. albicans* : les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) ; elles correspondent aux mannanes, glucanes et mannoprotéines de *Candida*. Les PAMPs sont reconnus par les PRRs (Pattern-Recognition Receptors) exprimés à la surface des cellules immunitaires et impliqués dans la phagocytose et la transduction des signaux aboutissant à la synthèse de cytokines pro ou anti-inflammatoires (28).

Il existe deux classes majeures pour la reconnaissance de *C. albicans* :

- TLRs (Toll like receptors) : TLR2 et TLR4
- CLR (C-type lectine receptors) : MR et DC-SIGN

Des polymorphismes des gènes codant pour les TLRs et C-lectines correspondant à des variants génétiques sont associés à une susceptibilité aux infections (24).

Les PNN constituent la première ligne de défense contre les infections à *Candida* et jouent un rôle majeur dans le contrôle des CI. Ils possèdent une activité fongicide sur les formes levures et filamenteuses et une activité immunomodulatrice avec sécrétion de cytokines inflammatoires qui activent en retour les macrophages (TNF- $\alpha$ , IL-6) ou qui orientent l'immunité spécifique (IL-12 ou IL-10) vers un profil protecteur Th1 ou délétère Th2 (29). Ainsi les individus souffrant de neutropénie congénitale ou acquise sont prédisposés aux infections à *Candida*. La neutropénie est donc un facteur de risque majeur de candidoses confirmé par les modèles animaux (30).

Les macrophages participent à la lutte contre *C. albicans* par leur capacité à phagocyter les levures et à sécréter de nombreuses enzymes lysosomiales dans le milieu environnant. Les cellules dendritiques ont aussi un rôle central pour leur capacité à orienter la réponse immunitaire.

## **4.2.2. Réaction immunitaire spécifique**

### **4.2.2.1. Immunité humorale**

Il existe un panel complexe d' Ac anti-*Candida* ayant des rôles divers et mal connus (31). Ces Ac sont utiles mais non indispensables. Cliniquement, le déficit cellulaire B n'est pas associé à une susceptibilité accrue aux infections cependant des études sur des modèles murins ont décrits des Ac protecteurs de l'hôte pendant l'infection. De plus, des Ac monoclonaux anti-*Candida* sont à l'essai chez l'Homme pour le traitement des CI (32).

### **4.2.2.2. Immunité cellulaire**

La différenciation des cellules T CD4+ en cellules T-helper de type 1 (Th1) ou de type 2 (Th2) est décisive pour la susceptibilité ou la résistance de l'hôte aux infections fongiques invasives.

Au cours d'une infection par *C. albicans*, les défenses de l'hôte sont principalement de type Th1, médiées par des cytokines telles que l'IL-12 impliquées dans l'activation des fonctions fongicides des cellules de l'immunité innée (33). A l'inverse, une réponse de type Th2 est associée à une susceptibilité accrue à l'infection à cause de leur propriété de désactivation des cellules effectrices fongiques.

L'importance de l'immunité à médiation cellulaire T est ainsi démontrée par la prévalence des candidoses oropharyngée et oesophagiennes chez les sujets sidéens dont les taux de lymphocytes T CD4+ systémiques sont inférieurs à 0.2 G/L dans le sang (29).

Ainsi chez l'Homme, le portage commensal digestif est sous la médiation d'une réponse Th1 alors qu'au cours d'une CI la réponse est de type Th2.

### III. Epidémiologie des candidoses invasives

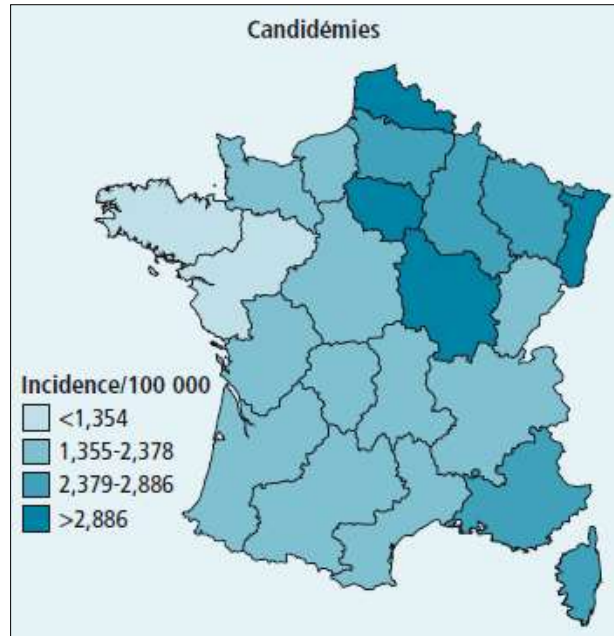
#### 1. Épidémiologie et impact des infections invasives à *Candida*

Les CI sont un problème de santé publique dans le monde du fait de leur prévalence et de leur gravité. Ce sont des infections sévères principalement acquises à l'hôpital et elles représentent 2,5 à 10 % des infections nosocomiales (2). Toutefois ces dernières années, une élévation de l'incidence des candidémies communautaires est observée en raison d'une évolution des pratiques médicales avec l'augmentation des hospitalisations à domicile (34). Les candidémies sont la forme clinique la plus commune des CI, mais elles représentent moins de 75 % des CI (1) et les hémocultures restent encore souvent négatives.

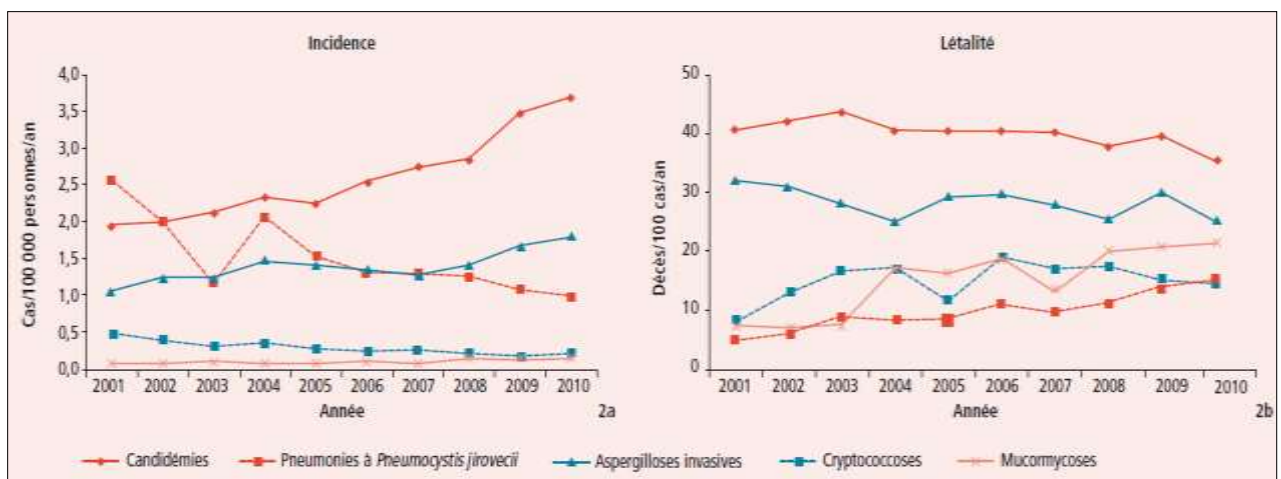
Depuis les années 1980, les levures du genre *Candida* sont les champignons les plus fréquemment impliqués dans les infections fongiques invasives, responsables de plus de 85 % des fongémies (1). Elles représentent 5 à 10 % des septicémies (35) et occupent le quatrième rang des pathogènes isolés aux Etats-Unis et en Europe (36), précédées par les staphylocoques à coagulase négative, *Staphylococcus aureus* et les entérocoques (37,38). Au cours des 30 dernières années, l'incidence des infections fongiques invasives a nettement augmenté. Entre les années 1970 et le début des années 1990, la plupart des études européennes et américaines ont rapporté une importante élévation de l'incidence des CI puis selon les études celles-ci ont continué de progresser (39) ou sont restées remarquablement constante jusque dans les années 2000 (2,40) avec 8 à 10 cas / 100 000 habitants (1). L'incidence est restée semblable ces dernières années ou a même légèrement diminué en Australie (1,8 / 100 000 habitants), au Canada (2,9 / 100 000 habitants), en Europe (1,4 à 5,7 / 100 000 habitants selon les pays) avec des valeurs plus élevées au Danemark et en Espagne. Aux Etats-Unis elle est encore plus importante (6 à 10 cas / 100 000 habitants) (1) mais les équipes nord-américaines ne différencient pas systématiquement les candidémies des autres formes invasives qui sont exclues dans la plupart des études ce qui peut constituer ainsi un biais dans ces chiffres. Dans le reste du monde, le nombre de CI continue de progresser dont l'Amérique latine avec un taux 3 à 15 fois plus élevé au Brésil comparé aux données des études nord-américaines ou européennes (41).

L'analyse des données du programme de médicalisation des systèmes d'information (PMSI) entre 2001 et 2010 a permis d'estimer l'incidence des infections invasives d'origine fongique en France avec en moyenne 5,9 cas / 100 000 personnes / an dont 43,3 % étaient représentés par les candidémies.

Une disparité de répartition des candidémies est observée selon les régions de France (figure 3). L'analyse des tendances a montré une augmentation des candidémies de 7,8 % (figure 4) au cours de ces dix dernières années. Cette progression pourrait être corrélée à l'augmentation du nombre de personnes à risque en particuliers les immunodéprimés ce qui est étroitement liée au progrès médical (42).



**Figure 3 : Distribution régionale des candidémies en France métropolitaine (2001-2010) (42)**



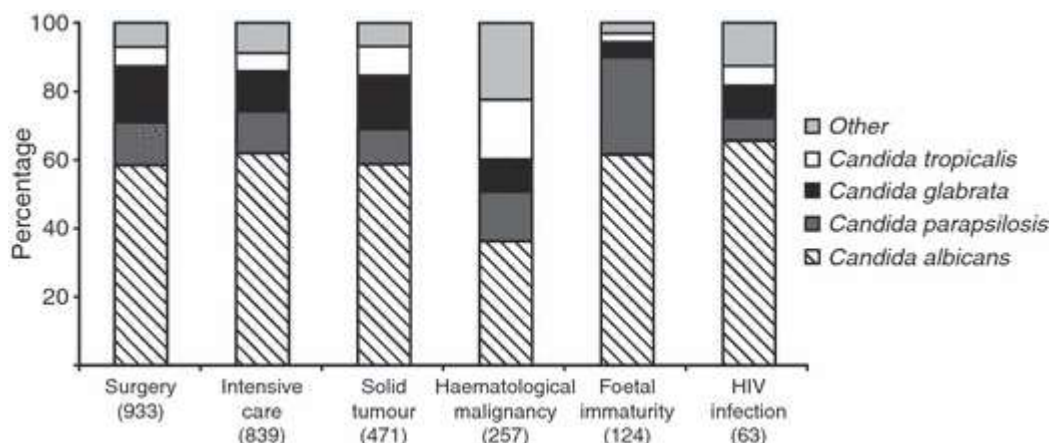
**Figure 4 : Evolution des taux annuels d'incidence (à gauche) et de létalité (à droite) des infections fongiques invasives de 2001 à 2010 (42)**

## 2. Les espèces responsables de candidémies

Bien que plus de 17 espèces différentes de *Candida* aient été retrouvées comme agents étiologiques possibles, plus de 90 % des CI sont causées par 5 espèces : *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei* (2,34,43).

Durant les deux dernières décennies, la plupart des études épidémiologiques ont rapporté un changement important dans l'étiologie des CI avec l'émergence progressive des espèces non *albicans*, notamment de *C. glabrata* et *C. krusei* (1). Néanmoins même si la part de *C. albicans* a régulièrement diminué ces dernières années, elle reste toujours l'espèce prédominante et est responsable de 50 à 60 % des infections (37). *C. glabrata* est la deuxième cause de candidémies aux Etats-Unis et en Europe, représentant entre 9 à 12 % des infections dans le monde (1).

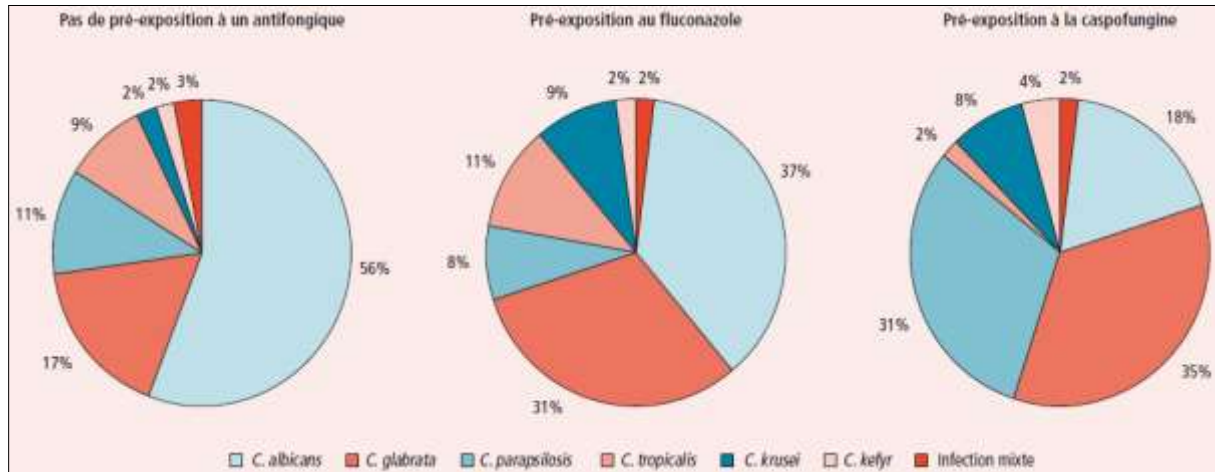
La répartition des espèces est très variable au cours du temps, d'un pays à l'autre, d'un hôpital à l'autre, selon la population étudiée et selon les facteurs de risque sous-jacents (figure 5), d'où l'importance du suivi de l'épidémiologie locale (36,37).



**Figure 5 : Distribution des espèces de *Candida* selon les pathologies/soins médicaux d'après l'étude de l' ECMM (36)**

En France l'observatoire des levures (ODL), mis en place depuis 2002 par le Centre national de référence des mycoses invasives et des antifongiques (CNRMA) regroupant 27 hôpitaux, permet de surveiller les fongémies à levures en Ile-de-France. Les levures du genre *Candida* représentaient au total 95 % des isolats provenant de 3824 patients (3932/4136 souches collectées), *C. albicans* a été retrouvé dans 54 % des infections (45).

Les principales causes de cette évolution sont liées au changement des pratiques médicales. Ainsi l'exposition antérieure à des antifongiques entraîne une modification considérable de la répartition des espèces avec une augmentation des souches de *Candida* non *albicans* (figure 6).



**Figure 6: Répartitions des principales espèces de *Candida* responsables de fongémie selon l'exposition au fluconazole, à la caspofungine ou à aucun antifongique dans les 30 jours précédents la candidémie (42)**

Chez les patients d'hémo-oncologie, les espèces autres qu'*albicans* sont plus fréquemment isolées (65 %) (figure 5) (46). Les infections à *C. glabrata* surviennent plus fréquemment chez les adultes, en particulier de plus de 80 ans (44).

*C. parapsilosis* habituellement associé à la colonisation des cathéters veineux centraux et à la nutrition parentérale, est principalement isolé chez les patients atteints de cancer et chez les jeunes adultes et nouveaux-nés provenant des USI.

Les principales autres espèces émergentes moins fréquentes sont *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et leur apparition dépend souvent d'écologies particulières (voir tableau 1). Elles ont la particularité d'être moins sensibles aux azolés.

En Europe du Nord, *C. dubliniensis*, une espèce étroitement liée à *C. albicans*, peut atteindre 2 à 3 % des isolats (1).

Les candidémies mixtes ne dépassent pas 5 % des candidémies et *C. albicans* est l'espèce la plus fréquemment isolée avec *C. glabrata* et *C. tropicalis* dans la majorité des épisodes (1).

### 3. Morbidité et mortalité

Malgré une meilleure prise en charge des CI et la mise à disposition de nouveaux antifongiques, les candidémies restent des infections hospitalières associées à une mortalité élevée supérieure à celle des infections bactériennes, en particulier dans les services de réanimation (47). En Europe, elle varie de 28 à 59 % (40) avec les valeurs les plus élevées pour les infections à *C. glabrata* et les personnes âgées (40). Les infections à *C. parapsilosis* sont associées quant à elles à une mortalité plus faible (1).

*C. krusei*, *C. glabrata* et *C. tropicalis* sont responsables d'infections particulièrement sévères, avec une évolution défavorable chez 40 % des patients (36).

En France, d'après le rapport d'activité de 2014 du CNRMA, la mortalité brute à 30 jours était de 40,6 % (45).

Les candidémies prolongent aussi la durée du séjour et augmentent le coût des soins médicaux (48).

### 4. Epidémiologie des résistances fongiques

Un suivi des résistances est important pour évaluer l'impact de l'utilisation des nouveaux agents antifongiques.

La proportion de candidémies causée par des souches de *Candida* de sensibilité diminuée aux antifongiques demeure faible en Europe. Ainsi l'analyse des données des études de 7 pays européens dont la France sur les fongémies à *Candida* réalisée dans le cadre de l'European Confederation of Medical Mycology (ECMM) a rapporté moins de 2 % de *C. albicans* résistant à la fluorocytosine ou au fluconazole. Parmi les *Candida* non *albicans* isolés 5,3 % et 10,3 % étaient résistants à la fluorocytosine et au fluconazole respectivement (36).

En France, le CNRMA réalise une surveillance de l'évolution de la sensibilité *in vitro* aux antifongiques pour les principales levures responsables de fongémie depuis 2002. L'analyse des données permet de constater que les profils de sensibilité aux antifongiques n'ont pas significativement changé au cours du temps. La prévalence de résistance aux antifongiques azolés (fluconazole et voriconazole) pour *C. albicans* est également très faible avec aussi moins de 2 % des souches de sensibilité diminuée. Depuis 2007, l'émergence de *C. parapsilosis* résistante au fluconazole est observée et celle-ci concerne 2 à 14 % des souches entre 2008 et 2013. Cette espèce possède par ailleurs une moindre sensibilité ou une

résistance intrinsèque aux échinocandines. Pour *C. tropicalis*, la prévalence des souches résistantes aux azolés est variable, mais  $\leq 6\%$  (45).

L'utilisation des antifongiques azolés tel que le fluconazole en prophylaxie ou en curatif est associée à l'émergence d'espèces moins sensibles (*C. krusei*, *C. glabrata*) (figure 6) et à l'acquisition *de novo* de résistance (43,49). Ainsi, pour le voriconazole et le posaconazole, des valeurs plus élevées de CMI sont observées pour *C. glabrata* et *C. krusei* comparativement à *C. albicans* (45), ceci confirmant l'existence de résistances croisées.

La résistance à la caspofungine pour les espèces de *Candida* habituellement sensibles reste rare (0 à 1 % pour *C. albicans*, 0 à 5 % pour *C. glabrata*, 0 à 3 % pour *C. tropicalis*) ou absente (*C. krusei*) (45). Néanmoins la sélection d'espèces naturellement moins sensibles (*C. parapsilosis*) ou le développement de résistance chez les souches initialement sensibles ont aussi été récemment constatés pour les échinocandines (43). L'amphotéricine B (AmB) possède une activité antifongique excellente et les résistances restent exceptionnelles mais l'impact des prescriptions accrues de cet antifongique avec des valeurs de CMI de *Candida* plus élevées a toutefois été démontré. *C. glabrata* et *C. krusei* ont occasionnellement une sensibilité diminuée à l'AmB mais les résistances pendant le traitement sont courantes pour *C. guilliermondii* et *C. lusitaniae* (50).

## 5. Facteurs de risque

De nombreux facteurs sont associés à une augmentation de l'incidence des CI. Les facteurs de risque liés à l'hôte (ou intrinsèques) se distinguent des facteurs exogènes (ou extrinsèques) qui sont le plus souvent d'origine iatrogène (tableau 2).



**Tableau 2 : Principaux facteurs de risque prédisposant au développement d'une candidose invasive (46,51,52)**

<i>Facteurs intrinsèques</i>	<i>Facteurs extrinsèques et/ou iatrogènes</i>
<i>Physiologiques</i>	<i>Traitements médicaux</i>
Âges extrêmes *	- Immunosuppression (corticoïdes, immunosuppresseurs)
<i>Terrain du patient</i>	- Antibiothérapie large spectre
- Colonisation des sites corporels multiples	- Chimiothérapie
- Neutropénie	<i>Traitements et/ou manœuvres chirurgicales</i>
- Diabète *	- Chirurgie digestive majeure
- Insuffisance rénale *	- Chirurgie des voies urinaires (en présence de candidurie)
- Score APACHE II > 20	- Voie veineuse centrale
- Pancréatite aiguë sévère	- Nutrition parentérale
<i>Locaux</i>	- Dialyse
- Brûlure étendue (> 50%)	- Ventilation mécanique
- Traumatisme majeur (ISS>20)	- Accès vasculaire *
- Lésion du tractus digestif	- Sondage urinaire *
- Candidurie > 10 <sup>5</sup> UFC/ml	- Transfusions multiples *
- Séjour prolongé en réanimation > 7 jours *	- Chirurgie récente *

\* = facteurs de risque non spécifiques (facteurs généraux d'infections nosocomiales)

APACHE (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) = score d'évaluation quantitatif de la sévérité de la maladie

ISS (Injury Security Score) = Score du trauma

L'incidence des CI est généralement plus élevée chez les hommes (60 % des cas) (1) ainsi qu'aux âges extrêmes de la vie en particulier chez les enfants de moins de 1 an (8 %) et les adultes de plus de 65 ans (28 %) (2,36). Les dernières données en France relevaient un âge moyen de 56 ans (45).

Le terrain joue également un rôle majeur dans la survenue de ces infections.

La colonisation par *Candida* est le principal facteur de risque prédisposant aux candidoses systémiques. Cependant la différenciation entre colonisation et infection invasive est souvent difficile chez les patients sévèrement malades. Seulement 5 à 15 % des patients hospitalisés sont déjà colonisés à l'admission (51) mais cette proportion augmente considérablement avec le temps et l'exposition à d'autres facteurs de risque pouvant atteindre 80 % des patients en soins intensifs après une semaine d'hospitalisation. Néanmoins, moins de 10 % d'entre eux développeront une candidose sévère (52).

Des cultures de surveillance des sites périphériques sont souvent réalisées pour apprécier la colonisation mais la signification clinique de la positivité de ces cultures est difficile à

interpréter. Dans ce contexte, certains auteurs ont développé des scores de colonisation plus pertinents pour prédire le risque d'infection invasive. L'objectif de ces scores est d'identifier précocement les patients à haut risque dans le but de mettre en route un traitement antifongique afin de diminuer le risque de dissémination.

En 1994, Pittet a mis en évidence le rôle de la colonisation dans le développement ultérieur de l'infection et a établi un index de colonisation (IC) correspondant au rapport du nombre de site colonisés sur le nombre total de sites prélevés (51). Dans son étude, les patients infectés avaient un seuil positif en moyenne 6 jours avant le développement de la candidose mais la faible spécificité de l'IC (tableau 3) suggère qu'un nombre non négligeable de patients soit traité par excès. L'index de colonisation corrigé proposé secondairement prend en compte l'intensité de la colonisation des différents sites prélevés.

En pratique, l'IC n'est utilisé que pour le suivi de patients hospitalisés en USI et nécessite la mise en culture de tous les prélèvements disponibles de façon systématique et régulière : écouvillonnage endo-buccal, selles ou écouvillonnage anal, sécrétions trachéales (aspiration), liquide de drainage (estomac, cavité péritonéale, ...), urines ou autres prélèvements selon la clinique à l'exception des hémocultures (53). Depuis sa publication, cet indice n'a pas été validé dans les grands essais multicentriques mais plusieurs équipes ont suggéré son utilité potentielle dans leurs études pour caractériser la dynamique de colonisation et évaluer la signification des candiduries et l'impact des prophylaxies antifongiques ; toutefois ces données sont seulement limitées aux patients non-chirurgicaux. (52)

Léon *et al.* avaient ensuite proposé un autre marqueur le « Candida Score » intégrant les données de la colonisation mais aussi d'autres facteurs de gravité du patient (tableau 4) (54).

**Tableau 3 : Sensibilités, spécificités, valeurs prédictives négatives (VPN) et positives (VPP) des différents scores de candidoses invasives (51,55)**

<i>Scores</i>	<i>Sensibilité (%)</i>	<i>Spécificité (%)</i>	<i>VPP (%)</i>	<i>VPN (%)</i>
Index de colonisation (valeur $\geq 0,5$ )	100	69	66	100
Index de colonisation corrigé (valeur $\geq 0,5$ )	100	100	100	100
Candida Score (score $\geq 2,5$ )	81	74	14	98

**Tableau 4 : Paramètres intégrés dans le calcul du Candida score (54)**

<i>Présence d'éléments suivants</i>	<i>Points</i>
Nutrition parentérale totale	1
Colonisation multiple à <i>Candida</i>	1
Sepsis sévère	2
Chirurgie à l'admission	1

De par leur VPN élevée (tableau 3), ces différents scores de colonisation ont un intérêt potentiel pour réduire la surexposition inutile aux agents antifongiques chez les patients à haut risque d'infection et peut permettre l'arrêt d'un traitement empirique non justifié.

Les principaux services à risque concernent surtout la réanimation (chirurgicale et médicale) mais aussi l'hémo-oncologie, la pédiatrie et la néonatalogie. Selon les données de l'ODL, près de la moitié des candidémies (48 %) surviennent chez les patients hospitalisés en USI et environ trois quarts de ces patients (74 %) disposent de cathéters veineux centraux. Les autres principales comorbidités associées étaient une intervention chirurgicale récente (39 %) (dans les 30 jours précédents), un cancer (33,5 %), une hémopathie maligne (16,8 %), une transplantation d'organe solide (6,6 %) ou une infection par le VIH (4,0%) (42). L'exposition à une antibiothérapie à large spectre surtout si elle est prolongée est aussi un facteur de risque majeur (37).

#### **IV. Tableaux cliniques des candidémies et infections systémiques**

Le spectre clinique des candidoses est très varié comme le montre le tableau 5.

Les levures du genre *Candida* peuvent être à l'origine d'infections superficielles au niveau du revêtement cutané (peau et phanères) ou des muqueuses (digestives et urogénitales) ainsi que d'atteintes profondes, pouvant affecter de nombreux organes.

Les candidoses superficielles sont les plus fréquentes, et habituellement bénignes. Elles sont le plus souvent la traduction d'un passage des levures de l'état commensal à l'état pathologique, favorisé par certains facteurs.

On parle de candidose profonde lorsque au moins un organe profond est touché et de candidose systémique ou invasive lorsque plusieurs organes sont touchés lors d'une dissémination hémotogène de levures du genre *Candida*.

**Tableau 5 : Les différents types de candidoses (56)**

<i>Infections hématogènes</i>	<i>Infections non hématogènes</i>
Candidémie	<b><i>Infections superficielles</i></b>
Endophtalmie	Candidose cutanée
Infection d'accès intravasculaire	Candidose oropharyngée
Thrombophlébite septique	Vulvovaginite
Endocardite	
Arthrite	<b><i>Infections profondes</i></b>
Ostéomyélite/ Spondylodiscite	Candidose œsophagienne
Méningite	Cystite à <i>Candida</i>
Pyélonéphrite	Candidose péritonéale
Candidose pulmonaire	Candidose pulmonaire
Candidose hépatosplénique	

La symptomatologie des fongémies et des infections systémiques à *Candida* n'est pas spécifique, elle est identique à celle retrouvée dans les épisodes de bactériémie.

Une fièvre résistante à une antibiothérapie à large spectre et d'intensité variable est observée dans environ 80 % des cas et une leucocytose dans 50 % (17). Cet épisode fébrile est habituellement associé à une altération de l'état général et peut être accompagné de douleurs musculaires (11).

Les localisations secondaires sont liées à une dissémination hématogène et peuvent apparaître des semaines ou des mois après.

### **1. Manifestations cutanées**

Les candidoses systémiques peuvent aussi se manifester par des lésions cutanées considérées comme des métastases prenant l'aspect de papulopustules, de nodules érythémateux uniques ou multiples siégeant préférentiellement au tronc et aux extrémités (figure 7). Elles seraient retrouvées dans 10 % des cas et s'observent lors de neutropénie prolongée.

Chez les héroïnomanes des pustuloses douloureuses de la barbe et du cuir chevelu sont décrites (16,17).



**Figure 7 : Lésions cutanées dues à la dissémination hémotogène de *Candida* (57)**

## **2. Endophtalmie**

Des manifestations oculaires à type de chorioretinite sont à rechercher systématiquement au fond d'œil en cas de candidémie. L'aspect typique est celui de nodules réiniens blanchâtres ou jaunâtres et duveteux (figure 8). Cette lésion pathognomonique n'est toutefois rencontrée que chez 8 à 25 % des patients (56). L'atteinte est plus fréquente chez le non neutropénique et n'entraîne pas forcément de troubles visuels.



**Figure 8 : Fond d'œil lors d'une endophtalmie à *Candida* (18)**

### **3. Candidoses cardiaques**

L'endocardite à *Candida* reste rare, cependant leur fréquence est très probablement sous-estimée, du fait de la difficulté du diagnostic.

Auparavant elle était surtout observée chez le sujet porteur d'une valvulopathie ou chez le toxicomane intraveineux. Elle concerne aujourd'hui de plus en plus le sujet immunodéprimé, soumis à une antibiothérapie à large spectre ou à des procédures invasives. Les principaux facteurs de risques sont la présence d'une valve prothétique et le port de voies veineuses centrales.

L'endocardite fongique partage les mêmes signes cliniques que l'endocardite bactérienne, la classification diagnostique basée sur les critères de Duke modifiés étant couramment utilisée. Cependant, le diagnostic clinique d'endocardite fongique est plus difficile. La grande taille des végétations est en faveur d'une mycose, les embolies artérielles sont fréquentes.

Le diagnostic repose sur la positivité des hémocultures, mais celle-ci ne sont positives que dans 50 à 70 % des candidémies. La plupart des cas sont diagnostiqués devant la présence d'une candidémie prolongée qui est une indication légitime pour réaliser l'échographie transoesophagienne et le fond d'œil (58).

Les autres tuniques du cœur peuvent être touchées (myocardite, péricardite) mais moins fréquemment.

### **4. Candidoses ostéoarticulaires**

L'ostéoarthrite survient en général plusieurs mois (2 à 12 mois), le plus souvent après un épisode de candidémie. Elle peut aussi résulter d'une inoculation directe par injection ou traumatisme, consécutive à une chirurgie ou à la mise en place d'une prothèse.

Les candidoses osseuses restent relativement rares, les principales populations à risque sont représentées par les toxicomanes et les prématurés. Les spondylodiscites dorsolombaires, les atteintes costales et sternales sont des localisations préférentielles.

Les signes cliniques et radiologiques ne sont pas spécifiques et sont identiques aux étiologies bactériennes. Le diagnostic repose essentiellement sur l'isolement de la levure après ponction ou lors d'une exploration chirurgicale du foyer lésionnel (17).

## **5. Candidoses du SNC**

Les localisations neuro-méningées restent rares chez l'adulte au cours des candidoses systémiques (sauf chez le toxicomane) mais sont plus fréquentes chez le nouveau-né. La méningite peut être isolée ou associée à des abcès dépistés au scanner.

Les méningites à *Candida* peuvent aussi être une des complications infectieuses de la neurochirurgie, en particulier après dérivation. L'analyse du LCR révèle une réaction cellulaire modérée avec hypoglycorachie et discrète protéinorachie. Le diagnostic est difficile car le LCR est inconstamment positif (17).

## **6. Candidoses pulmonaires**

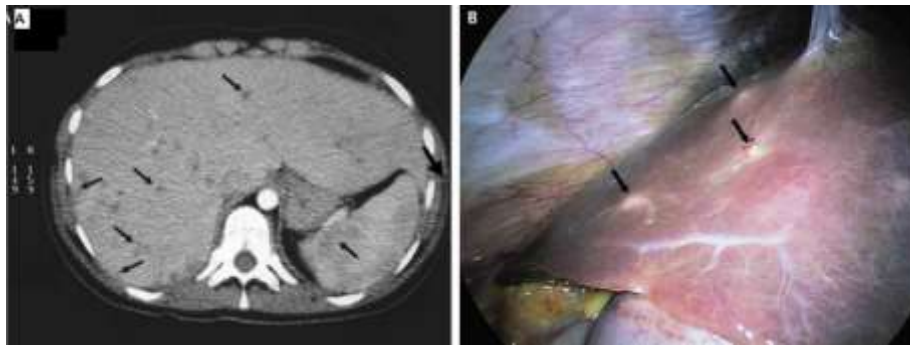
L'atteinte des voies aériennes supérieures par *Candida* est fréquente chez les patients sous ventilation mécanique et les recommandations européennes et américaines préconisent de considérer la présence de levures du genre *Candida* dans les sécrétions respiratoires comme une colonisation ne nécessitant pas de traitement antifongique systématique. La présence de levures dans les prélèvements respiratoires peut néanmoins s'intégrer dans l'analyse des sites colonisés chez les patients de réanimation (18).

La pneumopathie primitive à *Candida* reste rare même chez l'immunodéprimé. Elle est le plus souvent secondaire à une dissémination hématogène et se manifeste sous la forme de microabcès multiples. Le diagnostic est difficile du fait de la colonisation habituelle de l'arbre trachéo-bronchique chez ces patients et requiert une étude histopathologique après biopsie du tissu pulmonaire (11).

## **7. Candidoses hépatosplénique (candidose disséminée chronique)**

Cette forme particulière de candidose systémique évolue sur le mode chronique. Elle survient chez le patient neutropénique soumis à une antibiothérapie à large spectre et s'observe essentiellement chez les patients provenant des services d'onco-hématologie traités pour une leucémie aiguë dont la maladie est en rémission après une chimiothérapie. Ce syndrome associe le plus souvent une fièvre en sortie d'aplasie, une hépatomégalie et/ou splénomégalie et des signes digestifs qui doivent conduire à réaliser une échographie, un scanner et surtout une IRM montrant des nodules intraparenchymateux au niveau du foie et de la rate, parfois des reins (figure 9). Les hémocultures sont souvent négatives. Le diagnostic repose

essentiellement sur la sérologie *Candida* associée à une élévation des phosphatases alcalines et il ne sera confirmé que sur la biopsie de ces lésions (11,17).



**Figure 9 : Candidose hépatosplénique (4)**

A : Lésions multiples hypodenses au niveau du foie et de la rate par tomodensitométrie

B : Biopsie des lésions hépatiques

## 8. Candidoses rénales

L'isolement des levures du genre *Candida* dans les urines est fréquent, en particulier en milieu hospitalier chez les patients porteurs d'une sonde urinaire. En effet, la présence de cette levure concerne 1 à 11 % des patients hospitalisés pour atteindre 25 à 30 % des patients séjournant en réanimation (22).

La colonisation de l'arbre urinaire par *Candida* peut se faire par dissémination hématogène, lors de candidémie ou par voie ascendante à partir de la flore digestive ou vaginale (59). L'existence d'un cathéter urinaire, d'un diabète sucré ou d'une immunodépression sont des facteurs de risque habituellement rencontrés. L'apparition d'une candidurie peut être donc un signe d'alarme chez un sujet à risque avec un syndrome infectieux inexplicé.

La candidurie asymptomatique est la plus commune. Les symptômes d'infection urinaire à *Candida* sont rares et identiques à ceux des infections bactériennes. Les bégards fongiques appelés *fungus ball* résultent de la formation de pseudofilaments par certaines espèces de *Candida* pouvant être responsables d'une obstruction des voies urinaires. Ils surviennent préférentiellement chez le diabétique et sont visualisables par échographie (60) (55).

La signification d'une candidurie reste encore délicate et il n'existe pas de référentiel pour le diagnostic des infections urinaires candidosiques. En effet, celle-ci peut être le témoin d'une contamination, d'une simple colonisation ou d'une infection invasive. Une candidurie supérieure ou égale à  $10^4$  UFC/mL associée à des facteurs de risque pourrait être liée à un



risque accru de candidémie mais la valeur de ce seuil reste encore controversée selon les études (61).

En réanimation, la recherche de candidurie fait partie du score de Pittet ou index de colonisation (51).

## **9. Péritonites candidosiques**

Les péritonites à *Candida* sont surtout consécutives à une contamination à partir du tube digestif. Elles sont favorisées par la nutrition parentérale et l'antibiothérapie. Elles compliquent aussi une perforation gastro-intestinale, une dialyse péritonéale ou une intervention chirurgicale. Le pronostic de ces péritonites post-opératoire reste sévère (16,17).

## **V. Méthodes de diagnostic biologique des candidoses invasives**

Le diagnostic des CI se heurte à de nombreuses difficultés au vu du manque de sensibilité et/ou de spécificité des techniques de biologie utilisées. Il est d'autant plus difficile que les signes cliniques sont peu spécifiques.

A côté de l'identification mycologique, d'autres techniques indirectes basées sur la détection d'une réaction immunologique spécifique ou la mise en évidence d'Ag circulants peuvent être contributives au diagnostic.

### **1. Mycologie phénotypique**

Le diagnostic mycologique comprend 4 étapes importantes :

- le prélèvement,
- l'examen direct ou anatomo-pathologique,
- la culture sur des milieux appropriés,
- et l'identification du champignon isolé.

Une étude de la sensibilité aux antifongiques pourra être réalisée si besoin.

#### **1.1. Prélèvement**

Le prélèvement est une étape importante. En effet, la fiabilité de l'examen mycologique dépend en grande partie de la qualité du prélèvement.

Les échantillons biologiques doivent être prélevés en quantité suffisante et acheminés rapidement au laboratoire pour éviter un envahissement par la flore saprophyte. Les prélèvements doivent être réalisés à distance de tout traitement antifongique (14,62,63).

**Tableau 6 : Modalités de prélèvements selon la localisation des lésions dans les mycoses profondes ou systémiques. D'après Pihet (62)**

<i>Clinique et localisation</i>	<i>Prélèvement</i>	<i>Conditionnement (volume minimal)</i>	<i>Conservation si traitement différé</i>
Nodules ou autres lésions sous cutanés, Liquides biologiques ou produits de sécrétions	Biopsie	Flacon stérile	< 24 h à + 4°C
Broncho-pulmonaires	LBA Aspiration bronchique	Flacon stérile (20 mL)	< 24 h à + 4°C
Pleurales	Liquide de ponction	Flacon stérile (1 mL)	Traitement immédiat (< 2 h)
Articulaires	Liquide de ponction	Flacon stérile (1 mL)	Traitement immédiat (< 2 h)
Péritonéales	Liquide de dialyse, redons, drains	Flacon stérile (1 mL)	Traitement immédiat (< 2 h)
Cérébrales	LCR	Flacon stérile (1 mL)	Traitement immédiat (< 2 h)
Tissus profonds (foie, ...)	Biopsie	2 flacons stériles : 1 pour la mycologie, 1 pour l'anatomo-pathologie	< 24 h à + 4 C
Septicémies	Sang Cathéters	Hémocultures Flacons stériles (5 à 10 mL)	< 24 h à température ambiante
Liquides biologiques et produits divers	Urines, selles, expectorations,...	Flacon stérile	< 24 h à + 4 C

Le prélèvement sanguin est réalisé en première intention pour le diagnostic des candidémies. D'autres prélèvements à l'aide d'écouvillons peuvent être effectués (vagin, peau, muqueuses, anus...), ils seront utiles pour mettre en évidence une colonisation.

## **1.2. Examen direct**

L'examen direct et/ou l'examen histologique, à partir du prélèvement est une étape primordiale en mycologie. En effet, il permet une orientation rapide du diagnostic pour débiter éventuellement une thérapeutique adaptée et affirme la présence du champignon au niveau du site prélevé sous sa forme invasive. La quantité d'éléments fongiques dans le prélèvement sera également appréciée.

### 1.2.1. Examen direct des prélèvements de sites profonds

L'examen direct est réalisé au microscope, à l'état frais entre lame et lamelle. Il peut être facilité par l'utilisation de colorants (noir chlorazol, bleu lactophenol...). L'emploi de fluorochrome dans les laboratoires spécialisés tels que le Blankophor<sup>®</sup> (Bayer) permet une identification plus aisée des éléments fongiques mais nécessite un microscope à fluorescence. Les échantillons liquides (urines, LCR, liquide de ponction, de lavage) peuvent être concentrés par centrifugation pendant 15 minutes à 1500 g.

L'examen se fait dans un premier temps à faible grossissement (objectif x 10 ou x 25) afin de lire rapidement un volume important. Lorsqu'il est positif à levures du genre *Candida*, l'examen direct montre des éléments cellulaires arrondis ou ovalaires à paroi mince et non capsulés, de 1 à 10 µm avec un ou plusieurs bourgeonnements (figure 10). Les levures peuvent être éventuellement associées à des pseudomycéliums de taille variable (10,64R66).



**Figure 10 : Examen à faible grossissement montrant des levures bourgeonnantes sans filaments**

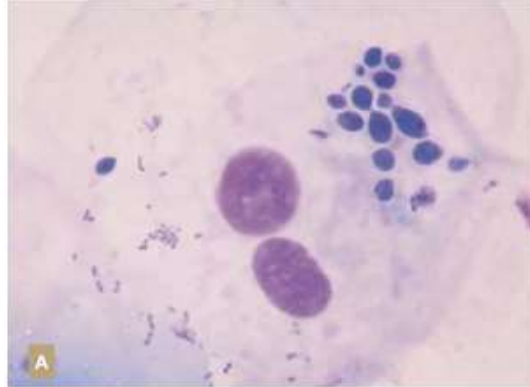
A gauche : Examen à l'état frais (57)

A droite : Examen direct d'une hémoculture positive à l'aide du Blankophor<sup>®</sup> et d'un microscope à fluorescence (17)

Diverses techniques de colorations sont utilisables pour les frottis, les appositions sur lames ou les spots de cyto centrifugation réalisés à partir de prélèvements profonds (pus d'abcès, liquides de ponction, LBA, biopsies tissulaires) :

- le May-Grünwald-Giemsa (MGG) : le cytoplasme des éléments fongiques est coloré en violet et la paroi reste blanche (figure 11)
- le bleu de méthylène : les éléments fongiques sont colorés en bleu

Les levures sont également visibles par la coloration de Gram classiquement utilisée en bactériologie, elles sont Gram positif (figure 11). Néanmoins la lecture à un fort grossissement pour observer les bactéries diminue la sensibilité de cet examen.



**Figure 11 : Amas de blastospores sur une expectoration (coloration MGG) (56)**

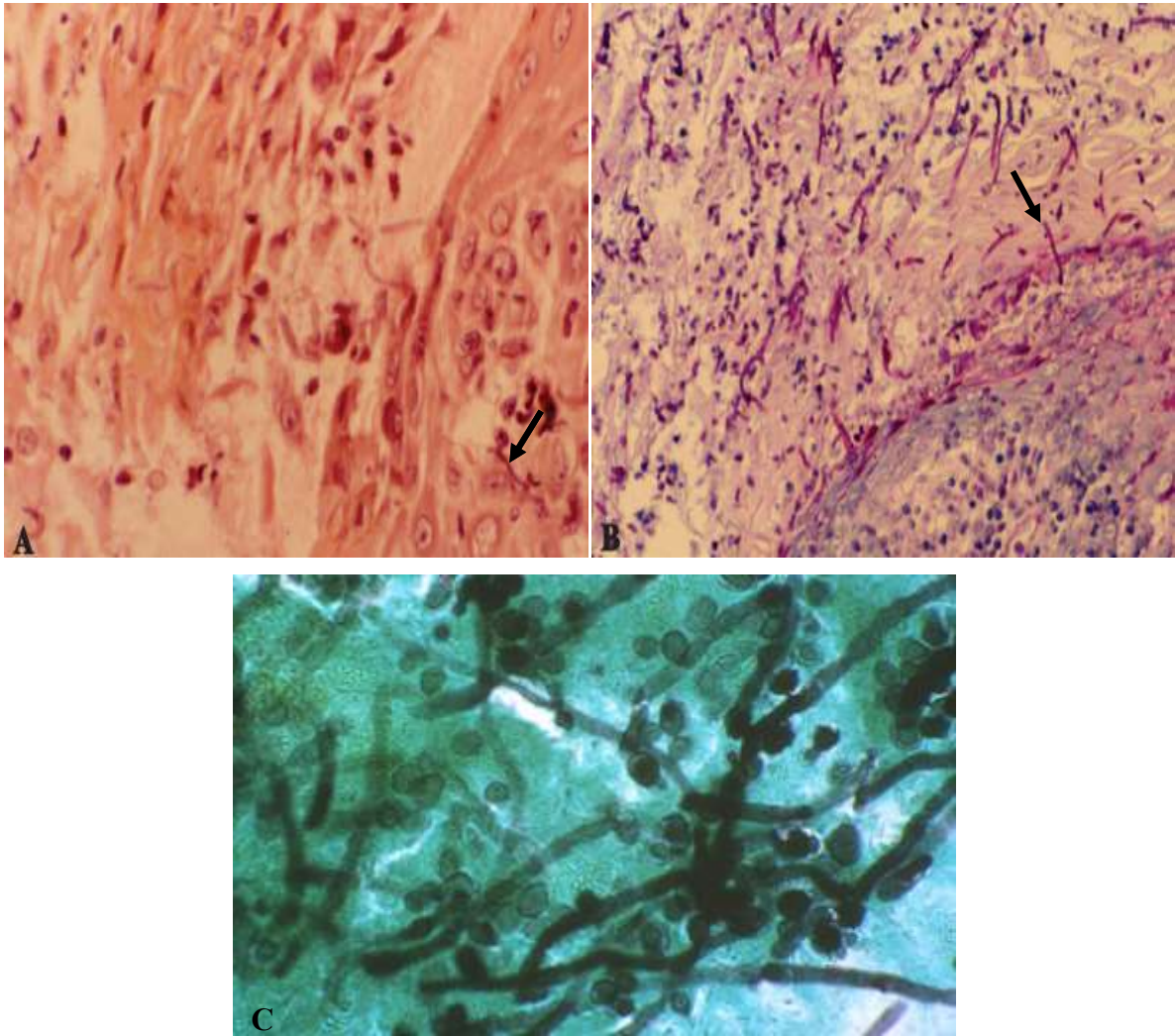
L'examen direct est cependant moins sensible que la culture (67), un examen négatif ne permet pas d'exclure un diagnostic de levurose. En effet, il faut que l'échantillon contienne au moins  $10^4$  à  $10^5$  éléments par mL pour détecter le champignon (66).

### **1.2.2.Examen anatomo-pathologique**

L'examen histologique est indispensable pour les prélèvements tissulaires et profonds et doit être réalisé lors d'une suspicion de candidose systémique. Sur une biopsie cutanée, il confirme le caractère invasif de la levure (62,65).

Les coupes, issues de biopsies ou de ponctions, sont d'abord fixées dans du formol. Plusieurs colorations anatomo-pathologiques sont classiquement utilisées :

- la coloration par l'acide périodique de Schiff (PAS) qui colore en rouge violet de façon non spécifique les éléments fongiques mais aussi les bactéries et parasites (figure 12 B)
- l'imprégnation argentique de Gomori-Grocott (figure 12 C) qui colore intensément la paroi des champignons dans les tissus, elle constitue la coloration de référence
- l'hématéine-éosine-safran (HES) qui permet d'apprécier la réaction tissulaire de l'hôte (infiltrat cellulaire, granulome, nécrose, fibrose) (figure 12 A).



**Figure 12 : Examen anatomo-pathologique d'une biopsie œsophagienne (7)**

A. Dépôts fibrinoïdes, PNN altérés et filaments mycéliens (coloration à l'HES)

B. Filaments mycéliens (coloration au PAS)

C. Filaments mycéliens associés à des blastospores (coloration argentique de Gomori-Grocott)

### 1.3. Culture

La culture est indispensable pour l'isolement et l'identification de la levure en cause. Elle permettra aussi la réalisation de l'antifongigramme.

### **1.3.1. Milieux d'isolement**

#### **1.3.1.1. Les milieux standards**

Les levures du genre *Candida* sont peu exigeantes, elles poussent sur la plupart des milieux de culture utilisés en microbiologie (géloses au sang, bouillon cœur-cerveille...).

Le milieu gélosé de Sabouraud est toutefois mieux adapté à la culture des champignons.

En pratique courante, le milieu de Sabouraud additionné de chloramphénicol et/ou de gentamicine est utilisé. L'ajout d'antibiotiques permet d'empêcher la pousse de la flore bactérienne associée. En revanche, le milieu contenant du cycloheximide (Actidione®), limitant la croissance de nombreux champignons filamenteux susceptibles de contaminer les cultures ne doit pas être utilisé, il est surtout réservé à la recherche de dermatophytes. Cette molécule peut en effet inhiber la croissance de certaines levures telles que *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ou *C. famata* (62).

Les boîtes de Pétri sont préférées aux tubes. Elles possèdent l'avantage d'avoir une surface d'ensemencement plus importante permettant un bon isolement des colonies, une numération facile et une excellente visualisation des associations. Par contre, les milieux se dessèchent plus rapidement lors d'une incubation prolongée.

#### **1.3.1.2. Les milieux chromogéniques**

Plusieurs milieux ont été développés pour une identification rapide des levures (68-70) (tableau 7).

Ces milieux contiennent des substances chromogènes qui vont réagir spécifiquement avec des enzymes sécrétées par les levures, et confèrent aux colonies qui s'y développent une coloration caractéristique qui varie en fonction de l'espèce et du milieu utilisé. L'activité enzymatique mise en évidence dans ces milieux est une hexosaminidase, ainsi la  $\beta$ -galactosaminidase est spécifique de *C. albicans*. La détection de la  $\beta$ -glucosidase ou de la phosphatase est souvent associée (71). Un mélange d'inhibiteur permet d'empêcher la croissance de la plupart des bactéries.

**Tableau 7 : Principaux milieux chromogéniques commercialisés pour l'identification des différentes espèces de *Candida* (16,72)**

<i>Nom commercial</i>	<b>CHROMagar® <i>Candida</i></b>	<b><i>Candida</i> ID®2 ChromID® <i>Candida</i></b>	<b><i>CandiSelect</i>®4</b>	<b><i>Candida</i> Brilliance®</b>
<b>Fabricant</b>	Becton-Dickinson	BioMérieux	Bio-Rad	Oxoid
<b>Enzymes recherchées</b>	β-galactosaminidase phosphatase	β-galactosaminidase β-glucosidase	β-galactosaminidase phosphatase	β-galactosaminidase phosphatase
<b>Identification immédiate</b>	<i>C. albicans</i> (vert clair à moyen) <i>C. tropicalis</i> (bleu verdâtre à bleu métallisé) <i>C. krusei</i> (rose pâle blanchâtre en périphérie)	<i>C. albicans</i> (bleu)	<i>C. albicans</i> (rose à violette)	<i>C. albicans</i> (vert)
<b>Identification présomptive</b>	<i>C. dubliniensis</i> (vert foncé) <i>C. glabrata</i> (mauve à mauve foncé)	<i>C. tropicalis</i> <i>C. lusitaniae</i> <i>C. kefyr</i> (rose)	<i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. krusei</i> (turquoise, aspect différent des colonies)	<i>C. tropicalis</i> (bleu) <i>C. krusei</i> (rose bords irréguliers)

Ces milieux permettent d'identifier directement *C. albicans* en 24 à 48 heures avec une sensibilité et une spécificité excellentes de l'ordre de 95 à 100 % (73,74). Le milieu CHROMagar® offre le spectre le plus large pour l'identification directe des colonies (75,76). Pour les autres espèces, ils ne permettent qu'une identification présomptive qui devra être confirmée par des tests complémentaires.

De nombreuses études ont montré l'avantage des milieux chromogènes comparés aux milieux de culture conventionnels. De plus ils permettent de visualiser directement les associations de levures (figure 13) (71). Powell *et al.* ainsi que Gaschet *et al.* rapportent 22 % de cultures mixtes dans leurs études (69,77).

Ces milieux sont plus onéreux que les milieux standards et possèdent quelques limites :

- La difficulté de différenciation entre *C. albicans* et *C. dubliniensis*, même avec une reformulation du milieu CHROMagar® ; les colonies ont une coloration très proche, la distinction entre ces deux espèces nécessite ensuite la réalisation de tests spécifiques (76).
- Le manque de marqueurs chromogéniques spécifiques pour *C. glabrata*, espèce fréquemment isolée (71).
- L'inhibition insuffisante de la croissance des bactéries et un risque de confusion entre certaines colonies en particulier pour le milieu *Candida* ID (66).



**Figure 13 : Mise en évidence d'une association de différentes espèces de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*) sur le milieu *Candida* ID2® (62)**

### **1.3.1.3. Les milieux fluorogéniques**

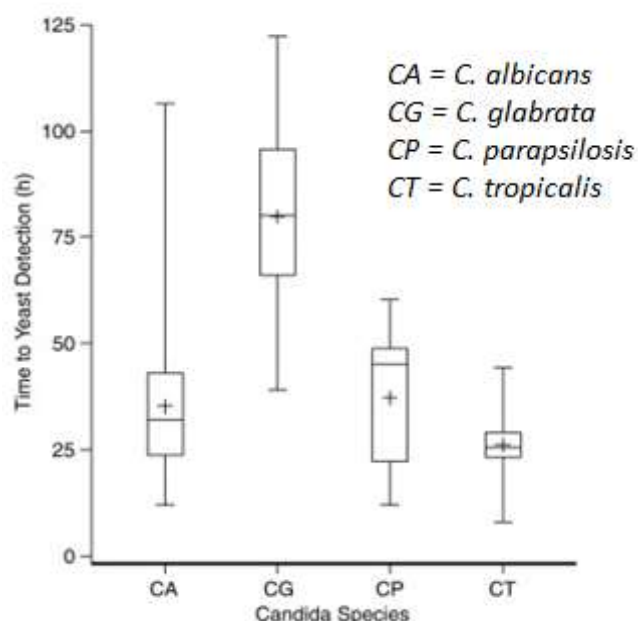
Le milieu Fluoroplate® *Candida* (Merck) repose sur le même principe mais le substrat est fluorogène. *C. albicans* est identifiée directement après 24 à 48 heures d'incubation grâce à la fluorescence bleutée des colonies sous lumière ultraviolette. La sensibilité (99.3%) et spécificité (99.7%) sont excellentes, mais ces milieux nécessitent un équipement spécifique (78,79).

### **1.3.2. Cas particulier de l'hémoculture**

L'hémoculture est l'examen de choix dans le diagnostic des CI. Cependant les hémocultures restent de sensibilité faible, elles ne sont positives que dans seulement 50 à 75 % des candidoses documentées (80) malgré l'amélioration des milieux et des systèmes de détection. La sensibilité dépend de l'espèce et de l'automate d'hémocultures, la détection est particulièrement moins bonne pour *C. glabrata* si les flacons spécifiques pour la mycologie ne sont pas utilisés. La sensibilité sera plus faible chez les sujets neutropéniques ou en cas d'administration d'antifongiques (3).

De plus, elles nécessitent une incubation de minimum 24 à 48 h pour se positiver en fonction des espèces (81). Le délai de détection est beaucoup plus long pour *C. glabrata* comme le montre la figure 14. Mais une seule hémoculture positive est suffisante pour poser diagnostic de candidémie (82).





**Figure 14 : Boîte à moustache (Box Plot) des temps de détection de croissance par espèces de *Candida* (81)**

Les zones délimitant la boîte représentent les valeurs des quartiles, la barre dans la boîte correspond à la médiane et la moyenne est représentée par le symbole (+). Les valeurs adjacentes de la moustache représentent le minimum et le maximum des valeurs de temps de détection des levures obtenues.

Les hémocultures doivent être prélevées régulièrement au cours de l'épisode pour surveiller la bonne efficacité du traitement. Des recommandations européennes dictent les modalités de prélèvements des hémocultures, elles sont résumées dans le tableau ci-dessous (tableau 8).

**Tableau 8: Recommandations ESCMID pour le recueil des hémocultures (3)**

<i>Modalités de recueil</i>	<i>Recommandations</i>
Nombre	3(2-4)
Volume Enfant < 2 kg	2 à 4 mL
2-12 kg	6 mL
12-36 kg	20 mL
Adulte	40 à 60 mL
Site	Ponction veineuse périphérique
Fréquence	Tous les jours
Durée d'incubation	Au moins 5 jours
Sensibilité	50 à 75 %

Les premières techniques permettant un raccourcissement des délais de détection de la croissance fongique consistaient en une lyse-centrifugation (système Isolator<sup>®</sup>) afin de concentrer les agents infectieux. Elles ont été abandonnées au profit des automates d'hémocultures (83).

Deux types d'automates sont classiquement utilisés (tableau 9) (62,84) :

- Le système Bactec<sup>®</sup>, où il existe un milieu spécialement formulé pour l'isolement des champignons dans le sang
- Le système BacT/Alert<sup>®</sup>, utilisant un même milieu de culture pour la détection des bactéries et champignons.

Le principe de détection de la croissance fongique repose sur la mesure du CO<sub>2</sub> produit dans les flacons par un système de lecture.

**Tableau 9 : Caractéristiques des deux principaux automates d'hémocultures utilisés dans les laboratoires (85,86)**

<i>Automates</i>	<i>Bactec<sup>®</sup> system</i>	<i>BacT/Alert<sup>®</sup> system</i>
Fournisseur	Becton-Dickinson	BioMérieux
Principe de détection	Fluorimétrie	Colorimétrie
Fréquence de lecture	Toutes les 10 minutes	Toutes les 10 minutes
Volume de milieu de culture par flacon	25 à 30 mL	40 ml (sauf BacT/Alert <sup>®</sup> FA 30 mL)
Principaux flacons disponibles pour les adultes	Bactec Plus Aerobic/F <sup>®</sup> Bactec Plus Anaerobic/F <sup>®</sup> Bactec Lytic/10Anaerobic/F <sup>®</sup> Bactec IC/F Mycosis <sup>®</sup>	BacT/Alert SA <sup>®</sup> (standart aérobie) BacT/Alert FA <sup>®</sup> (aérobie FAN*) BacT/Alert SN <sup>®</sup> (standart anaérobie) BacT/Alert FN <sup>®</sup> (anaérobie FAN*) (milieu FAN : avec charbon actif)

\*les milieux FAN contiennent des billes polymériques absorbantes permettant une meilleure neutralisation des antibiotiques.

La plupart des levures sont capables de pousser sur les flacons d'hémoculture standards. Les flacons destinés à la détection des bactéries aérobies seront préférés aux flacons mis en anaérobiose, car mieux adaptés à la croissance des levures sauf pour *C. glabrata* qui est paradoxalement mieux détecté en anaérobiose avec un délai de pousse plus rapide.

Ainsi Horvath *et al.* ont mis en évidence un temps moyen de croissance pour *C. glabrata* de 22,14 +/- 2,47 h en anaérobiose et de 120,89 +/- 35,33 en aérobie (87).

Les recommandations préconisent au moins 5 jours d'incubation (3).

Plusieurs publications ont évalué les performances des différents milieux.

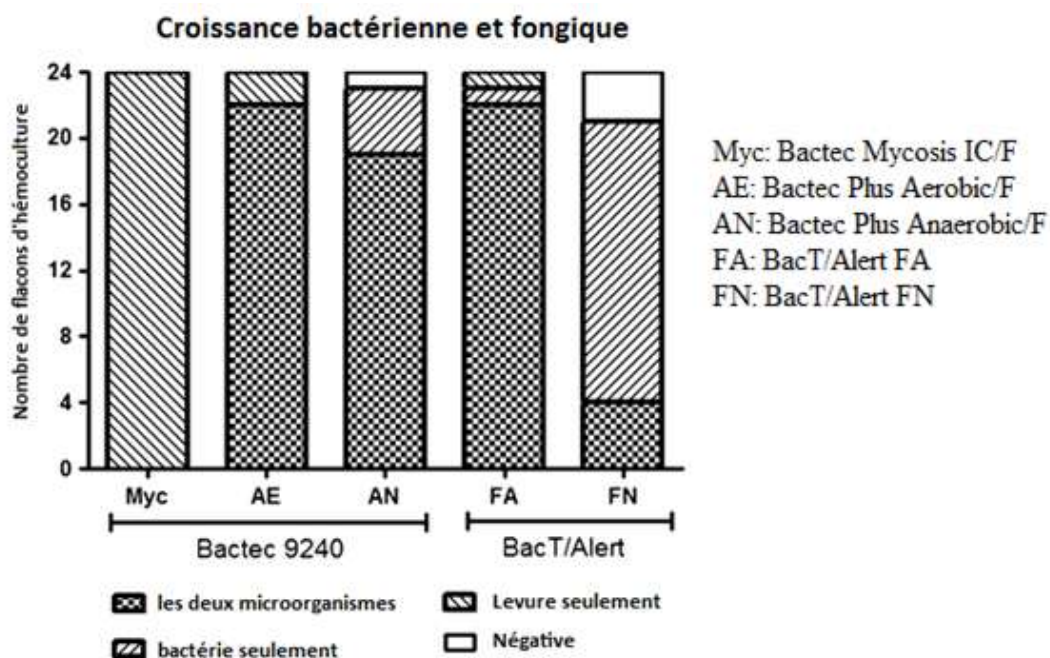
Mirret *et al.* et Horvath *et al.* ont montré une supériorité des milieux BacT/Alert® sur les milieux aérobies classiques Bactec® pour la détection de la croissance fongique et le temps de détection (25 h vs 27 h). La croissance fongique plus rapide sur les milieux BacT/Alert® peut s'expliquer par la différence de composition des milieux. Le milieu Biomérieux est en effet moins nutritif et est plus enrichi en oxygène par rapport au milieu de Becton-Dickinson pouvant expliquer la supériorité de ce milieu (88,89).

Mycosis IC/F® est un milieu spécifique pour les champignons, il est plus efficace que les milieux précédents. Ce milieu contient des antibiotiques (chloramphénicol et tobramycine) pour inhiber la croissance bactérienne, des facteurs de croissance ainsi qu'un cytolitique (saponine), le rendant sélectif et particulièrement adapté à la croissance des champignons.

Meyer *et al.* ont clairement montré la supériorité de ce milieu comparé au milieu Aerobic F® pour le diagnostic des candidoses systémiques particulièrement pour les espèces *C. albicans* et *C. glabrata* les plus fréquemment isolées. En effet ce milieu a une sensibilité bien meilleure (93% vs 76%) et un temps de détection plus court (de 7,6 heures en moyenne et jusqu'à 43,7 h pour *C. glabrata*) (84). Ce milieu est également considérablement plus sensible lorsqu'il y a présence concomitante de levures et de bactéries, alors que les milieux BacT/Alert® et Bactec® ont des performances assez similaires (figure 15).

L'absence de détection des levures dans les milieux bactériens peut être due à l'inhibition de la croissance des levures par le développement plus rapide des bactéries ou par la production des substances antifongiques par ces dernières. Les sepsis polymicrobiens sont fréquents (20 à 24 % des candidémies) et associés à une mortalité atteignant 30 à 40 % d'où l'intérêt d'associer le milieu Mycosis IC/F® aux milieux bactériens au cours de syndrome septicémique chez les patients à haut risque pour augmenter la sensibilité et la rapidité du diagnostic des candidoses systémiques (90). Néanmoins ces milieux sont trois fois plus cher que les milieux classiques, ils sont donc réservés aux situations particulières (89).

En cas de positivité un repiquage sur milieux standards ou chromogéniques est alors nécessaire pour identifier l'espèce, exigeant 24 à 72 h de culture supplémentaire. Ceci entraîne donc un retard diagnostique et par conséquent un délai supplémentaire dans l'initiation d'un traitement antifongique approprié.



**Figure 15 : Croissance de *Candida* et des bactéries dans les différents flacons d'hémoculture après ensemencement avec un mélange levure/bactérie (90)**

### 1.3.3. Ensemencement

Le sang est directement recueilli dans des flacons pour hémocultures.

L'ensemencement des autres prélèvements se fait par isolement en épuisant progressivement l'inoculum sur la gélose (en quadrants, en étoile ou par rotation).

Les écouvillons seront déchargés directement.

Les urines sont ensemencées après homogénéisation sur des géloses en boîtes et le résultat de la culture est exprimé en UFC/mL grâce à une calibration de l'inoculum permettant ainsi de dénombrer les levures. Les prélèvements épais comme les aspirations bronchiques sont fluidifiés à l'aide d'un produit mucolytique. Les prélèvements liquides comme le LCR sont d'abord centrifugés et le culot de centrifugation est ensemencé. Les biopsies sont préalablement découpées au bistouri ou broyées à l'aide d'un Potter puis mises en culture en frottant directement les fragments sur la gélose ou quelques gouttes du produit de broyage sont déposées sur la boîte (62,63).

### **1.3.4. Incubation**

Les géloses sont les plus souvent incubées à 35-37 °C (64), température optimale de croissance des *Candida*. Une durée d'incubation de 24 à 72 heures est généralement suffisante pour isoler la majorité des *Candida*. Cependant le délai d'isolement pour certaines espèces peut être plus long comme *C. glabrata* (rarement plus de cinq jours) (91).

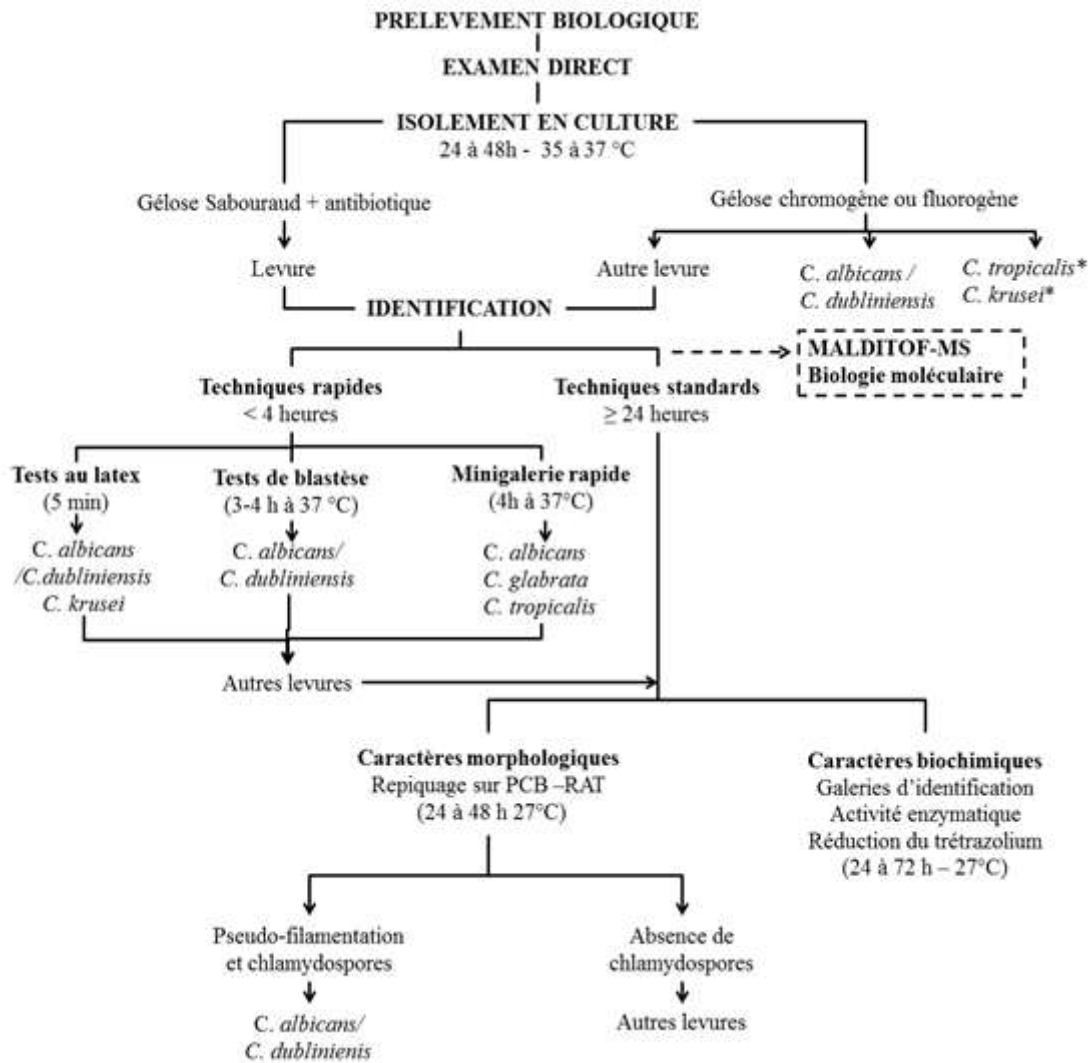
Pour les prélèvements profonds, une incubation des cultures d'une à quatre semaines est alors nécessaire. Elles seront conservées au minimum cinq jours, voire deux semaines pour les hémocultures, ou même quatre semaines pour les biopsies, le LCR et le LBA à cause de la lenteur de croissance de certains agents fongiques responsables de mycoses profondes (63).

### **1.4. Identification**

L'identification précise et rapide des levures à partir de colonies isolées chez un patient à risque de candidose profonde est indispensable pour le clinicien de par la diversité des espèces et leur spectre de sensibilité aux antifongiques variable. Elle permet ainsi une adaptation du traitement si nécessaire.

En pratique au laboratoire, elle est surtout basée sur l'étude des caractères biochimiques et sur des tests d'agglutination. Les caractéristiques morphologiques des cultures s'avèrent cependant très utiles. Elles permettent d'identifier le genre *Candida* et parfois d'orienter vers une espèce, mais d'autres tests plus spécifiques seront nécessaires à l'identification de la levure incriminée.

*C. albicans* étant l'espèce la plus fréquemment isolée et impliquée en pathologie, la démarche diagnostique consistera dans un premier temps à rechercher cette espèce grâce à des techniques rapides d'identification (figure 16) (86).



\*seulement sur les géloses CHROMagar® Candida

**Figure 16: Démarche diagnostique d'identification d'une levure du genre *Candida*.  
D'après Letscher-Bru (92)**

## 1.4.1. Caractères morphologiques des cultures

### 1.4.1.1. Caractères macroscopiques

L'examen macroscopique des cultures est fondamental car il oriente le diagnostic et permet de détecter d'éventuelles associations.

L'aspect des colonies permet tout d'abord de faire la distinction entre les levures et les champignons filamenteux qui eux présentent un aspect duveteux et un développement aérien du mycélium. Etant donné la diversification des espèces, les colonies du genre *Candida* possèdent des aspects et des formes très variés sur milieu Sabouraud. Leur couleur est le plus souvent

blanche à crème, leur texture sèche, muqueuse ou crémeuse, leur surface peut être luisante, brillante ou mate et présenter un aspect lisse, plissé ou rugueux (66).

Les colonies mesurent quelques millimètres de diamètre sur milieux standard après une incubation de 24 à 48 heures à 37°C.

La lecture est plus aisée et informative sur les milieux chromogéniques. L'identification pourra être ainsi immédiate pour certaines espèces comme *C. albicans* (tableau 7).

#### **1.4.1.2. Caractères microscopiques**

L'examen microscopique des colonies, entre lame et lamelle, permet d'apporter des informations supplémentaires sur la forme, la taille et le mode de bourgeonnement.

L'observation de blastospores rondes ou ovales, à bourgeonnements multipolaires orientés vers une levure du genre *Candida* (14).

#### **1.4.2. Tests physiologiques**

L'identification de *C. albicans* reposait historiquement sur l'association de deux tests qui ont été progressivement abandonnés au profit d'autres tests plus rapides et/ou spécifiques de l'espèce.

##### **▪ Le test de blastèse ou test de filamentation en sérum (72)**

Quelques colonies isolées sont incubées pendant 3 à 4 h maximum dans du sérum humain ou animal à 37°C. La présence de fins tubes germinatifs à paroi mince est recherchée au microscope. Ces filaments sont émis par les blastospores et ne présentent pas de constriction à la base contrairement aux pseudofilaments (figure 17 A).

Ce test simple, rapide et peu onéreux comporte toutefois quelques limites :

- 5 % des souches de *C. albicans* ne produisent pas de tubes germinatifs ;
- *C. dubliniensis* possède la même propriété phénotypique ;
- la confusion des tubes germinatifs est possible avec les pseudofilaments de *C. tropicalis* produits dans les mêmes conditions

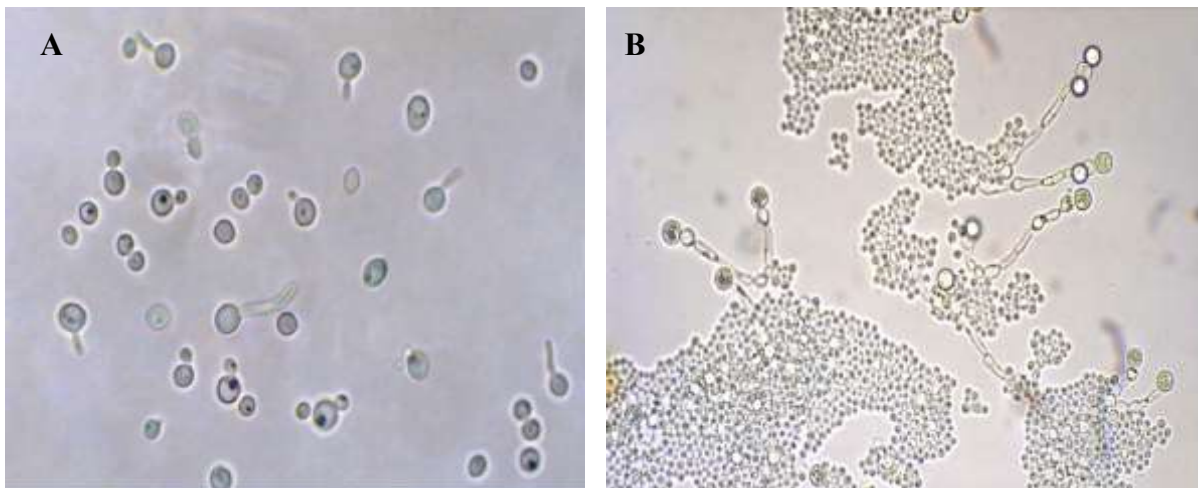
##### **▪ Le test de chlamydo sporulation**

Une goutte de la même suspension utilisée pour le test de blastèse est recouverte d'une lamelle stérile (culture en semi-anaérobiose) puis incubée 24 à 48 heures sur des milieux pauvres, milieu RAT (crème de riz - agar - tween) ou PCB (pomme de terre - carotte - bile) à

20 - 25°C. Ces milieux favorisent la pseudofilamentation et la filamentation des levures. Le milieu de culture est ensuite observé au microscope.

Ce test permet le diagnostic de genre. Les levures du genre *Candida sensu stricto* sont reconnaissables par la présence de blastospores et d'un pseudomycélium bien développé sur ces milieux, à l'exception des levures de l'ancien genre *Torulopsis* (*C. glabrata*, *C. famata* ...) qui ne filamentent pas (92).

L'espèce *C. albicans* sera facilement identifiée par ses chlamydospores terminales caractéristiques (figure 17 B), structures globuleuses, à paroi épaisse de 10 à 15 µm. Néanmoins comme pour le test de blastèse, il ne permet pas véritablement de différencier *C. dubliniensis* et *C. albicans*, bien qu'une production de chlamydospores plus abondante ait été rapportée pour *C. dubliniensis* (93).



**Figure 17 : Différents aspects morphologiques microscopiques des levures du genre *Candida***

A : Tube germinatif (tests de blastèse) (16)

B : Chlamydospores terminales de *C. albicans* sur milieu PCB (92)

### **1.4.3. Tests d'identification rapide**

#### **1.4.3.1. Méthodes immunologiques**

Ces tests reposent sur le principe d'agglutination de particules de latex sensibilisées par des Ac monoclonaux reconnaissant spécifiquement un Ag de la paroi des différentes espèces.



Le Bichro-latex<sup>®</sup> *albicans* (Fumouze Diagnostics) permet ainsi d'identifier le complexe *C. albicans* / *C. dubliniensis*. Une réaction positive se traduit par la formation en quelques minutes d'agglutinats rouges sur fond vert (figure 18). Ce test possède une excellente sensibilité et spécificité (99.74 % et 99.87 % respectivement) (94); néanmoins ce test ne peut pas être utilisé directement à partir de flacons d'hémocultures à cause d'une mauvaise sensibilité (69 %) (95).

Le Bichro-Dubli<sup>®</sup> (Fumouze Diagnostics) est utile pour différencier les deux espèces phénotypiquement très proches *C. albicans* et *C. dubliniensis* avec une sensibilité et spécificité proche de 100 % (91,92).

Le KruseiColor<sup>®</sup> (Fumouze Diagnostics) peut être intéressant pour l'identification de *C. krusei* mais ne semble pas très utile en pratique courante (96).



**Figure 18 : Bichrolatex albicans<sup>®</sup> (16)**

### 1.4.3.2. Méthodes enzymatiques

Le test fongiscreen<sup>®</sup> (Bio-rad) se présente sous la forme d'une mini galerie de 6 cupules et étudie 7 caractères. La détection de 5 enzymes spécifiques, la réduction du Tétrazolium, et l'assimilation du tréhalose se lisent par un changement de couleur. Ce système rapide (4 heures à 37°C) permet d'identifier 4 espèces de levures pathogènes : *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ainsi que *Cryptococcus néofomans* (97).

Le *Glabrata* RTT<sup>®</sup> (Fumouze Diagnostics) repose sur la capacité de *C. glabrata* à hydrolyser le tréhalose et pas le maltose. Ce test requiert seulement 4 à 6 colonies et donne des résultats en 20 minutes avec une très bonne sensibilité comprise entre 94 et 98 % et une spécificité variant de 97.3 à 98.6 % en fonction des milieux utilisés (98).

### 1.4.4. Tests biochimiques

Lorsque les colonies sur milieux chromogènes ne donnent pas une coloration caractéristique et que les tests rapides s'avèrent négatifs, un large panel de galeries d'identification peut être utilisé en routine (Tableau 10). Ces galeries sont indispensables pour l'identification des autres espèces que *C. albicans*. Ces tests sont principalement basés sur des réactions d'assimilation des glucides en aérobiose (auxanogramme) ou de leur fermentation en anaérobiose (zymogramme). L'étude de l'hydrolyse de substrats chromogéniques, des détections d'enzymes ou encore la résistance au cycloheximide peuvent être couplées à ces tests d'assimilation.

Ces réactions se traduisent, selon les systèmes commercialisés par l'apparition d'un trouble dans la cupule ou d'un virage d'un indicateur de pH. Le profil obtenu traduit en code numérique est alors comparé à des bases de données permettant d'identifier jusqu'à 63 espèces de levures selon les systèmes (16).

Il existe un système d'identification phénotypique entièrement automatisé le Vitek 2. Il offre un temps de manipulation réduit et des résultats d'identification rapides (18 h) (99).

**Tableau 10 : Caractéristiques des différentes galeries commercialisées. D'après Pihet (99,100)**

Paramètres	API®20C	Auxacolor®2	Candifast®	Fungichrom®	Fungifast®	ID32®C	Vitek®YST
Fournisseurs	Biomérieux	Bio-Rad	ElitechGroup	ElitechGroup	ElitechGroup	Biomérieux	Biomérieux
Nombre de taxons	43	33	10	24	10	63	50
Nombre de tests	19	20	9	15	20	31	20
Mode de lecture	Opacité Visuel	Colorimétrique Visuel	Colorimétrique Visuel	Colorimétrique Visuel	Colorimétrique Visuel	Opacité Visuel ou lecteur automatisé	Colorimétrique Lecteur automatisé
Durée	48 à 72 h	24 à 72 h	24 à 72 h	24 à 48 h	24 à 72 h	48 à 72 h	18 h
Caractères morphologiques	Obligatoires	Obligatoires	Non obligatoires	Non obligatoires	Obligatoires	Non demandés	Obligatoires
Antifongigramme Inclus	Non	Non	AmB 5FC Nystatine Fluconazole Econazole Ketoconazole Miconazole	Non	AmB 5FC Itraconazole Fluconazole Vorinazole	Non	AmB 5FC Fluconazole Vorinazole

Les galeries API® 20C, Candifast®, Fungichrom® sont de manipulation simple mais peu discriminantes et ne permettent d'identifier qu'un nombre restreint de levures (100).

La galerie ID<sup>®</sup>32C est depuis longtemps considérée comme la méthode de référence pour l'identification des levures. En effet ce test performant est capable d'identifier 63 espèces de levures différentes avec un taux élevé d'identification correcte (94 %) pour les espèces de levures les plus communes (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, et *Cryptococcus neoformans*) selon l'étude comparative de Meletiadis *et al.*, néanmoins ce taux est beaucoup plus faible pour les espèces rares (56 %). Ce test a aussi l'avantage de pouvoir intégrer un système de lecture automatisé et une interprétation informatisée du résultat.

La carte colorimétrique Vitek<sup>®</sup>YST utilisée avec le VITEK 2 possède également de bonne performance pour les espèces communes avec 92 % d'identifications correctes dans cette même étude ; pour les espèces rares le système Vitek<sup>®</sup> a donné de meilleurs résultats avec 64 % d'identifications conformes. De plus ce système permet une identification satisfaisante indépendamment du milieu d'isolement (101).

### **1.4.5. Spectrométrie de masse MALDI-TOF**

Les méthodes conventionnelles d'identification sont parfois insuffisantes pour assurer une identification fongique de par la diversité des espèces, l'évolution récente de leur taxonomie et la description de complexes d'espèces composés de nouvelles espèces grâce à l'introduction de la biologie moléculaire. Cependant, au sein des complexes d'espèces les spectres de sensibilité peuvent être différents et conduire à des traitements antifongiques inadaptés.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF, de plus en plus répandue en microbiologie, a fait son apparition depuis une dizaine d'année dans le domaine de la mycologie en complément ou en alternative des techniques conventionnelles (102).

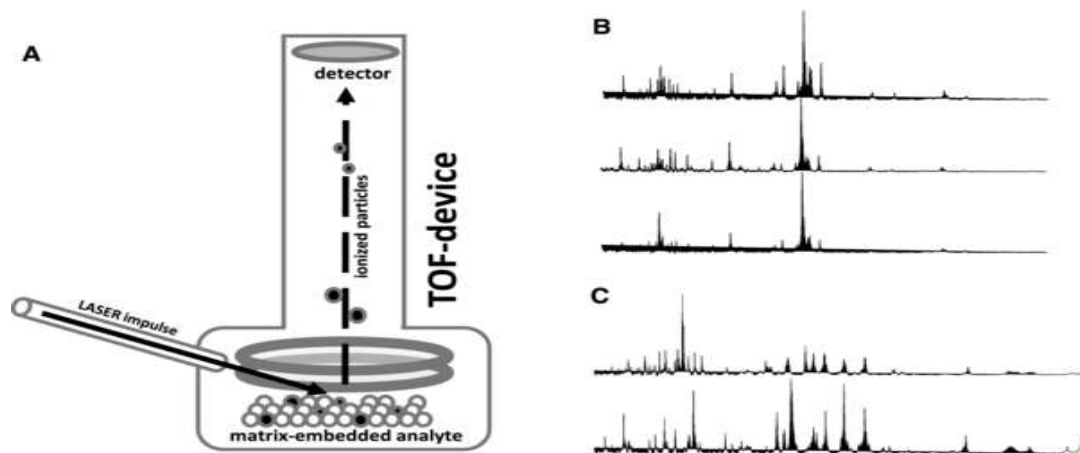
#### **1.4.5.1. Principe du MALDI-TOF**

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF permet une identification rapide des micro-organismes par analyse de leurs protéines totales directement à partir d'une colonie isolée des cultures.

Il s'agit d'une technique physique d'analyse fondée sur la séparation de molécules transformées en ions, en fonction de leur rapport  $m/z$  (où  $m$  = masse et  $z$  = charge). Elle repose sur une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, *Matrix-Assisted Laser*

*Desorption/Ionisation*) couplée à un analyseur à temps de vol (TOF, *time-of-flight mass spectrometry*). Les résultats sont donnés sous forme d'une série de pics (spectre) correspondant aux différents fragments issus de la molécule originale (figure 19). Les protéines détectées correspondent aux protéines ribosomales mais aussi à différents types de protéines structurales (103).

Ainsi, en comparant le spectre de l'échantillon à une base de données, il est possible d'identifier l'espèce fongique de l'isolat clinique. Les spectres de masse sont fortement reproductibles pour une même espèce (figure 19 B) mais suffisamment différents entre deux espèces fortement liées (figure 19 C) pour permettre une identification précise de l'espèce.



**Figure 19 : Principe schématique du MALDI-TOF (A), spectre de masse de trois *C. parapsilosis* isolés par les techniques d'identification classique (B). Comparaison des spectres de masse de *C. glabrata* et *C. bracarensis* (C) (102)**

#### 1.4.5.2. Les différents systèmes d'analyse disponibles

Actuellement il existe trois systèmes concurrents en France : Vitek MS<sup>®</sup> (BioMérieux), MicroFlex<sup>®</sup> (Bruker Daltonics) et Andromas<sup>®</sup> (Andromas) (103).

Ces systèmes disposent d'instruments différents mais également des protocoles de préparation de l'échantillon et des bases de données qui leur sont propres (102).

### 1.4.5.3. Intérêt du MALDI-TOF

Plusieurs études récentes ont comparé les performances des différents systèmes.

L'équipe de Lacroix *et al.*, a montré la supériorité des systèmes Bruker/Biotyper v.2<sup>®</sup> et Andromas<sup>®</sup> par rapport aux méthodes classiques et entre eux en termes de performance d'identification des *Candida*. Les deux automates avaient des performances équivalentes avec une identification correcte dans 98,2 % des cas néanmoins la procédure d'identification était plus simple et plus rapide avec le système Andromas<sup>®</sup> (104).

Dans l'étude de Bader *et al.*, le pourcentage de bonne identification sur 1 192 isolats cliniques était de 97,6 pour le système Bruker<sup>®</sup> (105).

Ces études ont également souligné la performance pour la discrimination des espèces de *Candida* au sein des complexes et la distinction des espèces rares non identifiables par les méthodes biochimiques en particulier pour le système Bruker<sup>®</sup>.

Il existe cependant des limites au niveau de la méthodologie pour valider définitivement les différents systèmes MALDI-TOF, avec bien souvent une sur-représentation des espèces communes dans les souches testées et un manque de comparaison avec les techniques de biologie moléculaire, ce qui peut biaiser les pourcentages d'identification annoncés.

Le principal avantage de cette technique est le gain de temps par rapport aux techniques usuelles. L'identification par spectrométrie de masse est en effet directement effectuée à partir de colonies isolées, elle nécessite toutefois pour certains systèmes la réalisation d'une extraction préalable. Cette technique précise et rapide permet ainsi d'obtenir à partir d'une culture pure l'identification d'une espèce en moins de 30 minutes (106).

L'identification peut également être immédiate à partir de flacons d'hémocultures. Cependant comme pour les bactéries, la procédure nécessite des étapes pré-analytiques supplémentaires de purification à l'aide de détergents (Tween 80, sodium dodecyl sulfate ou saponine) et par centrifugation différentielle par exemple, afin d'éliminer les substances contenues dans le bouillon d'hémocultures (protéines sériques, hémoglobine) qui génèrent de nombreux pics interférents. Par ailleurs, les flacons d'hémocultures sans charbon doivent être employés. La résine utilisée pour absorber les antibiotiques par le système Bactec<sup>®</sup> n'interfère pas sur la qualité des spectres. Par contre si un mélange de levures est présent, la combinaison de leur masse peut aboutir à un score bas d'identification ou à des résultats ambigus (102).

Les avantages de cette technique, en plus de sa rapidité, sont le coût modéré (0,5 \$ par isolat) et la réalisation très aisée (103,107).

## 2. Biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire reposent sur des méthodes d'amplification génique par *polymerase chain reaction* (PCR). Récemment, plusieurs méthodes de PCR ont été développées pour amplifier et détecter l'ADN des espèces de *Candida* pathogènes : PCR conventionnelle, PCR nichée, PCR en temps réel.

Elles peuvent s'effectuer, en fonction du contexte, à partir de la culture ou directement sur le prélèvement biologique (108).

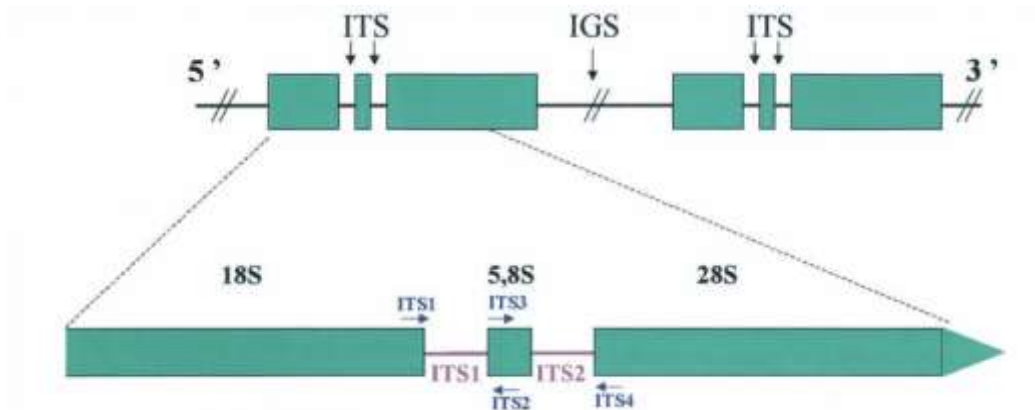
Elles permettent :

- d'identifier les levures lorsque les procédures conventionnelles de diagnostic mycologique sont insuffisantes pour une identification précise de l'espèce ;
- de rechercher une infection chez les patients à très haut risque ;
- de comparer des souches à visée épidémiologique, notamment le typage moléculaire des isolats cliniques de *Candida*, qui peut s'avérer très utile dans l'étude des infections fongiques nosocomiales (63) ;
- ou encore de rechercher des résistances aux antifongiques (109).

### 2.1. Méthodes d'identification moléculaire

L'identification par biologie moléculaire des levures du genre *Candida* à partir d'une culture sur gélose ou d'un flacon d'hémoculture est plus précise que les techniques habituelles (110). L'apparition de levures rares pathogènes qui expose au risque de résistance au fluconazole, difficilement ou non identifiables par les autres techniques explique le développement de ce nouvel outil. Même si l'approche moléculaire permet de réduire considérablement le délai d'identification, son coût élevé limite son utilisation aux situations de candidoses profondes qui justifient une identification rapide et précise de l'espèce pour mettre en place précocement un traitement antifongique adapté.

Les gènes ribosomiques constituent les cibles de choix. Ce sont des séquences hautement conservées chez les champignons permettant d'utiliser un couple d'amorce universel. Ces gènes codant pour l'ARN ribosomal 5,8S, 18S et 28S sont séparés par des régions non codantes très variables d'une espèce de champignon à l'autre (figure 20) : les régions ITS (*internal transcribed spacer* ou espaceur interne transcrit) ou IGS (*Inter Genic Spacer* ou espaceur intergénique). Les régions ITS sont les plus utilisées, leur polymorphisme sert ainsi de support pour l'identification moléculaire.



**Figure 20 : Représentation schématique des différentes régions de l'ARN ribosomique (108)**

Les rectangles correspondent aux régions codantes, les amorces consensus et les positions d'hybridation sont représentées par les flèches bleues.

Le fragment amplifié est ensuite le plus souvent séquencé et comparé grâce à l'utilisation d'outils bio-informatiques à des séquences disponibles dans les banques de données, les plus connues étant Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ou encore celles proposées par la CBS (CentraalBureau voor Schimmelcultures) spécifique des champignons (<http://www.cbs.knaw.nl/collections/Biolomics.aspx>).

Il est également possible d'étudier le polymorphisme de longueur des amplicons ou d'avoir recours à une PCR multiplex.

Récemment des techniques d'hybridation *in situ* des acides nucléiques de *Candida* avec des sondes fluorescentes spécifiques d'espèces ont été développées (PNA FISH, peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridation). Ainsi le kit Yeast Traffic Light PNA FISH® (AdvanDx) permet une identification rapide (en 90 minutes) directement à partir des hémocultures positives des principales espèces impliquées dans les candidémies grâce à la couleur de la fluorescence avec une bonne spécificité (96%) (111).

Son coût élevé limite son adoption pour une utilisation en routine et ce test ne permet pas la distinction entre *C. albicans* et *C. parapsilosis* ou entre *C. glabrata* et *C. krusei* et les autres espèces ne produisent pas de fluorescences caractéristiques (112).

## 2.2. Diagnostic moléculaire des candidoses invasives

La biologie moléculaire permet d'assurer un diagnostic des infections fongiques plus rapide que l'approche diagnostique standard avec une sensibilité élevée et une spécificité excellente. Plusieurs études cliniques prospectives confirment l'intérêt diagnostique de la détection d'ADN circulant au cours des infections invasives. La PCR nichée et la PCR en temps réel présentent les meilleurs résultats.

La PCR nichée est plus sensible que l'hémoculture, elle est caractérisée par une bonne spécificité (98%) (113). Cette technique qui associe deux PCR classiques successives, expose aux risques de contaminations et par conséquent de faux positifs, de ce fait, elle est difficilement utilisable en routine.

La PCR en temps réel possède l'avantage de diminuer le risque de contamination et de quantifier l'ADN fongique dans l'échantillon. L'étude de McMullan a montré de bons résultats pour le diagnostic rapide des infections à *Candida* par PCR en temps réel chez les adultes non neutropéniques en USI à partir de sérums avec une sensibilité de 87 % et une spécificité de 100 %. Seulement une candidémie à *C. albicans* sur 23 infections prouvées avait une PCR négative. Le temps nécessaire pour rendre un résultat était inférieur à 6 heures (114).

Lau *et al.* montrent les bonnes performances de la PCR multiplex dans une étude rétrospective, notamment à partir des flacons d'hémoculture (Se : 75%, Sp : 97%, VPP : 95%, VPN : 85%) (115). La détection était plus fréquente sur le plasma (75 %), que sur le sérum (71 %) ou le sang total (54 %). De plus, pour 70 % des patients, la détection était en moyenne de 2.2 jours plus tôt que la première hémoculture positive. La VPN élevée de la PCR est un autre avantage comparativement aux hémocultures.

Une méta-analyse récente de 54 études utilisant des méthodes basées sur la PCR pour le diagnostic des candidémies à partir des prélèvements de sang a permis de conclure que la PCR avait une sensibilité plus élevée que les hémocultures avec une spécificité supérieure à 90 %. La sensibilité et la spécificité sont très bonnes quand l'étude inclut seulement des patients avec une candidémie prouvée, mais celle-ci a tendance à diminuer lorsque les patients avec une candidémie probable ou possible sont ajoutés à la population. La sensibilité était ici meilleure sur sang total (116).



Enfin la commercialisation récente du kit Light Cycler<sup>®</sup> SeptiFast (Roche) permet la détection directe à partir du sang des vingt plus fréquentes bactéries et levures responsables de septicémies. Les résultats sont obtenus en 7-15 h. L'étude de Wammet *et al* rapporte 10 % de positivité des hémocultures par la technique classique *versus* 15 % pour SeptiFast avec une sensibilité de 78 %, et une spécificité de 99 % (117). Cependant peu d'espèces de levures sont identifiables.

La PCR permet ainsi de rattraper les faux négatifs en hémoculture ou en culture des biopsies. En revanche, la détection d'ADN fongique circulant par PCR n'est pas recommandée dans la stratégie diagnostique des candidémies et CI (3). En effet elle n'est pas encore suffisamment standardisée et évaluée pour la proposer comme marqueur précoce de l'infection invasive. De plus la majorité des PCR est restreinte aux espèces les plus fréquentes au cours des candidoses systémiques (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*) et son coût freine son utilisation. Les autres inconvénients incluent la difficulté de distinguer colonisation fongique et maladie et les potentiels résultats faux positifs résultants d'une contamination (80).

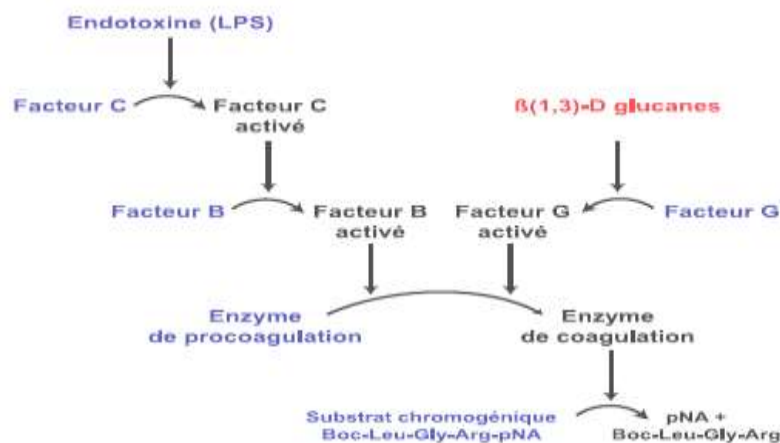
### **3. Méthodes diagnostiques indirectes**

Le manque de spécificité des signes cliniques, la faible sensibilité des hémocultures, leur positivité tardive et la réalisation souvent très problématique de prélèvements profonds nécessitant des procédures invasives ont favorisé le développement de méthodes immunologiques afin de détecter des marqueurs d'infection fongique. La mise en évidence dans le sérum d'Ac et d'Ag spécifiques permet ainsi d'évaluer le risque de CI et peut contribuer au diagnostic de mycose profonde.

#### **3.1. $\beta$ -D glucanes**

Les  $\beta$ -(1-3)-D glucanes ( $\beta$ DG) sont des polysaccharides composant majoritairement la paroi de la plupart des champignons, à l'exception de l'espèce *Cryptococcus* qui produit de très faibles taux de  $\beta$ DG et des mucorales qui ne sont pas connues pour en produire. Ces métabolites sont libérés dans la circulation en cas d'infection fongique invasive et peuvent être par conséquent détectés dans le sang des patients présentant une CI, une aspergillose invasive, ou encore de nombreuses autres mycoses (80).

Plusieurs kits principalement développés au Japon permettent le dosage de ces métabolites. Seul le test Fungitell® (Associates of Cape Code Inc) est commercialisé en France. Son principe repose sur un dosage colorimétrique du  $\beta$ DG basé sur l'activation d'une cascade de coagulation d'une limule (*Limulus polyphemus*) (figure 21). La lecture du test fait appel à un spectrophotomètre et les résultats sont rendus en fonction d'une courbe de calibration. Des taux supérieurs à 80 pg/mL chez les patients à risque sont considérés comme positifs (118).



**Figure 21 : Principe du dosage des  $\beta$ -D Glucanes (118)**

Une récente méta-analyse de 16 études a évalué les performances de ce test. Les sensibilités et spécificités varient largement selon les études, s'étendant de 57 % à 97 % et de 56 % à 93 % (119). Chez les patients présentant une infection prouvée, la sensibilité globale était de 77 %. Il n'a pas été observé de différence de sensibilités des  $\beta$ DG pour la détection des CI ou aspergilloses invasives.

La VPN élevée de ce test présente un avantage diagnostique certain permettant d'exclure une CI lorsque le test est négatif chez les patients à risque. L'équipe de Posteraro a obtenu un résultat positif de  $\beta$ DG 24 à 72 h avant l'hémoculture dans tous les cas d'infections candidosiques prouvées (120).

Dans une récente étude réalisée chez les patients de réanimation chirurgicale à haut risque, le test Fungitell® était supérieur à l'indice de colonisation et au « Candida Score » pour le diagnostic des candidoses intra-abdominales et a permis un diagnostic plus précoce devant des hémocultures négatives (116).

La recherche des  $\beta$ DG a été incluse en 2008 dans les nouveaux critères diagnostiques de l'EORTC (European organisation for research and treatment of cancer) comme marqueur d'infection fongique invasive probable (82). De plus, la détection du  $\beta$ DG sérique fait partie des tests diagnostiques recommandés chez l'adulte pour les candidémies et CI (3). Cependant il n'existe pas de recommandations officielles quant à la périodicité et au nombre des prélèvements, ni sur l'utilisation d'autres liquides biologiques que le sérum.

Un résultat positif ne permet pas de différencier une infection à levure et à champignon filamenteux (121). De plus, des réactions croisées sont possibles avec des substances d'origine iatrogène (membrane de cellulose des hémodialyses, immunoglobulines IV, certains antibiotiques) ainsi qu'avec certains microorganismes (patients bactériémiques) (122).

### **3.2. Détection des mannanes circulants et des anticorps sériques anti-mannanes**

Le mannane (Mn) est un composant majoritaire de la paroi cellulaire de *C. albicans*, il représente un des principaux Ag qui circule lors d'une infection. Contrairement aux glucanes, les mannanes sont liés de façon non covalente à la paroi et sont fortement immunogènes (122). Différents tests permettant de rechercher l'Ag Mn ou les Ac anti-Mn dans le sérum sont commercialisés.

#### **3.2.1. Détection des Ag Mn circulants**

L'utilisation de l'Ag Mn pour le diagnostic immunologique des CI a été suggérée par Weiner and Coats-Stephen il y a environ deux décennies (7). Trois tests sont actuellement disponibles en France (62) :

- Le kit Pastorex<sup>®</sup> *Candida* (Bio-Rad) développé en 1991 est basé sur l'agglutination visible à l'œil nu de particules de latex sensibilisées par un Ac monoclonal de rat EBCA-1 dirigé contre des oligomannosides particuliers de *Candida*. Ce test semi-quantitatif présente l'avantage d'avoir une lecture immédiate mais son faible seuil de détection de l'ordre de 2,5 ng/mL limite son utilisation (123).
- Le kit Platelia<sup>®</sup> *Candida* Ag (Bio-Rad) détecte les Mn circulants par technique ELISA sandwich en microplaque (124). Ce test automatisable est adapté au suivi régulier des patients à risque.

- Le test Serion ELISA antigène *Candida*<sup>®</sup> (Virion/Serion) est également basé sur la détection des Ag Mn par technique ELISA.

### 3.2.2. Détection des Ac anti – Mn

Plusieurs techniques sérologiques existent pour détecter ces Ac spécifiques (62) :

- L'ELISA en microplaque met en évidence les Ac dirigés contre les Mn pariétaux : Platelia<sup>®</sup> *Candida* Ab (Bio-Rad) ; Serion<sup>®</sup> ELISA classic *Candida albicans* IgG/IgM/IgA (Virion).
- L'immunofluorescence indirecte (IFI) a été récemment ré-introduite par un groupe espagnol, qui a commercialisé le *Candida albicans* IFA IgG<sup>®</sup> (Viricell) pour la détection des Ac dirigés contre les tubes germinatifs de *C. albicans*. Ce kit présenterait l'avantage de ne pas être influencé par la colonisation ou le traitement antifongique (125,126).
- L'hémagglutination indirecte (Candidose Fumouze<sup>®</sup>, Fumouze Diagnostics) détecte la présence d'Ac anti-*C. albicans* sériques par une agglutination d'hématies sensibilisées par un Ag soluble en se traduisant par un voile rouge tapissant la cupule.
- Les techniques d'immunoprécipitation : l'immunoélectrophorèse et l'électrosynérèse permettent une détection semi-quantitative des Ac précipitants. Elles sont d'interprétations difficiles, fastidieuses et longues à réaliser.

La détection combinée d'Ag sériques Mn et d'Ac sériques anti-Mn fait ainsi partie des recommandations européennes pour le diagnostic des candidémies (3). Elle pourrait être plus précoce que l'hémoculture. De plus sa VPN est élevée.

Ces tests doivent donc s'inscrire dans une stratégie de surveillance.

### 3.3. Autres tests

Parmi les autres tests sérologiques proposés pour le diagnostic de candidoses profondes figurent la détection d'énolase ou encore du métabolite D-arabinitol mais ils n'ont pas été commercialisés. Certains kits commerciaux basés sur l'agglutination de particules de latex sensibilisées par des Ac polyclonaux ciblant des Ag non définis (CanD-tec<sup>®</sup>, Ramco) sont commercialisés aux États Unis.

## **4. Détermination de la sensibilité aux antifongiques**

### **4.1. Intérêt et indications**

Face à la gravité des candidoses systémiques, en plus de l'identification mycologique le biologiste joue un rôle important dans l'évaluation *in vitro* de la sensibilité aux antifongiques des souches de *Candida* isolées. L'antifongigramme permet ainsi au clinicien d'adapter le traitement antifongique, mais également de surveiller l'émergence de souches résistantes.

L'étude de la sensibilité aux antifongiques doit être réalisée de manière systématique lorsque la levure est isolée d'une hémoculture ou d'un site profond. Elle sera faite aussi pour les malades hospitalisés dans les services à risque : réanimation, services de transplantations d'onco-hématologie quelle que soit l'origine du prélèvement (10,127).

### **4.2. Méthodes utilisées**

De nombreuses techniques de détermination *in vitro* de la sensibilité des champignons aux antifongiques existent. De plus, de multiples facteurs tels que le milieu de culture, l'inoculum, la température et la durée d'incubation ou le pH peuvent entraîner une variation des résultats obtenus (128).

Ainsi plusieurs sociétés savantes, le CLSI (Clinical and laboratory standards institute anciennement NCCLS) aux USA et l'EUCAST (European committee on antimicrobial susceptibility testing) en Europe ont proposé une standardisation des techniques. Elles constituent les méthodes de référence.

#### **4.2.1. Méthodes de références CLSI et EUCAST**

Le principe de ces deux méthodes repose sur une microdilution en milieu liquide. Une suspension de levure calibrée est mise en contact avec des concentrations croissantes d'antifongique à tester dans les puits d'une microplaque contenant du milieu de culture. La présence ou non d'une culture dans chaque puits est alors observée et comparée à celle d'un témoin (culture de la levure en l'absence d'antifongiques) (62).

Les premiers travaux de standardisation ont débuté dans les années 1980 par le groupe NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) permettant la publication d'un premier document M27-P en 1992 donnant des recommandations détaillées, réactualisé par la suite par le CLSI (méthode M27-A3 et son supplément M27-S3).

Plus récemment le comité européen EUCAST a proposé une nouvelle technique de référence, en apportant plusieurs modifications par rapport à la méthode NCCLS dont une supplémentation en glucose du milieu, un inoculum 100 fois supérieur, ceci permettant une incubation courte de 24 h (tableau 11) (129,130).

**Tableau 11 : Caractéristiques techniques comparées des méthodes de référence du CLSI et de l'EUCAST pour la détermination des CMI des levures (131)**

Caractéristiques	CLSI M27-A3	EUCAST EDef 7.1
Concentration de l'inoculum	0,5-2,5 10 <sup>3</sup> UFC/ml	0,5-2,5 10 <sup>5</sup> UFC/ml
Milieu de culture	RPMI 1640 avec glutamine sans bicarbonate + glucose 0,2% Tampon MOPS	RPMI 1640 avec glutamine sans bicarbonate + glucose 2% Tampon MOPS
Plaques microtitration	96 puits à fonds ronds	96 puits à fonds ronds
Incubation	24-48 h à 35°C sans agitation	24 h à 35+/- 2°C sans agitation
Lecture	Visuelle	Spectrophotométrique
Détermination des CMI : % d'inhibition	AmB 100 % azolés et EC 50 %	AmB 90 % azolés et EC 50 %

La CMI est définie comme la concentration la plus faible en antifongique qui inhibe la croissance du champignon dans une période de temps définie. Elle est exprimée en µg/mL.

La lecture des CMI est différente selon les antifongiques testés. Ainsi pour l'AmB, la CMI correspond au premier puits avec une absence de pousse selon le CLSI ou à 90 % d'inhibition par rapport au puits témoin de culture pour l'EUCAST. Pour les autres molécules la CMI sera lue où la pousse est inhibée de 50 % par rapport au puits de contrôle.

Des études comparatives ont montré qu'il existait une bonne corrélation entre ces deux techniques, particulièrement pour les azolés et une excellente reproductibilité inter et intralaboratoire (132-135).

Ces techniques sont lourdes et non adaptées en routine. Elles sont par conséquent réservées à des laboratoires spécialisés et ont pour objectifs l'établissement des seuils d'interprétation, la validation des nouvelles techniques de routine, les études d'activité des nouveaux antifongiques. Des tests commerciaux ont ainsi été développés pour une utilisation plus simple au laboratoire.

#### **4.2.2.E test ® (AB Biodisk)**

Cette méthode est dite par dilution diffusion. Des bandelettes graduées imprégnées d'un antifongique à un gradient croissant de concentration sont déposées sur une gélose préalablement ensemencée. Après une incubation de 24 à 48 h à 37°C, les CMI sont lues directement sur l'échelle de lecture au point d'intersection de la zone d'inhibition en forme d'ellipse avec la bandelette (figure 22) (127).



**Figure 22 : Etude de la sensibilité aux antifongiques azolés fluconazole, voriconazole et posaconazole par bandelette Etest® (62)**

Cette méthode possède une bonne corrélation avec les méthodes de référence avec une concordance globale de 90 % en particulier pour les azolés et les echinocandines (136). De plus, elle a montré une meilleure sensibilité pour la détection des résistances à l'AmB (137). Elle présente l'avantage d'une utilisation facile, accessible à tous les laboratoires et soumise à des critères de qualité. Cependant ces bandelettes ont un coût assez élevé et la lecture n'est pas toujours aisée (62).

#### **4.2.3.Galeries commercialisées (dilutions en milieu semi-solide)**

Parmi les antifongigrammes disponibles dans le commerce, le kit Sensitive YeastOne® est largement utilisé. Il se présente sous forme d'un test de microdilution colorimétrique en plaque de 96 puits. Ce système offre la possibilité de tester 8 antifongiques. Les plaques peuvent être lues visuellement, à l'aide d'un miroir de lecture présentant le dessous des cupules. La croissance des levures dans les solutions antifongiques sera mise en évidence par le virage de l'indicateur colorimétrique de croissance du bleu (négatif) au rouge (positif).

Des études ont montré que ce système possède une excellente reproductibilité (99 %) et corrélation (95 %) avec la méthode de référence CLSI (138,139).

Les galeries Fungitest<sup>®</sup> (Bio-Rad) et ATB Fungus<sup>®</sup> (BioMérieux) comportent plusieurs puits contenant des antifongiques différents sous formes déshydratées à différentes concentrations. Ces méthodes rapides ne testent qu'un panel restreint d'antifongiques avec seulement deux concentrations d'antifongiques et sont sujettes à des erreurs de lecture dues à une mauvaise standardisation de l'inoculum ou à une mauvaise homogénéisation des milieux. Les échinocandines ne sont pas disponibles avec ces tests de sensibilité.

Même si il existe une bonne corrélation du Fungitest<sup>®</sup> avec la méthode de référence NCCLS pour les souches trouvées sensibles ces galeries ne sont pas recommandées pour une utilisation en routine, elles peuvent rendre des résultats erronés pour certaines espèces en particulier pour *C. glabrata* (140) avec une capacité limitée à détecter les colonies résistantes.

Des méthodes automatisées telles que le système Vitek 2<sup>®</sup> existent et déterminent par lecture spectrophotométrique la croissance fongique en 12 à 18 h permettant simultanément l'identification et la détermination des CMI pour l'AmB, le fluconazole, la 5-FC et le voriconazole. Un logiciel expert est intégré au système qui valide et interprète les résultats des tests de sensibilité. Des études publiées ont montré un haut niveau de reproductibilité et une excellente corrélation avec la procédure de référence CLSI (> 95 %) pour le fluconazole, et plus récemment pour l'AmB, la 5-FC et le voriconazole. Devant ces données, la FDA (Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) a approuvée en 2006 son utilisation clinique pour détecter la résistance au fluconazole (141). Cependant, une sous-estimation de résistances a été observée pour certaines souches de *C. glabrata* (142).

#### **4.2.4.Méthode des disques en milieu gélosé**

Elle utilise des disques imprégnés d'antifongique déposés sur des géloses préalablement ensemencées par inondation ou par écouvillonnage. En fonction du diamètre d'inhibition les souches sont classées en sensible, intermédiaire ou résistante (143). Cette technique n'est plus utilisée en pratique courante.



### 4.3. Interprétation de l'antifongogramme

Selon la valeur de la CMI déterminée, les résultats sont interprétés en catégorie clinique sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R). La présence de souches de sensibilité « dose-dépendante » nécessite une augmentation des posologies.

Cependant, la sensibilité *in vitro* ne permet pas à elle seule de prédire la réponse au traitement du patient. En effet, les tests de sensibilité n'explorent que l'activité directe de l'antifongique sur le champignon et ne tiennent pas compte les facteurs inhérents à l'hôte (statut immunitaire du patient, terrain...), ni les caractéristiques pharmacocinétiques de la molécule (demi-vie, diffusion...). Le site de l'infection et le champignon (facteurs de virulence, taille de l'inoculum) sont aussi des facteurs qui jouent un rôle crucial dans l'évolution clinique.

Ainsi l'interprétation des tests de sensibilité doit répondre à quatre principes (144) :

- une CMI n'est pas une mesure physique ou chimique, son résultat est influencé par de multiples facteurs ;
- les facteurs liés à l'hôte supplantent souvent les résultats des tests de sensibilité pour juger de la réponse clinique ;
- la sensibilité *in vitro* n'est pas prédictive du succès thérapeutique ;
- la résistance *in vitro* n'est pas prédictive d'un échec thérapeutique.

La règle des « 90-60 » est souvent utilisée pour établir la corrélation entre sensibilité et succès thérapeutique : une infection due à une souche sensible répond au traitement approprié dans 90 % des cas alors qu'une infection due à une souche résistante (ou avec un traitement non adapté) répond dans 60 % des cas (145).

C'est ainsi que la notion de seuil de sensibilité clinique « Clinical Breakpoints (CBPs) » a été introduite en 1997 afin de mieux corréliser cette relation *in vitro* / *in vivo* (144).

La détermination des CBPs a été établie par le CLSI ou EUCAST en considérant de nombreux paramètres tels que la pharmacocinétique de l'antifongique, les ECV « Epidemiological Cutoff Values », les données expérimentales chez l'animal, les résultats des études cliniques ... Les CBPs sont donc révisés au cours du temps. Ils permettent une interprétation des CMI et ont pour but d'avoir une pertinence clinique.

Une souche est considérée comme sensible ou résistante lorsque le niveau d'activité antifongique est associé à une probabilité importante, respectivement, de succès ou d'échec thérapeutique (146).

Les ECV sont définies à partir de l'analyse visuelle de l'histogramme de distribution des CMI ou par des calculs mathématiques pour chaque espèce et chaque antifongique. Ils représentent un indicateur sensible de l'émergence de résistance microbologique dans les études de surveillance épidémiologique.

Pour les techniques qualitatives commercialisées, l'interprétation des résultats se fait selon les seuils proposés par les fabricants. Ils n'ont pas développés leurs propres «valeurs seuils d'interprétation» mais proposent des valeurs obtenues par corrélation avec CLSI ou EUCAST. L'utilisation des valeurs propres au CLSI et à l'EUCAST n'est pas recommandée.

## **VI. Traitement des infections fongiques invasives**

### **1. Les antifongiques**

#### **1.1. Molécules antifongiques utilisées**

Quatre familles d'antifongiques (ATF) systémiques sont disponibles pour le traitement des infections fongiques invasives à *Candida* (Tableau 12) (147,148).

La classe des polyènes, la plus ancienne, comprend l'amphotéricine B (AmB) deoxycholate et ses formes lipidiques.

La classe des triazolés comporte actuellement 4 molécules utilisées pour le traitement des candidoses : le fluconazole, l'itraconazole, le voriconazole et le posaconazole. L'itraconazole n'est quasiment plus utilisé. Le voriconazole et le posaconazole appartiennent à la seconde génération des triazolés systémiques.

Une autre famille ancienne est celle des pyrimidines dont la 5-fluorocytosine (5-FC) en est la seule représentante.

Enfin, la classe d'ATF la plus récente, les échinocandines est représentée par la caspofongine comme chef de file.

**Tableau 12 : Antifongiques disponibles en France pour le traitement des candidoses invasives (42,149)**

Classe	DCI (Nom commercial)	Voie d'administration	Date AMM	Indications	Toxicité
<b>Polyenes</b>	Amphotéricine B desoxycholate (Fungizone®)	IV	1961	Mycoses systémiques à germes sensibles	Rénale +++ Hypokaliémie Réaction immédiate +
	AmB complexe lipidique (Abelcet®)	IV	1997	Mycose invasive sensible à l'AmB en cas d'insuffisance rénale	Rénale + Réaction immédiate +
	AmB liposomale (Ambisome®)	IV	1998	- Mycose invasive sensible à l'AmB en cas d'insuffisance rénale - Traitement empirique en cas de neutropénie fébrile	Rénale +
<b>Pyrimidine</b>	5-fluorocytosine (Ancotil®)	IV, VO	1975	Mycoses systémiques sévères à germes sensibles, en alternative ou en relais de la voie parentérale notamment, en association avec autres molécules (en particulier AmB)	Hématologique ++ Digestive ++ Hépatique ++
<b>Azoles</b>	Fluconazole (Triflucan®)	IV, VO	1988	- Candidose systémique incluant candidose disséminée et profonde (candidémie, péritonite), - Candidose œsophagienne, urinaire, oropharyngée chez les patients immunodéprimés - Prophylaxie des infections à <i>Candida</i> sensibles (allogreffé de moelle osseuse, induction et consolidation des leucémies aiguës)	Hépatique +/-
	Itraconazole (Sporanox®)	IV, VO	1992	Candidose orale et/ou œsophagienne	Hépatique +
	Voriconazole (V-Fend®)	IV, VO	2002	Candidémie et candidose invasive grave, candidose œsophagienne	Hépatique +, Neurologique + Photosensibilisation Troubles vision +
	Posaconazole (Noxafil®)	IV, VO	2005	Candidose oropharyngée Prophylaxie des infections fongiques invasives en hématologie (neutropénie prolongée, allogreffé de moelle osseuse avec GVH)	Hépatique +
<b>Échinocandines</b>	Caspofungine (Cancidas®)	IV	2001	Candidose invasive Aspergillose invasive (patients intolérants ou réfractaires à d'autres molécules) Traitement empirique en cas de neutropénie fébrile Candidose œsophagienne (patients intolérants ou réfractaires à d'autres molécules)	Faible
	Micafungine (Micamine®)	IV	2008	Candidose invasive Prophylaxie des infections à <i>Candida</i> (allogreffé de moelle osseuse, neutropénie)	Faible Développement de tumeurs hépatiques chez l'animal, non établi chez l'Homme
	Anidulafungine (Ecalta®)	IV	2007	Candidose invasive (hors neutropénie)	Faible

## 1.2. Mécanismes d'action (147,150)

### • Les polyènes

L'AmB est un macrolide cyclique isolé de *Streptomyces nodus* au début des années 1950. Il se fixe sélectivement à l'ergostérol, composant majeur de la membrane plasmique fongique, en formant des pores à son niveau. La fuite par ces pores des électrolytes cytoplasmiques aboutit à un déséquilibre ionique à l'intérieur de la cellule à l'origine de la mort cellulaire (figure 23). Son affinité pour le cholestérol (principal stérol des membranes cellulaires des mammifères) est moindre, mais néanmoins présente ce qui explique sa toxicité.

L'AmB a été longtemps une molécule de référence dans le traitement des infections invasives à *Candida* notamment chez l'immunodéprimé (151). Sa néphrotoxicité importante, fréquente et facteur d'aggravation de la mortalité limite son utilisation (152).

Afin de réduire la toxicité, des formulations lipidiques d'AmB ont été développées avec moins d'effets secondaires, ainsi l'AmB peut être :

- associée à des complexes lipidiques (Abelcet<sup>®</sup>)
- associée à des lipides particuliers (Amphotec<sup>®</sup>, Amphocil<sup>®</sup>, plus commercialisés en France)
- enrobée dans des liposomes (AmBisome<sup>®</sup>)

Des études ont montré qu'aux posologies usuelles, Ambisome<sup>®</sup>, mieux toléré que Abelcet<sup>®</sup>, aurait une efficacité supérieure à l'AmB, entraînerait moins d'effets secondaires à la perfusion (frissons, vomissements, hypotension) et serait moins néphrotoxique (152-155).

### • La flucytosine ou 5-fluorocytosine (5-FC)

La 5-FC, un analogue de pyrimidine possède un pouvoir fongistatique. Elle pénètre dans la cellule fongique grâce à un transporteur membranaire la cytosine perméase, puis est transformée en 5-fluorouracile (5-FU) par la cytosine désaminase. La 5-FU, ensuite phosphorylée inhibe la synthèse de l'ADN par inhibition de la thymidylate synthétase et la synthèse protéique du champignon (figure 23). Elle possède une action synergique avec l'AmB et avec les imidazolés sur *Candida*.

La faible toxicité chez l'Homme s'explique par la quasi absence de cytosine-désaminase dans les cellules de mammifères.

- **Les azolés**

Les ATF triazolés interfèrent avec la biosynthèse de l'ergostérol, en inhibant une enzyme dépendante du cytochrome P450 la lanostérol 14 $\alpha$ -déméthylase (figure 23). Leur action est fongistatique. Ce phénomène conduit à la disparition de l'ergostérol qui intervient dans la fluidité de la membrane plasmique et l'accumulation d'autres stérols toxiques pour le champignon.

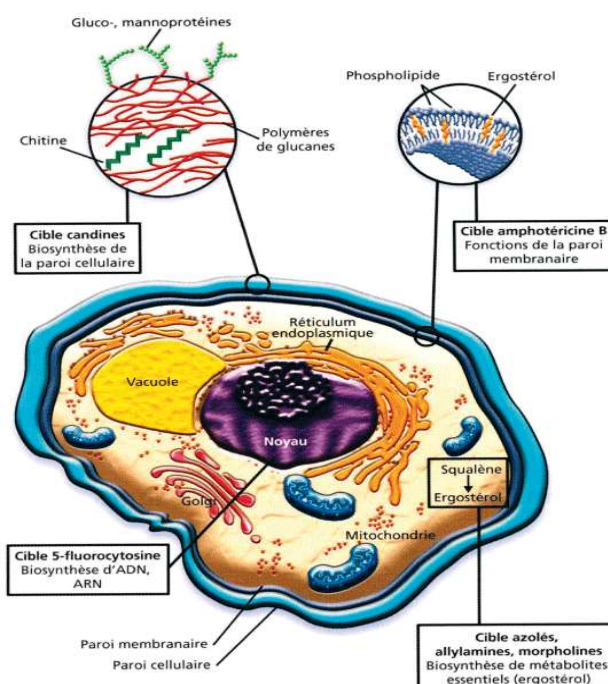
Le voriconazole, dérivé du fluconazole fait partie des triazolés de seconde génération à large spectre antifongique. Son inhibition de la déméthylation du 24-méthylène dihydrolanostérol, serait responsable de son activité sur les souches résistantes au fluconazole (156).

- **Les échinocandines**

Elles représentent une nouvelle classe d'ATF. Rapidement fongicides, ces lipopeptides agissent en inhibant l'activité de la (1,3)- $\beta$ -D-glucane synthase. Il en résulte un blocage de la synthèse des glucanes, composants essentiels à la constitution de la paroi fongique (figure 23).

Ce mécanisme d'action confère deux avantages à ces antifongiques :

- une toxicité sélective pour le champignon, les glucanes étant absents des cellules humaines ;
- l'absence théorique de résistance croisée avec les autres familles, en raison d'un site d'action différent des autres antifongiques (147).



**Figure 23 : Mécanismes d'action des antifongiques (157)**

### 1.3. Spectre d'activité

Comme illustré dans le tableau 13, certaines espèces du genre *Candida* présentent des résistances naturelles aux antifongiques.

**Tableau 13 : Spectre des molécules antifongiques utilisables pour le traitement des candidoses systémiques (158)**

Espèces	Fluconazole	Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole	5-FC	AmB	Candines
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S	S à R <sup>a</sup>
<i>C. glabrata</i>	S-DD à R	S-DD à R	S-DD à R	S-DD à R	S	S à I	S
<i>C. krusei</i>	R	S-DD à R	S	S	I à R	S à I	S
<i>C. lusitaniae</i>	S	S	S	S	S	S à R	S

I = Intermédiaire, R = Résistant, S = Sensible Dose-dépendant, a = Résistance rare

L'AmB, ATF à très large spectre, est active sur la plupart des espèces pathogènes, seules certaines souches de *C. lusitaniae* et *C. guilliermondii* y sont résistantes naturellement (156).

Le fluconazole présente également un large spectre. Cependant, *C. krusei* est naturellement résistant et la sensibilité de *C. glabrata* est inconstante et souvent dose dépendante (151,156).

Trente pourcents des souches de *C. tropicalis* et de *C. krusei* sont résistantes à la 5-FC. De plus, la fréquence d'apparition des résistances secondaires restreint son usage, d'où son utilisation en association avec un autre antifongique (156).

L'itraconazole possède aussi un large spectre d'activité, cependant peu d'études existent sur son efficacité dans le traitement des infections invasives à *Candida* (151). De plus, la biodisponibilité des formes encapsulées est non prédictible et la mise à disposition tardive de la forme parentérale a largement contribué à limiter son utilisation (18).

Les antifongiques récents (voriconazole et échinocandines) sont très efficaces quelle que soit l'espèce de *Candida*, y compris celles résistantes au fluconazole. Néanmoins, *C. parapsilosis* apparaît intrinsèquement moins sensible aux échinocandines (158) et les CMI de *C. glabrata* et *C. krusei* sont plus élevées que celles des autres espèces pour le voriconazole tout en restant sensibles (151).

## 2. Mesures générales de prise en charge d'une candidose invasive

Le choix initial du traitement, avant l'identification de la souche de *Candida*, dépend de nombreux paramètres liés au patient lui-même (148,157) :

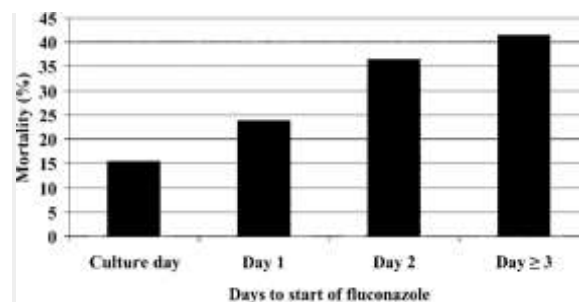
- du terrain : gravité de la maladie, état stable ou non du sujet, existence d'une neutropénie ;
- des antécédents de traitements ATF, en particulier l'exposition antérieure aux azolés ;
- de l'existence d'une insuffisance rénale ;
- de la possibilité d'interactions médicamenteuses ;
- du site infectieux.

Il doit également être envisagé en tenant compte des caractéristiques épidémiologiques du service hospitalier. Après l'identification, une première adaptation thérapeutique sera envisageable.

Devant la gravité des infections systémiques à *Candida*, le traitement doit être débuté le plus rapidement possible. Une thérapie appropriée précoce est un facteur majeur de bon pronostic dans les infections fongiques (158,159). En effet, plusieurs études ont montré le lien entre le délai de mise en place du traitement antifongique dans les CI et le taux de mortalité.

Dans l'étude de Nolla Salas *et al*, la probabilité de survie passe de 60 % si le traitement est instauré précocement (inférieur à 48 h après l'épisode de candidémie) à 20 % en cas de thérapie tardive (160). Dans une étude plus récente, Garey *et al*, a également souligné l'importance du début du traitement. Comme le montre la figure 24, le taux de mortalité était plus faible à J0 (15 %) comparé à J1 (24 %), J2 (37 %) et jusqu'à 41 % si le traitement est instauré avec un délai supérieur à deux jours (161).

Des résultats comparables avaient été trouvés dans l'étude de Morell *et al*, les auteurs avaient montré que l'instauration du traitement antifongique 12 h après la première hémoculture positive à *Candida* était associée à une augmentation de la mortalité hospitalière (162).



**Figure 24 : Relation entre le retard du traitement antifongique et le taux de mortalité dans les candidémies (161)**

### 3. Stratégie de prise en charge des candidoses invasives

Le choix du traitement antifongique fait l'objet de nombreuses recommandations d'experts et de comités de consensus, périodiquement mises à jour :

- Recommandations Françaises SFAR (Société Française d'Anesthésie et de Réanimation), SPILF (Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française), SRLF (Société de Réanimation de Langue Française) (2004)
- Recommandations Américaines (IDSA 2009)
- Recommandations Européennes :
  - ECIL 3 (European Conference on Infections in Leukaemia) (2009) : recommandations pour les patients présentant une pathologie hématologique et les transplantées de moelle osseuse
  - ECIL 4 (2010) : pour les patients pédiatriques avec cancer ou greffe de moelle osseuse allogénique
  - ESCMID (2012) (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases)

Les recommandations américaines et européennes sont élaborées sur la méthode GRADE (tableau 14).

**Tableau 14 : Niveau de preuve et force des recommandations de la méthode GRADE**

Niveau	Qualité de preuve
<b>I</b>	Au moins 1 travail randomisé contrôlé
<b>II</b>	Autres type de travaux
<b>III</b>	Avis d'expert

Grade	Force de la Recommandation
<b>A</b>	Supporte fortement
<b>B</b>	Supporte modérément
<b>C</b>	Supporte de façon marginale
<b>D</b>	Est contre (seulement pour ESCMID)

#### 3.1. Définitions

Quatre approches différentes existent classiquement dans la prise en charge des infections fongiques invasives (163,164) (figure 25) :

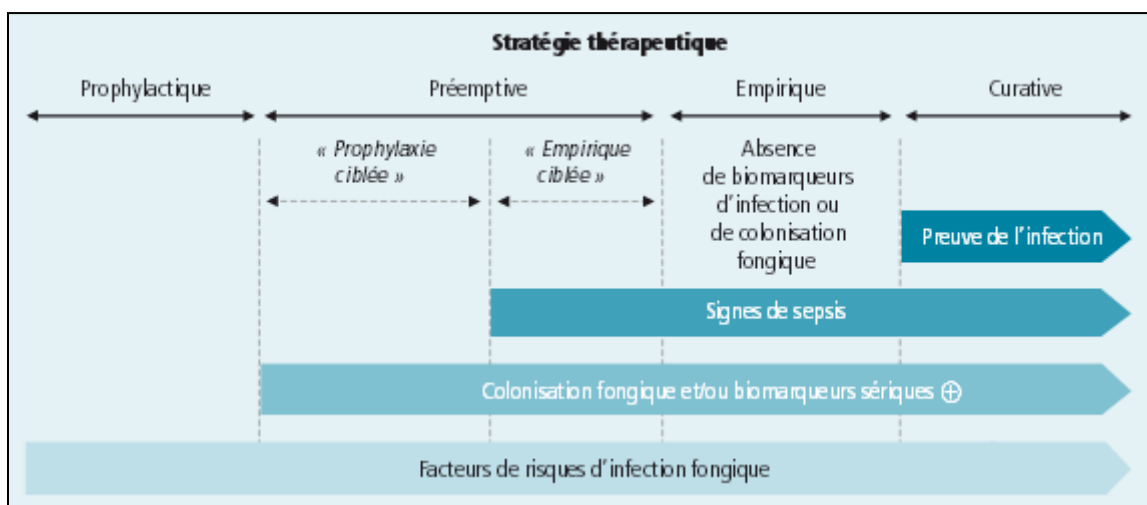
Un **traitement curatif** est défini comme un traitement antifongique prescrit chez un patient présentant une infection fongique invasive documentée (hémoculture positive ou examen direct positif à levure dans un site stérile).



Un **traitement** antifongique appliqué à un patient septique avec facteurs de risques sans colonisation à *Candida* documentée (pas de données microbiologiques, sérologiques ou histologiques) est défini comme **empirique**.

Un **traitement préemptif** se définit comme un traitement antifongique précoce donné à un patient avec plusieurs facteurs de risque d'infection fongique invasive et colonisé à *Candida* (signes radiologiques, marqueurs biologiques ou les deux).

Un **traitement prophylactique** est prescrit chez un patient présentant des facteurs de risque de CI mais sans documentation mycologique ni signes de sepsis.



**Figure 25 : Les différentes thérapeutiques antifongiques envisagées en fonction de l'estimation du risque d'infection fongique invasive et du degré de certitude (42)**

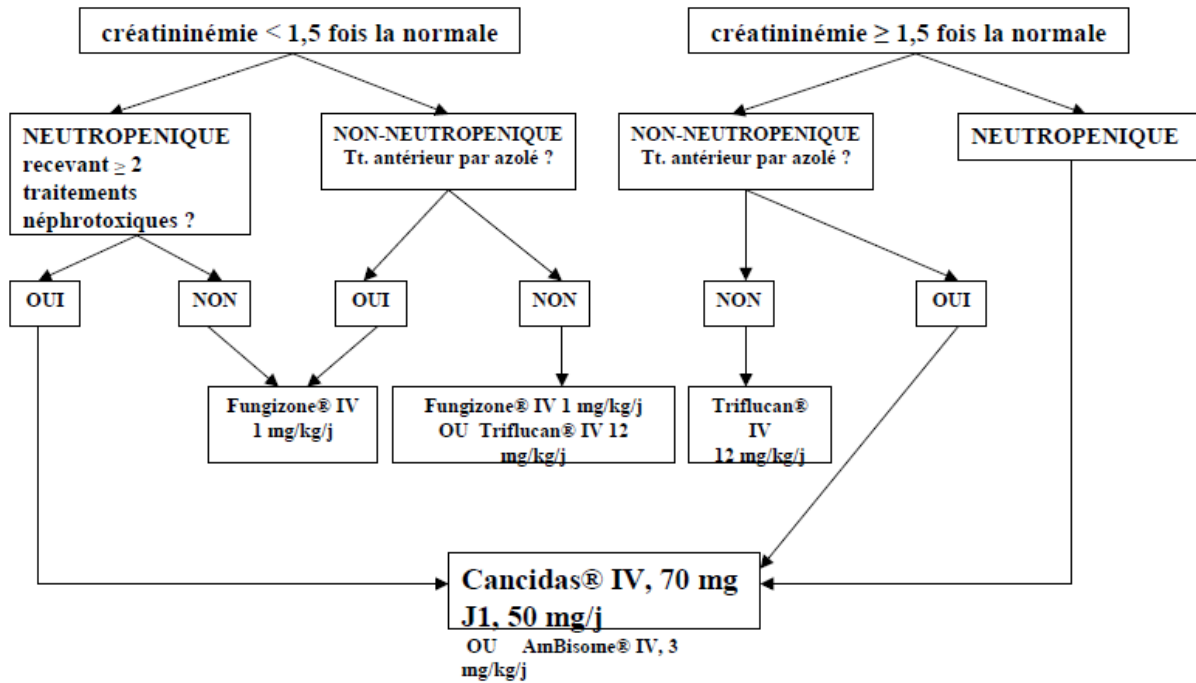
### 3.2. Recommandations françaises

Les dernières recommandations françaises établies par la conférence de consensus organisée conjointement par la SFAR, la SPILF et la SRLF sont relativement anciennes (2004) (148).

Elles ne sont plus vraiment adaptées car elles préconisent fréquemment l'utilisation de l'AmB, malgré que sa néphrotoxicité soit bien établie (figure 26).

Ainsi l'étude Amarcand, qui a réalisé une enquête observationnelle dans les services de réanimation français entre 2005 et 2006 a montré que ces recommandations étaient peu respectées. En effet, moins de 50 % des traitements étaient conformes aux recommandations françaises (165).

- Avant l'identification de l'espèce de *Candida*:



- Après identification de l'espèce de *Candida*:

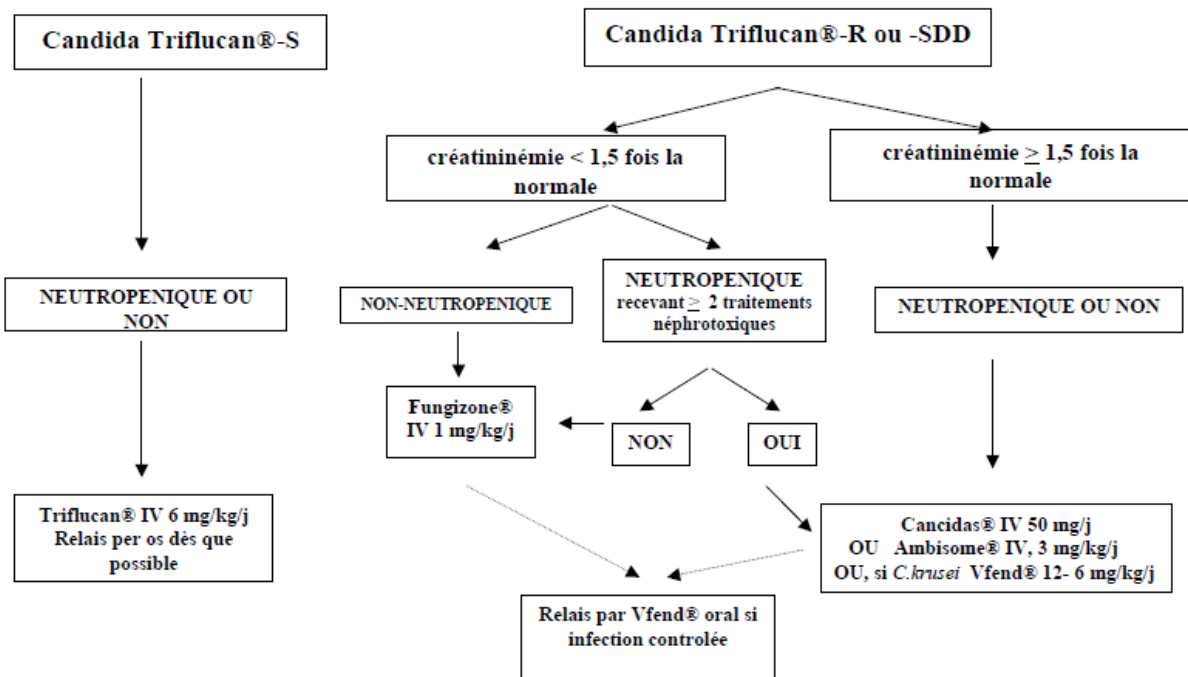


Figure 26: Traitement des candidoses invasives d'après la conférence de consensus commune de 2004 (148)

### 3.3. Recommandations américaines

L'IDSA a publié en 2009 des recommandations plus simples. Elles considèrent seulement l'existence ou non d'une neutropénie mais prennent en compte la néphrotoxicité de l'AmB conventionnelle, l'émergence de *Candida non albicans* de sensibilité diminuée au fluconazole, et la résistance croisée entre azolés (tableau 15).

Après identification de l'espèce, une adaptation thérapeutique est parfois nécessaire :

- Une désescalade thérapeutique vers le fluconazole est recommandée si la souche de *Candida* est sensible à celui-ci dans les formes peu graves avec évolution favorable (AII).
- En cas d'identification de *C. glabrata*, une échinocandine est préférée (BIII), en cas de prescription initiale d'un traitement azolé, celui-ci est néanmoins poursuivi si l'espèce est sensible avec un relais *per os*.
- En cas de candidémie à *C. parapsilosis*, le fluconazole est recommandé (BII) sauf si une échinocandine déjà mise en place fait preuve de son efficacité.
- En cas d'infections à *C. krusei*, une échinocandine, le voriconazole ou l'amphotéricine B est recommandé (BIII)

Les critères pour débiter une thérapie antifongique empirique chez les patients non neutropéniques sont peu définis. Ces recommandations amènent à considérer l'instauration d'un traitement empirique chez les patients fébriles avec des facteurs de risque d'infection fongique et sans autre cause de fièvre identifiée.

**Tableau 15 : Recommandations thérapeutiques IDSA (2009) pour le traitement des candidémies (158)**

Patients	1ère intention	Alternative	Commentaires
<b>Candidémie prouvée (avant identification)</b>			
Patients non neutropéniques	Fluconazole (AI) 800 mg J1 puis 400 mg/j Echinocandines (AI) - Caspofungine 70mg à J1 puis 50 mg/j - Micafungine 100mg/j - Anidulafungine 200mg à J1 puis 100mg/j	AmB 3-5 mg/kg ou AmB liposomale 1-2 mg/kg ou Voriconazole 400 mg J1 et J2 puis 200 mg (AI)	Echinocandines préférables (AIII) : - pour les infections modérées à sévères - et chez les patients récemment exposés à un azolé.
Patients Neutropéniques	Echinocandines (AII) Caspofungine 70 mg J1 puis 50 mg/j Anidulafungine ou 200mg J1 puis 100 mg/j AmB liposomale (AII) 3 à 5 mg/kg/j	Fluconazole (BIII) 800 mg J1 puis 400 mg/j Voriconazole (BIII) 400 mgx2/j puis 200 mg 2x/j	Fluconazole recommandé si exposition récente aux azolés (BIII) pour les malades peu sévères
<b>Candidémie présumée (traitement empirique)</b>			
Patients non neutropéniques	Identique candidémie prouvée (BIII)	AmB liposomale 3-5 mg/kg ou AmB 1-2 mg/kg (BIII)	Indications : - Etat critique à risque de CI - Pas d'autre cause à la fièvre - Facteur de risque, marqueur sérologique, colonisation
Patients Neutropéniques	AmB liposomale (AI) 3-5 mg/kg Caspofungine (AI) 70 mg J1 puis 50 mg/j Voriconazole (BI) 400 mgx2/j puis 200 mg 2x/j	Fluconazole (BI) 800 mg J1 puis 400 mg/j Itraconazole (B1) 200 mg/j	Indications : - Après 4 j de fièvre sous antibiotiques - Sérodiagnostic, Scanner Azolés non utilisés si prophylaxie antérieure par un azolé
<b>Traitement prophylactique</b>			
Transplanté Organe solide	Fluconazole (AI) 200 à 400mg/j AmB liposomale (AI) 1 à 2 mg/kg/j		Durée 7 à 14 j Après transplantation : Foie (AI), pancréas (BII), tube digestif (BIII)
Patients de réanimation	Fluconazole (BI) 400mg/j		Pour patients adultes à risque
Patients neutropénique sous Chimiothérapie	Fluconazole (AI) 400mg/j Posaconazole(AI) 200mgx3/j Caspofungine (BII) 50 mg/j	Itraconazole (AI) 200mgx2/j	A l'induction pour durée de la neutropénie
Greffe de cellules souches	Fluconazole (AI) : 400 mg /j Posaconazole (AI): 200 mg /kg 3x/j Micafungine (AI) : 50 mg/j		

### 3.4. Recommandations européennes

Plus récemment en 2012, le groupe européen de l'ESCMID représentant douze pays a aussi développé un guide pratique à la fois pour le biologiste et le clinicien avec des recommandations pour le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des CI (tableau 16).

La conduite à tenir en cas d'hémoculture positive à *Candida* est de débiter le traitement antifongique (A II).

Un traitement pré-emptif est recommandé (CII) pour les patients de réanimation avec des  $\beta$ -D-glucanes positif mais le traitement n'est pas spécifié.

Pour le traitement prophylactique, la population idéale en réanimation n'est actuellement pas définie. Une prophylaxie par fluconazole est recommandée chez les patients qui ont bénéficié d'une chirurgie abdominale avec des perforations gastro-intestinales répétées ou des fistules (BI).

Chez les patients neutropéniques d'hématologie ou d'oncologie un bilan complet est requis pour exclure une infection fongique de type aspergillose ou mycoses émergentes nécessitant un traitement antifongique spécifique.

**Tableau 16 : Recommandations thérapeutiques ESCMID (2012) pour le traitement des candidémies (165,166)**

Patients	1 <sup>ère</sup> intention	Alternative	Commentaires
<b>Candidémie (avant identification)</b>			
Patients non neutropéniques	<b>Echinocandines (AII)</b> Caspofungine: 70 puis 50 mg/j Micafungine 100 mg/j Anidulafungine 200 puis 100mg/j	AmB liposomale (BI) 3mg/kg Voriconazole (BI) 6/3 mg/kg/J Fluconazole (CI) 400-800 mg AmB lipidique (CII) 5mg/kg/J	Déconseillé : AmB Itraconazole Posaconazole Associations
Hémato/ oncologie Patients neutropéniques	Caspofungine (AII) Micafungine*(AII)	Anidulafungine (BII) AmB liposomale (BII) Fluconazole (CII) Voriconazole (CII) AmB lipidique (CII)  Déconseillé : AmB Itraconazole, posaconazole	Fluconazole réservé à la désescalade, si espèce sensible patient peu grave • Pas d'exposition récente • Si ablation cathéter • Arrêt si intolérance  Si prophylaxie ATF: changement de classe d'ATF (CIII)
<b>Traitement empirique de la neutropénie fébrile (y compris greffe de CSH)</b>			
Patients non neutropéniques	Fluconazole ou échinocandine (CII)		Patient de réanimation + facteurs de risque de candidose invasive + fièvre inexplicée
Hémato/ oncologie Patient neutropénique	Caspofungine (AI) 70 mg/j puis 50 mg/j AmB liposomale (A1) 3 mg /kg/j	Ampho B lipidique (BI) 5mg/kg/j Voriconazole (BI) 400 2x/j puis 200 2x/j Itraconazole (BI) 200mg/ 2x/ j (2j) 200mg/j Micafungine*(BI) 100mg/j Fluconazole (CI) 400mg/j AmB colloïdale (CI) 1mg/j  Déconseillé (DII): AmB	Critères : - Fièvre persistante malgré antibiothérapie large spectre (3-4 jrs) - neutropénie prolongée (> 10j)(AII) - Chimio d'induction ou consolidation de LAM, SMD - Greffe de moelle auto ou allogénique

\*restriction d'AMM micafungine : risque potentiel de développement de tumeurs hépatiques; à n'utiliser que si l'administration des autres antifongiques n'est pas appropriée

### 3.5. Comparaison des recommandations américaines et européennes

**Tableau 17: Tableau comparatif des recommandations IDSA et ECSCMID**

	<b>IDSA (2009)</b>	<b>ECMID (2012)</b>
<b>Caractéristiques des patients</b>	Non Neutropéniques Neutropéniques Pédiatriques	Non neutropéniques Service d'hématologie/ oncologie VIH et SIDA Pédiatriques
<b>Stratégie diagnostique</b>	Non	Oui
<b>Indication du traitement antifongique</b>	Tous les patients avec une hémoculture positive à <i>Candida</i>	Tous les patients avec une hémoculture positive à <i>Candida</i> même si asymptomatique
<b>Thérapie recommandé en première ligne</b>	Echinocandines: gravité modérée à sévère Fluconazole : gravité peu sévère	Echinocandines seulement
<b>Durée du traitement</b>	2 semaines (AIII) après négativation des hémocultures et résolution des symptômes associés à la candidémie + régression de la neutropénie	14 j (BII) après négativation des hémocultures, récupération de la neutropénie, résolution des signes cliniques et élimination d'une endocardite et d'une endophtalmie
<b>Ré-évaluation thérapeutique</b>	Relais par fluconazole ou voriconazole après 3-5 j d'EC chez le patient stable par voie orale	Relais fluconazole après 10 j ttt I.V. (BII) : - Souche sensible - Voie <i>per os</i> . possible - Patient stable
<b>Surveillance du traitement</b>	1 hémoculture/j (AII)	1 hémoculture/j jusqu'à négativation (BIII)
<b>Dépistage de foyers</b>	Fond d'œil systématique la première semaine	Recommandation modérée (BII) - ETO à la recherche d'endocardite - Fond d'œil à la recherche d'endophtalmie - Echo-doppler à la recherche de thrombus sur cathéters
<b>Retrait cathéters centraux</b>	Ablation de tous les cathéters si possible - non neutropénique (AII) : systématique - neutropénique (BIII) : controversé	2 Situations - Retrait possible : recommandation FORTE (AII) - Retrait «impossible» (BII) Si maintien du KT : prescrire une EC ou de l'AmB liposomale
<b>Test de sensibilité</b>	Recommandé pour toutes les colonies de <i>Candida</i> isolées du sang ou sites profonds (ou superficiels si échec du traitement)	Recommandé pour <i>C. glabrata</i> , échec du traitement initial, résistance suspectée aux azoles  Non recommandé pour <i>C. albicans</i>
<b>Surveillance des concentrations sanguines des traitements</b>	Recommandé pour voriconazole, posaconazole et 5-FU, EC pour les patients avec oxygénation par membrane extra-corporelle (ECMO)	Recommandé pour voriconazole et itraconazole si traitement prolongé

### 3.6. Localisations particulières

Il existe également des recommandations plus spécifiques pour des patients présentant des localisations secondaires (tableau 18).

**Tableau 18 : Comparaison des recommandations ESCMID /IDSA pour le traitement spécifique des localisations particulières**

	ESCMID	IDSA
<b>Infections urinaires</b>		
<b>Asymptomatique</b>	Non traité	Non traité
<b>Cystite symptomatique</b>	Fluconazole (BII)	Fluconazole (AIII) 15 j
<b>Pyélonéphrite</b>	Fluconazole ou AmB lipidique ± 5-FC (AIII)	Fluconazole (BIII) 15 j
<b>Endocardite</b>		
<b>Valve native</b>	Chirurgie dans la semaine (AII) AmB liposomale ± 5 FC (BII)	AmB Liposomale ± 5 FC (BIII) AmB-d ± 5 FC
<b>Valve prothétique</b>	Chirurgie dans les jours (AIII) Caspofungine (B III) Ampho B liposomale (B III)	EC Remplacement valve : 6 sem A vie si pas de chirurgie (fluconazole)
<b>Candidémie ostéoarticulaire</b>		
<b>Arthrite</b>	Fluconazole ≥ 6 sem. (AII)  Amphotéricine B liposomale 2 sem. puis fluconazole 400 mg, pdt ≥ 4 sem. (AII)  Caspofungine pdt 6 sem. (CII)  Voriconazole pdt ≥ 6 sem. (BIII)	Fluconazole au - 6 semaines AmB liposomale plusieurs sem puis fluconazole (BIII)
<b>Ostéomyélite, spondylodiscite</b>	Fluconazole 400 mg pdt 6-12 mois AmB liposomale / lipidique pdt 2-6 sem. puis fluconazole 400 mg, total 5-11 mois (AII)	Fluconazole 6-12 mois AmB Liposomale plusieurs sem puis fluconazole pendant 6-12 mois (BIII)
<b>Péritonite</b>	Non couvert par les recommandations	
<b>Choriorétinite/ endophtalmie</b>		
	Fluconazole ou voriconazole (A II) AmB liposomale (B III) Vitrectomie (BII)	AmB-d + 5FC (AIII) Fluconazole (BIII) Vitrectomie (BIII)
<b>Méningite</b>		
	AmB liposomale + 5 FC pdt 10 sem puis fluconazole pdt 5 sem. LF Amb + fluconazole 4 sem (BIII)	



#### 4. Mécanisme de résistance des *Candida* aux antifongiques

- **AmB**

Même après plus de 40 ans d'utilisation clinique, la résistance acquise à l'AmB reste exceptionnelle.

De rares cas de résistances acquises ont été rapportés chez *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et encore plus rarement *C. albicans* notamment chez des malades très immunodéprimés lors d'un traitement au long cours (147,150,166)

La déplétion en ergostérol de la membrane cellulaire, cible de l'antifongique semble être le principal mécanisme de résistance des souches de *C. albicans* d'origine clinique (167).

- **5-FC**

La résistance à la 5-FC est relativement fréquente. Ainsi, la proportion de souches du genre *Candida* résistantes est estimée à 7-8 % et ce taux passe à 22 % pour les *Candida non albicans* (11). De ce fait, la 5-FC n'est pas utilisée en monothérapie au cours des infections sévères, elle est indiquée uniquement en association avec un autre antifongique, le plus souvent l'AmB car leur association est synergique (147,168).

Les résistances résultent de différentes mutations responsables (150,167) :

- d'un déficit des différentes enzymes nécessaires à l'action de la 5-FC
- d'une augmentation de l'expression du gène codant pour la thymidilate synthétase
- d'un défaut de pénétration intracellulaire.

- **Azols**

Trois mécanismes cellulaires principaux à l'origine de la majorité des résistances sont décrits (167,169): modifications de la cible (14-alpha-déméthylase) avec diminution de l'affinité des azols, surproduction de la cible ou phénomène d'efflux par surproduction de transporteurs entraînant une diminution de la concentration intracellulaire de l'antifongique. Ce dernier mécanisme est le plus fréquent.

- **Echinocandines**

La résistance aux échinocandines est relativement rare. La proportion d'isolats sensibles est estimée à plus de 99 % chez les espèces genre *Candida* (11).

Le seul mécanisme démontré correspond à une diminution de l'affinité pour leur cible. (167,170).

**PARTIE II :**

**ENQUÊTE SUR LA**

**PRESCRIPTION DES**

**SEROLOGIES *CANDIDA* AU CHU**

**DE NANCY**

## **I. Les objectifs de l'enquête**

Des demandes de sérologies *Candida* sont régulièrement adressées au laboratoire de mycologie du CHU de Nancy par différents services de l'hôpital. La plupart du temps les renseignements cliniques ne sont pas précisés. Ceci ne permet pas au biologiste de réaliser une validation biologique optimale avec une interprétation contextuelle du résultat comme l'exige l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010. La prestation de conseils aux prescripteurs fait aussi partie des missions du biologiste depuis la réforme de la biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 portant sur l'accréditation des laboratoires de biologie médicale.

L'objectif principal de cette enquête est de connaître les indications de prescription des sérologies *Candida* au CHU de Nancy.

Différentes questions ont retenu notre attention :

- quelles informations le clinicien souhaite-t-il recueillir lorsqu'il prescrit un sérodiagnostic fongique *Candida* ?
- quel sera l'impact sur la prise en charge thérapeutique du patient ?

Les indications précises du sérodiagnostic en fonction des services prescripteurs seront donc détaillées et des informations pourront être réalisées en cas de mésusage (sous ou sur prescription).

## **II. Méthodes**

Nous avons identifié dans un premier temps les services qui prescrivaient des sérologies *Candida* au CHU de Nancy. Pour cela une extraction de données grâce au système informatique du laboratoire Glims® (société MIPS, Gent, Belgique) a été réalisée à partir des résultats des sérologies *Candida* sur une période de 18 mois (du 01/07/2013 au 01/01/2015), les services prescripteurs figurant sur les dossiers des patients. Ensuite afin d'évaluer les besoins des cliniciens et de mettre en évidence leurs habitudes de prescriptions, une enquête a été choisie comme méthode d'évaluation sous forme d'un questionnaire à choix multiples. La principale difficulté dans la rédaction du questionnaire était de proposer les questions les plus pertinentes possibles et exploitables qui répondent à nos préoccupations sans que les propositions de réponse influencent celles du prescripteur mais reflètent réellement ses

pratiques et son utilisation. Le questionnaire élaboré présentait 9 items avec un ou plusieurs choix à faire parmi plusieurs réponses prédéfinies (entre 3 et 7 réponses en fonction des questions). Un choix « Autre ... » était néanmoins possible pour la plupart des questions (Annexe). Les items concernaient les indications de la prescription et leur fréquence, les différentes informations recueillies, le type de patients ciblé. L'interprétation des résultats devant une sérologie négative ou positive et la conduite à tenir devant une sérologie positive étaient aussi évaluées. Pour finir nous souhaitions savoir si d'autres examens biologiques étaient associés à cette demande.

Dans un deuxième temps, ce questionnaire devait être adressé aux cliniciens ayant déjà prescrits des sérologies *Candida*. Nous avons fait le choix de nous rendre directement dans les services et de rencontrer les prescripteurs plutôt que de passer par un envoi électronique ou par courrier du questionnaire. De courts entretiens individualisés ont également pu être réalisés directement avec les prescripteurs dans les quelques services à risque d'infections candidosiques, afin de connaître leurs pratiques devant une suspicion d'infection invasive à *Candida* lorsque ceux-ci utilisaient rarement la sérologie *Candida*.

### **III. Résultats**

#### **1. Données sur la prescription de sérologie *Candida* au CHU de Nancy**

- **Nombre de sérologie prescrite**

En 2014, 148 demandes de sérologie ont été adressées au laboratoire de parasitologie mycologie du CHU de Nancy par différents services, ce qui représente approximativement 12 prescriptions par mois. En règle générale les sérologies étaient prescrites une seule fois, seuls 8 patients ont eu deux sérologies prescrites, et un patient avait 3 sérologies prescrites.

- **Services prescripteurs**

Les services les plus gros demandeurs de sérologie *Candida* étaient : (figure 27)

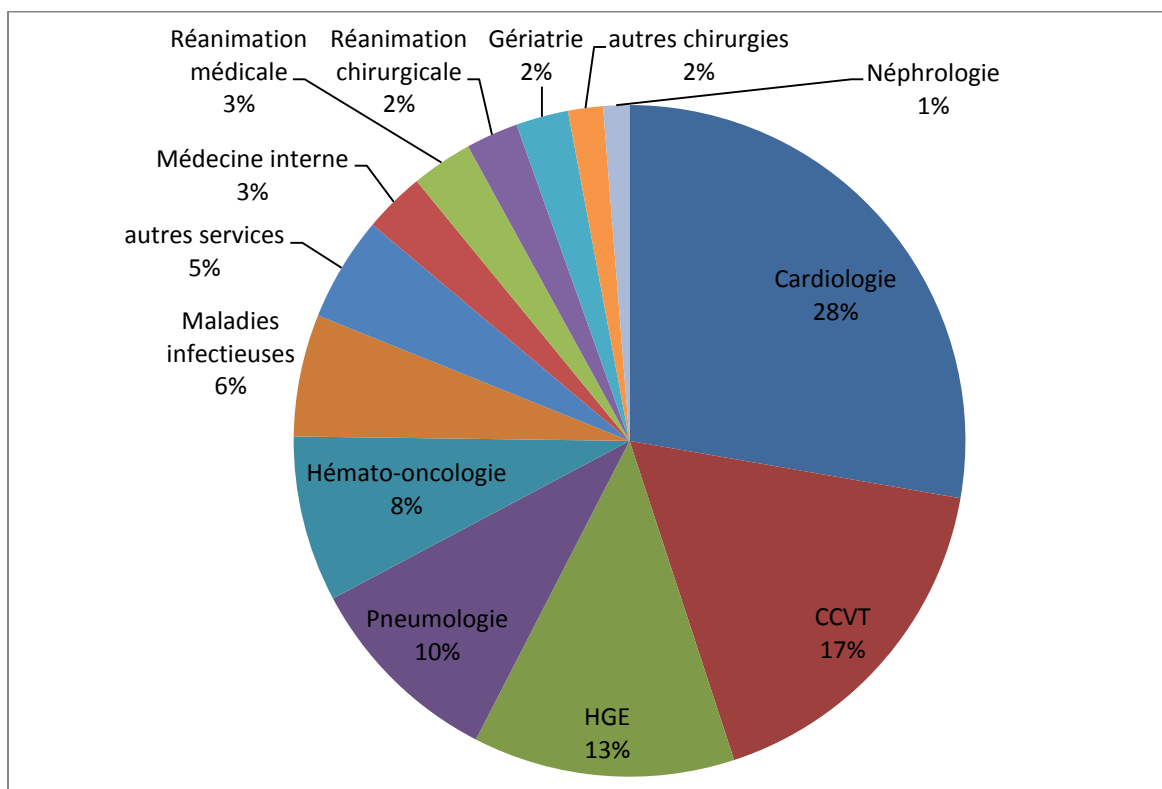
- les départements de cardiologie avec 66 prescriptions (53 en secteurs, 12 en USI et 1 en médecine vasculaire) sur une période de un an et demi soit environ 12 prescriptions par mois
- la chirurgie cardio-vasculaire et thoracique (CCVT) (n = 41)
- puis l'hépatogastroentérologie (HGE) (n = 30)

La pneumologie représente 10 % des prescripteurs (n = 23). Les principaux services à risque de CI représentaient seulement 13 % des prescriptions avec 8 % en hématologie (n = 9), 3 % en réanimation médicale (n = 7) et 2 % en réanimation chirurgicale (n = 6).

Les autres services prescripteurs étaient le service de maladies infectieuses (6 %, n = 14), de médecine interne (3 %, n = 7), la gériatrie (2 %, n = 6), des services de chirurgie (chirurgie digestive, chirurgie générale continue, chirurgie viscérale infantile, et chirurgie orthopédique infantile) (2 %, n = 4) et la néphrologie (1 %, n = 3).

D'autres demandes ponctuelles ont été trouvées dans divers services : la dermatologie (n = 2), les services d'allergologie (n = 7), la consultation ORL (n = 1), l'unité d'assistance nutritionnelle (n = 1).

Les services de consultation représentaient 8 % des demandes.



**Figure 27 : Services prescripteurs de sérologie *Candida* au CHU de Nancy du 01/07/13 au 01/01/2015**

## 2. Compte rendu de l'enquête

### • Réponses au questionnaire

Quatre prescripteurs ont pu répondre à notre questionnaire :

- Un MCU-PH de la CCVT
- Un Praticien Hospitalier d'onco-hématologie
- Un Assistant chef de clinique des maladies infectieuses, un autre d'HGE.

Les réponses aux questions étaient les suivantes :

#### ➤ Dans quelle(s) indication(s) prescrivez-vous une sérologie *Candida* ?

Les sérologies sont prescrites devant une fièvre résistante aux antibiotiques en maladies infectieuses.

Elles sont prescrites dans les services les plus demandeurs (cardiologie, CCVT et HGE) en systématique dans le cadre de pré-greffe. Elles peuvent occasionnellement être aussi prescrites en postgreffe lors d'une fièvre d'origine inexplicée.

En onco-hématologie, les rares sérologies prescrites ne concernaient pas des patients ayant bénéficié de greffe de moelle osseuse mais avaient été demandées dans un contexte oncologique lors d'un prélèvement invasif impossible. Une sérologie avait été indiquée récemment pour une candidose hépatosplénique.

#### ➤ Quelles informations souhaitez-vous recueillir lorsque vous prescrivez une sérologie *Candida* ?

- Mise en évidence d'une colonisation (3 réponses/4)
- Diagnostic précoce pour mettre en route un traitement préemptif (2/4)
- Diagnostic de certitude d'une candidose invasive (1/4)
- Diagnostic d'un épisode à la phase aigüe (1/4)

#### ➤ Quels types de patients ciblez-vous ?

Les patients ciblés sont les immuno-déprimés (3 réponses/4) et les patients d'onco-hématologies (2/4), ces patients sont par ailleurs souvent immunodéprimés.

#### ➤ Souhaitez-vous une recherche Ag et/ou Ac ?

Une recherche d'Ac et d'Ag est demandée dans tous les cas (4/4 réponses).

➤ **A quelle fréquence réalisez-vous les prélèvements sanguins ?**

Les sérologies sont demandées une seule fois (4 réponses/4).

➤ **Comment interprétez-vous le résultat d'une sérologie positive ?**

- Colonisation (3/4 réponses)
- Foyer fongique profond (3/4)
- Infection aiguë (2/4)

➤ **Quelle stratégie adoptez-vous lors d'une sérologie négative ?**

- Arrêt de la surveillance microbiologique (1 réponse/4)
- Poursuite d'une surveillance microbiologique (2/4)
- Prescription d'une nouvelle sérologie (1/4)
- Arrêt de prescription des sérologies (1/4)

➤ **Quelle conduite adoptez-vous lors d'une sérologie positive ?**

- Introduction d'un traitement pré-emptif (3 réponses /4)
- Réalisation d'une surveillance microbiologique (2/4)

➤ **Prescrivez-vous d'autres examens associés à la sérologie ?**

- Hémocultures (3 réponses/4)
- $\beta$ -D glucanes (3/4)

• **Entretien avec les cliniciens**

Nous avons cherché à savoir pourquoi autant de demandes avaient été retrouvées en pneumologie puisque ce service figure en troisième position. Après contact avec le prescripteur les différentes étiologies étaient :

- une aggravation dans un contexte de pneumopathie infiltrante diffuse chez une patiente éligible à une greffe pulmonaire
- une dégradation respiratoire chez une patiente atteinte de sarcoïdose.

Nous nous sommes également rendus dans les principaux services à risque de CI, même si ceux-ci finalement correspondaient seulement à quelques cas de prescriptions : les services d'onco-hématologie pédiatrique et de réanimation.

Un MCU-PH de la réanimation Picard des hôpitaux de Brabois, nous a confirmé que les sérologies *Candida* n'étaient pas réalisées en pratique dans les services de réanimation du

CHU de Nancy et que ces sérologies avaient probablement été demandées par erreur. La cartographie mycologique est habituellement prescrite lors d'une suspicion d'infection invasive fongique chez un patient présentant des facteurs de risque seulement pour apprécier le degré de colonisation en réalisant des prélèvements de plusieurs sites périphériques.

En hématologie (service adulte) nous n'avons trouvé aucune personne qui avait déjà prescrit cette sérologie. Nous avons été surpris que certains cliniciens ignorent la réalisation de cette analyse au sein de notre laboratoire. Dans ce service, devant une fièvre inexplicée seulement des hémocultures sont prélevées. Chez ces patients à risque et immunodéprimés des prélèvements mycologiques périphériques au niveau de la bouche, du nez et de la gorge permettent de dépister les portages fongiques et des recherches d'Ag aspergillaires sont réalisées régulièrement pour suivre ces patients. Dans le service d'onco-hématologie pédiatrique un seul médecin avait déjà demandé qu'exceptionnellement un sérodiagnostic *Candida* dans un contexte oncologie plutôt qu'hématologique.

Les autres services où nous avons enquêté étaient les maladies infectieuses et la néphrologie. Dans ce dernier service, la sérologie *Candida* ne figure pas dans les bilans pré-greffe dans le protocole de transplantation rénale. Par contre des flacons d'hémocultures spécifiques pour la mycologie sont prélevés chez le donneur et le liquide de conservation de greffon est également mis en culture avec une recherche mycologique.

Dans ces différents services visités tous les internes questionnés n'avaient jamais prescrit cette analyse.

#### **IV. Discussion**

Cette étude nous a permis de constater que la sérologie *Candida* au CHU de Nancy était très peu connue des prescripteurs, ce qui explique le faible nombre de questionnaires remplis.

Elles ne sont que rarement prescrites dans les principaux services à risque, et les cliniciens rencontrés avouent les demander qu'à titre exceptionnel, du fait probablement d'une méconnaissance de son utilité dans les CI. Elle était le plus souvent demandée dans le but d'un diagnostic précoce afin de débiter rapidement un traitement préemptif. En 2014, 60 épisodes de candidémie ont été diagnostiqués au laboratoire, ce qui n'est pas négligeable. Il serait donc intéressant de réaliser des interventions au sein des différents services afin de proposer des rappels sur ces infections et de présenter les résultats de nos travaux par exemple, pour bénéficier d'un autre marqueur chez les patients à risque. Hormis de rares cas,



la sérologie n'est prescrite qu'une seule fois. D'ailleurs les 4 cliniciens rencontrés ont répondu ne l'avoir demandée qu'une seule fois. Or il est plus adapté de réaliser un suivi régulier afin de suivre la cinétique des sérologies lors d'une suspicion d'infection invasive à *Candida*.

Plus de la moitié des prescriptions sont réalisées dans le bilan prégreffe afin de mettre en évidence une colonisation éventuelle seulement pour les transplantations cardiaques et hépatiques au CHU de Nancy.

La colonisation préalable au niveau digestif est en effet une situation à risque dans tous les types de transplantation, il s'agit également d'une porte d'entrée fréquente d'infections fongiques systémiques chez les greffés hépatiques, liée aux soins d'urgence et de réanimation dans la transplantation hépatique (171). De plus, si la recherche d'Ac est négative avant l'induction d'une immunodépression, les résultats des sérologies ultérieures seront plus faciles à interpréter.

La greffe de moelle osseuse et la greffe hépatique sont les transplantations les plus à risque (171), toutefois au CHU les sérologies *Candida* ne figurent pas dans le protocole des allogreffes.

L'immunosuppression thérapeutique pour prévenir le rejet du greffon par l'hôte est un facteur de risque incontournable.

L'incidence des candidémies ou des CI est en augmentation régulière au cours de greffe de moelle osseuse ou en cas de transplantation d'organes solides (171). En transplantation d'organe, les candidoses restent le plus souvent localisées (bouche, tube digestif, appareil urinaire), mais elles peuvent aussi être responsables d'infections disséminées très graves en post-greffe. Ce sont les infections fongiques les plus fréquentes en post-greffe hépatique associées à une mortalité importante (172). En transplantation rénale, l'infection à *Candida* peut compromettre l'anastomose vasculaire et imposer une détransplantation.

La souche de *Candida* peut provenir soit du receveur, par contamination endogène lors de la transplantation, soit du donneur, par contamination du greffon lors des étapes de prélèvement, de conservation ou de transport. Les situations de prélèvements d'organe à risque septique élevé sont les prélèvements multi-organes, les prélèvements chez les donneurs ayant séjourné plus de 7 jours en soins intensifs et chez les donneurs en arrêt cardiaque.

L'Agence de la biomédecine propose ainsi des recommandations sur l'analyse des liquides de conservation d'organe. Elle requiert une analyse systématique :

- par culture bactériologique et mycologique avec un prélèvement du liquide réalisé au bloc opératoire,

- un dépistage infectieux systématique du donneur, avec des prélèvements de sang et d'urine à la recherche d'agents bactériens et fongiques,
- un prélèvement profond pulmonaire en cas de prélèvement de greffon pulmonaire
- et le signalement et le prélèvement pour cultures de toute brèche digestive chez le donneur, au moment de l'incision, afin qu'un traitement prophylactique puisse être instauré au receveur (173).

**PARTIE III :**

**PLACE DU SERODIAGNOSTIC**

**DANS LES CANDIDOSES**

**INVASIVES**

## I. Contexte scientifique

Le diagnostic des infections fongiques invasives à *Candida* est particulièrement complexe du fait de la faible spécificité des signes cliniques et biologiques qui ne permettent pas de faire la différence entre un syndrome infectieux d'origine fongique ou bactérien (17). Ces infections sont le plus souvent évoquées devant une simple fièvre résistante à une antibiothérapie à large spectre (174).

D'après les critères consensuels de diagnostic de mycoses invasives du groupe de travail international de l'EORTC pour les patients d'onco-hématologie, la mise en évidence d'une levure du genre *Candida* dans un site normalement stérile ou une hémoculture positive signe le diagnostic de CI (82).

Le diagnostic des CI nécessite souvent des prélèvements profonds et invasifs (62), tels que les biopsies, qui ne sont pas toujours possibles chez les patients fragilisés. Les hémocultures constituent le « gold standard ». Même si une seule hémoculture positive suffit à poser le diagnostic, cet examen manque encore de sensibilité pour ce type d'infection (seulement 50 à 75 %) (3), en dépit des améliorations techniques (utilisation d'automate, milieu spécifique de culture fongique). De plus, toutes les CI ne se traduisent pas toujours par une candidémie (péritonites, candidoses hépatospléniques) et cet épisode se manifeste souvent trop tardivement.

Par ailleurs, le délai de positivité de cet examen reste important, les hémocultures mettent en moyenne deux à trois jours avant de se positiver (8,81). Ceci a pour conséquence de retarder l'initiation du traitement, ce qui est associé à une mortalité hospitalière élevée (161).

Ces difficultés diagnostiques expliquent l'intérêt porté aux examens qui ne sont pas basés sur l'isolement du champignon. Ainsi pour tenter d'améliorer le diagnostic des candidoses systémiques, plusieurs approches ont été proposées ces dernières années dans un but de diagnostic précoce afin de débiter rapidement un traitement antifongique :

- La détection de marqueurs biologiques sériques : Ac totaux (8), Ac IgG IgM ou IgA (175), Ag Mn (7) et  $\beta$ -DG (121) un constituant majeur des parois cellulaires fongiques mais celui-ci n'est pas spécifique des infections candidosiques (121).
- Plus récemment la détection d'ADN de *Candida* par amplification génique (108), cette dernière n'est toutefois pas encore adaptée à l'activité de routine.
- La détermination de l'index de colonisation chez les patients de réanimation (51).

Les sérologies *Candida* font partie des recommandations diagnostiques européennes de 2012 ESCMID (3). Elles préconisent comme procédure alternative aux hémocultures la détection combinée de l'Ag Mn et de l'Ac anti-Mn dans le sérum (Platelia® *Candida* Antigen Plus and Antibody Plus, Bio-Rad) pour anticiper le diagnostic des candidémies.

Le terme de sérodiagnostic fongique regroupe en plus du diagnostic indirect (recherche d'Ac), un diagnostic direct par la détection d'Ag *Candida* dans le sang des patients.

- **Sérodiagnostic fongique indirect**

Plusieurs techniques pour rechercher les Ac anti-*Candida* dans les laboratoires de mycologie existent (tableau 19) et se répartissent en techniques de dépistage ou de confirmation. La plupart de ces techniques sont dites « maison » et possèdent des critères d'interprétation propres à chaque laboratoire. Ces techniques fastidieuses sont progressivement supplantées par des techniques commercialisées de type ELISA permettant une meilleure standardisation des résultats entre les différents laboratoires. Même si ceux-ci nécessitent plusieurs heures de manipulation, ces kits possèdent l'avantage de pouvoir traiter des séries importantes et peuvent être adaptables à des automates pour certains. De plus, la lecture est automatisée permettant de s'affranchir des variations opérateur-dépendantes.

En raison du caractère commensal des levures du genre *Candida*, il est recommandé d'associer au moins deux techniques (174).

- **Sérodiagnostic fongique direct**

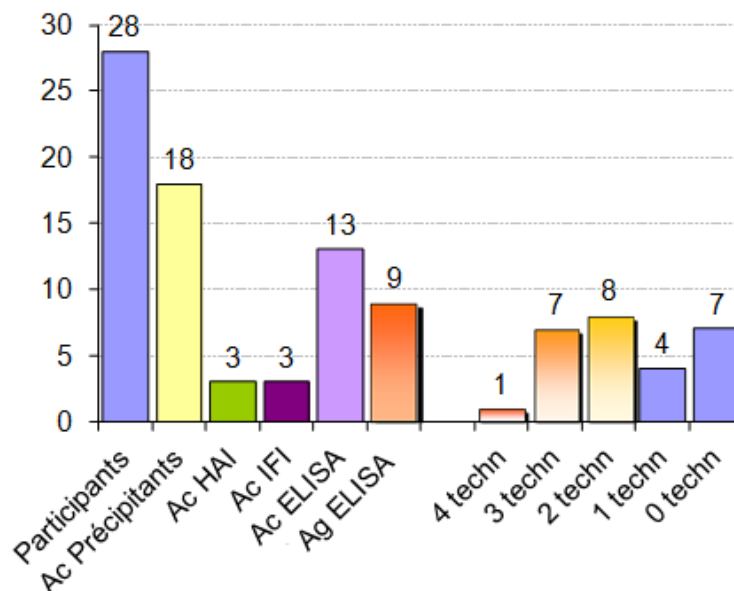
Ces méthodes relativement récentes sont basées essentiellement sur l'utilisation de kits commercialisés qui reposent sur une agglutination au latex ou un test ELISA. Elles détectent les Mn circulants, molécules émises lors du renouvellement de la paroi fongique, grâce à des Ac monoclonaux.

D'après l'enquête réalisée par l'ANOFEL en 2012 dans laquelle 28 laboratoires hospitaliers de mycologie ont participé, 21 laboratoires recherchent les Ac anti-*Candida* avec des techniques de dépistage et éventuellement de confirmation. Les techniques d'immunoprécipitation restent encore les plus utilisées suivies par les tests ELISA. Seulement 9 laboratoires pratiquent la recherche des Ag Mn (figure 28).

Actuellement au laboratoire la recherche des Ac totaux anti-Mn et des Ag Mn est réalisée en série une fois par semaine par technique ELISA.

**Tableau 19 : Principales caractéristiques des différentes techniques utilisées pour la recherche des Ac *Candida* (174)**

<i>Technique</i>	<i>Utilisation</i>	<i>Type d'Ag utilisé</i>	<i>Détection</i>	<i>Résultats</i>
<b>IFI</b>	Dépistage	Figuré (structure du champignon préservée)	Lecture visuelle de la fluorescence (microscope)	Semi-quantitatifs (rendus en taux de dilution)
<b>Hémagglutination indirecte</b>	Dépistage	Soluble (broyat de champignon et/ou surnageant de culture)	Lecture visuelle de l'agglutination	Semi-quantitatifs (rendus en taux de dilution)
<b>ELISA</b>	Dépistage	Soluble	Lecture automatique de l'absorbance	Qualitatifs (négatif/positif) Quantitatifs (index, unités arbitraires)
<b>Electrosynérèse</b>	Dépistage	Soluble	Lecture visuelle des arcs de précipitation	Comparaison possible du nombre d'arcs pour différents prélèvements d'un patient
<b>Coelctrosynérèse</b>	Confirmation			Qualitatifs
<b>Immuno-Electrophorèse</b>	Dépistage	Soluble	Lecture visuelle	Détermination du nombre d'arcs
	Confirmation			



**Figure 28 : Résultats de l'enquête ANOFEL sur les sérologies *Candida* dans les CHU de français (données personnelles)**

## II. Objet de l'étude

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'immunodiagnostic *Candida* (recherche d'Ag et d'Ac) comme méthode de diagnostic dans les infections invasives à *Candida*.

Dans un premier temps l'intérêt de la recherche combinée de l'Ag Mn de *Candida* et des Ac totaux anti-Mn par technique ELISA PLATELIA<sup>®</sup> (Bio-Rad, France) actuellement utilisée au CHU de Nancy en routine dans le diagnostic des candidoses systémiques a été évalué en terme de précocité par rapport aux hémocultures. De plus les données obtenues ont été comparées à celles trouvées avec un autre fournisseur SERION ELISA<sup>®</sup> (Virion, Allemagne).

## III. Matériels et méthodes

### 1. Patients

Cette étude rétrospective a été réalisée sur des sérums de patients ayant eu au moins une hémoculture positive à *Candida*, donc présentant une CI prouvée. Tous les patients hospitalisés au CHU de Nancy ayant présenté un épisode de candidémie entre le 01 janvier 2012 et le 30 janvier 2015 diagnostiqué au laboratoire de parasitologie-mycologie quel que soit leur service d'hospitalisation, ont été retenus. Ces patients devaient aussi posséder au moins un sérum prélevé aux alentours de la date de prélèvement de la première hémoculture positive, conservé dans la sérothèque de la plateforme d'immunoanalyse du CHU de Brabois à - 20°C pendant 18 mois afin de réaliser les sérologies. Une large période de sélection autour de l'épisode de candidémie a été établie, entre 20 jours avant la date de prélèvement de la première hémoculture positive et 24 jours après en fonction des différents sérums disponibles dans la sérothèque. L'extraction de ces données biologiques a été effectuée par le logiciel informatique du laboratoire.

Toutes les souches de *Candida* avaient été isolées à partir des flacons hémocultures bactériens aérobies et anaérobies (Bactec Plus Aerobic/F<sup>®</sup> et Bactec Plus Anaerobic/F<sup>®</sup>). Au CHU de Nancy les flacons sont incubés dans un automate Bactec<sup>®</sup> (Becton-Dickinson) 5 jours ou 21 jours si une recherche mycologique est précisée. Aucun flacon Mycosis<sup>®</sup> n'a été prélevé. Les flacons d'hémocultures spécialement formulés pour l'isolement des champignons dans le sang ne sont pas utilisés en pratique courante et sont réservés seulement à des protocoles particuliers dans le cadre de dons d'organes.

Ont été exclus de l'analyse les patients avec des souches d'hémocultures non identifiées comme appartenant au genre *Candida*, les patients non hospitalisés au CHU ou ne possédant pas de sérums dans la sérothèque pendant la période définie.

Afin de mieux connaître la population concernée par ces épisodes de candidémie, différents paramètres démographiques ont été recueillis : âge, sexe et service d'hospitalisation au moment du diagnostic.

Plusieurs données mycologiques ont été détaillées dans le cadre de cette étude :

- Date de la première hémoculture positive ;
- Nombre et date des autres hémocultures prélevées (négatives ou positives) ;
- Délai de positivité des hémocultures ;
- Espèce identifiée ;
- Sensibilité *in vitro* aux différents antifongiques testés au laboratoire ;
- Résultats des cultures des autres prélèvements mycologiques réalisés ;
- Résultats de la cartographie (si réalisée) ;
- Résultat des sérologies *Candida* (si déjà réalisées).

Différents facteurs de risque ont été recherchés pour les patients de cette étude :

- Présence d'une neutropénie ou lymphopénie ;
- Présence de cathéters centraux ou de chambre implantable ;
- Pathologies sous-jacentes (pathologies hématologiques, VIH, insuffisance rénale ...) ;
- Transplantation d'organes ou traitement immunosuppresseur en cours ;
- Administration d'antibiotiques à large spectre dans les jours précédents l'épisode de candidémie.

Plusieurs paramètres biologiques ont pu être trouvés par le système informatique du laboratoire :

- Valeurs des globules blancs, des PNN et des lymphocytes ;
- Présence d'une insuffisance rénale (urée, créatinine, CKD épi, MDRD) ;
- Présence d'une insuffisance hépatique (ASAL, ALAT) ;
- Renseignements sur les traitements en cours grâce aux résultats des dosages médicamenteux (antibiotiques, immunosuppresseurs, antirétroviraux).

Certaines données cliniques recueillies étaient renseignées par les cliniciens (présence d'un cathéter...), par les biologistes (diagnostic des pathologies hématologiques), ou ont pu être



extrapolées en fonction des services prescripteurs (dialyse, néphrologie transplantation) ou des analyses biologiques (VIH et taux de lymphocytes CD4 et CD8). Cependant les dossiers cliniques n'ont pas été consultés.

## **2. Méthodes**

Le dosage des Ag Mn et des Ac anti-Mn dans le sérum des patients a été réalisé à l'aide de deux kits commerciaux différents reposant sur le même principe :

- Le kit PLATELIA<sup>®</sup> de Bio-rad actuellement utilisé
- Le kit SERION ELISA<sup>®</sup> de Virion

### **2.1. Détection des Ag Mn par technique ELISA**

#### **2.1.1. PLATELIA<sup>®</sup> *Candida* Ag Plus**

##### **2.1.1.1. Principe du test**

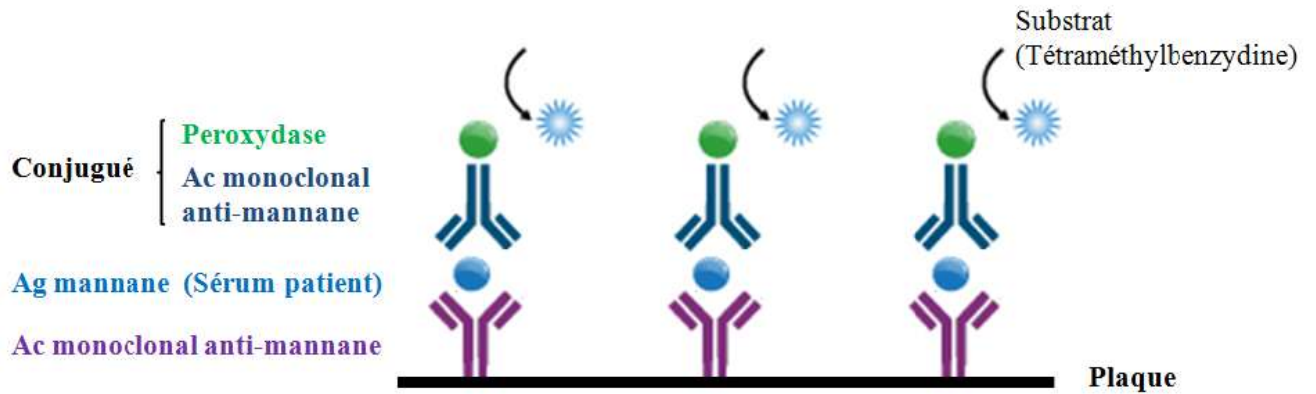
Platelia<sup>®</sup> *Candida* Ag Plus est une technique immuno-enzymatique ELISA de type sandwich, réalisée sur microplaque en une seule étape, permettant la détermination de l'Ag Mn circulant dans le sérum ou le plasma humain, principal constituant de la paroi de levures du genre *Candida*. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un Ac monoclonal de rat EBCA-1 dirigé contre les résidus  $\alpha$  1-5 oligomannosides de *Candida* relargués dans le sang qui permet d'une part de sensibiliser les puits de la microplaque et de lier l'Ag Mn. Un Ac monoclonal secondaire couplé à une enzyme, la peroxydase, révèle d'autre part l'Ag fixé à la microplaque sensibilisée. L'ajout d'un substrat permet le développement d'une coloration dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'Ag présent dans l'échantillon. Celle-ci est mesurée par une méthode spectrophotométrique.

La réalisation de ce test comprend les étapes suivantes (figure 29) :

- Les échantillons de sérum ou plasma sont traités préalablement à la chaleur en présence d'EDTA afin de dissocier les complexes immuns et de précipiter les protéines sériques susceptibles de générer des interférences avec la réaction immuno-enzymatique.
- Les échantillons traités puis le conjugué sont distribués et incubés à 37°C dans les puits de la plaque sensibilisés par l'Ac monoclonal anti-Mn. Des étapes de lavage sont réalisées

après chaque incubation pour éliminer tout matériel non fixé. En présence d'Ag circulant dans l'échantillon, un complexe Ac anti-Mn/Mn/conjugué.

- Les complexes éventuellement formés sont révélés par l'ajout de chromogène contenant le substrat de la peroxydase.
- Après arrêt de la réaction enzymatique à l'aide d'acide sulfurique, la lecture de la densité optique est effectuée avec un spectrophotomètre.



**Figure 29 : Principe du dosage de l'Ag mannane par technique ELISA Sandwich (Platelia<sup>®</sup> Candida Ag Plus)**

### 2.1.1.2. Mode opératoire

- Réactifs

Voir tableau 20

**Tableau 20 : Tableau comparatif des réactifs utilisés pour le dosage des Ag avec les deux techniques**

Réactifs	PLATELIA® <i>Candida</i> Ag Plus	SERION ELISA® antigen <i>Candida</i>
<b>Microplaque</b>	96 puits (12 barrettes de 8 puits) sensibilisés avec l'Ac monoclonal anti-mannane	
<b>Solution de lavage</b> (A diluer)	Tampon Tris-NaCl contenant du Tween®20	
	Contient 2 % de Tween®20	Non précisé
	Concentrée 20 fois à diluer dans de l'eau distillée (50 mL dans 950 mL d'eau distillée)	Concentrée 30 fois à diluer dans de l'eau distillée (2 mL dans 58 mL d'eau distillée)
<b>Contrôle</b> (A traiter)	- 1 Contrôle négatif - 1 Contrôle positif	1 Contrôle négatif
<b>Calibrateurs</b>	5 points de gamme 0 - 62,5 $\dot{R}$ 125 $\dot{R}$ 250 - 500 pg/mL (Mannane purifié de <i>C. albicans</i> dilué dans tampon TRIS-NaCl-tréhalose) (prêts à l'emploi)	1 standard C = 3,20 UA/mL ( <i>C. albicans</i> antigen dans sérum humain supplémenté avec du sérum de veau fœtal) (A traiter)
<b>Solution de traitement des échantillons</b> (prête à l'emploi)	Solution acide d'EDTA	Tampon de dilution Solution acide
<b>Conjugué</b> (prêt à l'emploi)	Ac monoclonal anti-mannane marqué à la peroxydase	
<b>Solution de substrat</b> (prête à l'emploi)	Solution de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Solution d'arrêt</b> (prête à l'emploi)	Solution d'acide sulfurique 1N	Solution d'acide sulfurique 0,5N

- **Traitement des échantillons**

Les échantillons de sérums des patients sont préalablement décongelés à température ambiante, vortexés puis centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes.

Les sérums des patients, le contrôle négatif et le contrôle positif doivent être traités de la même façon :

- Mettre 300  $\mu$ L de chaque échantillon dans des tubes à vis de 1,5 mL
- Ajouter 100  $\mu$ L d'EDTA dans chaque tube
- Vortexer et placer les tubes dans un bloc chauffant à 120°C pendant 6 minutes
- Centrifuger les tubes à 10 000 g pendant 10 minutes afin de former un précipité nuageux blanc
- Le test doit être réalisé rapidement sur le surnageant (dans les 2 heures).

- **Procédure du test**

Le plan de distribution des sérums, contrôles et calibrateurs est établi selon le schéma suivant :

- Puits A1 : Contrôle positif (surnageant du contrôle traité)
- Puits B1 : Calibrateur 500 pg/mL
- Puits C1 : Calibrateur 250 pg/mL
- Puits D1 : Calibrateur 125 pg/mL
- Puits E1 : Calibrateur 62,5 pg/mL
- Puits F1 : Calibrateur 0 pg/mL
- Puits G1 : Contrôle négatif (surnageant du contrôle traité)
- A partir de H1 : sérums des patients traités

Les étapes suivantes sont réalisées de façon manuelle.

- 1- Distribution de 100 µL de surnageant d'échantillon traité et des calibrateurs dans les puits correspondants selon le schéma de la plaque.
- 2- Distribution de 100 µL de solution de conjugué dans chaque puits. La plaque est recouverte d'un film adhésif.
- 3- Incubation de la microplaque dans un incubateur sec pendant 90 min à 37°C.
- 4- Lavage de la plaque 5 fois avec 800 µL de solution de lavage diluée à l'aide d'un laveur automatisé.
- 5- Distribution de 200 µL de solution de chromogène TMB dans chaque puits à l'abri de la lumière.
- 6- Incubation à l'obscurité à +19-25°C pendant 30 minutes.
- 7- Ajout de 100 µL de solution d'arrêt dans chaque cupule.
- 8- Déposer la plaque dans l'automate Quadriga BeFree® (Siemens) un système d'immunoanalyse automatisé avec spectrophotomètre intégré.
- 9- Lecture de la densité optique (DO) de chaque puits à 450 nm (filtre de référence à 620 nm) par le spectrophotomètre.

### **2.1.1.3. Critères de validité**

Pour valider le test, les résultats suivants doivent être obtenus :

- DO du point de gamme 62,5 pg/mL > 0,280
- DO du contrôle négatif < DO du point de gamme 62,5 pg/mL

- Rapport DO du point de gamme 62,5 pg/mL / DO du point de gamme 0 pg/mL > 1,25
- Rapport DO du point de gamme 125 pg/mL / DO du point de gamme 62,5 pg/mL > 1,15
- Rapport DO du point de gamme 250 pg/mL / DO du point de gamme 125 pg/mL > 1,15
- Rapport DO du point de gamme 500 pg/mL / DO du point de gamme 250 pg/mL > 1,20
- La concentration du contrôle positif doit être égale à (**voir flacon**)

#### **2.1.1.4. Détermination de la concentration en Ag Mn (pg/mL) des échantillons testés**

Une courbe d'étalonnage [DO = fonction (concentration en Mn (pg/mL))] est réalisée par le logiciel avec les 5 points de gamme 0 - 62,5 - 125 - 250 - 500 pg/mL. Les concentrations exprimées en pg/mL pour chaque échantillon sont extrapolées à partir de la courbe de calibration. Le domaine de linéarité du test est de 20 à 470 pg/mL.

#### **2.1.1.5. Interprétation des résultats**

Les résultats sont interprétés suivant la concentration C en Mn présente dans l'échantillon :

- **C < 62,5 pg/mL** : Négatif (absence d'Ag Mn)
- **62,5 ≤ C < 125 pg/mL** : Intermédiaire (considéré comme douteux)
- **C ≥ 125 pg/mL** : Positif (présence de l'Ag Mn)

#### **2.1.1.6. Limites d'utilisation**

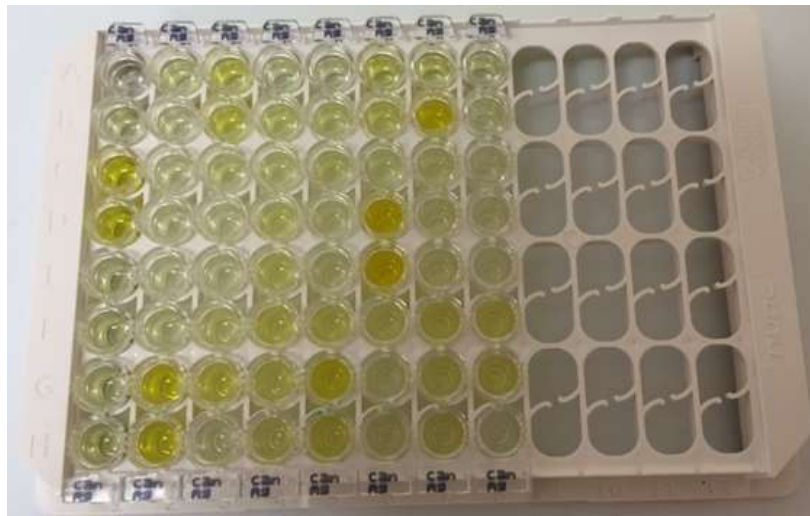
Des réactions faussement positives sont observées lorsque les échantillons contiennent un taux de gammaglobulines humaine > 60 g/L ainsi qu'avec certains échantillons contenant des Ac anti-Toxoplasme.

### **2.1.2. Kit SERION ELISA<sup>®</sup> antigène *Candida***

#### **2.1.2.1. Principe du test**

Cette méthode immunoenzymatique qualitative et quantitative repose sur le même principe que le kit PLATELIA<sup>®</sup> *Candida* Ag Plus. Cependant cette technique est réalisée en deux étapes, le conjugué est ajouté après une incubation préalable des échantillons. Après ajout du

substrat une coloration bleue se développe puis celle-ci devient jaune lorsque la solution d'arrêt est distribuée (figure 30). La nature de l'Ag détecté n'est pas spécifiée.



**Figure 30 : Plaque de microtitration du kit SERION ELISA<sup>®</sup> antigène *Candida* après distribution de la solution d'arrêt.**

#### **2.1.2.2. Mode opératoire**

- **Réactifs**

Voir le tableau 20

A noter que le fabricant ne précise pas quel acide est utilisé dans le tampon de pré-traitement, ni la nature de l'Ac monoclonal utilisé.

De plus ce kit ne fournit pas de contrôle positif. Toutefois il est recommandé dans la notice d'utiliser un contrôle positif SERION ELISA *controls* pour satisfaire aux exigences de gestion de la qualité interne des laboratoires. Par mesure d'économie, aucun contrôle positif n'a été utilisé dans cette étude.

- **Traitement des échantillons**

Les échantillons de sérum des patients sont préalablement décongelés à température ambiante, vortexés puis centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes. Avant d'effectuer le test, les échantillons patients et contrôle négatif doivent être dilués dans une solution acide : 300 µL d'échantillon dans 100 µL de tampon de dilution. Après homogénéisation, les échantillons doivent être chauffés à 110°C pendant 10 minutes puis centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes.

Le sérum standard doit également être traité dans les mêmes conditions contrairement à l'autre kit où les calibrateurs sont prêts à l'emploi.

- **Procédure du test**

Pour ce test les échantillons sont distribués de la façon suivante :

- Puits A1 : Blanc du substrat
- Puits B2 : Contrôle négatif (surnageant du contrôle traité)
- Puits C1 : Sérum standard traité
- Puits D1 : Sérum standard traité
- A partir de E1 : sérums des patients traités

Les étapes suivantes sont réalisées manuellement :

- 1- Distribution de 100  $\mu$ L de surnageant provenant des standards de sérum (en double), le contrôle négatif et les échantillons patients dans les puits appropriés. Laisser un puits pour le blanc du substrat.
- 2- Incubation des échantillons pendant 60 minutes à 37°C dans une chambre humide.
- 3- Lavage de la plaque 5 fois de façon manuelle avec 300  $\mu$ L de solution de lavage préparée.
- 4- Ajout de 100  $\mu$ L de conjugué dans les puits (sauf dans le puits A1).
- 5- Incubation du conjugué pendant 60 minutes à 37°C dans une chambre humide.
- 6- Lavage de la plaque 5 fois de la même façon.
- 7- Ajout de 100  $\mu$ L de solution de substrat TMB à chaque puits y compris le puits A1.
- 8- Incubation du substrat pendant 30 minutes à 37°C dans une chambre humide à l'abri de la lumière.
- 9- Ajout de 100  $\mu$ L de solution d'arrêt à chaque cupule puis agitation douce de la plaque afin de mélanger.
- 10- Lecture de la DO de chaque puits à 450 nm par rapport à un blanc de substrat dans les 60 minutes (longueur de référence entre 620 et 690 nm).

### **2.1.2.3. Critères de validité**

Pour être valide le test doit respecter les critères ci-dessous :

- Le blanc du substrat doit avoir une DO < 0,25.
- Le contrôle négatif doit donner un résultat de test négatif.

- La valeur moyenne des DO du sérum standard (après soustraction du blanc du substrat) doit être comprise entre 0,57 et 1,80.
- La variation des valeurs de DO du standard ne doit pas dépasser 20 %.

#### 2.1.2.4. Détermination de la concentration en Ag (UA/mL) des échantillons testés

Les valeurs de DO mesurées pour les échantillons des patients doivent être multipliées par un facteur de correction F afin de compenser les variations entre les tests. Cette étape permet d'ajuster le niveau réel du test de l'utilisateur avec la courbe de référence spécifique pour chaque lot fournie dans le kit.

$F = \text{Valeur de référence de DO (standard)} / \text{Valeur réelle de DO (standard)}$

[Valeur de référence DO (standard) = 1,13 UA/mL]

Les concentrations d'Ag exprimées en UA/mL sont déterminées à partir de la formule suivante (modèle logistique logarithmique à 4 paramètres donnés pour chaque lot) :

$$C = \text{Exp} [ 2,803 - \text{Ln} (5,904 / (\text{DO}(\text{Patient}) \times F \times 1,13 / (\text{DO}(\text{STD}) - 0,198) - 1) / 1,021 ]$$

Après saisie des quatre paramètres et de la valeur de référence du sérum standard, les concentrations des Ag sont calculées par le logiciel d'évaluation SERION *evaluate* délivré par le fournisseur.

Le domaine de linéarité du test pour le lot testé est de 0,7 à 50 UA/mL.

#### 2.1.2.5. Interprétation des résultats

Les résultats peuvent être interprétés en fonction des limites de la fourchette mentionnées sur le certificat de contrôle du test pour chaque lot :

- **C < 1,4 UA/mL**: Négatif
- **C > 2,6 UA/mL**: Positif

Des résultats négatifs n'excluent pas une infection aiguë. L'Ag peut-être masqué par les Ac anti-*Candida*, le processus de dénaturation au cours de la préparation de l'échantillon peut ne pas être suffisant pour permettre la détection de l'Ag.



## 2.2. Détection des Ac anti-Mn par technique ELISA

### 2.2.1. Kit PLATELIA<sup>®</sup> *Candida* Ab Plus

#### 2.2.1.1. Principe du test

Cette technique immuno-enzymatique ELISA indirecte, réalisée en deux étapes, sur microplaque permet de mettre en évidence les Ac anti-Mn présents dans le sérum des patients. Les puits de la microplaque sont sensibilisés avec du Mn purifié à partir de *C. albicans*. Les échantillons sont d'abord distribués dans les cupules puis incubés puis lavés. Le conjugué qui est un Ac polyclonal de chèvre anti-IgG/IgA/IgM humaines marqué par une peroxydase est ensuite ajouté. Après incubation, en présence d'Ac anti-Mn dans le sérum du patient un complexe Mn / Ig humaine anti-Mn / conjugué se forme, celui-ci est révélé grâce à l'addition de chromogène contenant le substrat de la peroxydase (figure 31).

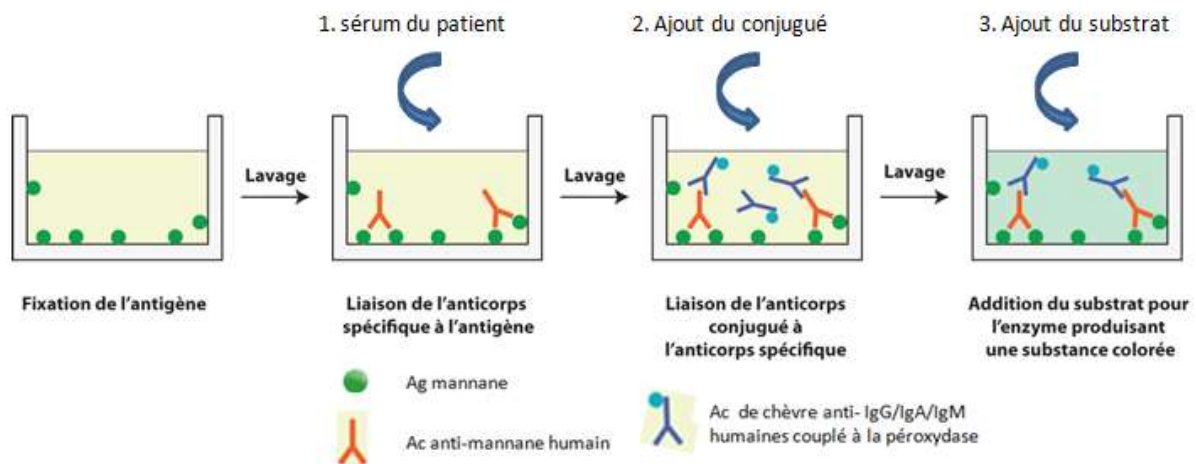


Figure 31 : Principe du test ELISA indirect

#### 2.2.1.2. Mode opératoire

- Réactifs

Voir tableau 21

**Tableau 21 : Tableau comparatif des réactifs utilisés pour le dosage des Ac avec les deux techniques**

Réactifs	PLATELIA® <i>Candida</i> Ab Plus	SERION ELISA® Ab <i>Candida</i>
<b>Microplaque</b>	96 puits (12 barrettes de 8 puits) sensibilisées par un Ag spécifique	
	Mannane purifié à partir de <i>C. albicans</i>	Non précisé
<b>Solution de lavage</b> (A diluer)	Tampon Tris-NaCl (pH = 7,4)	
	Contient 2 % Tween®20	Contient du Tween®20 et 30
	Concentrée 20 fois à diluer dans de l'eau distillée (50 mL dans 950 mL d'eau distillée)	Concentrée 30 fois à diluer dans de l'eau distillée (1,5 mL dans 43,5 mL d'eau distillée)
<b>Contrôle</b> (prêt à l'emploi)	Pas de contrôles	1 Contrôle négatif (A traiter)
<b>Tampon de dilution</b> (prête à l'emploi)	Tampon tris-NaCl (0,1% Tween®20) <b>Diluant 1 :</b> + Rouge de phénol <b>Diluant 2 :</b> + Bleu de bromothymol	Protéine contenant du tampon phosphate avec du tween®20
<b>Conjugué</b> (prêt à l'emploi)	Ac polyclonal de chèvre anti-Ig humaine marqué à la peroxydase	Ac anti-IgG humain conjugué avec la phosphatase alcalise
<b>Solution de substrat</b> (prête à l'emploi)	Solution de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) (<0,1%) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (<1%)	P-nitrophénylphosphate Ne contient pas de tampon
<b>Calibrateurs</b> (prêts à l'emploi)	5 points de gamme 0 - 5 - 10 - 20 - 80 UA/mL (Sérum humain contenant des Ig anti-Mn dilué dans tampon TRIS-NaCl)	1 standard C = 3,20 UA/mL (protéine sérique humaine contenant du tampon phosphate)
<b>Solution d'arrêt</b> (prête à l'emploi)	Solution d'acide sulfurique 1N	Hydroxyde de sodium 1,2N

- **Préparation des échantillons**

Les échantillons de sérum des patients sont préalablement décongelés à température ambiante, vortexés puis centrifugés.

Les sérums des patients sont pré-dilués extemporanément au 1/20 (10 µL de sérum dans 190 µL de diluant 1).

- **Procédure du test**

Les étapes suivantes sont réalisées par l'automate Quadriga BeFree<sup>®</sup>.

- 1- Distribution de 200 µL des calibrateurs dans les puits selon le schéma suivant :
  - Puits A1 : Calibrateur 0 UA/mL
  - Puits B1 : Calibrateur 5 UA/mL
  - Puits C1 : Calibrateur 10 UA/mL
  - Puits D1 : Calibrateur 20 UA/mL
  - Puits E1 : Calibrateur 80 UA/mL
- 2- Distribution de 190 µL de diluant 2 dans les cupules destinées à recevoir les échantillons des patients à partir du puits F1 : sérums des patients dilués
- 3- Distribution de 10 µL des échantillons prédilués au 1/20.
- 4- Incubation de la microplaque dans un incubateur sec pendant 60 min à 37°C.
- 5- Lavage de la plaque 4 fois avec 800 µL de solution de lavage diluée à l'aide d'un laveur automatisé intégré au système.
- 6- Distribution de 200 µL de solution de conjugué dans chaque puits.
- 7- Incubation de la microplaque dans un incubateur sec pendant 60 min à 37°C.
- 8- Lavage de la plaque 5 fois avec 800 µL de solution de lavage diluée.
- 9- Distribution de 200 µL de solution de chromogène TMB dans chaque puits à l'abri de la lumière.
- 10- Incubation à l'obscurité à température ambiante (+19-30°C) pendant 30 minutes.
- 11- Ajout de 100 µL de solution d'arrêt dans chaque cupule.
- 12- Lecture de la DO de chaque cupule à 450 nm (filtre de référence à 620 nm) grâce au spectrophotomètre intégré.

### **2.2.1.3. Critères de validité**

Pour valider le test, les résultats suivants doivent être obtenus :

- DO du calibrateur 5 UA/mL > 0,160
- Rapport DO du calibrateur 5 UA/mL / DO du calibrateur 0 UA/mL > 6
- Rapport DO du calibrateur 10 UA/mL / DO du calibrateur 5 UA/mL > 1,20
- Rapport DO du calibrateur 20 UA/mL / DO du calibrateur 10 UA/mL > 1,20
- Rapport DO du calibrateur 80 UA/mL / DO du calibrateur 20 UA/mL > 1,20

#### **2.2.1.4. Détermination de la concentration en Ac anti-Mn (UA/mL) des échantillons testés**

Une courbe d'étalonnage [DO = fonction (concentration en Ac anti-Mn (UA/mL))] est réalisée par le logiciel avec les 5 points de gamme 0 - 5 - 10 - 20 et 80 UA/mL. Les concentrations en Ac anti-Mn exprimées en UA/mL pour chaque échantillon sont extrapolées à partir de la courbe de calibration.

Le domaine de linéarité du test est de 2 à 78 UA/mL.

#### **2.2.1.5. Interprétation des résultats**

Les résultats sont interprétés suivant la concentration C en Ac anti-Mn présente dans l'échantillon:

- $C < 5$  UA/mL : Négatif (absence d'Ac anti-Mn)
- $5 \leq C < 10$  UA/mL : Intermédiaire (considéré comme douteux)
- $C \geq 10$  UA/mL : Positif (présence d'Ac anti-Mn)

#### **2.2.1.6. Limites d'utilisation**

L'interprétation des résultats est difficile chez les sujets avec une altération du système immunitaire.

### **2.2.2. Kit SERION ELISA *classic*<sup>®</sup> *Candida albicans* IgG**

#### **2.2.2.1. Principe du test**

Ce test qualitatif et quantitatif est également basé sur une méthode immunoenzymatique ELISA indirecte en deux étapes. Cependant la nature de l'enzyme couplée à l'Ac secondaire permettant la révélation du complexe immunitaire diffère. Une phosphatase alcaline permet ainsi la transformation du substrat incolore le p-nitrophénylphosphate en un produit coloré le p-nitrophénol.

Contrairement au PLATELIA<sup>®</sup> *Candida* Ab Plus qui recherche en même temps les Ac anti-Mn de type IgG, IgM ou encore IgA grâce à l'utilisation d'un Ac polyclonal, le kit SERION ELISA *Classic* sépare la détection des Ac selon l'isotype recherché. Le kit testé dans cette étude met seulement en évidence les Ac de type Ig G. Le fournisseur propose également

d'autres kits pour la détection des IgA ou des IgM où seule la nature du conjugué sera différente.

### **2.2.2.2. Mode opératoire**

- **Réactifs**

Voir tableau 21

Le kit ne fournit pas de contrôle positif.

- **Préparation des échantillons**

Avant d'effectuer le test, les échantillons patients doivent être dilués au 1/1000 dans le tampon de dilution selon le procédé ci-dessous :

- 10  $\mu$ L d'échantillon dans 1000  $\mu$ L de tampon de dilution.
- 20  $\mu$ L de la première dilution sont de nouveau dilués dans 180  $\mu$ L de tampon de dilution

Le sérum standard et le sérum de contrôle sont prêts à l'emploi et ne doivent pas être dilués.

- **Procédure du test**

Pour ce test les échantillons sont distribués de la façon suivante :

- Puits A1 : Blanc du substrat
- Puits B2 : Contrôle négatif
- Puits C1 : Sérum standard
- Puits D1 : Sérum standard
- A partir de E1 : Sérums des patients dilués

Les étapes suivantes sont réalisées manuellement :

- 1- Dépôt de 100  $\mu$ L du contrôle négatif, des sérums standards (en double), et des échantillons patients dilués dans les puits appropriés. Laisser un puits pour le blanc du substrat.
- 2- Incubation des échantillons pendant 60 minutes à 37°C dans une chambre humide.
- 3- Lavage de la plaque 4 fois de façon manuelle avec 300  $\mu$ L de solution de lavage préparée.
- 4- Ajout de 100  $\mu$ L de conjugué IgG prêt à l'emploi dans les puits (sauf dans le puits A1).

- 5- Incubation du conjugué pendant 30 minutes à 37°C dans une chambre humide.
- 6- Lavage de la plaque 4 fois de la même façon.
- 7- Ajout de 100 µL de solution de substrat dans chaque puits y compris le puits A1.
- 8- Incubation du substrat pendant 30 minutes à 37°C dans une chambre humide à l'abri de la lumière.
- 9- Ajout de 100 µL de solution d'arrêt à chaque cupule puis agitation douce de la plaque afin de mélanger.
- 10- Lecture de la DO de chaque puits à 405 nm par rapport à un blanc de substrat dans les 60 minutes (longueur de référence entre 620 et 690 nm).

### 2.2.2.3. Critères de validité

Pour être valide le test doit respecter les critères ci-dessous :

- Le blanc du substrat doit avoir une DO < 0,25.
- Le contrôle négatif doit donner un résultat de test négatif.
- La valeur moyenne des DO du sérum standard (après soustraction du blanc du substrat) doit être comprise entre 0,48 et 1,62.
- La variation des valeurs de DO du standard ne doit pas dépasser 20 %.

### 2.2.2.4. Détermination de la concentration en Ac anti-Mn IgG (UA/mL) des échantillons testés

Les valeurs de DO mesurées pour les échantillons des patients doivent être multipliées par un facteur de correction F afin de compenser les variations entre les tests.

$F = \text{Valeur de référence de DO (standard)} / \text{Valeur réelle de DO (standard)}$

[Valeur de référence DO (standard) = 0,95 UA/mL]

Les concentrations d'Ac anti-Mn de type IgG exprimées en UA/ml sont déterminées à partir de la formule suivante (modèle logistique logarithmique à 4 paramètres donnés pour chaque lot) :

$$C = \exp [ 4,797 - \ln( 1,956 / (\text{DO(Patient)} \times F \times 0,95 / \text{DO(STD)} - 0,01) - 1 ) / 1,017 ]$$

Après saisie des quatre paramètres et de la valeur de référence du sérum standard, les concentrations des Ac sont calculées par le logiciel d'évaluation SERION *evaluate* délivré par le fournisseur. Le domaine de linéarité du test pour le lot testé est de 5 à 450 UA/mL.

### **2.2.2.5. Interprétation des résultats**

Les résultats peuvent être interprétés en fonction des limites de la fourchette mentionnées sur le certificat de contrôle du test pour chaque lot :

- **C < 40 UA/mL** : Négatif
- **C > 100 UA/mL** : Positif

Si des titres modérément élevés sont détectés, une plage limite de 40 à 60 UI/mL peut être utilisée.

Les variations des titres en dessous de la limite sont hautement significatives chez les immunodéprimés à cause de la diminution de la réponse humorale ainsi que chez l'enfant à cause de l'immaturation du système immunitaire.

## **IV. Résultats**

### **1. Caractéristiques des candidémies**

#### **1.1. Données épidémiologiques**

##### **1.1.1. Données démographiques**

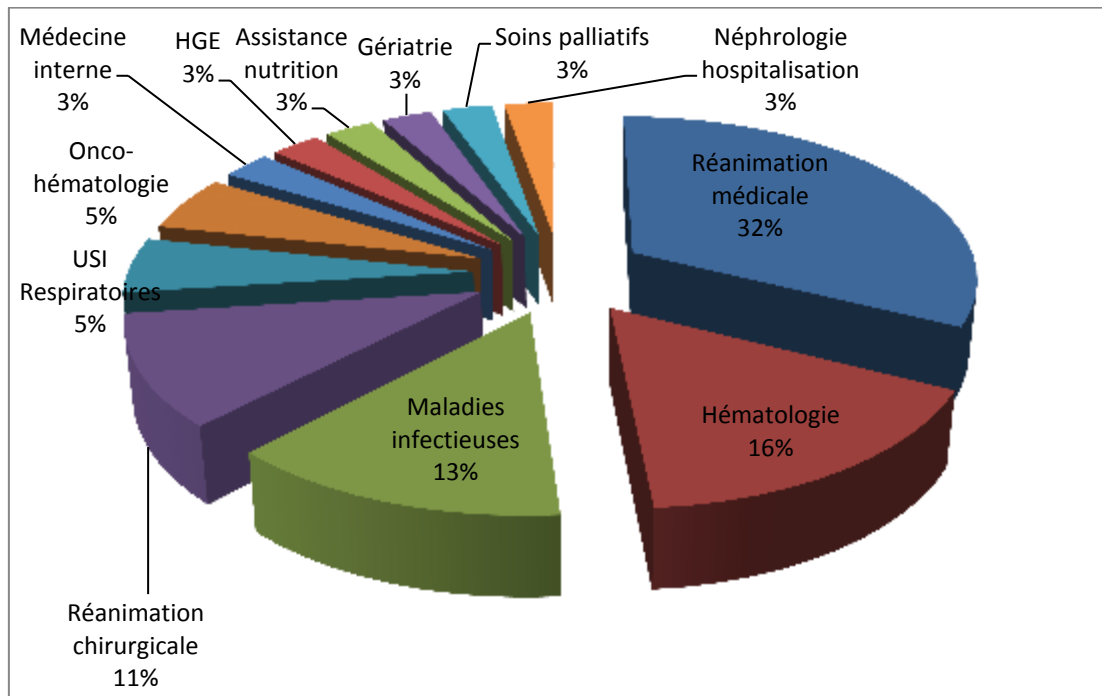
Dans cette étude au total 92 sérums provenant de 39 patients ont été analysés. Les patients sont représentés par 26 hommes et 13 femmes (sexe ratio hommes/femmes = 2). L'âge moyen est de 58 ans, les âges extrêmes sont de 3 et 93 ans. Quarante et un pour cent de la population avaient plus de 65 ans (n = 16). Deux enfants (3 et 10 ans) étaient inclus dans l'étude.

##### **1.1.2. Services d'hospitalisation**

Comme l'illustre la figure 32, certains services sont plus concernés que d'autres pour la survenue d'un épisode de candidémie.

Parmi les patients étudiés, plus de 70 % (n = 31) ont été hospitalisés dans l'un des services suivants : réanimation médicale (32 %, n = 12), hématologie (16%, n = 6) ou onco-hématologie (5 %, n = 2), maladies infectieuses (13 %, n = 5) et réanimation chirurgicale (11 %, n = 4). Les autres patients proviennent des USI respiratoires (5 %, n = 2), de médecine interne (3 %, n = 1), d'HGE (3 %, n = 1), de l'unité assistance nutrition (3 %, n = 1), de gériatrie (3 %, n = 1), des soins palliatifs (3 %, n = 1) et de néphrologie (3 %, n = 1).

Le service pris en compte est le service où le patient est hébergé au moment du diagnostic de la candidémie (première hémoculture positive). Le malade a pu être hospitalisé successivement dans plusieurs de ces services.



**Figure 32 : Répartition des services d'hospitalisation des patients à la date de la première hémoculture positive à *Candida***

### 1.1.3. Facteurs de risque présents

Les principaux facteurs de risque retrouvés pour les patients de notre étude sont présentés dans le tableau 22.

La majorité des patients ont plusieurs facteurs de risques associés. Les patients cumulaient en moyenne 2,87 facteurs de risque (entre 1 et 6 facteurs de risque). Néanmoins certains facteurs sont étroitement associés : hémopathie maligne et neutropénie, lymphopénie et VIH, insuffisance rénale et dialyse, transplantation d'organe et traitement immunosuppresseur ...

Dix patients présentaient une maladie hématologique sous jacente [LAM (n = 1), LAL de type B (n = 3), leucémie lymphoïde chronique (n = 1), Maladie de Hodgkin (n = 1), Leucémie aiguë indifférenciée (n = 1), Lymphome non Hodgkinien à grandes cellules LNHGC (n = 1), lymphome de la zone marginale (n=1), myelosuppression induite par un médicament (n = 1)].

Une lymphopénie a été mise en évidence chez 69,2 % des patients.

Une neutropénie est retrouvée chez 28,2 % des patients, 9 des 10 de patients ayant une hémopathie maligne présentent une neutropénie.



Le port d'une voie veineuse centrale a été rapporté pour 56,4 % des patients. Vingt deux patients avaient un cathéter et seulement deux une chambre implantable de type Port à Cath (PAC) (un patient avait les deux). Trois patients étaient VIH positif avec des taux de lymphocytes CD4 et CD8 bas. Une antibiothérapie récente (au moins deux antibiotiques associés), dans les 14 jours précédents la candidémie a été retrouvée chez 38,5 % des patients. Une candidurie a été retrouvée chez 8 patients (20,5 %).

**Tableau 22 : Présentation des principaux facteurs de risque dans notre population**

Facteurs de risque	N	%
- Lymphopénie	27	69,2
- Voie veineuse centrale	22	56,4
- Antibiothérapie récente	15	38,5
- Neutropénie	11	28,2
- Hémopathie maligne	10	25,6
- Candidurie	8	20,5
- Insuffisance rénale	7	17,9
- Acte chirurgical récent	3	7,7
- Traitement immunosuppresseur	3	7,7
- VIH	3	7,7
- Dialyse	2	5,1
- Insuffisance hépatocellulaire, cirrhose	2	5,1
- Transplantation médullaire	2	5,1
- Transplantation rénale	2	5,1
- Toxicomanie	1	2,6

## 1.2. Données mycologiques

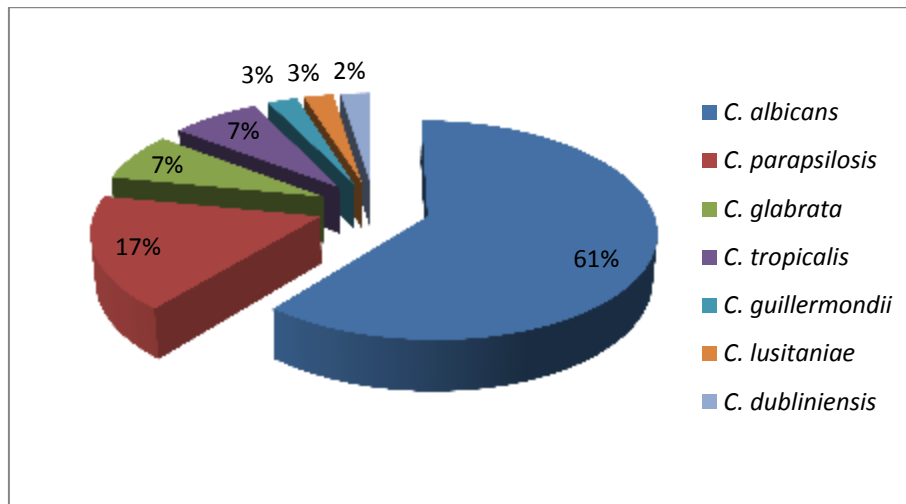
### 1.2.1. Espèces fongiques responsables de la candidémie

Sur l'ensemble des 39 patients inclus dans cette étude *C. albicans* est l'espèce la plus isolée avec une fréquence de 61 % (n = 25) suivie par *C. parapsilosis* (17 %, n = 7), *C. glabrata* (7 %, n = 3), et *C. tropicalis* (7 %, n = 3). *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* et *C. dubliniensis* sont isolés une seule fois chacun (figure 33).

Pour deux patients, deux espèces de *Candida* ont été isolées au cours du même épisode (5 %). Chez un des patients, une seule hémoculture positive à *C. guilliermondii* est retrouvée alors que les 4 autres flacons prélevés sont positifs à *C. parapsilosis*.

Une vraie association de levures (*C. albicans* et *C. glabrata*) est retrouvée dans deux hémocultures différentes chez un autre patient (11 autres flacons sont positifs à *C. glabrata*).

*C. albicans* et *C. tropicalis* ont été isolés chez les deux enfants (10 et 3 ans respectivement). Cinq des patients infectés porteurs de voie veineuse centrale avaient des hémocultures positives à *C. parapsilosis*, dont un avait également un cathéter colonisé par cette espèce et un autre avait à la fois le cathéter et la chambre implantable. Les autres espèces retrouvées sont *C. albicans* (n = 5) et *C. lusitaniae* (n = 1).



**Figure 33 : Répartition des espèces de *Candida* isolées à partir des flacons d'hémoculture**

### 1.2.2. Délai de positivité des hémocultures

Les hémocultures ont nécessité une incubation moyenne de 2,33 jours (médiane = 2) pour se positiver toutes espèces de *Candida* confondues. Ont été exclues du calcul 3 hémocultures contaminées par des bactéries de type *Lactobacillus* sp., *Staphylococcus epidermidis* ou *Enterococcus faecium* faussant le résultat réel du temps de détection de la croissance fongique. Deux hémocultures avec des associations de levures (*C. albicans* et *C. glabrata*) n'ont pas été prises en compte pour l'analyse.

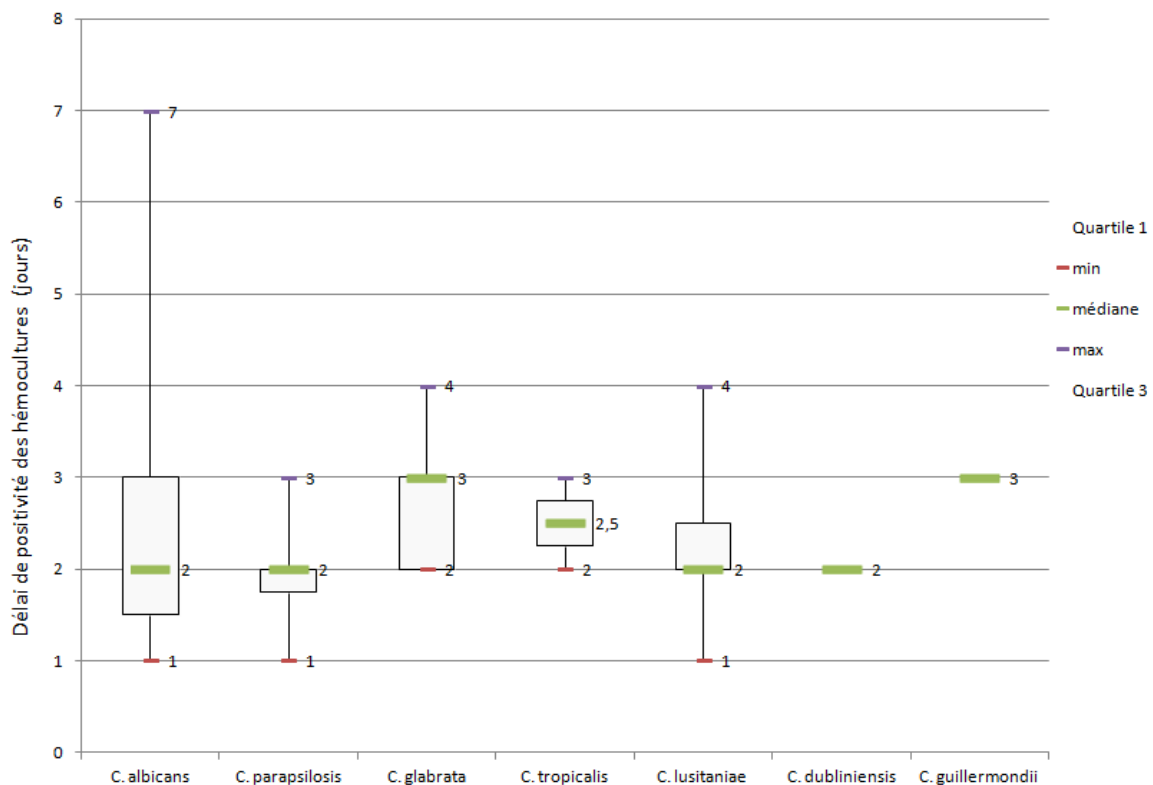
Le délai de positivité moyen était de 2,37 jours pour *C. albicans*, de 1,81 jours pour *C. parapsilosis*, de 2,73 jours pour *C. glabrata*, de 2,5 jours pour *C. tropicalis*, de 2,20 jours pour *C. lusitaniae* et 2 jours pour *C. dubliniensis* (Tableau 23). Une seule hémoculture est sortie positive à *C. guillermondii* après 3 jours d'incubation.

**Tableau 23 : Délai moyen de positivité des hémocultures en jours pour chaque espèce (n = nombre d'hémocultures positives)**

	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. guilliermondii</i>
Moyenne	2,37	1,81	2,73	2,5	2,20	2	3
n	43	16	15	2	7	2	1

Les temps de détection de croissance pour chaque espèce de levures sont représentés dans la figure 34 par un graphique en boîte à moustache.

Le délai d'incubation le plus court était de 1 jour, il a été retrouvé pour les espèces *C. albicans*, *C. parapsilosis* et *C. lusitaniae*. Un délai maximal d'incubation de 7 jours a été retrouvé pour *C. albicans*. Les boîtes n'ont pas pu être réalisées pour *C. dubliniensis* (seulement deux hémocultures positives) et *C. guilliermondii* (une seule valeur), seule la valeur de la médiane est représentée.



**Figure 34 : Délai de détection de croissance des levures dans les hémocultures par espèces de *Candida*.**

### 1.2.3. Nombre et nature des flacons d'hémocultures positifs

Dans cette étude seuls les flacons aérobies ont permis la détection de l'ensemble des levures du genre *Candida* hormis pour *C. glabrata* où des flacons mis en anaérobiose sont sortis positifs. Deux des 3 patients qui ont eu des candidémies à *C. glabrata* avaient seulement le flacon anaérobie positif sur une paire d'hémoculture prélevée. Pour le patient 33 au total *C. glabrata* a été détecté dans 4 flacons anaérobies et 9 flacons aérobies sur une période de 11 jours entre la première et la dernière hémoculture positive. Les temps de détection étaient plus courts en anaérobiose (1,2 ou 3 jours) qu'en aérobiose (3 et 4 jours).

Dans plus de la moitié des cas (57 %, n = 23), un seul flacon était retrouvé positif au cours de l'épisode de candidémie (figure 35). Quelques patients (patient 1, 8, 11, 21 et 38) avaient une seule paire de flacons d'hémoculture prélevée.

Vingt cinq pour cent (n = 10) avaient deux flacons positifs et dans 5 % (n = 3) trois flacons positifs. Dans de rares cas un nombre supérieur de flacons détectait la présence de levures. Ainsi pour le patient 4, 6 flacons aérobies (sur 8 paires prélevées) se sont positivés à *C. parapsilosis* sur une période de 18 jours. De même pour le patient 26 la totalité des flacons aérobies était positive (3 hémocultures prélevées le même jour, 2 flacons 2 jours après et 1 dernier 5 jours plus tard). Un total de 7 flacons sur 12 jours était positif à *C. lusitaniae* pour le patient 28, mais 9 autres flacons aérobies étaient négatifs. Le cathéter retiré à 11 jours après le premier flacon positif était colonisé par la même espèce que celle retrouvée dans le sang.

Hormis les patients 18, 23 et 26 où tous les flacons prélevés étaient retrouvés positifs (6/6, 5/5 et 6/6 respectivement), tous les autres patients (79,5 %, n = 31) avaient au minimum une autre paire d'hémoculture négative prélevée le même jour ou à des dates proches du flacon positif.

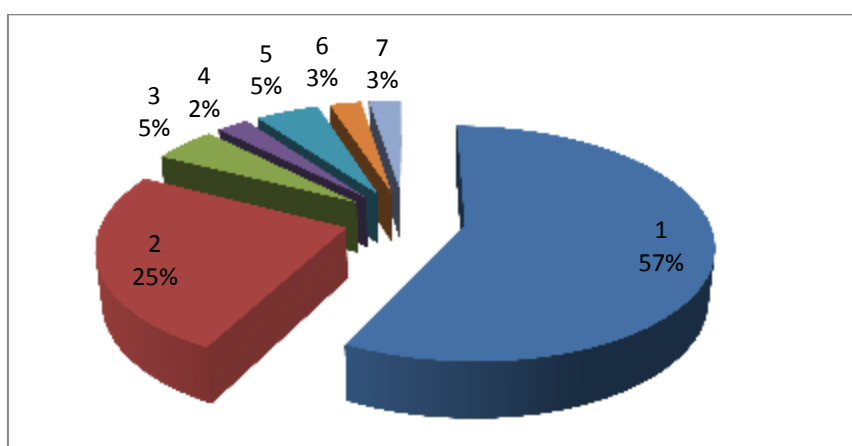


Figure 35 : Nombre de flacons d'hémocultures retrouvés positifs pour les 39 patients

### 1.2.4. Sensibilité aux antifongiques

Au laboratoire du CHU de Nancy, la détermination des sensibilités *in vitro* est réalisée à l'aide d'une microplaque Sensititre YeastOne® (TREK Diagnostic systems) pour les antifongiques suivants : 5-FC, AmB, Voriconazole, Posaconazole, Itraconazole, Fluconazole, Caspofongine, Micafongine et Anidulafongine.

Les résistances retrouvées chez les différentes souches des patients inclus dans l'étude sont exposées dans le tableau 24.

Seule une souche de *C. albicans* est résistante au 5-FC, les autres sont sensibles à tous les antifongiques testés. Les résistances les plus retrouvées sont celles à l'itraconazole et au 5-FC. Des résistances au fluconazole ont été retrouvées pour les souches de *C. glabrata* et *C. lusitaniae*.

**Tableau 24 : Résistances des souches de *Candida* de notre étude aux différents antifongiques testés au laboratoire**

	N	Souches S pour tous les ATF	Souches I/R pour au moins 1 ATF	Résistances rencontrées
<i>C. albicans</i>	25	24	1	5-FC R
<i>C. dubliniensis</i>	1	1		
<i>C. glabrata</i>	3		1 1 1	Itraconazole R, Fluconazole I Itraconazole R, Fluconazole R Itraconazole R
<i>C. guilliermondii</i>	1			Itraconazole R
<i>C. lusitaniae</i>	1			5-FC R, Itraconazole R, Fluconazole R
<i>C. parapsilosis</i>	7	6	1	Itraconazole R
<i>C. tropicalis</i>	3		2 1	5-FC R Itraconazole R

### 1.2.5. Autres tests mycologiques

Sur les 39 patients, seuls 4 ont eu des sérologies demandées. Les résultats sont présentés dans le tableau 25. Toutes les sérologies ont été prescrites après l'épisode de candidémie.

Une cartographie mycologique a été réalisée pour 3 patients. Les seuls prescripteurs sont les services de réanimation (réanimation médicale, USI).

Les sites périphériques habituellement prélevés sont :

- la bouche
- le rectum
- le nez
- le pli axillaire
- le pli inguinal

Un patient n'était pas du tout colonisé, un moyennement et un autre fortement colonisé (tableau 25).

D'autres prélèvements positifs à *Candida* sont aussi retrouvés au niveau de la bouche, gorge et nez pour d'autres patients réalisés dans les services d'Hématologie. Ces prélèvements sont réalisés pour évaluer le portage fongique mais pas forcément pour anticiper une éventuelle candidémie, ils n'ont donc pas été pris en compte dans ces résultats.

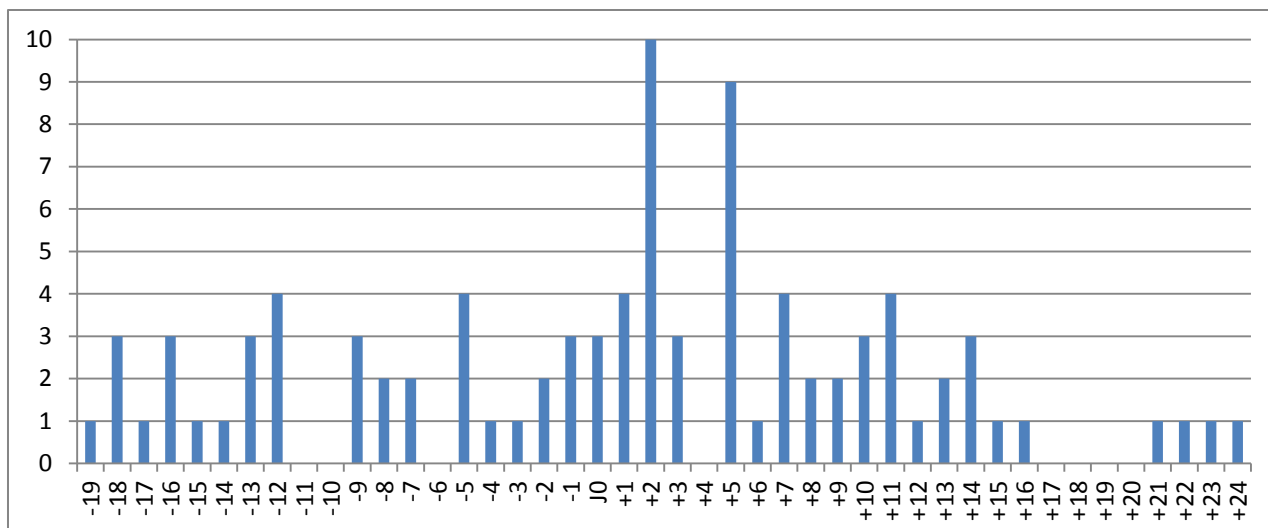
**Tableau 25 : Résultats des sérologies et cartographies *Candida* prescrites**

Age	Sexe	Services prescripteurs	Distance sérologie / Hémoculture positive	Résultat sérologie (Bio-rad)		Nombres d'hémocultures positives
				Ag	Ac	
83	M	USI Respiratoire	+2	-	+	1
46	F	USI Respiratoire	+10	-	+	1
10	M	Onco-hémato	+ 35	-	+	1
79	F	Maladies infectieuses	+3	-	-	6

Age	sexe	Services prescripteurs	Distance Hémoculture positive / cartographie	Nombres de sites colonisés
69	M	Réa med	14 jours avant	0/5
35	F	Réa med	12 jours avant	2/5
			4 jours avant	3/5
64	F	USI	1 jour après	5/5

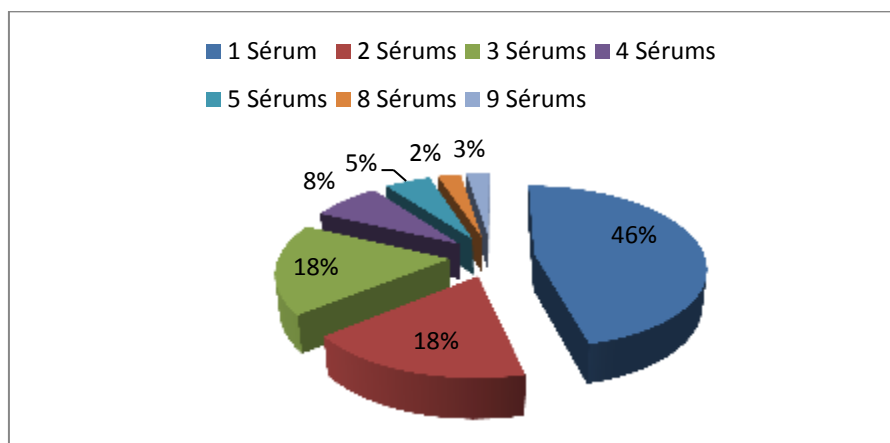
## 2. Caractéristiques des sérums collectés

Sur les 92 sérums collectés 35 ont été prélevés avant la date de prélèvement de la première hémoculture positive (J0), 3 ont été prélevés à J0, 4 à J+1, 10 à J+2 et 40 après J+2 (figure 36).



**Figure 36 : Répartition du nombre total de sérums analysés en fonction de la distance avec la date de prélèvement de la première hémoculture positive (J0)**

Pour chaque patient entre 1 (n = 18) et 9 (n = 1) sérums ont été analysés (figure 37) avec une médiane de 2 sérums par patient.



**Figure 37 : Nombre de sérums collectés par patient**

Les patients ont été numérotés par ordre croissant en fonction de la date de prélèvement de l'hémoculture positive (1 = le plus ancien, 39 = le plus récent) (figure 38).

Sur les 39 patients de l'étude (figure 38) :

- Neuf patients avaient uniquement des sérums avant la date de prélèvement de la première hémoculture (dont 2 patients avec un sérum aussi prélevé à J0)
- Un patient avait un seul sérum prélevé à J0
- Quinze avaient uniquement des sérums prélevés après J0
- Quatorze avaient des sérums prélevés avant et après J0.

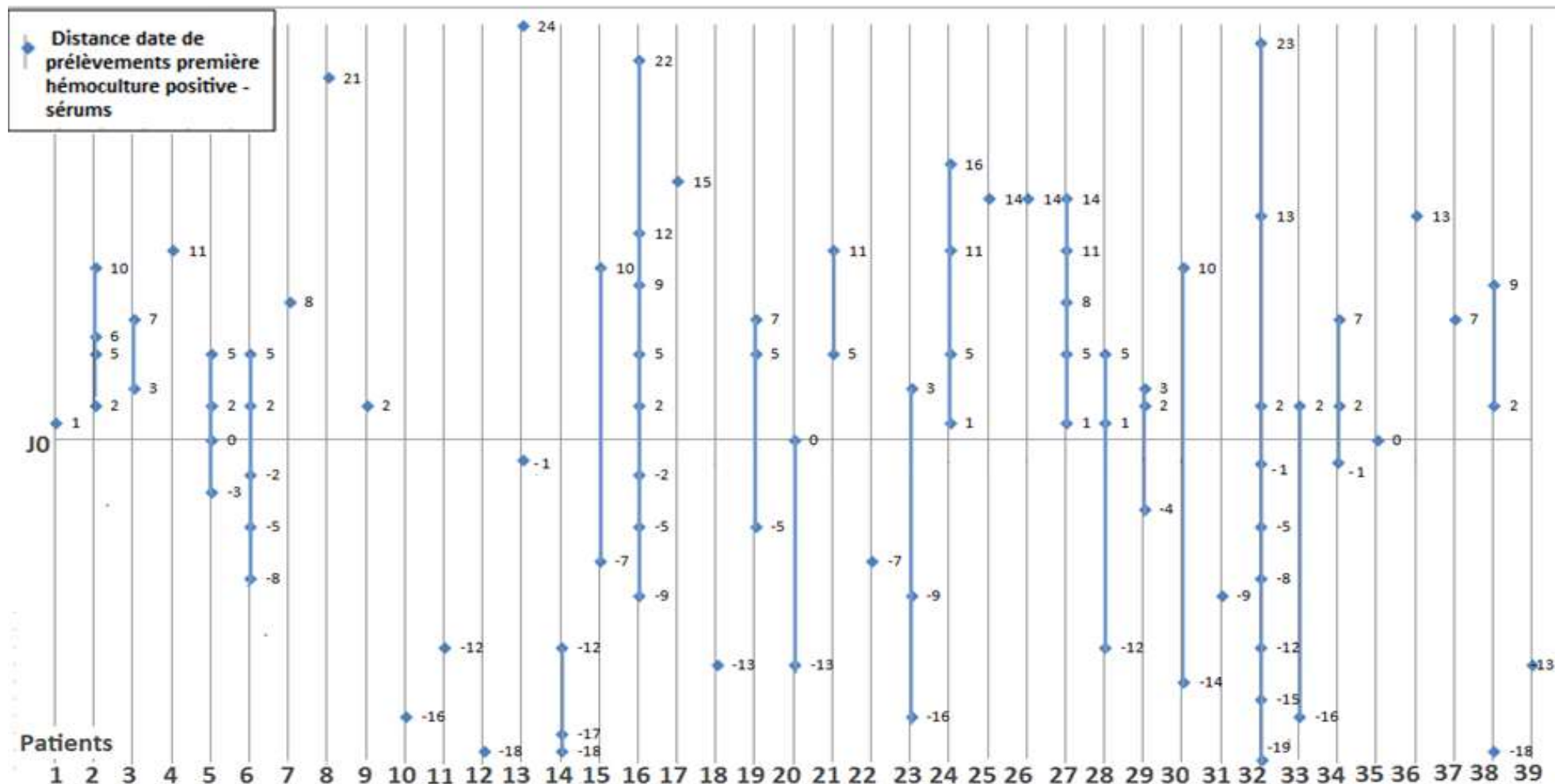


Figure 38 : Répartition des sérums analysés pour chaque patient en fonction de la distance avec J0



### 3. Résultats des sérologies *Candida*

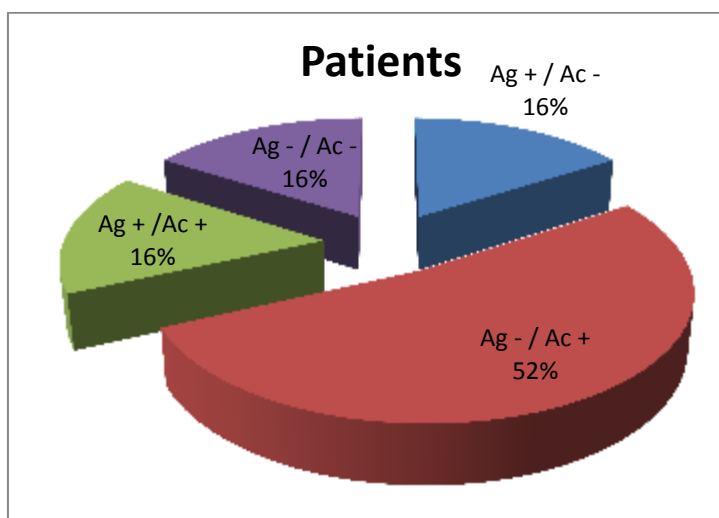
#### 3.1. Répartition des résultats de sérologies *Candida*

Sur les 39 patients inclus dans l'étude, 84 % avaient au moins une sérologie *Candida* positive (n = 32) et 16 % avaient une sérologie négative (n = 7) sur une période couverte de 42 jours (18 jours avant l'hémoculture positive et 24 jours après) (figure 39) :

- 52 % avaient des Ac positifs seulement (n = 23 dont 10 résultats intermédiaires I)
- 16 % avaient des Ag positifs seulement (n = 7 dont 2 résultats I)
- 16 % avaient des Ac et des Ag positifs en même temps (n = 7 dont 3 Ag I / Ac + et 1 Ag + / Ac I).

Certains patients ont présenté plusieurs cas de figure possibles au cours du temps :

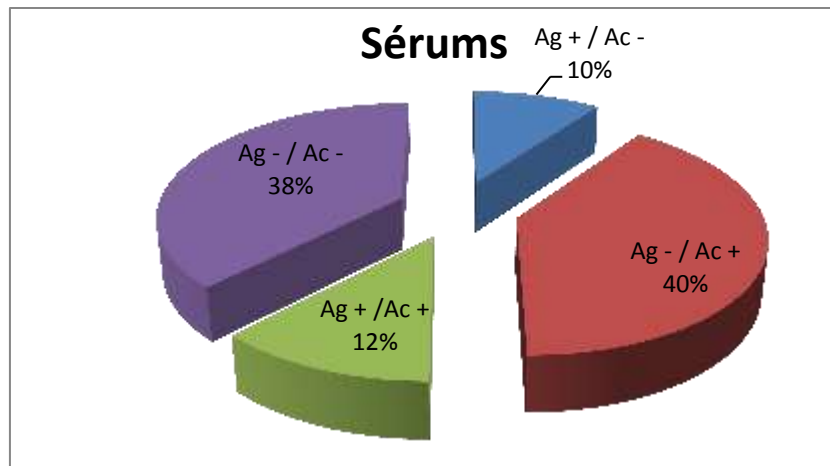
- Le patient 6 a eu des Ac positifs puis des Ag + / Ac +.
- Le patient 23 a eu des Ac I puis des Ag + / Ac I.
- Le patient 27 a eu des Ag positifs puis des Ag + / Ac +.
- Le patient 28 a eu des Ac I puis des Ag positifs.



**Figure 39 : Répartition des résultats de sérologies *Candida* chez les patients de l'étude**

Sur les 92 sérums analysés la sérologie était négative dans 38 % des cas (n = 34) et positive dans 62 % des cas (figure 40) :

- 40 % des sérums avaient seulement des Ac + (n = 36 dont 16 résultats I)
- 10 % des sérums avaient seulement des Ag + (n = 9 dont 2 résultats I)
- 12 % des sérums avaient des Ag + et Ac + en même temps (n = 11 dont 7 résultats I : 1 Ag I / Ac I, 5 Ag + / Ac I) et 1 Ag I / Ac +).



**Figure 40 : Répartition des résultats des sérologies *Candida* des sérums collectés**

La figure 41 illustre la répartition des différents résultats des sérologies *Candida* en fonction du délai avec la première hémoculture positive J0.

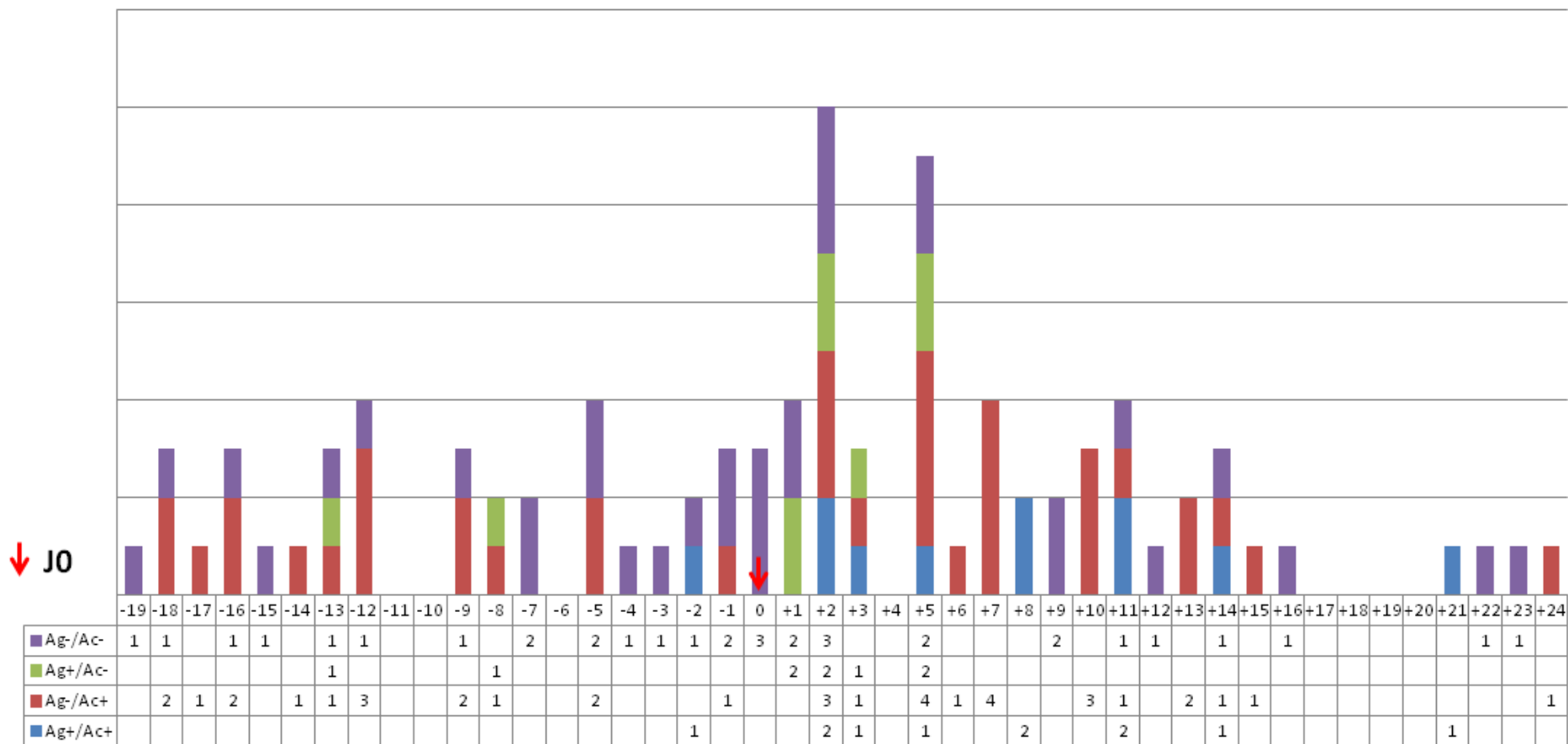
Les sérums les plus éloignés de J0 ont des sérologies négatives (J-19, J+24) (histogramme violet).

Sur les 38 sérums où seulement des Ac anti-Mn ont été détectés, 16 sérums (dont 7 résultats I) ont été prélevés avant la date de prélèvement de la première hémoculture positive (J0) et 22 sérums (dont 19 résultats I) après J0. Des Ac étaient présents dans le sérum des patients entre 18 jours avant J0 et jusqu'à 24 jours après J0 (histogramme rouge).

Sur les 9 sérums où seuls des Ag Mn ont été détectés, seulement 2 sérums ont été prélevés avant J0 (J-13 et J-8) et les résultats étaient intermédiaires (histogramme vert). Deux sérums étaient positifs à J+1, 2 à J+2 et 1 à J+3. Les derniers résultats positifs ont été retrouvés à J+5 (2 sérums).

Sur les 11 sérums où des Ag et Ac ont été mis en évidence en même temps, un seul a été prélevé avant J0 (J-2) et les résultats étaient I pour les Ag et Ac (histogramme bleu). Deux sérums étaient positifs à J+2 (dont 1 Ag + / Ac I), 1 sérum à J+3 (Ag + / Ac I) et à J+5 (Ag + / Ac I), 2 à J+8 (1 Ag I / Ac +), 2 à J+11 (1 Ag + / Ac I) et 1 à J+14 (Ag I / Ac +).

Le dernier couple positif a été retrouvé à J+21 avec des Ag I.

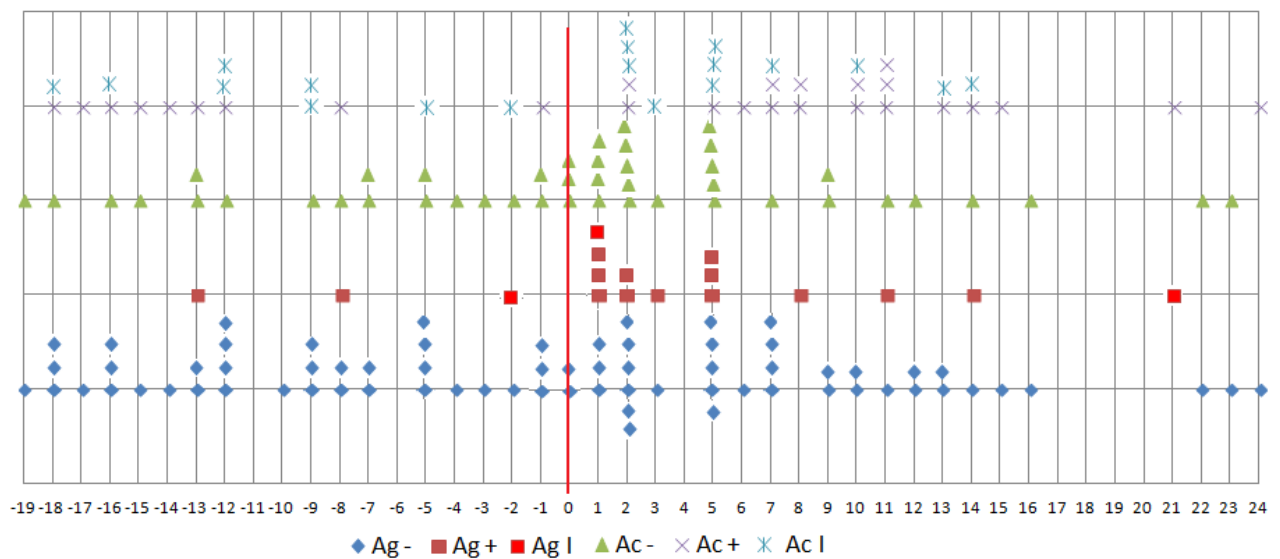


**Figure 41 : Répartition des sérologies *Candida* pour l'ensemble des 92 sérums collectés par rapport à J0 (date prélèvement de la première hémoculture positive)**

Les résultats I ont été pris en compte dans la représentation graphique comme des résultats positifs.

Comme l'illustre la figure 42 où est représenté l'ensemble des résultats des sérologies, des Ac anti-*Candida* ont été mis en évidence dans de nombreux sérums bien avant l'épisode de candidémie (entre J-18 et J-1). De même ces Ac sont présents entre J+2 et J+24. Un grand nombre de sérums prélevés aux alentours de l'épisode de candidémie a une sérologie Ac négative entre J-1 et J+2 (Croix grises et bleues sur le graphique).

La majorité des Ag Mn est détectée dans les sérums entre J+1 et J+5 (Carré rouge). Aucun Ag n'a été trouvé dans les sérums prélevés avant J-13 et après J+21. Trois sérologies Ag étaient positives avant J0 et 4 à J+1.

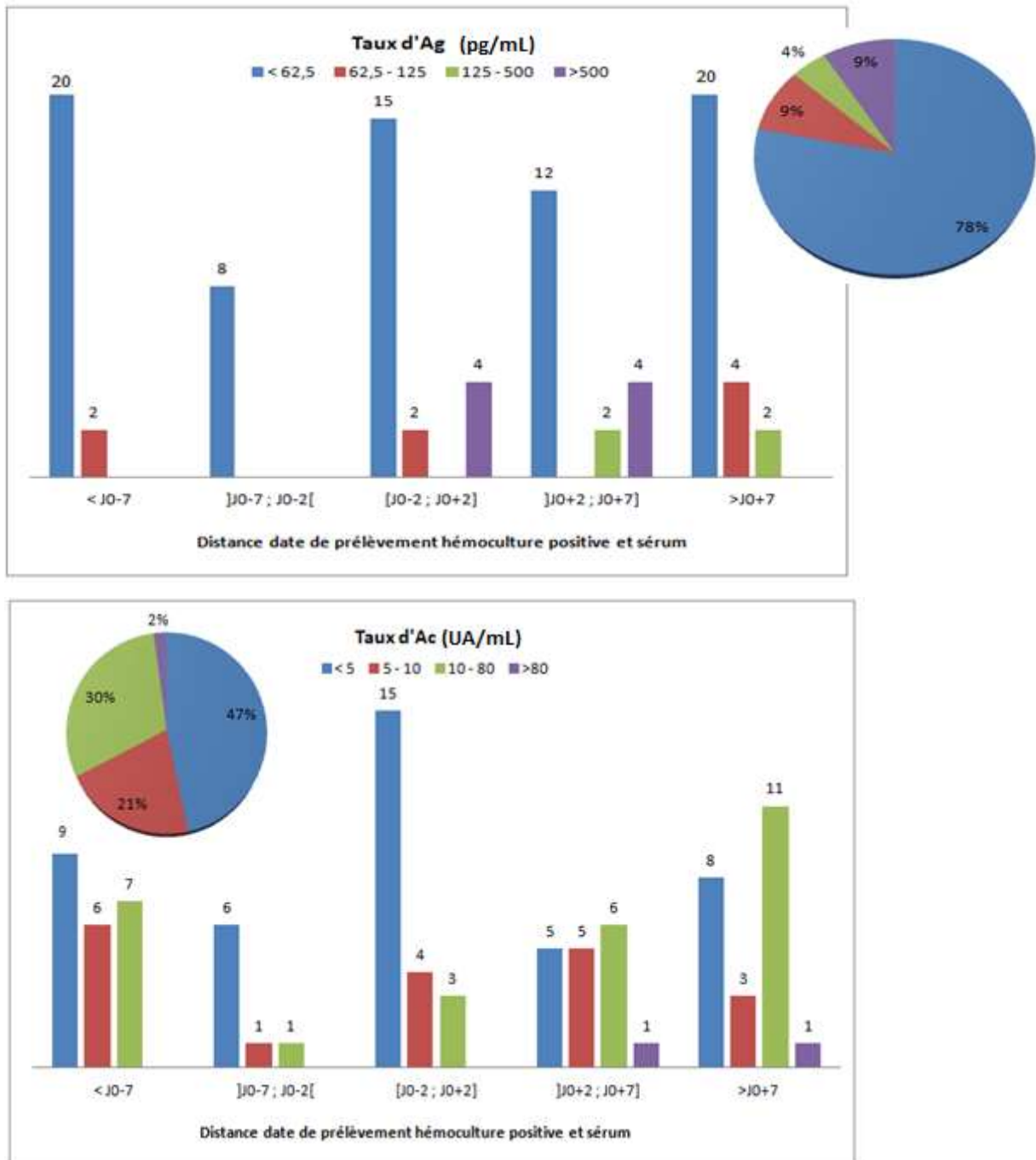


**Figure 42 : Répartition des résultats des sérologies Ag Mn et Ac anti-Mn pour l'ensemble des 92 sérums en fonction de la distance entre le prélèvement du sérum et de la première hémoculture positive**

### 3.2. Taux des Ag et Ac

Sur l'ensemble des 92 sérums analysés, l'antigénémie est négative dans 78 % des cas (n = 72), un grand nombre d'Ag négatif est retrouvé dans les prélèvements éloignés de J0 (n = 20 avant J-7 et n = 20 après J+7) (figure 43). Au total des Ag ont été détectés dans 20 échantillons. Des résultats intermédiaires ou douteux sont retrouvés pour 9 % (n = 8) des sérums chez 7 patients différents (patient 6, 7, 8, 9, 27, 32 et 39) et concernent les sérums prélevés à J-13, -8, -6, -2 et J+2, +8 +11, +14 et +21. Quatre patients ont des taux compris entre 125 et 500 pg/mL (patient 4 à J+11, patient 23 à J+3 et patient 27 à J+5 et +8). Des taux supérieurs à 500 pg/mL sont trouvés dans 9 % des sérums à J+1 (n = 2), J+2 (n = 3), J+3 (n = 1) et J+5 (n = 2) chez les patients 1, 6, 28, 29 et 33.

Aucun Ag n'a été détecté entre J-7 et J-2.



**Figure 43 : Répartition des taux d'Ag (pg/mL) et d'Ac (UA/mL) pour l'ensemble des 92 sérums analysés en fonction de la distance entre le sérum et la date de prélèvement de l'hémoculture positive**

Des Ac anti-*Candida* sont détectés dans environ la moitié des sérums analysés (53 % n = 49) (figure 43). Un grand nombre de sérums est négatif en sérologie Ac entre J-7 et J+2 (6/8 et 15/22). Les taux sont intermédiaires (entre 5 et 10 UA/mL) dans 21 % (n = 19). Trente pourcent des sérums (n = 28) ont des titres importants (> 10 UA/mL), un grand nombre est

retrouvé avant J-7 (7/22), après J+2 (6/17) et surtout après J+7 (11/23). Deux patients ont eu des taux d'Ac supérieurs à 80 UA/mL : le patient 3 à J+7 et le patient 27 à J+14.

### 3.3. Cinétique des Ag et Ac : analyse de cas

Des cinétiques des concentrations en Ag et Ac ont été réalisées lorsque les patients avaient plusieurs sérums. Plusieurs cas intéressants sont décrits ci-dessous (figure 44-48) :

Le patient 2, un homme âgé de 67 ans était hospitalisé en réanimation médicale. Il présentait de nombreux facteurs de risque de CI : une transplantation rénale récente, un traitement immunosuppresseur par ciclosporine qui s'accompagnait d'une lymphopénie profonde ( $Ly = 0,04$  G/L). Ce patient avait également une insuffisance rénale au moment du diagnostic de la candidémie (MDRD = 32 ml/min) et était porteur d'un cathéter. Les hémocultures prélevées 7 jours et 4 jours avant la date de prélèvement de la première hémoculture positive (J0) ainsi que celle prélevées 1, 2, 3 et 4 jours après l'épisode de candidémie sont toutes restées négatives. Un seul flacon aérobie a détecté la croissance de *C. albicans* après 2 jours d'incubation du flacon. Les index de colonisation n'avaient pas été réalisés mais 2 urines étaient positives à *C. albicans* (prélevées J-19 et J-4) et 2 autres à *C. albicans* et *C. glabrata* (prélevées à J-6 et à J0). Un LBA (prélevé à J+1) et un cathéter (prélevé à J+2) étaient aussi colonisés par *C. albicans* et *C. glabrata*. Aucun sérum n'a été trouvé avant J0 et le premier sérum disponible dans la sérothèque était prélevé 2 jours après la date de prélèvement de la première hémoculture positive (J+2). A cette date qui correspond également au jour de positivité de l'hémoculture, le patient avait des Ac anti-*Candida* intermédiaires, mais l'Ag était négatif (figure 44). On observe une augmentation du taux d'Ac avec le temps. A J+5, les Ac sont encore intermédiaires et à J+6 les Ac sont retrouvés positifs ( $C = 12,6$  UA/mL). L'antigénémie reste négative dans le temps, on observe néanmoins une légère ascension du taux d'Ag entre J+2 et J+5 ( $C = 32$  pg/mL à J+5) puis ce taux diminue de nouveau à partir de J+5.

Le patient 3 est une femme de 18 ans atteinte de mucoviscidose et hospitalisée en médecine interne. Une lymphopénie ( $Ly = 0,50$  G/L) a été retrouvée à plusieurs reprises sur ses bilans biologiques. Deux flacons aérobies prélevés à J0 et J+4 étaient positifs à *C. parapsilosis*. (incubation de 2 jours). Une paire d'hémoculture avait été prélevée 3 jours avant J0 mais celle-ci est restée négative. La culture du cathéter retiré à J+5 a également retrouvé du *C. parapsilosis*. La paire d'hémoculture également prélevée à J+5 était négative. La porte

d'entrée était donc probablement d'origine cutanée. Des Ac anti-*Candida* ont été détectés dans les sérums à un titre très important à J+3 (C = 50 UA/mL) et supérieur à la limite de détection à J+5 (C > 80 UA/mL) (figure 44). On présume donc que ce patient avait déjà des Ac positifs avant la date d'isolement de la levure (flèche rouge), à J0 voire même avant étant donné la valeur élevée retrouvée. Aucun Ag n'a été détecté à J+3 et J+5.

La patiente 5 (61 ans hospitalisée en hématologie) a bénéficié d'une deuxième allogreffe de moelle osseuse pour une rechute de LAM de type 2. Elle est traitée par immunosuppresseurs (tacrolimus). Une neutropénie (PNN = 0,58 G/L) et une lymphopénie (Ly = 0,5 G/L) sont retrouvées. Des prélèvements mycologiques réalisés à J+4 et +5 au niveau de la gorge et du nez mettaient en évidence d'assez nombreuses colonies de *C. albicans*. Le délai d'incubation de l'hémoculture de 1 jour peut être biaisé à cause de la bactérie retrouvée aussi en culture (*Enterococcus faecium*). Les autres hémocultures prélevées à J-3, +1 et +2 étaient négatives. Un deuxième flacon aérobie est sorti positif à J+5. La sérologie Ag reste strictement négative entre J-3 et J+5. On observe une élévation du titre d'Ac à partir de J0 mais le titre reste faible (résultat intermédiaire) (figure 44).

Le patient 6 (homme, 74 ans) était hébergé dans le service d'hématologie pour une LAL de type B. Ce patient était fortement immunodéprimé (PNN = 0,3 G/L et Ly = 0,16 G/L). Les prélèvements ORL réalisés à J-8, J-2 et J+5 retrouvaient d'assez nombreuses colonies de *C. albicans* seulement au niveau du nez (culture de gorge négative). Deux flacons aérobies détectaient *C. albicans* (J0 et J+3). Pour ce patient le diagnostic de candidémie a été tardif après une incubation de 3 jours. Les hémocultures à J-5, J-1, J+2 et J+5 sont restées négatives. A J-5 le patient avait déjà des Ac anti-Mn positif dans le sérum (C = 14 UA/mL) (figure 45) L'antigénémie mannane commence à augmenter probablement entre J-6 et J-4, le taux est intermédiaire à J-2 (C = 100 pg/mL) puis il est retrouvé supérieur à la limite de détection à J+2 et +5 (C > 500 pg/mL). Parallèlement à l'ascension de l'Ag une légère diminution du titre d'Ac est observée.

Pour le patient 14 (homme, 72 ans, maladies infectieuses), des Ac étaient détectés dans les sérums à J-18, -17 et -12 avec des titres croissants. La sérologie Ag était négative pour les 3 sérums (figure 45). Ce malade VIH traité par trithérapie n'avait pas de neutropénie ni de lymphopénie à l'hémogramme mais la valeur des Ly CD4 était diminuée (LT4 = 0,240G/L [N=0,3-1,4 G/L]) et les Ly CD8 augmentés (LT8 = 1,768 G/L [N = 0,2-0,9 G/L]). Seul un

flacon aérobie était positif (flacon anaérobie et une paire d'hémocultures prélevés à J+1 négatifs). Le temps de détection de la croissance de *C. albicans* était de 3 jours.

Le patient 16 (homme, 46 ans, service d'hématologie) a reçu une transplantation de cellules souches périphériques deux mois avant l'épisode de candidémie. Des dosages de méthotrexate ont été réalisés pendant cette période. Il était en aplasie profonde au moment du diagnostic (leucocytes = 0,010 G/L). Les prélèvements mycologiques de dépistage étaient négatifs. Le sérodiagnostic était peu contributif pour ce patient puisque tous les sérums étaient négatifs (J-9, -5, -2, +2, +5, +9, +12 et +22) en Ag et Ac (figure 45). Seuls les deux premiers sérums à J-9 et J-5 avaient des résultats intermédiaires mais faibles en Ac (C = 5,85 UA/mL). Néanmoins une décroissance du taux d'Ac est observée parallèlement à une légère croissance du taux d'Ag avec un pic à J+9. Un seul flacon parmi de nombreuses hémocultures prélevées était positif à *C. albicans* après 2 jours d'incubation (hémocultures négatives : une autre paire à J0 et 2 paires à J+3, +4, +5, +6).

Le patient 19 est un enfant âgé de 10 ans et atteint probablement d'un cancer ou d'une pathologie hématologique (hospitalisé dans le service d'onco-hématologie). Il n'a pas de neutropénie ni de lymphopénie. Un seul flacon a permis de faire le diagnostic de candidémie à *C. albicans* après une longue incubation de 6 jours (hémocultures J+1, +3, +5 +6 négatives). On observe pour cet enfant une cinétique croissante des Ac entre J-5 et J+7 (figure 46). Au moment du prélèvement de l'hémoculture J0 soit 6 jours avant l'isolement de la levure, les Ac étaient probablement déjà positifs. L'antigénémie était négative pendant cette période. Une sérologie *Candida* a été demandée par le service 34 jours après l'épisode de candidémie. Elle détectait encore des Ac positif mais à une concentration deux fois plus faible qu'à J+7 (C = 23 UA/mL).

Pour la patiente 23 (79 ans, maladies infectieuses) la sérologie Ag était positive à J+3 à des titres élevés (C = 201 pg/mL) (figure 46). A la date de détection de la levure (J+1), du prélèvement de l'hémoculture (J0), l'antigénémie était déjà détectable. Les résultats de la sérologie Ac était intermédiaires entre J-16 et J+3 à des titres constants. De nombreux flacons aérobies étaient positifs pour ce patient (2 à prélevés à J0, 2 à J+1 et 2 à J+2) après une incubation de 1 ou 2 jours. La sérologie *Candida* avait été demandée par le service à J+3. Les facteurs de risque retrouvés étaient une antibiothérapie récente au long cours, le port d'un cathéter et une lymphopénie (Ly = 0,54 G/L).



Le patient 27 (71 ans, service d'hématologie) atteint d'une leucémie aiguë indifférenciée est fortement aplasique (PNN = 0 G/L et Ly = 0,250 G/L). Un seul flacon aérobie était positif à *C. tropicalis* après un jour d'incubation (hémocultures prélevées à J+3, +5, +9 et +13 négatives). A la date de positivité de l'hémoculture, les sérologies Ac et Ag sont négatives pour ce patient (figure 46). A partir de J+1 le taux d'Ag augmente pour atteindre un pic vers J+5 (C = 228 pg/mL) puis diminue de façon régulière avec le temps, le résultat devient intermédiaire aux alentours de J+11. La détection des Ag est inversement corrélée à celle des Ac puisque le taux d'Ac augmente à partir du moment où l'antigénémie diminue. A J+14, ce taux est supérieur à 80 UA/mL.

Des Ag Mn ont été détectés pour les patients 28 (homme, 69 ans), 29 (homme, 69 ans) et 33 (homme, 49 ans) à des titres très importants alors que les Ac restaient négatifs (figure 47). Ces 3 patients étaient hospitalisés en réanimation.

Sept flacons aérobies prélevés entre J0 et J+12 étaient positifs à *C. lusitaniae* avec des délais de détection de croissance fongique allant de 1 à 4 jours pour le patient 28. Au total 15 paires d'hémocultures avaient été prélevées entre J-1 et J+15 et 4 paires avaient été incubées pendant 21 jours. Le cathéter retiré à J+12 était aussi colonisé par *C. lusitaniae*. L'index de colonisation réalisé à J-14 était négatif, mais *C. lusitaniae* était également retrouvé dans un LBA réalisé à J0. Le sérum J+1 testé met en évidence des taux très élevés d'Ag (C > 500 pg/mL) (figure 47). Le sérum J+5 retrouvait encore ce taux d'Ag. Les Ag étaient donc détectables dans le sérum bien avant le prélèvement de l'hémoculture et l'isolement de la levure. Une lymphopénie est présente avant l'épisode de candidémie pour ce patient sans neutropénie.

Pour le patient 29 des taux d'Ag supérieurs à 500 pg/mL ont été détectés dans les sérums à J+2 et J+3 (figure 47). A J-4 ce taux était indétectable, les Ag se sont donc probablement positivés entre J-3 et J-1. L'hémoculture réalisée à J-4 était négative. Deux flacons étaient ensuite positifs à *C. dubliniensis* à J0 et J+1 après 2 jours d'incubation. Les autres hémocultures J+3 et J+5 restaient négatives après une incubation de 21 jours. Ce patient présentait comme facteur de risque une hémopathie (LNHGC), une aplasie (PNN = 0,070 G/L, Ly= 0,150 G/L), une cytolyse hépatique (ASAT 441/ALAT 1015) et était porteur d'un cathéter.

Le sérum du patient 33 J+2 avait également des taux d'Ag supérieurs à 500 pg/mL alors que son sérum à J-16 était négatif (C = 13 pg/mL) (figure 47). Son antigénémie s'est donc

possiblement positivée entre J-16 et J0 mais elle devait probablement déjà être élevée au moment du prélèvement de l'hémoculture à J0. Pour ce patient au total 13 flacons dont 4 anaérobies et 8 aérobies prélevés entre J0 et J+11 étaient positifs à *C. glabrata*. *C. albicans* étaient aussi détectés dans deux flacons aérobies à J0 et J+4 en association avec *C. glabrata*. Le délai d'incubation était de 1 à 2 jours pour les flacons anaérobies avec des temps de croissance supérieurs pour les flacons aérobies (3 et 4 jours). Les hémocultures J+5, +7 et +9 restaient négatives. Les LBA et PDP réalisés à J-21 et J-12 quand le patient était hospitalisé en maladies infectieuses mettaient déjà en évidence ces deux espèces. Ce patient VIH positif traité n'avait pas de cytopénie mais les taux de CD4 et CD8 étaient très bas (LT4 = 0,137  $\times 10^6$   $\text{L}^{-1}$  LT8 = 0,167).

Pour le patient 32 (figure 48) dans un premier temps une légère croissance des Ag est observée entre J-19 et J-9 avec un pic à J-8 à un titre faible intermédiaire (C = 63,2 pg/mL) puis une décroissance de ce titre. Les Ac restent strictement négatifs jusque J+2 (C = 0 UA/mL), ils atteignent leur maximum à J+9 avec des résultats intermédiaires (C = 7,4 UA/mL) puis se négativent de nouveau. Il s'agissait d'un enfant de 3 ans hospitalisé en oncologie pour une hémopathie (LAL de type B) et il était fortement immunodéprimé (PNN = 0 G/L et Ly = 0,340 G/L). Cinq hémocultures aérobies étaient positives au total : 4 à *C. parapsilosis* (prélevées à J0, J+1, +3 et +4) et 1 à *C. guilliermondii* (prélevée à J+1). Les autres hémocultures étaient négatives (prélevées à J0-1, J+2, +3, +5). A J-1 et J+6, les cultures mycologiques de dépistage chez les patients immunodéprimés mettaient en évidence au niveau des écouvillonnages réalisées au niveau de la gorge et de la bouche d'assez nombreuses colonies de ces 2 espèces (culture du nez négative). *C. parapsilosis* était aussi isolé dans des selles réalisées à J-8 et l'association des 2 espèces était retrouvée dans les selles de J-1. Ce patient avait également été traité par une antibiothérapie large spectre et était porteur d'un cathéter.

Pour le patient 34 (femme de 64 ans, USI respiratoire) l'antigénémie a été trouvée négative entre J-1 et J+7 (figure 48). Des Ac ont été détectés dans les sérums à J+2 et J+7 à des taux intermédiaires (C = 9,6 UA/mL et C = 7,9 UA/mL respectivement). Un seul flacon d'hémoculture aérobie était positif à *C. albicans* après 2 jours d'incubation. Les autres hémocultures prélevées à J+1, +2, +3, +4 et +5 étaient négatives. La patiente était fortement colonisée avec 5/5 sites périphériques prélevés positifs pour la cartographie réalisée à J+1. *C. albicans* était aussi isolé dans l'aspiration bronchique du prélèvement J+1. Cette patiente VIH positive avait une lymphopénie (Ly = 0,420 G/L) et des taux de CD4 et CD8 bas (LT4 =

0,212 G/L et LT8 = 0,156 G/L). Les PNN étaient augmentés. Un traitement antibiotique au long cours constituait un autre facteur de risque.

Le patient 24 (homme, 54 ans) avait une antigénémie à 40,5 pg/mL à J+1 (figure 48). Celle-ci était retrouvée négative à J+5 (C = 3,7 pg/mL) puis à J+11 et J+16. Les Ac étaient négatifs sur les différents prélèvements. Ce patient atteint d'une maladie de Hodgkin était hospitalisé en réanimation médicale et avait comme facteur de risque en plus de l'hémopathie une neutropénie (PNN = 0,8 G/L), une lymphopénie profonde (Ly = 0,010 G/L), une insuffisance rénale (CPK épi = 60 mL/min) et portait un cathéter. Deux flacons aérobie (J0 et J+1) ont mis en évidence *C. albicans* et le premier était contaminé par *Staphylococcus epidermidis*. Les délais de détection étaient de 2 et 5 jours. Au total 5 paires d'hémocultures avaient été prélevées sur une période de 7 jours. De nombreuses colonies de *C. albicans* étaient également retrouvées dans une urine, un crachat et un LBA prélevés à J+1).

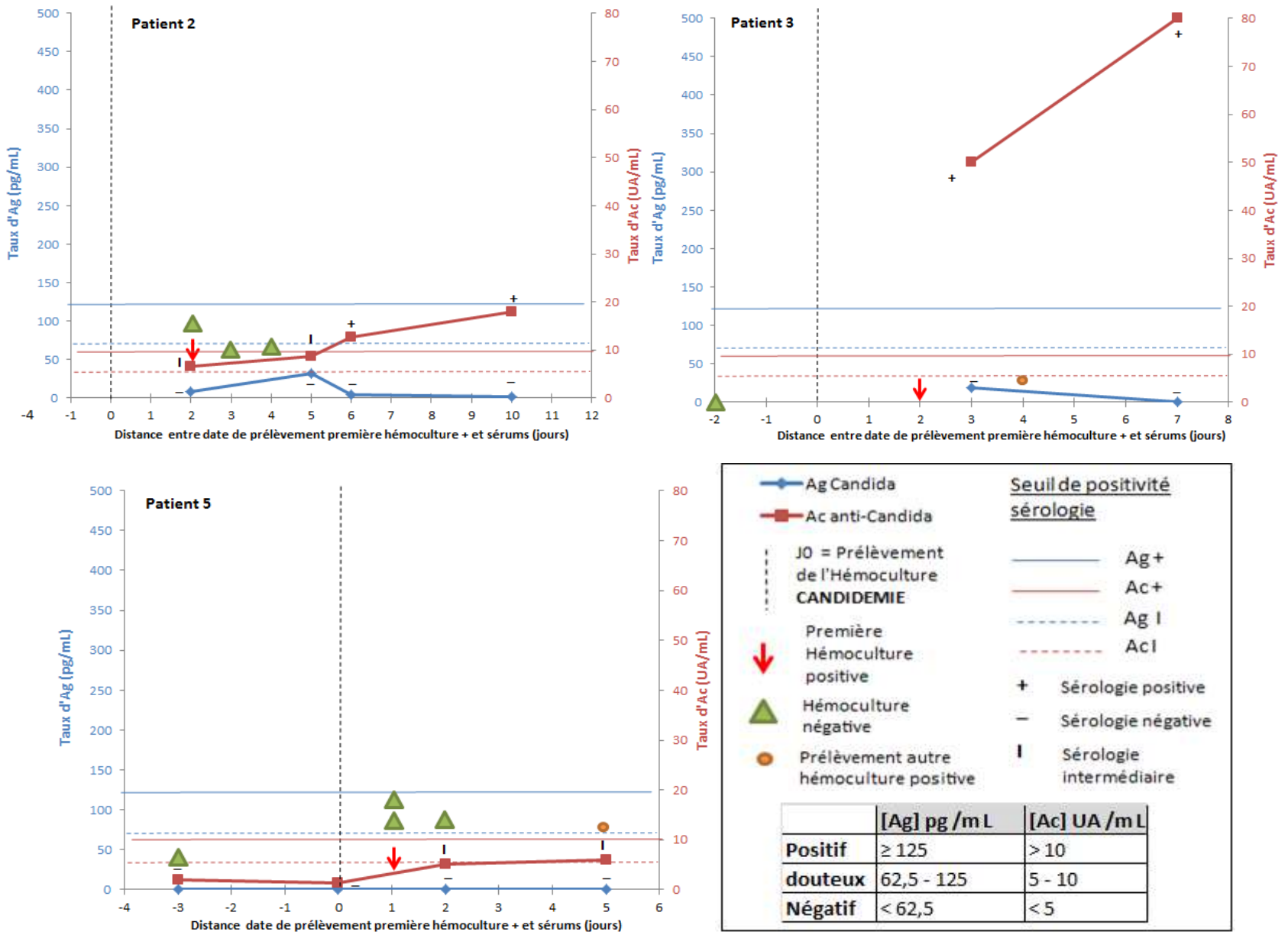
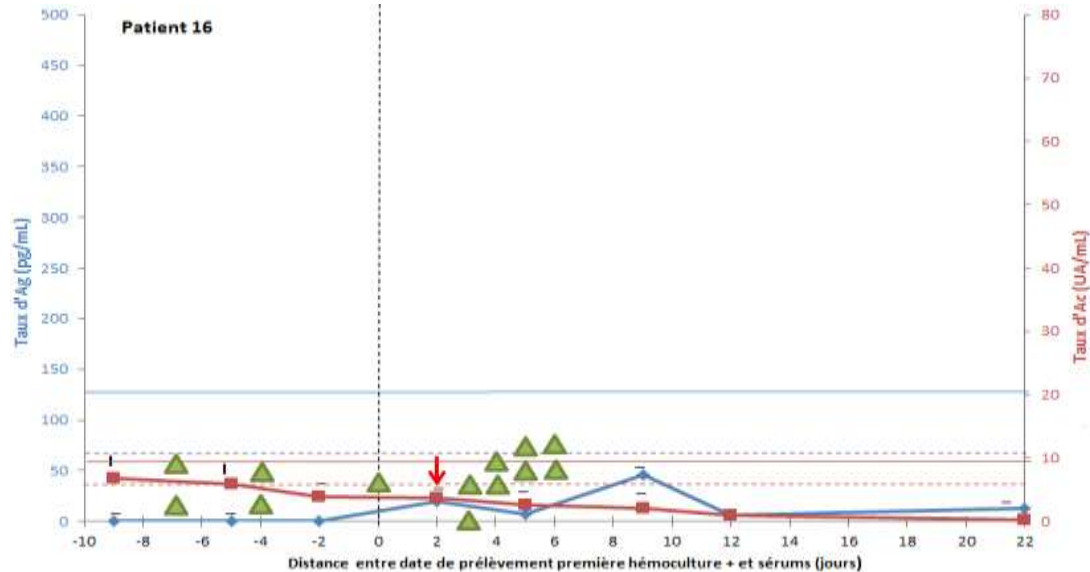
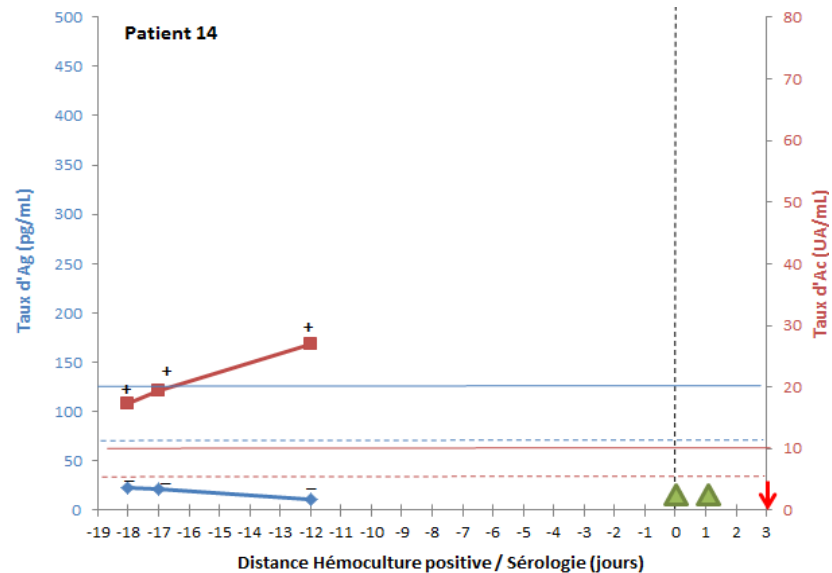
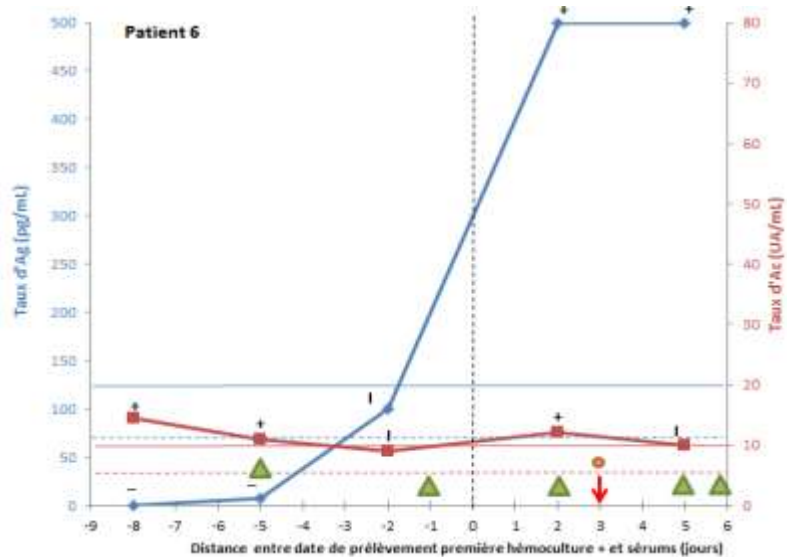


Figure 44 : Représentation des cinétiques Ac et Ag des patients 2, 3 et 5



—●— Ag Candida  
—■— Ac anti-Candida  
 J0 = Prélèvement de l'Hémoculture **CANDIDEMIE**  
↓ Première Hémoculture positive  
▲ Hémoculture négative  
● Prélèvement autre hémoculture positive  
 Ag+  
 Ac+  
 Ag I  
 Ac I  
+ Sérologie positive  
- Sérologie négative  
| Sérologie intermédiaire

	[Ag] pg /m L	[Ac] UA /m L
<b>Positif</b>	≥ 125	> 10
<b>douteux</b>	62,5 - 125	5 - 10
<b>Négatif</b>	< 62,5	< 5

Figure 45 : Représentation des cinétiques Ac et Ag des patients 6, 14 et 16  
137

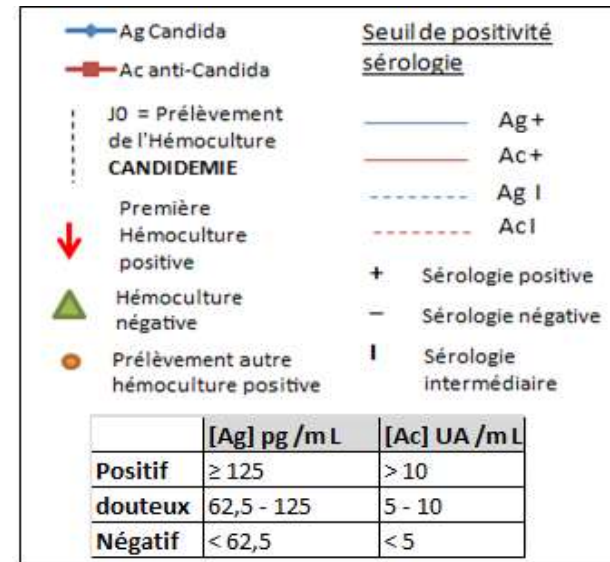
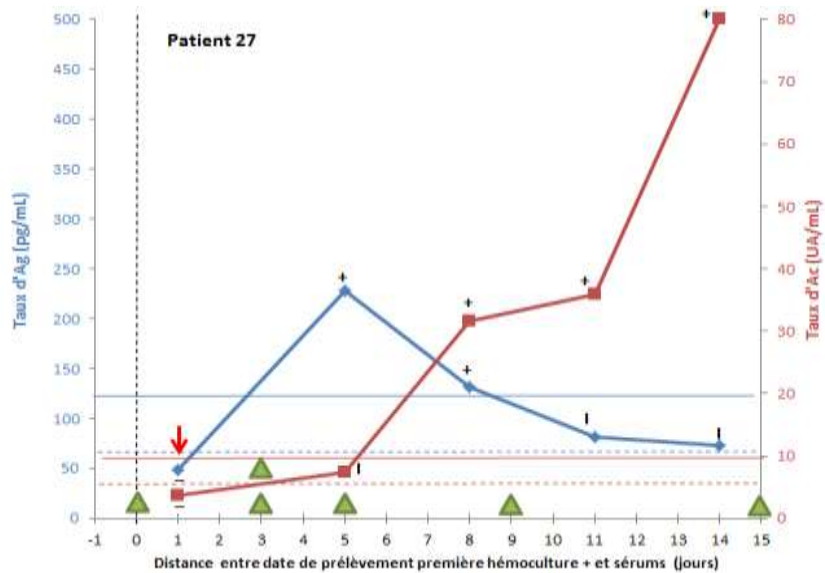
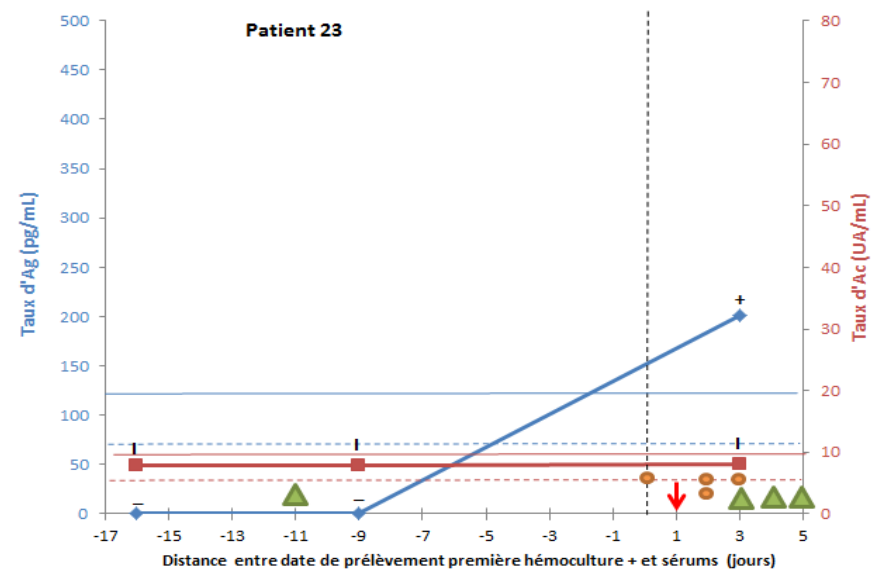
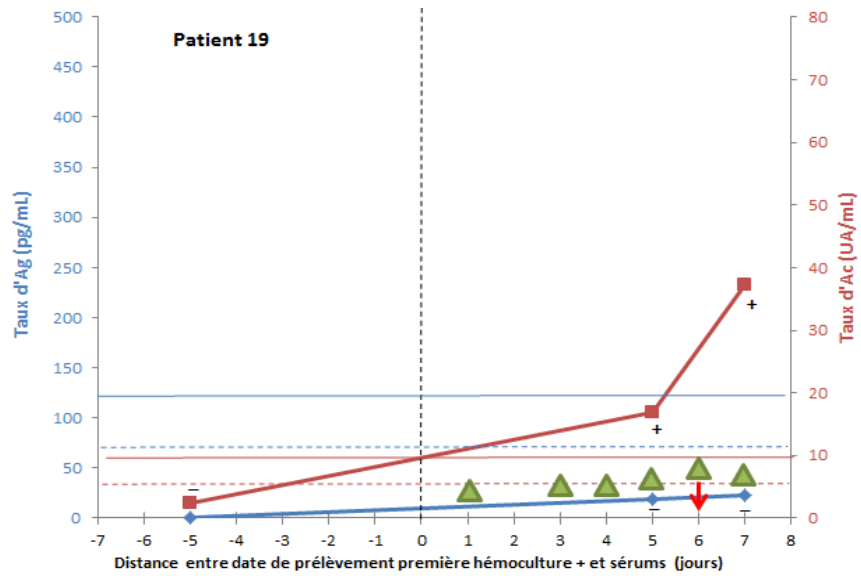


Figure 46 : Représentation des cinétiques Ac et Ag des patients 19, 23 et 27

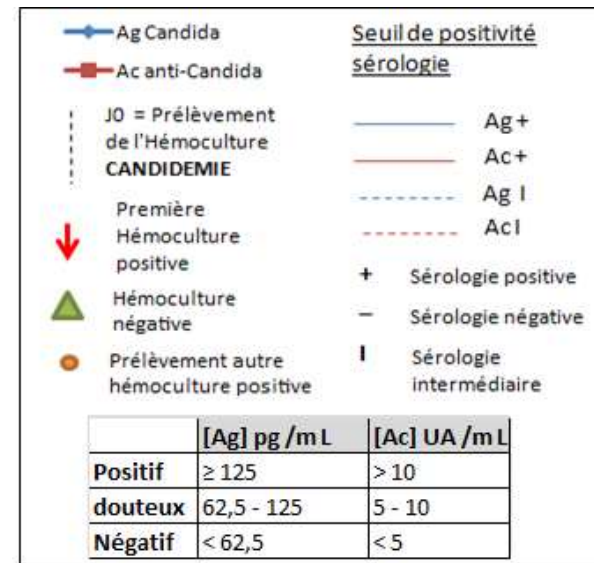
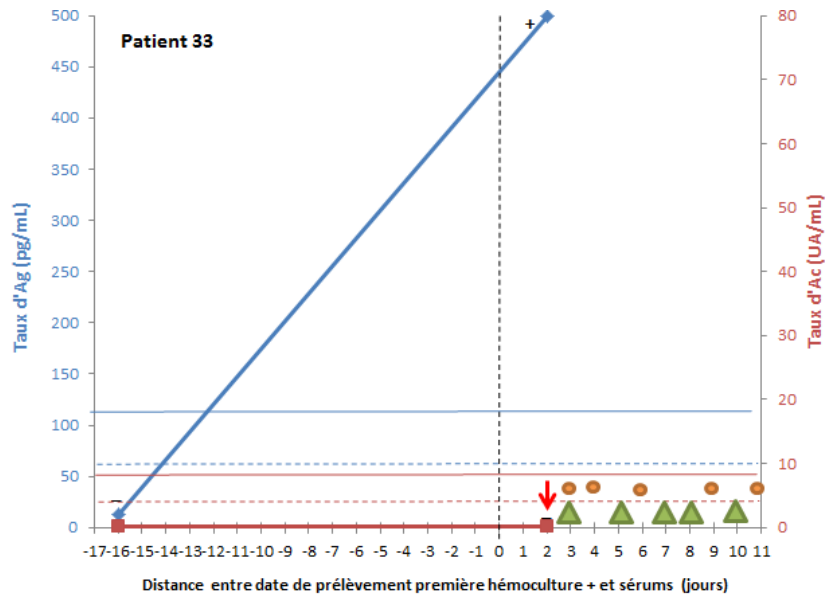
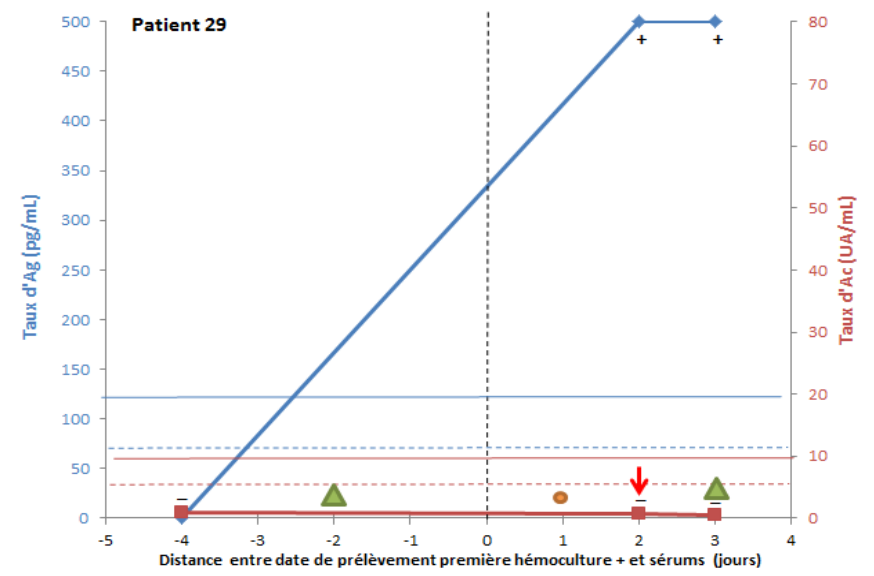
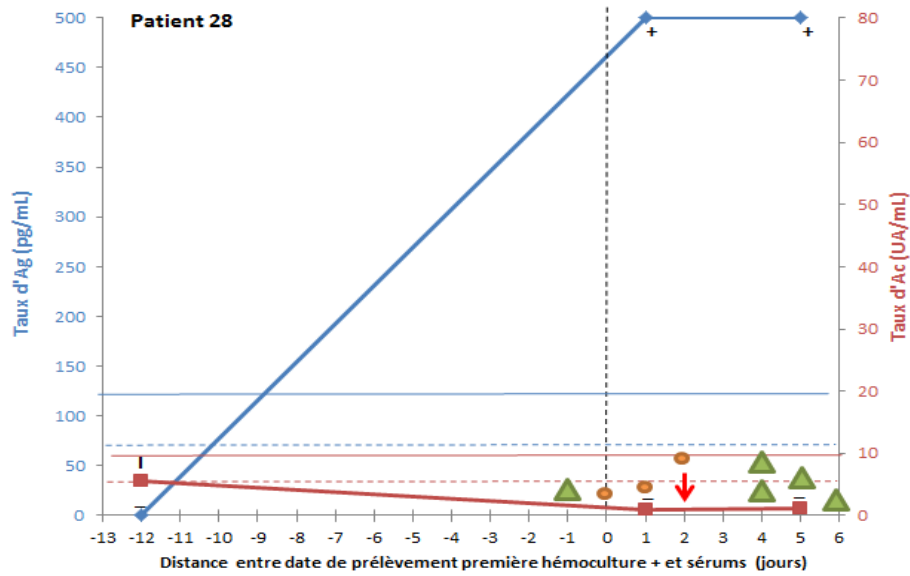
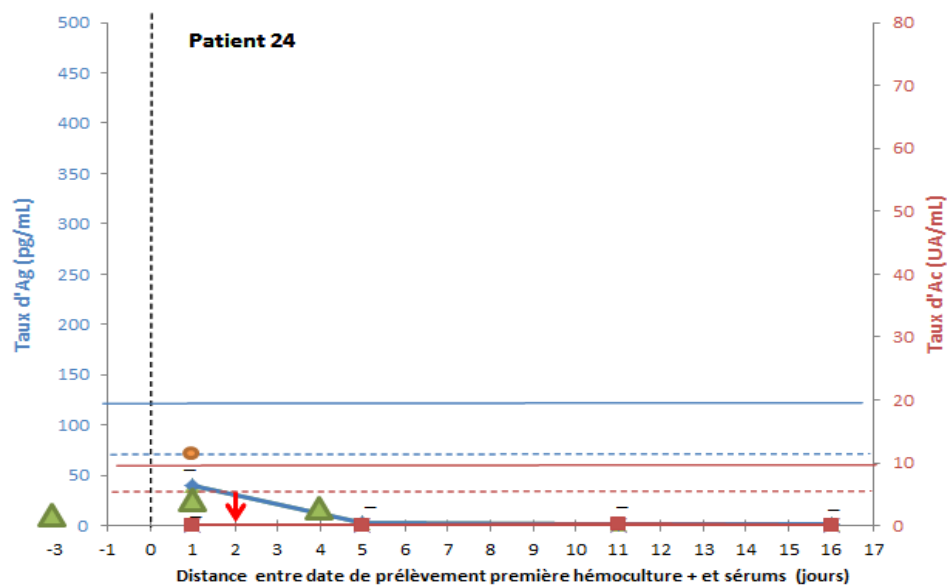
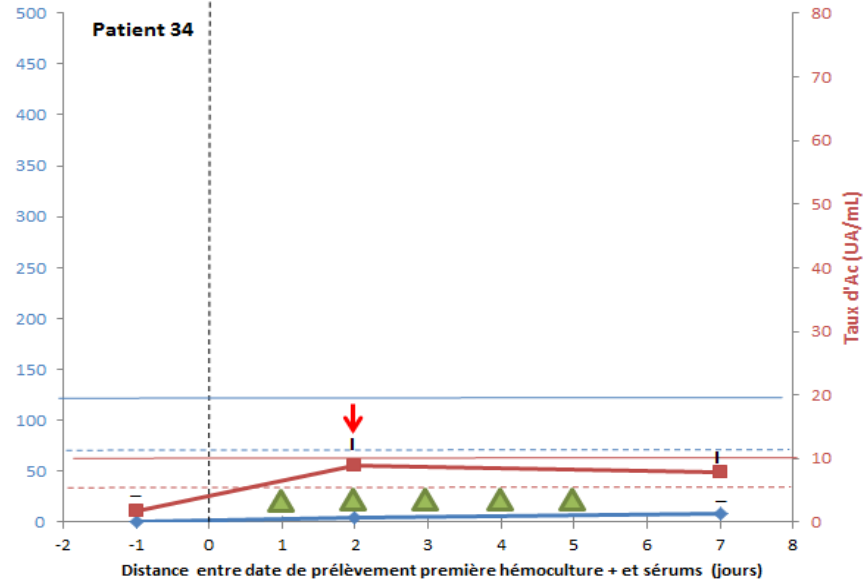
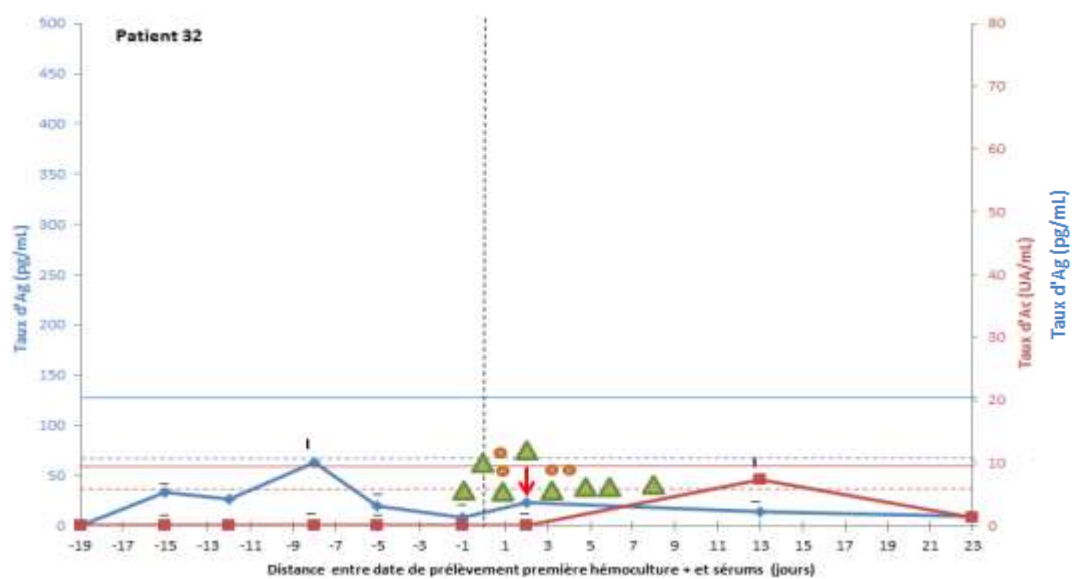


Figure 47 : Représentation des cinétiques Ac et Ag des patients 28, 29 et 33



—◆— Ag Candida	<b>Seuil de positivité sérologie</b>	
—■— Ac anti-Candida	— Ag+	— Ac+
--- JO = Prélèvement de l'Hémoculture CANDIDEMIE	- - - Ag I	- - - Ac I
↓ Première Hémoculture positive	+ Sérologie positive	- Sérologie négative
▲ Hémoculture négative	I Sérologie intermédiaire	
● Prélèvement autre hémoculture positive		
	[Ag] pg / mL	[Ac] UA / mL
<b>Positif</b>	≥ 125	> 10
<b>douteux</b>	62,5 - 125	5 - 10
<b>Négatif</b>	< 62,5	< 5

Figure 48 : Représentation des cinétiques Ac et Ag des patients 24, 32 et 34



### 3.4. Relation entre les résultats des sérologies et le nombre de sérums par patient

Globalement plus le nombre de sérums disponibles était grand pour chaque patient et plus le pourcentage de patients possédant une sérologie positive était important.

**Tableau 26 : Répartition des résultats des sérologies en fonction du nombre de sérums par patient**

La valeur entre parenthèse représente le pourcentage de patient positif dans chaque catégorie (en fonction du nombre de sérums prélevés).

Nb de sérums	Nb patients Ag +	Nb patients Ac +	Nb patients Ag + et/ou Ac +	Total patients
1	6 dont 4 I (33 %)	12 dont 3 I (66 %)	14 dont 4 I (77%)	18
2	1 (14 %)	5 dont 1 I (71 %)	6 font 1 I (85 %)	7
3	3 (43 %)	5 dont 3 I (71 %)	6 dont 1 I (85 %)	7
4	0 (0 %)	2 dont 1 I (67 %)	2 dont 1 I (67 %)	3
5	2 (100 %)	2 (100 %)	2 (100 %)	2
8	0 (0 %)	1 dont 1 I (100 %)	1 dont 1 I (100 %)	1
9	1 dont 1 I (100 %)	1 dont 1 I (100 %)	1 dont 1 I (100 %)	1
<b>Total</b>	13	28	32	39

### 3.5. Précocité du diagnostic

L'ensemble des résultats des sérologies *Candida* obtenus pour les 39 patients est représenté dans la figure 49.

Dans notre étude, 13 patients ont des sérums trop éloignés de la date de l'hémoculture positive et par conséquent ne permettent pas de conclure quant à la précocité du diagnostic.

Comme nous l'avons vu précédemment, le délai de détection médian par le système Bactec<sup>®</sup> des levures du genre *Candida* sur flacon standard était de 2 jours toutes espèces confondues. La date du diagnostic biologique de candidémie peut être donc estimée approximativement à J+2.

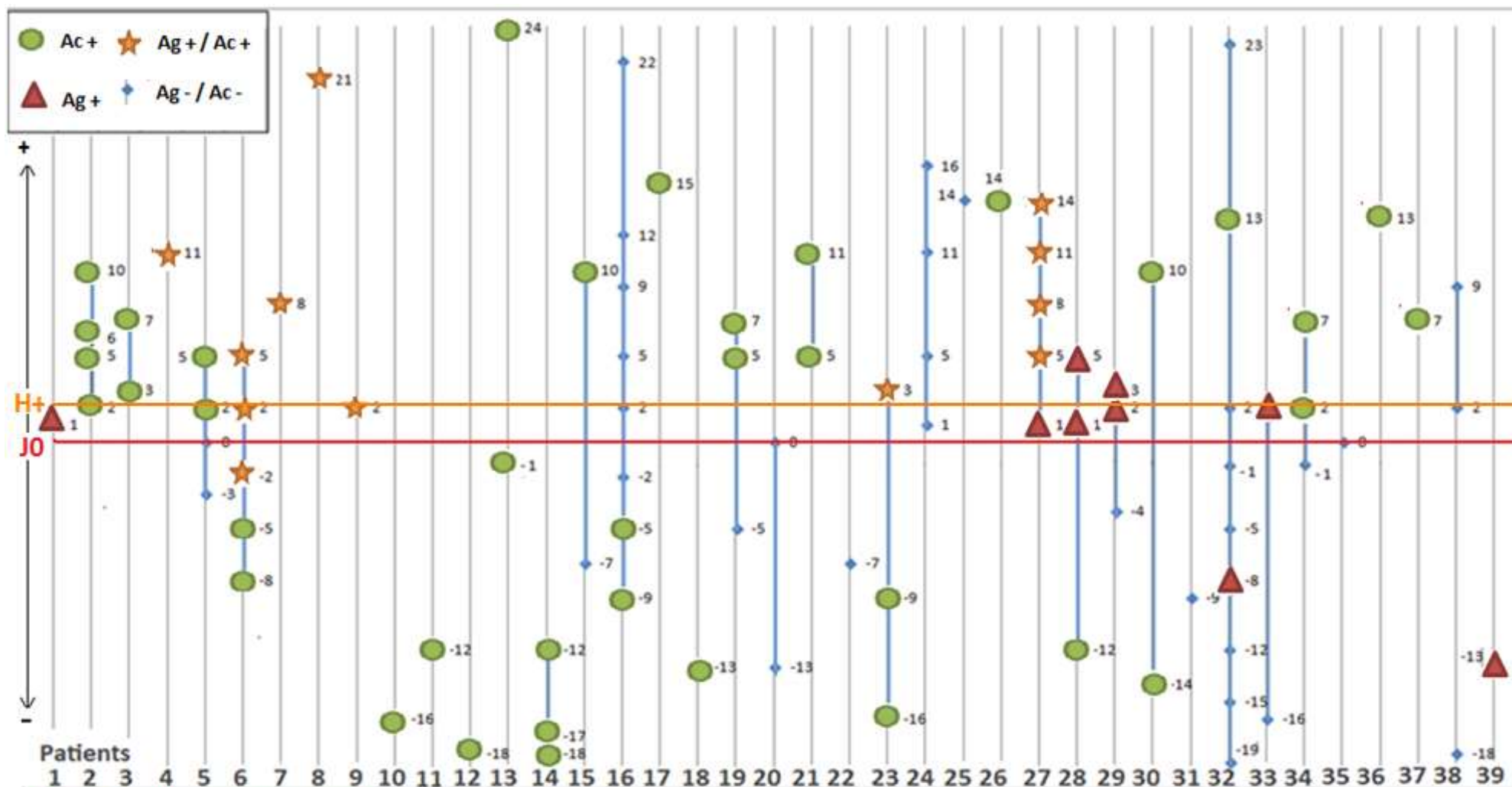
Au final 27 patients de cette étude avaient des sérums prélevés avant J+2:

- 15 avaient une sérologie positive avant le prélèvement de l'hémoculture J0.
- 2 avaient une sérologie positive à J1.

Au total 5 patients ont eu des Ag positifs avant J+2 : 1 patient à J-8, 1 à J-3 et 3 autres à J+1.

Onze patients ont eu des Ac avant J0, des Ac ont été détectés de J-18 à J-1.

Par conséquent, en considérant ce délai de positivité les sérologies étaient positives avant les hémocultures chez au moins 63 % des patients (n = 17).



J0 = date de prélèvement de l'Hémoculture  
H+ = première hémoculture positive

Figure 49 : Représentation des résultats des sérologies *Candida* Ag et Ac pour les patients 1 à 39 pour l'ensemble des sérums collectés

#### 4. Comparaison des méthodes PLATELIA<sup>®</sup> / SERION<sup>®</sup>

Une étude comparative a été réalisée entre la méthode PLATELIA<sup>®</sup> *Candida* Ag Plus et *Candida* Ab Plus (Bio-rad) actuellement utilisée pour le dosage des Ag Mn et des Ac anti-Mn au laboratoire de mycologie avec un autre kit commercial disponible sur le marché SERION ELISA<sup>®</sup> *antigen Candida* et *classic Candida albicans* IgG (Virion).

##### 4.1. Résultats bruts

L'analyse comparative porte sur un total de 83 sérums provenant des 39 patients de notre étude. Seulement une plaque de 96 puits était mise à notre disposition par le fournisseur, 3 séries de patients ont été effectuées (12 + 12 + 60 patients). Un sérum a été testé deux fois par erreur. Les échantillons exclus de l'analyse correspondaient aux sérums des patients les plus éloignés de la date probable de l'épisode de candidémie (date de prélèvement de l'hémoculture positive):

- Sérum J-18 du patient 14
- Sérums J+11 et +16 du patient 24
- Sérums J-19, -15, -12 et +23 du patient 32
- Sérum J-18 du patient 38.

Le dosage en SERION<sup>®</sup> n'a également pas été réalisé sur le sérum J+3 du patient 29 même si la date de prélèvement du sérum était proche de la date de la candidémie car celui-ci avait déjà donné une sérologie positive avec ce même kit sur le sérum J+2.

Dix pour cent des échantillons (n = 8) ont une antigénémie positive à la fois avec la méthode PLATELIA<sup>®</sup> et la méthode SERION<sup>®</sup>. Dans 77 % (n = 64) la sérologie Ag est négative quelle que soit la méthode utilisée. Enfin dans 13 % des cas, les résultats des Ag sont discordants.

La sérologie Ac est négative dans les deux techniques dans 42 % des cas (n = 35). On retrouve des résultats positifs concordants dans 21 % (n = 17) et intermédiaires concordants dans 13 % des échantillons (n = 11). Les résultats des Ac sont discordants dans 24 % des cas (n = 10 + 2 + 12).

Au total le pourcentage de concordance entre les deux techniques est de 87 % pour l'antigénémie et de 76 % pour la sérologie Ac.

Le tableau 50 récapitule l'ensemble de ces données.

**Figure 50 : Comparaison des résultats des dosages Ag et Ac avec le kit Bio-rad et Virion**

• **Ag**

<b>BIO-RAD</b> <b>VIRION</b>	<b>Négatif</b>	<b>Intermédiaire</b>	<b>Positif</b>
<b>Négatif</b>	77 % (n = 64)	10 % (n = 8)	2 % (n = 2)
<b>Intermédiaire</b>	(n = 0)	(n = 0)	1 % (n = 1)
<b>Positif</b>	(n = 0)	(n = 0)	10 % (n = 8)

• **Ac**

<b>BIO-RAD</b> <b>VIRION</b>	<b>Négatif</b>	<b>Intermédiaire</b>	<b>Positif</b>
<b>Négatif</b>	42 % (n = 35)	10 % (n = 8)	2 % (n = 2)
<b>Intermédiaire</b>	0 (n = 0)	13 % (n = 11)	12 % (n = 10)
<b>Positif</b>	(n = 0)	0 (n = 0)	21 % (n = 17)

#### **4.2. Résultats discordants**

Parmi les résultats discordants des Ac:

- 2 échantillons positifs en PLATELIA<sup>®</sup> sont retrouvés négatifs en SERION<sup>®</sup>.
- 8 résultats intermédiaires en PLATELIA<sup>®</sup> sont négatifs en SERION<sup>®</sup>.
- 10 résultats positifs PLATELIA<sup>®</sup> sont intermédiaires en SERION<sup>®</sup>.

Onze discordances ont été trouvées pour le dosage des Ag. Celles-ci sont décrites dans le tableau ci-dessous (tableau 51).

**Figure 51 : Analyse des résultats Ag discordants entre le kit PLATELIA® et VIRION®**

Patient	Distance prélèvement	Ag PLATELIA®		Ag VIRION®	
		Taux (pg/mL)	Interprétation	Taux (UA/mL)	Interprétation
4	J+11	188	+	< min	-
6	J-2	100	I	0,69	-
7	J+8	66,5	I	0,78	-
8	J+21	88,3	I	1,17	-
9	J+2	65	I	0,51	-
23	J+3	201	+	2,06	I
27	J+8	131	+	1	-
27	J+11	82,1	I	0,54	-
27	J+14	72,7	I	0,39	-
32	J-8	63,2	I	0,74	-
33	J-13	110	I	1,24	-

### 4.3. Performance des tests

La sensibilité du kit Bio-rad et du kit Virion a été déterminée à partir des 83 échantillons des 39 patients ayant présenté une candidose invasive microbiologiquement prouvée sur la base d'au moins une hémoculture positive à *Candida* (tableau 27).

Pour les deux kits utilisés, les Ag Mn et les Ac anti-Mn sont détectés indépendamment de l'espèce de *Candida* en cause (tableau 28).

**Tableau 27 : Performance des sérologies *Candida* Ag et Ac en incluant ou pas les résultats intermédiaires pour les deux kits testés**

PLATELIA (Bio-rad)	Sérologie Ag +		Sérologie Ac +		Combinaison résultats Ag et Ac	
	62,5 pg/mL (I)	125 pg/mL	5 UA/mL (I)	10 UA/mL	I considérés comme positif	I considérés comme négatif
Seuil de positivité	62,5 pg/mL (I)	125 pg/mL	5 UA/mL (I)	10 UA/mL	I considérés comme positif	I considérés comme négatif
39 patients (83 sérums)	13 (19)	8 (11)	28 (47)	18 (28)	32 (56)	23 (37)
Sensibilité	33,3 % 95% IC: 21-49%	20,5 % 95% IC: 11-36%	71,8 % 95% IC: 56-83%	46,2 % 95% IC: 32-61%	82,1 % 95% IC: 67-91%	59,00 % 95% IC: 43-73%

SERION (Virion)	Sérologie Ag +		Sérologie Ac +		Combinaison résultats Ag et Ac	
	1,4 UA/mL (I)	2,6 UA/mL	40 UA/mL (I)	100 UA/mL	I considérés comme positif	I considérés comme négatif
39 patients (83 sérums)	7 (9)	6 (8)	20 (35)	11 (19)	26 (44)	16 (25)
Sensibilité	18 % 95% IC: 9-33%	15,4 % 95% IC: 7-30%	51,3 % 95% IC: 36-66%	28,2 % 95% IC: 32-61%	66,7 % 95% IC: 51-79%	41,0 % 95% IC: 27-57%

**Tableau 28 : Performance des sérologies *Candida* en combinant les 2 tests Ag et Ac en fonction des espèces de *Candida* détectées par la technique PLATELIA® ou VIRION®**

Les résultats entre parenthèse représentent le nombre de sérums positifs ou négatifs.

La valeur en italique correspond au pourcentage de positivité.

Espèces	Combinaison résultats Ag et Ac PLATELIA®		Combinaison résultats Ag et Ac VIRION®		Patients (échantillons)
	+	-	+	-	Total
<i>C. albicans</i>	18 (34) <i>75 %</i>	6 (20)	13 (25) <i>54 %</i>	11 (29)	24 (54)
<i>C. parapsilosis</i>	5 (6) <i>83 %</i>	1 (1)	5 (6) <i>83 %</i>	1 (1)	6 (7)
<i>C. glabrata</i>	2 (3) <i>100 %</i>		2 (3) <i>100 %</i>		2 (3)
<i>C. tropicalis</i>	3 (6) <i>100 %</i>		2 (4) <i>100 %</i>	1 (2)	3 (6)
<i>C. lusitaniae</i>	1 (3) <i>100 %</i>		1 (2) <i>100 %</i>	0 (1)	1 (3)
<i>C. dubliniensis</i>	1 (1) <i>100 %</i>	(1)	1 (1) <i>100 %</i>	(1)	1 (2)

Les patients 32 et 33 pour lesquels une association de levures étaient isolées, n'ont pas été inclus dans ces résultats. Pour le premier une association de *C. albicans* et *C. glabrata* était retrouvée dans les hémocultures. Pour le second plusieurs hémocultures étaient positives à *C. parapsilosis* mais un autre flacon d'hémoculture détectait *C. guilliermondii* pouvant entraîner une interférence.

## V. Discussion

### 1. Données épidémiologiques

La population de notre étude révèle une nette prédominance de patients masculins (26 patients sur les 39 soit 67%) et est âgée en moyenne de 58 ans. Ces données sont retrouvées dans la plupart des études sur les candidémies (1). En France, l'ODL en Ile-de-France décrit des chiffres similaires avec une moyenne d'âge de 60 ans et 60% d'hommes (42).

Les causes de prédominance masculine ne sont pas encore clairement identifiées mais l'incidence plus importante des hémopathies et cancers gastro-intestinaux chez l'homme pourrait expliquer cette répartition (37).

De façon attendue, les services les plus touchés par les épisodes de candidémies dans notre CHU sont les principaux services accueillant les patients à risque : les services de réanimation médicale et chirurgicale (43 %) et d'hémato-oncologie (21%), comme illustré dans de nombreuses publications scientifiques (36,47,176,177). Selon les dernières données de l'ODL, 40 % des candidémies survenaient chez des patients hospitalisés en réanimation et 17 % chez des patients ayant une hémopathie (42).

Les principaux facteurs favorisant la survenue de ces infections candidosiques sont aujourd'hui bien connus ; ils sont liés à certaines populations de patients (âges extrêmes, hémopathies malignes, cancers...) ou à des conduites thérapeutiques (traitement médicamenteux, mise en place d'un matériel étranger) (177).

Pour mettre en évidence les différents facteurs de risque présents dans notre population, nous sommes donc basés sur ceux déjà identifiés dans les études.

Toutefois la lymphopénie présente chez un grand nombre de patients de notre population (69 %) n'est pas décrite dans la littérature comme facteur de risque. Son étiologie pouvait être multifactorielle dans la population étudiée : hémopathies lymphoïdes, insuffisance rénale chronique, traitements immunosuppresseurs, infection par le VIH.... De plus cette lymphopénie est aussi décrite chez les patients de réanimation dans le choc septique ou après un traumatisme grave. Une étude récente française présentée au 42<sup>ème</sup> congrès de SRLF démontre néanmoins l'association entre profondeur et persistance d'une lymphopénie et la survenue d'infections nosocomiales dans les jours qui suivent (178).

L'immunité innée est le mécanisme protecteur prédominant contre les CI par une réponse inflammatoire faisant intervenir principalement les PNN. La neutropénie retrouvée chez 28 % de nos patients est donc un facteur de risque majeur. Néanmoins l'immunité cellulaire, en



particulier les cellules T CD4+ jouent aussi un rôle de défense contre ces infections invasives par *C. albicans* (33). Par ailleurs 3 patients VIH positif (7,7 %) étaient inclus dans notre étude. A noter que le VIH n'est pas toujours identifié comme facteur de risque et les patients VIH au stade SIDA sont généralement peu représentés dans les différentes études (36,179).

Les autres facteurs de risque prédominants retrouvés sont l'existence d'un cathéter veineux central (56 %), et l'antibiothérapie large spectre récente (38,5 %), deux facteurs également prépondérants dans d'autres études (36).

Cependant de nombreux facteurs de risque n'ont pu être analysés pour les patients de cette étude pouvant ainsi constituer un biais dans l'analyse. En effet, la colonisation qui est un facteur de risque majeur n'a pas pu être appréciée puisque seulement 3 cartographies mycologiques avaient été prescrites. De plus certaines données sont difficiles à recueillir de façon rétrospective et concernent notamment la présence d'une ventilation mécanique, d'une nutrition parentérale ou d'un sondage urinaire ou encore certains traitements suivis par les patients (immunosuppresseurs, corticoïdes...). Certains traitements antibiotiques ou immunosuppresseurs ont pu être identifiés comme facteurs de risque présents dans la population seulement si un dosage de celui-ci avait été réalisé au laboratoire de pharmacologie-toxicologie.

## 2. Données mycologiques

L'ensemble des levures provenant des hémocultures sont identifiées au laboratoire par galerie (ID32C<sup>®</sup>, Biomérieux) reposant sur des données phénotypiques. Cette identification est performante pour les espèces les plus fréquentes et permet aussi la différenciation entre *C. albicans* et *C. dubliniensis*. Cependant elle peut être prise en défaut pour des espèces proches appartenant à un même complexe d'espèces comme c'est le cas pour le complexe « *C. parapsilosis* » et le complexe « *C. glabrata* » ou pour certaines espèces rares. Les souches mal identifiées par la galerie sont confirmées par biologie moléculaire.

*C. albicans* est l'espèce majoritaire représentant plus de 60 % des souches isolées des patients de notre étude et *C. parapsilosis*, *C. glabrata* et *C. tropicalis* sont les 3 espèces de *Candida* non *albicans* les plus fréquentes. Ceci est en accord avec les données de la littérature des diverses études internationales, nationales, régionales ou encore monocentriques (37). Des différences notables au sein des espèces non *albicans* sont toutefois observées :

- *C. krusei* qui occupe généralement la 5<sup>ème</sup> place est absente ici.

- *C. parapsilosis* occupe la deuxième place par ordre de fréquence dans notre étude (17 %), alors que dans de nombreuses études cette place est habituellement réservée à *C. glabrata* (2,36,179,180). Néanmoins dans quelques études en Espagne ou encore en Italie ces données ont également été retrouvées (37).
- Les candidémies à *C. glabrata* touchent des sujets plutôt jeunes dans notre étude (62 ans, 49 ans et 25 ans) et aucun cas n'est retrouvé dans les services d'hématologie, alors que cette espèce est habituellement décrite chez les patients atteints d'hémopathies malignes (181) ou encore chez les sujets de plus de 80 ans (37).

Ces variations peuvent être expliquées par plusieurs raisons :

- Tout d'abord pendant la période étudiée de 2 ans certains patients ne possédant pas de sérums aux alentours de l'épisode de candidémie ont été exclus, ce qui peut constituer un biais dans ces chiffres.
- Il peut aussi exister une variation épidémiologique significative entre les différents centres comparés à cause d'une disparité d'organisation qui influe sur la provenance des patients concernés par l'étude. En effet le type de service est un facteur influençant l'épidémiologie des *Candida* de façon notable. Ainsi une plus forte proportion de *C. parapsilosis* est habituellement retrouvée chez les patients de réanimation et est habituellement associée à la colonisation des cathéters veineux centraux alors que les autres espèces rares sont plus souvent retrouvées en hématologie.

Il serait donc intéressant d'étudier la répartition locale des différentes espèces au CHU de Nancy à plus grande échelle et sur plusieurs années pour confirmer ces résultats afin de vérifier l'absence d'émergence de *C. glabrata* qui est normalement décrite (1).

De plus, la présence d'espèces rares est observée au sein des souches isolées de la population étudiée, notamment *C. guillermondii* (3 %), *C. lusitaniae* (3 %) ou *C. dubliniensis* (2 %). Concernant *C. dubliniensis*, sa prévalence est semblable avec les données publiées (1 à 3 %) (1).

Seule une vraie association de levures composée de *C. albicans* et de *C. glabrata* était observée (2,6 %), ce qui est aussi concordant avec la littérature où les candidémies mixtes ne dépassent pas 5 % (1). Ces associations ne sont donc pas exceptionnelles et l'utilisation des milieux chromogènes facilite leur détection lors du repiquage des hémocultures.

La proportion de candidémies causées par des souches de *Candida* résistantes ou de sensibilités diminuées aux principaux antifongiques demeure faible dans la population de notre étude, comme ceci est décrit dans l'ensemble des publications européennes (36). Ainsi les souches isolées présentant des CMI élevées aux azolés concernaient les espèces *non albicans* dont principalement *C. glabrata* espèce naturellement de moindre sensibilité au fluconazole et à l'itraconazole. Seul un *C. albicans* sur les 25 isolés était résistant au 5-FC. L'émergence de souches de *C. parapsilosis* résistantes au fluconazole rapportée en France par le CNRMA (45) n'est pas observée.

### **3. Place des hémocultures dans le diagnostic des candidoses invasives**

Les examens de référence pour le diagnostic des CI restent toujours les hémocultures ou bien les cultures tissulaires positives ; cependant les prélèvements profonds et invasifs de tissus sont rarement réalisables (3,67,82). D'après les recommandations actuelles, l'isolement de *Candida* dans une seule hémoculture suffit pour débiter un traitement antifongique (6,158).

Dans cette étude nous avons voulu évaluer par ailleurs les performances des flacons d'hémocultures conventionnels (Bactec Plus Aerobic/F<sup>®</sup> et Bactec Plus Anaerobic/F<sup>®</sup>) classiquement utilisés au CHU de Nancy et du système de détection Bactec 9240<sup>®</sup> (Becton-Dickinson) dans le diagnostic des fongémies à *Candida* en exploitant les données recueillies grâce au système informatique du laboratoire.

Plusieurs limites des hémocultures pour le diagnostic des candidoses systémiques largement décrites dans la littérature ont été observées dans cette étude.

- **La faible sensibilité**

En effet, cette moindre sensibilité des hémocultures pour le diagnostic des candidémies a bien été mise en évidence dans cette étude. Pour chaque patient nous avons relevé le nombre d'hémocultures qui restaient négatives à proximité de la date de positivité de la première hémoculture. Sur les 39 patients inclus dans l'étude, 31 avaient au moins une hémoculture négative prélevée soit avant la date de l'hémoculture positive ou dans les jours qui suivent (pour 5 patients seulement une paire d'hémoculture avait été prélevée et pour 3 autres tous les flacons étaient positifs). Dans la majorité des cas (57 %), un seul flacon était positif. Bien que le nombre d'hémocultures négatives varie selon les patients, ces résultats démontrent bien le manque de sensibilité de cet examen.

Seuls les flacons aérobie ont permis la détection des levures dans notre étude, hormis pour *C. glabrata* où des flacons anaérobies étaient positifs.

Même si les automates d'hémocultures ont largement contribué à améliorer la sensibilité de détection des levures dans le sang (88), les hémocultures restent encore négatives dans approximativement 50 % des cas de candidoses disséminées ou des candidoses hépatospléniques prouvées à l'autopsie (182).

La sensibilité des hémocultures dépend de l'espèce de *Candida*, des milieux utilisés et de l'automate d'hémocultures, la détection est particulièrement moins bonne pour *C. glabrata* si les flacons spécifiques pour la mycologie ne sont pas utilisés (84). L'utilisation d'antifongiques en traitement prophylactique ou empirique peut encore réduire la sensibilité de cet examen (183).

Plusieurs explications ont été suggérées afin d'éclairer cette sensibilité inadéquate (67) :

- La courte durée de la candidémie avec une présence transitoire de levures dans la circulation sanguine ;
- La faible quantité de levures circulantes.

Par conséquent le volume de sang prélevé et cultivé est critique. Ainsi les dernières recommandations européennes préconisent de prélever pour un adulte 40 à 60 mL de sang sur une période de 30 minutes puis de le diviser en aliquotes de 10 mL afin d'ensemencer 3 flacons aérobie et 3 flacons anaérobies (3) ;

- La capture de *Candida* dans la circulation par les leucocytes. Ainsi la méthode de lyse des globules blancs suivie d'une centrifugation auparavant utilisée permettait d'améliorer la sensibilité de détection (83).

La principale limite de cette étude est l'absence de données concernant les délais de transports puis d'incubation des hémocultures après leur arrivée au laboratoire pouvant interférer dans ces délais de détection. Ces données sont en effet difficiles à recueillir dans les études rétrospectives. Ceci pourrait expliquer par exemple le délai d'incubation inhabituel de 7 jours pour *C. albicans* retrouvé chez un patient.

- **Délai important de détection**

Le délai de positivité moyen des hémocultures était de 2,33 jours avec une médiane de 2 jours toutes espèces confondues. Notre étude montrait aussi des différences de temps de détection en fonction des espèces de *Candida*.

*C. glabrata* nécessitait une incubation considérablement plus importante que les autres espèces avec une médiane de 3 jours et un temps de détection maximal de 4 jours. Des différences de temps de détection étaient aussi paradoxalement constatées pour cette espèce en fonction de la nature du flacon d'hémoculture. Ainsi les flacons aérobies restaient souvent négatifs ou les délais d'incubation étaient plus longs en aérobiose (3 ou 4 jours) qu'en anaérobiose (1, 2 ou 3 jours).

Ces résultats concordaient néanmoins avec ceux rapportés dans la littérature. Ainsi les études *in vitro* de Horvath *et al.* suggéraient un temps de détection de croissance plus long pour *C. glabrata* (de 34.03 h  $\pm$  10.59 en anaérobiose et de 106.00 h  $\pm$  18.99 en aérobiose avec les mêmes milieux que les nôtres et le même automate) (89). Leurs études mettaient aussi en évidence l'absence de détection des autres espèces en anaérobiose par le système Bactec<sup>®</sup> contrairement au système BacT/ALERT 3D<sup>®</sup> où des temps de détection étaient quasiment similaires en anaérobiose et aérobiose pour toutes les espèces hormis *C. glabrata*. Les flacons mycologiques ou les milieux en anaérobiose du système BacT/ALERT<sup>®</sup> permettaient de raccourcir considérablement les délais de détection pour *C. glabrata*.

Une autre étude réalisée *in vivo* à partir d'hémocultures provenant de patients décrivait des temps moyens de détection similaires (1,5 j pour *C. albicans* et 3,3 j pour *C. glabrata*) (81).

Ces résultats pourraient suggérer qu'une incubation prolongée (supérieure à 48 heures) augmente considérablement la probabilité d'identifier *C. glabrata* en culture, espèce pour qui le traitement par le fluconazole est inapproprié.

#### **4. Place des sérologies *Candida* dans le diagnostic des candidoses invasives**

##### **4.1. Sensibilité globale des tests**

Individuellement ces deux tests avaient des sensibilités médiocres pour le diagnostic des CI. Avec les niveaux de seuil de positivité indiqués par le fabricant, l'Ag a été détecté chez 8/39 des patients (21 %) et les Ac anti-Mn étaient positifs dans 18/39 cas (46 %). Quand ces tests étaient associés, la sensibilité de détection était de 59 % ; néanmoins celle-ci était de 82 % lorsque les résultats intermédiaires étaient considérés comme positifs. Des meilleures performances diagnostiques étaient ainsi obtenues en utilisant les valeurs intermédiaires de 62,5 pg/mL et 5 UA/mL comme seuils de positivité pour l'Ag Mn et les Ac anti-Mn respectivement.

La recherche d'anticorps anti-*Candida* est plus fréquemment positive que l'antigénémie Mn malgré la présence d'une immunodépression sévère d'étiologies diverses (chimiothérapie myéloablative, traitements immunosuppresseurs...) chez un grand nombre de patients. Toutefois 21 % des résultats des Ac étaient intermédiaires, la réponse humorale est en effet souvent diminuée chez les personnes immunodéprimées.

Comme Sendid *et al.* l'avaient initialement rapporté dans leur étude (7) puis d'autres (8,184), la détection combinée d'Ac et d'Ag dans le sérum a permis d'augmenter de façon considérable la sensibilité de cet examen.

Une revue de la littérature de 14 études principalement rétrospectives sur une période de plus de 10 ans utilisant aussi la méthode ELISA PLATELIA® (Bio-rad) représentant au total 453 patients nous a permis de comparer nos résultats (9). La population étudiée était aussi hétérogène.

La sensibilité moyenne des sérologies *Candida* de toutes ces études était de 62 %, variant de 31 % dans l'étude de Prella *et al.* (184) à 100 % dans l'étude de Sendid *et al.* (185). La sensibilité individuelle du Mn était évaluée à 58 % sur un total de 453 patients sur les 14 études et celle des anti-Mn était de 59 % sur 284 patients sur 10 études. La sensibilité moyenne des tests Ag Mn / Ac anti-Mn combinés était de 83 % variant de 71 à 100 % selon les publications.

Dans la plupart des études les performances diagnostiques des tests étaient aussi comparées aux hémocultures.

La sensibilité trouvée pour l'Ag Mn dans notre travail est beaucoup plus faible que celles rapportées. Hormis cette valeur, les résultats des sensibilités de l'anti-Mn et des tests combinés Mn/anti-Mn sont plutôt concordants avec la littérature.

Les valeurs des seuils de positivité utilisés variaient aussi en fonction des études. Les seuils choisis pour l'Ag étaient en plus supérieurs au nôtre (de 250 à 500 pg/mL). Néanmoins des cut-off raccourcis de 250 pg/mL pour l'Ag et de 5 UA/mL pour l'Ac étaient déjà aussi fréquemment utilisés. Mais aucune étude n'utilisait le seuil intermédiaire de 62,5 ou 125 pg/mL choisis ici. Dans deux études, la sérologie était considérée comme positive si un des deux tests était positif avec des valeurs intermédiaires retrouvées dans deux échantillons différents (186,187).

L'analyse statistique de l'étude de Ellis *et al.* à l'aide de courbe ROC établissait aussi des valeurs de seuils plus faibles que celles recommandées par le fabricant pour les Ag et Ac afin d'améliorer la sensibilité sans perdre de la spécificité (186).

D'après ces résultats, il apparaît évident que la faible sensibilité de l'antigénémie ne permet pas à elle seule de réaliser le diagnostic de CI. Plusieurs explications peuvent justifier ces chiffres.

Tout d'abord cette moindre sensibilité en cas de CI peut s'expliquer par le caractère précoce et très transitoire de l'apparition de l'antigénémie (188). Ces Ag ont une demi-vie courte et ont une élimination hépato-rénale.

De plus, dans notre étude un faible nombre de patients avait réellement un sérum à proximité de la date d'hémoculture positive J0. En effet, sur les 92 sérums collectés seuls 22 étaient prélevés entre J-2 et J+2. De plus, pour la grande majorité un seul sérum (48 %) voire 2 (18 %) étaient disponibles par patient. Ces caractéristiques ont forcément dû réduire la sensibilité du test. Par ailleurs ce test était plus fiable pour les patients qui avaient de multiples sérums. Parmi les 13 patients avec une antigénémie positive, 6 avaient au minimum trois prélèvements à des dates différentes et sur les 7 patients qui avaient au moins 4 sérums, 4 ont eu des sérologies Ag positives.

La modification récente des tests que nous utilisons dans cette analyse (Platelia<sup>®</sup> *Candida* Ag-Plus et Platelia<sup>®</sup> *Candida* Ab-Plus) avec une révision des valeurs de seuil de détection recommandées n'a significativement pas amélioré la sensibilité par rapport aux tests Platelia conventionnels. Lunel *et al.* avaient déjà fait ce constat dans leur étude (189); néanmoins la spécificité de l'Ag avait été réduite à approximativement 50 % avec des faux positifs rapportés chez des patients présentant une candidose superficielle.

La formation de complexes immuns peut aussi empêcher la détection des Ag. Verduyn et son équipe avaient remarqué que les patients non neutropéniques avaient plus fréquemment des Ac positifs que des Ag. Leur hypothèse était que la présence d'Ac facilitait la clairance de l'Ag par formation de complexe immun (190).

Notre population comportait effectivement un grand nombre de patients qui avait des Ac puisque 28 patients avaient une sérologie positive. Des Ac anti-*Candida* étaient détectés dans environ la moitié des sérums analysés (53 % n = 49) et dans 30 % (n = 28) des titres importants étaient trouvés (> 10 UA/mL). De plus seuls 16 % de la population avaient des Ac et des Ag positifs en même temps.

Un prétraitement des échantillons par chauffage à 120°C pendant 6 minutes en présence d'EDTA, permet normalement de libérer les Ag complexés. Cependant cette étape est

critique dans la réalisation de ce test et doit être rigoureusement respectée en température et en temps.

D'autres causes sont également possibles :

- Les traitements antifongiques peuvent entraîner une diminution de l'antigénémie, or cette donnée n'a pas été recherchée pour les différents prélèvements des sérums.
- Nos sérums avaient pu subir plusieurs cycles de congélation-décongélation pour la réalisation des analyses, ce qui a également pu altérer ces Ag.

Par conséquent, le moment au cours de l'infection auquel l'échantillon est prélevé, un échantillon inadéquat, une piètre préparation de l'échantillon ou un mauvais stockage peuvent être responsables d'un résultat négatif.

Pour conclure, la sensibilité est considérablement plus importante en abaissant les seuils de positivité des deux paramètres, permettant ainsi l'identification des patients qui pourraient bénéficier d'un traitement antifongique notamment chez les personnes profondément immunodéprimées.

## **4.2. Sensibilité des différentes espèces**

Dans notre étude les sérologies *Candida* étaient positives avec toutes les espèces de *Candida* isolées (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*), ce qui confirme la réactivité croisée importante entre les Mn des différentes espèces. Les résultats pour *C. guilliermondii* n'ont pas été pris en compte dans cette analyse car le patient avait aussi d'autres hémocultures positives avec *C. parapsilosis*.

Les kits PLATELIA<sup>®</sup> sont préparés à partir d'Ag oligomannosides de *C. albicans* et les Ac EBCA-1 monoclonaux sont produits par l'immunisation de rats par *C. albicans*.

La sensibilité est aussi variable selon l'espèce de *Candida* impliquée comme l'avait déjà observé Sendid (185). Les sensibilités de détection des Mn et anti-Mn pour les infections causées par *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis* étaient globalement en accord avec les résultats rapportés par Sendid (de 75 à 100 %), mais des résultats différents ont été retrouvés pour *C. parapsilosis*. En effet la sensibilité de détection pour cette espèce habituellement rapportée est bien moindre (30 %) alors que dans notre étude elle est estimée à 83 % (5 sur 6 patients ayant une infection à *C. parapsilosis*). Les infections causées par *C. dubliniensis* et *C.*



*lusitaniae* étaient aussi bien détectées par ces tests, la sensibilité vis-à-vis de ces espèces n'a pas été étudiée.

L'épitope ainsi reconnu dans ces tests est présent en grande quantité sur de nombreuses mannoprotéines dans la paroi de *C. albicans* mais aussi de *C. glabrata*, *C. tropicalis*, il est retrouvé à un degré moindre chez les espèces *C. parapsilosis* et *C. krusei*, par conséquent ces espèces devraient être moins bien détectées. Des faibles réactions croisées avec *Geotricum* et *Fusarium* peuvent être possibles, mais ces champignons causent plus rarement des infections invasives (191).

### **4.3. Cinétique des Ag et Ac dans l'infection**

Sendid *et al* avaient initialement observé la complémentarité des deux tests de détection Ag Mn et Ac anti-Mn en étudiant la cinétique de ces deux paramètres (7). Ils démontraient alors que la détection de l'Ag Mn dans le sérum des patients candidosiques était inversement corrélée à la réponse Ac anti-Mn.

Sur les 32 patients dont la sérologie *Candida* était positive, seuls 7 avaient des sérologies Ag et Ac positives en même temps dans seulement 11 sérums. Pour le reste des patients les sérologies Ac ou Ag étaient positives de façon isolée.

Ces observations confirment clairement la disparité entre la circulation de l'Ag Mn et la réponse Ac, ce qui justifie que l'association des deux tests immunoenzymatiques en routine est nécessaire pour le diagnostic de candidose.

Même si cette observation ne s'applique pas dans tous les cas de notre étude, les graphiques des patients 6, 27 et 32 (figure 45, 46 et 48) représentant les cinétiques des Ag et Ac illustrent bien cette bascule entre les taux d'Ag et d'Ac dans le temps. Une antigénémie Mn est ainsi observée en absence d'Ac anti-Mn et réciproquement des taux élevés d'Ac anti-Mn ne sont généralement pas associés à des Ag Mn dans le sérum. Il existe cependant une zone de croisement des cinétiques, sur une période plus ou moins variable, où les Ac et les Ag peuvent être détectés en même temps à des taux fluctuants.

La chronologie d'apparition des Ac et Ag variait en fonction des patients, pour certains l'Ag apparaissait en premier comme pour les patients 2, 27 et 32 (figure 44, 45, 46), pour d'autres patients la réponse Ac était inaugurale (figure 45: patients 6 et 16).

L'étude rétrospective de Yera et son équipe avait montré que cette chronologie dépendait des facteurs prédisposants chez les patients. En règle générale, les patients non neutropéniques

(principalement de chirurgie) présentaient d'abord des taux positifs d'Ac puis d'Ag puis des isolements de *Candida* dans les hémocultures. Inversement, les patients des services d'hématologie avaient tendance à présenter d'abord des taux positifs d'Ag puis d'Ac en fonction de la sortie d'aplasie (8).

Cette chronologie en fonction de la présence ou non d'une neutropénie n'était pas systématique chez nos patients.

#### 4.4. Date du diagnostic des CI

Le deuxième objectif de ce travail était d'analyser la période de détection des Ac et des Ag Mn lors d'une candidémie et de comparer la date de positivité de l'immunodiagnostic à celle des hémocultures. Il est certain que l'absence de prélèvements plus fréquents dans cette étude rétrospective représente une limite pour l'évaluation de l'utilité diagnostique de ces tests. Néanmoins la précocité diagnostique de la sérologie par rapport aux hémocultures a été mise en évidence pour plusieurs patients. Dans 17 cas, la sérologie était clairement positive avant la date de détection de la levure par le Bactec<sup>®</sup>, soit 63 % des patients qui avaient un sérum disponible avant la date de positivité de l'hémoculture. Le nombre et la date des sérums variaient en fonction des patients, il n'était donc pas possible d'établir une moyenne de précocité diagnostique et d'établir les intervalles de temps moyens entre l'observation d'un test sérologique positif et la positivité de l'hémoculture pour la détection d'Ac anti-Mn et de l'Ag Mn. Des Ac étaient néanmoins détectables dans le sérum jusqu'à 18 jours avant l'épisode de candidémie, et des Ag ont été mis en évidence jusqu'à 13 jours avant. Une majorité d'Ag était positive aux alentours de la candidémie (3 à J+1 et 2 à J+2).

Des taux d'Ag supérieurs à 500 pg/mL à J+1 et J+2 pour les patients 28, 29 et 33 (figure 47) ont été observés, ce qui présume que les Ag étaient déjà positifs à des dates antérieures.

De plus pour le patient 23 la sérologie Ag était positive à J+3 à des titres élevés (C = 201 pg/mL) (figure 46). A la date de détection de la levure (J+1), du prélèvement de l'hémoculture (J0), voire même probablement avant, l'antigénémie était déjà sans doute détectable et aurait permis un diagnostic plus précoce. Il en est de même pour le patient 3 (figure 44) dont les Ac étaient supérieurs à 80 UA/mL à J+3. Pour le patient 24 (figure 48) à J+1 les résultats de sérologie Ag sont négatifs, mais toutefois une concentration non négligeable à 40 pg/mL était retrouvée. On peut alors imaginer que l'on se trouve dans la phase de décroissance de l'antigénémie à J+1 et que la valeur était bien positive avant J0.

La cinétique des taux d'Ag et d'Ac pour le patient 32 est intéressante (figure 48). On observe en effet pour ce patient un léger pic à J-8 pour les Ag avec toutefois des résultats intermédiaires, puis les taux diminuent progressivement. En considérant les recommandations du fabricant pour les seuils de positivité, les sérologies Ag auraient été rendues négatives aux alentours de J-8. Or ce patient est profondément immunodéprimé (PNN = 0 G/L), ce qui explique les faibles valeurs obtenues. Par ailleurs la réponse Ac est beaucoup plus tardive comme l'avait remarqué Yera dans son étude, elle est également peu importante (C = 7, 38 UA/mL). Cet exemple illustre donc l'importance de réaliser régulièrement des sérologies *Candida* afin de suivre la cinétique et d'interpréter les résultats lors d'une suspicion d'infection fongique à *Candida*, notamment lors d'une fièvre résistante aux antibiotiques, en particulier chez une personne profondément immunodéprimée.

En considérant le taux de mortalité encore important associé aux infections profondes à *Candida* (28 à 59 %) (40), le pronostic aurait pu être amélioré pour ces patients par un diagnostic plus précoce et l'initiation rapide d'un traitement antifongique.

Cette précocité du diagnostic a été rapportée dans 5 études aussi bien chez des patients provenant des services d'hématologie que de réanimation (8,184,185,187,190). Dans l'étude de Yera chez 73 % des 45 patients présentant une candidémie au moins un des deux tests était positif en moyenne 6 jours pour l'Ag Mn et 7 jours pour les Ac anti-Mn avant l'isolement du *Candida* dans l'hémoculture. Cette découverte a été confirmée dans une autre étude de 63 patients (185), cette précocité des sérologies était mise en évidence chez 60 % des patients qui avaient un sérum disponible avant la date de prélèvement des hémocultures ; la positivité était majorée à 85 % lorsque le sérum était prélevé le même jour que l'hémoculture positive. De même dans une étude récente chez des patients subissant une chimiothérapie, les tests étaient positifs jusqu'à 23 jours plus tôt que la culture pour les Ac et en moyenne un jour pour l'Ag (190).

## **5. Comparaison du kit PLATELIA<sup>®</sup> au kit SERION<sup>®</sup>**

Dans notre étude, nous avons seulement recherché les IgG anti-*Candida*. Il ne nous a pas semblé pertinent de rechercher les autres isotypes même si l'intérêt de la mise en évidence des IgM anti-*Candida* a déjà été rapporté dans la précocité du diagnostic des candidoses profondes dans une étude (192). L'étude cinétique de Aubert a en effet montré que les

différents isotypes apparaissaient le plus souvent simultanément (175). De plus dans l'enquête ANOFEL aucun laboratoire n'a répondu réaliser la recherche des IgM et IgA.

### 5.1. Performance

Les kits SERION<sup>®</sup> ont aussi été évalués pour le diagnostic des infections candidosiques invasives dans cette étude. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus par la méthode PLATELIA<sup>®</sup>.

Quatre-vingt trois sérums provenant des 39 patients différents ont été testés en parallèle par les deux kits. En utilisant les tests SERION<sup>®</sup> l'Ag *Candida* et les Ac anti-*Candida* ont été détectés chez 7/39 (18 %) et 20/39 (51,3 %) des patients infectés en considérant les résultats intermédiaires comme positifs. La combinaison des deux tests a aussi permis d'augmenter de façon conséquente le nombre de patients positifs à 26/39 (66,7 %).

Le kit SERION<sup>®</sup> était donc sensiblement moins performant à la fois pour la détection des Ag et des Ac dans notre étude, néanmoins les Ag et les IgG étaient positifs avec toutes les espèces de *Candida* isolées, ce qui confirme aussi la réactivité croisée importante entre les Mn des différentes espèces comme cela avait été déjà observée avec le kit PLATELIA<sup>®</sup>. La concordance entre les deux techniques était de 87 % pour l'antigénémie et de 76 % pour la sérologie Ac.

Seulement deux d'études utilisant le kit SERION<sup>®</sup> pour la détection des Ac et Ag *Candida* ont été publiées dans la littérature.

La première suivait des patients neutropéniques recevant une chimiothérapie avec des CI prouvées et a comparé l'utilisation de ces deux tests et des  $\beta$ -DG. En utilisant les tests SERION<sup>®</sup> les Ag Mn et les Ac anti-Mn *Candida* étaient détectés chez 15/21 (71%) et 9/21 (43%) des patients. Dans le groupe des patients dont la neutropénie était inférieure à 15 jours la concordance des résultats entre ce test et le test PLATELIA<sup>®</sup> était de 85 %, quand la neutropénie était supérieure à 15 jours elle était de 93 %. La corrélation était aussi élevée pour les Ac. Cependant la discrimination entre les patients infectés et non infectés était inférieure à celle du test PLATELIA<sup>®</sup> (193). La seconde étude retrospective récente réalisée au CHU de Grenoble avait rapporté une sensibilité de 77 %.

Même si les performances trouvées dans ces publications sont relativement correctes elles sont loin de la sensibilité supérieure à 99 % annoncée par le fournisseur (194).

## 5.2. Analyse des discordances

Les Ac étaient moins bien détectés avec ce kit comparé à PLATELIA<sup>®</sup>. En effet, de nombreux résultats trouvés précédemment positifs donnent des résultats intermédiaires (8 échantillons) voire même négatifs pour 2 sérums. De la même façon 8 résultats intermédiaires deviennent négatifs avec ce kit.

L'hypothèse proposée est la différence de dilution réalisée dans ces tests. Les kits PLATELIA<sup>®</sup> pratiquent des dilutions sériques au 1/400. Ils présenteraient toutefois beaucoup de faux positifs chez les témoins et les patients à risque sans colonisation (195). Les kits SERION<sup>®</sup> préconisent des dilutions plus importantes de l'ordre du 1/1000 et d'après la notice le seuil a été établi de telle sorte que 90 % des donneurs obtiennent un résultat négatif ou douteux. La spécificité n'a cependant pas été évaluée dans notre étude.

Or dans nos travaux tous les patients sont infectés de façon certaine. Même si des Ac sont détectés bien avant la candidémie pour certains patients, ils reflètent vraisemblablement une colonisation intense qui est un facteur de risque majeur de développer une CI. Ceci conforte l'intérêt de réaliser une surveillance de la cinétique chez les patients à risque.

Une autre hypothèse serait que les Ac détectés par PLATELIA<sup>®</sup> soient en majorité des IgM, ce qui expliquerait que ces tests deviennent négatifs avec SERION<sup>®</sup>.

De la même façon les résultats des Ag trouvés précédemment intermédiaires étaient négatifs en SERION<sup>®</sup> chez 8 patients. De plus, deux discordances majeures ont été retrouvées : des Ag très fortement positifs en PLATELIA<sup>®</sup> étaient complètement négatifs en SERION<sup>®</sup> à J+8 et J+11. Il pourrait très bien s'agir aussi de résultats faussement positifs en PLATELIA<sup>®</sup>. Des interférences avec des molécules plasmatiques présentes dans les liquides de remplissage souvent utilisés en réanimation sont en effet rapportées dans la notice. Un des deux patients était par ailleurs hospitalisé en réanimation.

## Conclusion

Les sérologies *Candida* sont des analyses peu demandées au laboratoire de mycologie du CHU de Nancy, ce qui implique la réalisation de ces tests en série seulement une fois par semaine.

Elles figurent le plus souvent dans des bilans systématiques de protocoles de greffe hépatique ou cardiaque. Mais nous avons pu constater une inadéquation entre les prescriptions, les populations à risque et les candidémies avérées. Cette analyse est assez méconnue des cliniciens, et ses performances sont sous-évaluées. Des interventions auprès des médecins dans ces services seraient nécessaires afin de faire un rappel sur ces infections dont l'incidence n'est pas négligeable et de présenter les différents tests alternatifs aux hémocultures. L'augmentation des demandes impliquerait aussi au sein de notre laboratoire une réalisation plus fréquente de ces tests pour répondre au besoin notamment en termes de précocité diagnostique.

La faible sensibilité et le long délai de détection des hémocultures ont été confirmés.

La détection de l'Ag Mn et des Ac anti-Mn lors d'une candidémie a montré de bons résultats lorsque ces deux tests étaient utilisés en association, en accord avec les études précédentes.

La précocité du diagnostic par rapport aux hémocultures a été démontrée pour plusieurs patients.

Les performances de la détection des Ac et des Ag dans les sérums sont liées à la fréquence des tests réalisés chez les patients ; afin d'augmenter la sensibilité et la précocité de la positivité du test, un suivi régulier des patient à risque est important.

Néanmoins, la présence d'Ac anti-*Candida* chez les patients suspects de candidose systémique n'est pas d'interprétation facile du fait de leur présence possible chez des porteurs sains. Elle ne permet pas toujours de différencier infection et colonisation intense, mais cette dernière est un facteur de risque majeur de CI. Il serait nécessaire par ailleurs d'évaluer la spécificité du kit PLATELIA<sup>®</sup> dans une autre étude chez des patients sains et colonisés hospitalisés.

Le deuxième kit évalué n'a pas montré d'avantage, les performances étaient inférieures au kit actuellement utilisé au CHU de Nancy.

Malgré la petite taille de cette étude rétrospective, ces observations suggèrent que l'Ag Mn et les Ac anti-Mn puissent être utiles pour le diagnostic précoce des CI chez les patients à risque, en particulier lorsque les cultures sont négatives ou que l'histopathologie n'est pas réalisable. La simplicité, la standardisation et le coût abordable des tests représentent les avantages majeurs de cette approche diagnostique.

Des études prospectives seraient nécessaires pour déterminer l'impact d'une sérologie positive sur la prise en charge et le devenir des patients à risque de CI.

## Annexe

### ENQUÊTE SUR LA PRESCRIPTION DES SEROLOGIES *CANDIDA* AU

#### CHU DE NANCY

**Service :**

**Statut :**

Dans quelle(s) indication(s) prescrivez-vous une sérologie *Candida* ?

- Pré-greffe
- Post-greffe
- Fièvre résistante aux ATB
- Prélèvement invasif impossible
- Surveillance des patients à risque
- Patient avec un index de colonisation élevé
- Suivi thérapeutique
- Autre ....

Quelles informations souhaitez-vous recueillir lorsque vous prescrivez une sérologie *Candida* ?

- Mise en évidence d'une colonisation
- Diagnostic précoce pour mettre en route un traitement préemptif
- Diagnostic de certitude d'une candidose invasive
- Diagnostic d'un épisode à la phase aiguë
- Diagnostic rétrospectif
- Diagnostic d'une infection fongique d'évolution chronique
- Suivi de la cinétique du taux d'Ac

Quels types de patients ciblez-vous ?

- Soins intensifs
- Immunodéprimés
- Grands-brûlés
- Chirurgie digestive
- Onco / hématologie
- Autre ...



Souhaitez-vous une recherche Ag et / ou Ac ?

- Ag
- Ac
- Ag et Ac

A quelle fréquence réalisez-vous les prélèvements sanguins?

- Une seule fois
- Une fois par semaine
- Deux fois par semaine
- Autre ...

Comment interprétez-vous le résultat d'une sérologie positive?

- Colonisation
- Infection aiguë
- Foyer fongique profond
- Séroconversion
- Autre ...

Quelle stratégie adoptez-vous lors d'une sérologie négative ?

- Arrêt du traitement prophylactique ou pré-emptif
- Arrêt de la surveillance microbiologique
- Poursuite de la surveillance microbiologique
- Prescription d'une nouvelle sérologie
- Arrêt de prescription des sérologies
- Autre ...

Quelle conduite adoptez-vous lors d'une sérologie positive ?

- Introduction d'un traitement pré-emptif
- Réalisation d'une surveillance microbiologique
- Prescription d'une nouvelle sérologie
- Arrêt de prescription des sérologies
- Autre ...

Prescrivez- vous d'autres examens associés à la sérologie?

- Hémoculture
- $\beta$ -D glucanes
- Index de colonisation
- Biologie moléculaire
- Autre ...

## Bibliographie

1. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol.* mars 2014;31(1):42-8.
2. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev.* janv 2007;20(1):133-63.
3. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:9-18.
4. Halkic N, Ksontini R. Images in clinical medicine. Hepatosplenic candidiasis. *N Engl J Med.* 25 janv 2007;356(4):4.
5. Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:53-67.
6. Ullmann AJ, Cornely OA, Donnelly JP, Akova M, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: developing European guidelines in clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:1-8.
7. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol.* mai 1999;37(5):1510-7.
8. Yera H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* déc 2001;20(12):864-70.
9. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care.* 2010;14(6):R222.
10. Koenig H. *Guide de Mycologie Médicale.* Ellipses. Paris; 1995. 284 p.
11. Ripert C. *Mycologie médicale.* Tec & doc-Lavoisier. Paris; 2013. 690 p.
12. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell.* sept 2011;10(9):1173-82.
13. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* juill 2004;12(7):317-24.

14. Chabasse D, Bouchara J-P, Contet-Audonnet N, Basile A-M. Moisissures, dermatophytes, levures: du prélèvement au diagnostic. Biomérieux. Marcy-l'Etoile, France; 2008. 190 p.
15. Chabasse D, Guiguen C, Contet-Audonnet N. Mycologie médicale. Masson. Paris; 1999. 319 p.
16. Bouchara J-P, Pihet M, De Gentile L, Cimon B, Chabasse D. Les levures et levuroses. Bioforma. Paris; 2010. 200 p.
17. Develoux M, Bretagne S. Candidoses et levuroses diverses. EMC - Mal Infect. sept 2005;2(3):119-39.
18. Eggimann P, Pittet D. Candidémie et candidose généralisée. EMC - Anesth-Réanimation. janv 2010;7(1):1-25.
19. Nucci M, Anaissie E. Revisiting the Source of Candidemia: Skin or Gut? Clin Infect Dis. déc 2001;33(12):1959-67.
20. Dromer F, Lortholary O. Les Mycoses. Elsevier. Paris; 2003. 236 p.
21. Delaloye J, Calandra T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. Virulence. janv 2014;5(1):161-9.
22. Eggimann P, Pittet D. Candidoses en réanimation. Réanimation. mai 2002;11(3):209-21.
23. Soll DR. Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. Acta Trop. févr 2002;81(2):101-10.
24. Poulain D. Candida albicans, plasticité et pathogénie. Rev Francoph Lab. mars 2013;2013(450):37-46.
25. Kumamoto CA, Vines MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to Candida albicans virulence. Cell Microbiol. nov 2005;7(11):1546-54.
26. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of Candida albicans. Trends Microbiol. juill 2001;9(7):327-35.
27. Douglas LJ. Candida biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. janv 2003;11(1):30-6.
28. Jouault T, Sarazin A, Martinez-Esparza M, Fradin C, Sendid B, Poulain D. Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by Candida albicans. Cell Microbiol. juill 2009;11(7):1007-15.
29. Romani L. Immunity to Candida albicans: Th1, Th2 cells and beyond. Curr Opin Microbiol. août 1999;2(4):363-7.
30. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Puccetti P, Bistoni F. Neutrophils and the adaptive immune response to Candida albicans. Res Immunol. 1996;147(8):512-8.

31. Casadevall A. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect Immun.* janv 1995;63(11):4211-8.
32. Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. *Br J Haematol.* juin 2005;129(5):569-82.
33. Romani L. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. *J Leukoc Biol.* janv 2000;68(2):175-9.
34. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2011;55(2):561-6.
35. Wenzel RP, Edmond MB. The impact of hospital-acquired bloodstream infections. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(2):174-7.
36. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. *Candidaemia* in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* mai 2006;27(5):359-66.
37. Toubas D. Epidémiologie des candidoses invasives. *Rev Francoph Lab.* mars 2013;2013(450):27-36.
38. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1990-May 1999, Issued June 1999. *Am J Infect Control.* déc 1999;27(6):520-32.
39. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 17 avr 2003;348(16):1546-54.
40. Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses.* mai 2009;52(3):197-205.
41. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* sept 2010;51(5):561-70.
42. Grillot R. Numéro thématique Mycoses invasives en France: épidémiologie, enjeux diagnostiques et thérapeutiques. *BÉH - Bull Épidémiologique Hebd.* avr 2013;2013(12-13):107-28.
43. Arendrup MC. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J.* nov 2013;60(11):B4698.
44. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagn Microbiol Infect Dis.* nov 2010;68(3):278-83.

45. Centre National de Référence des Mycoses Invasives et des Antifongiques, rapport d'activité 2013 [En ligne]. (consulté le 21 janv 2015). Disponible sur: <http://www.pasteur.fr/ip/resource/filecenter/document/01s-000057001/rapactcnrma2013.pdf>
46. Caggiano G, Iatta R, Laneve A, Manca F, Montagna MT. Observational study on candidaemia at a university hospital in southern Italy from 1998 to 2004. *Mycoses*. 2008;51(2):123-8.
47. Leroy O, Gangneux J-P, Montravers P, Mira J-P, Gouin F, Sollet J-P, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med*. mai 2009;37(5):1612-8.
48. Moran C, Grussemeyer CA, Spalding JR, Benjamin Jr. DK, Reed SD. Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with *Candida glabrata* and *Candida albicans* bloodstream infections. *Am J Infect Control*. févr 2010;38(1):78-80.
49. Alanio A, Renaudat C, Bretagne S. Épidémiologie de la résistance des champignons : impact de nos prescriptions d'antifongiques. *J Anti-Infect*. mars 2014;16(1):2-7.
50. Fournier P, Schwebel C, Maubon D, Vesin A, Lebeau B, Foroni L, et al. Antifungal use influences *Candida* species distribution and susceptibility in the intensive care unit. *J Antimicrob Chemother*. déc 2011;66(12):2880-6.
51. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg*. déc 1994;220(6):751-8.
52. Eggimann P, Pittet D. *Candida* colonization index and subsequent infection in critically ill surgical patients: 20 years later. *Intensive Care Med*. 2014;40(10):1429-48.
53. Dubau B, Triboulet C, Winnock S. Utilisation pratique de l'index de colonisation. *Ann Fr Anesth Réanimation*. avr 2001;20(4):418-20.
54. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Alvarez-Lerma F, et al. A bedside scoring system (« *Candida* score ») for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Crit Care Med*. mars 2006;34(3):730-7.
55. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Galván B, Blanco A, Castro C, et al. Usefulness of the « *Candida* score » for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: a prospective multicenter study. *Crit Care Med*. mai 2009;37(5):1624-33.
56. Eggimann P, Pittet D. Candidoses du sujet non neutropénique : de la colonisation à l'infection. *Ann Fr Anesth Réanimation*. avr 2001;20(4):382-8.
57. Association française des enseignants de parasitologie. 2010. ANOFEL 4: banques d'images numériques [Cédérom]. Angers

58. Lefort A, Chartier L, Sendid B, Wolff M, Mainardi J-L, Podglajen I, et al. Diagnosis, management and outcome of Candida endocarditis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* avr 2012;18(4):E99-109.
59. Fisher JF. Candida Urinary Tract Infections: Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment: Executive Summary. *Clin Infect Dis.* mai 2011;52(suppl 6):S429-32.
60. Fraisse T, Lachaud L, Sotto A, Lavigne J-P, Cariou G, Boiteux J-P, et al. Recommandations du comité d'infectiologie de l'AFU. Diagnostic, traitement et suivi des candiduries. *Prog En Urol.* mai 2011;21(5):314-21.
61. Sellami A, Sellami H, Makni F, Bahloul M, Cheikh-Rouhou F, Bouaziz M, et al. La candidurie en milieu de réanimation : signification et intérêt de la numération des levures dans les urines. *Ann Fr Anesth Réanimation.* juin 2006;25(6):584-8.
62. Pihet M, Marot A. Diagnostic biologique des candidoses. *Rev Francoph Lab.* mars 2013;2013(450):47-61.
63. Brun S, Bouchara J-P, Chabasse D. Diagnostic au laboratoire des mycoses profondes. *Rev Fr Lab.* janv 2004;2004(359):33-8.
64. Kauffmann-Lacroix C, Albouy-Llaty M, Migeot V, Contet-Audonnet N. Enquête sur les conditions analytiques d'un examen de mycologie médicale auprès des membres de la Société française de mycologie médicale. *J Mycol Médicale J Med Mycol.* sept 2011;21(3):159-68.
65. Chabasse D, Contet-Audonnet N. Examen direct et place de l'histologie en mycologie. *Rev Fr Lab.* nov 2003;2003(357):49-54.
66. Michel-Nguyen A, Favel A, Regli P. Identification des levures au laboratoire: Comment allier performance et simplicité. *Feuill Biol.* 2002;43(245):41-52.
67. Pemán J, Zaragoza R. Current diagnostic approaches to invasive candidiasis in critical care settings. *Mycoses.* sept 2010;53(5):424-33.
68. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. *J Clin Microbiol.* août 1994;32(8):1923-9.
69. Gaschet A, L'Ollivier C, Laplanche A, Vagner O, Dalle F, Cuisenier B, et al. Evaluation of CandiSelect4, a new chromogenic medium for isolation and presumptive identification of Candida species from clinical specimens. *J Mycol Médicale J Med Mycol.* juin 2008;18(2):89-95.
70. Willinger B, Hillowoth C, Selitsch B, Manafi M. Performance of Candida ID, a New Chromogenic Medium for Presumptive Identification of Candida Species, in Comparison to CHROMagar Candida. *J Clin Microbiol.* janv 2001;39(10):3793-5.
71. Perry J d., Freydière A m. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *J Appl Microbiol.* 2007;103(6):2046-55.

72. Pincus DH, Orenge S, Chatellier S. Yeast identification f past, present, and future methods. *Med Mycol.* janv 2007;45(2):97-121.
73. Letscher-Bru V, Meyer M-H, Galois A-C, Waller J, Candolfi E. Prospective Evaluation of the New Chromogenic Medium Candida ID, in Comparison with Candiselect, for Isolation of Molds and Isolation and Presumptive Identification of Yeast Species. *J Clin Microbiol.* janv 2002;40(4):1508-10.
74. Resumes des conferences et des communications du Congres de la Societe Francaise de Mycologie Medicale, Nancy, 9-11 Mai 2007. *J Mycol Médicale J Med Mycol.* sept 2007;17(3):202-39.
75. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol.* janv 1996;34(1):58-61.
76. Jabra-Rizk MA, Brenner TM, Romagnoli M, Baqui A a. MA, Merz WG, Falkler WA, et al. Evaluation of a Reformulated CHROMagar Candida. *J Clin Microbiol.* janv 2001;39(5):2015-6.
77. Powell HL, Sand CA, Rennie RP. Evaluation of CHROMagar Candida for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* nov 1998;32(3):201-4.
78. Quindós G, San Millan R, Bikandi J, Pontón J. Utility of Fluoroplate Candida for the rapid identification of *Candida albicans*. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica.* déc 1996;14(10):586-9.
79. Rousselle P, Freydiere AM, Couillerot PJ, Montclos H de, Gille Y. Rapid identification of *Candida albicans* by using Albicans ID and fluoroplate agar plates. *J Clin Microbiol.* déc 1994;32(12):3034.
80. Ostrosky-Zeichner L. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med.* janv 2012;125(1 Suppl):S14-24.
81. Fernandez J, Erstad BL, Petty W, Nix DE. Time to positive culture and identification for *Candida* blood stream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* août 2009;64(4):402-7.
82. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* juin 2008;46(12):1813-21.
83. Berenguer J, Buck M, Witebsky F, Stock F, Pizzo PA, Walsh TJ. Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive candidiasis. Disseminated versus single-organ infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* sept 1993;17(2):103-9.

84. Meyer M-H, Letscher-Bru V, Jaulhac B, Waller J, Candolfi E. Comparison of Mycosis IC/F and Plus Aerobic/F Media for Diagnosis of Fungemia by the Bactec 9240 System. *J Clin Microbiol.* févr 2004;42(2):773-7.
85. Becton-Dickinson. BD (Becton, Dickinson and Company) - Diagnostic Systems: BD BACTEC™ Instrumented Blood Culture Systems [En ligne]. (consulté le 24 janv 2015). Disponible sur: <http://www.bd.com/ds/productcenter/bc-bactec.asp>
86. Biomérieux. BacT/ALERT 3D Microbial Detection Systems Overview | bioMérieux Clinical Diagnostics [En ligne]. (consulté le 24 janv 2015). Disponible sur: <http://www.biomerieux-diagnostics.com/bact-alert-3d-microbial-detection-systems-overview>
87. Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Detection of Simulated Candidemia by the BACTEC 9240 System with Plus Aerobic/F and Anaerobic/F Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol.* janv 2003;41(10):4714-7.
88. Mirrett S, Reller LB, Petti CA, Woods CW, Vazirani B, Sivadas R, et al. Controlled Clinical Comparison of BacT/ALERT Standard Aerobic Medium with BACTEC Standard Aerobic Medium for Culturing Blood. *J Clin Microbiol.* juin 2003;41(6):2391-4.
89. Horvath LL, George BJ, Murray CK, Harrison LS, Hospenthal DR. Direct Comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D Automated Blood Culture Systems for Candida Growth Detection. *J Clin Microbiol.* janv 2004;42(1):115-8.
90. Klingspor L, Muhammed SA, Ozenci V. Comparison of the two blood culture systems, Bactec 9240 and BacT/Alert 3D, in the detection of Candida spp. and bacteria with polymicrobial sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* nov 2012;31(11):2983-7.
91. Hennequin C. Rôle du laboratoire dans le diagnostic et la prévention des infections fongiques. *Ann Fr Anesth Réanimation.* avr 2001;20(4):407-12.
92. Letscher-Bru V. Candidoses. *EMC - Biol Médicale.* 2003;1(0).
93. Sullivan D, Coleman D. Candida dubliniensis: Characteristics and Identification. *J Clin Microbiol.* févr 1998;36(2):329.
94. Quindos G, San Millan R, Robert R, Bernard C, Ponton J. Evaluation of bichro-latex albicans, a new method for rapid identification of Candida albicans. *J Clin Microbiol.* mai 1997;35(5):1263-5.
95. Cahen P, Laurent F, Honderlick P, Saheb F. Utilization of Bichrolatex albicans test for the rapid identification of Candida albicans in blood culture bottles in fungemia: preliminary results from a multicenter study. *Pathol Biol (Paris).* mai 1999;47(5):512-4.
96. Freydiere AM, Buchaille L, Guinet R, Gille Y. Evaluation of latex reagents for rapid identification of Candida albicans and C. krusei colonies. *J Clin Microbiol.* janv 1997;35(4):877-80.



97. Grillot R. Les Mycoses humaines : démarche diagnostique. Elsevier. Paris; 1996. 392 p.
98. Freydiere A-M, Robert R, Ploton C, Marot-Leblond A, Monerau F, Vandenesch F. Rapid identification of *Candida glabrata* with a new commercial test, GLABRATA RTT. *J Clin Microbiol.* août 2003;41(8):3861-3.
99. Hata DJ, Hall L, Fothergill AW, Larone DH, Wengenack NL. Multicenter Evaluation of the New VITEK 2 Advanced Colorimetric Yeast Identification Card. *J Clin Microbiol.* avr 2007;45(4):1087-92.
100. Gündeş SG, Gulenc S, Bingol R. Comparative performance of Fungichrom I, Candifast and API 20C Aux systems in the identification of clinically significant yeasts. *J Med Microbiol.* janv 2001;50(12):1105-10.
101. Valenza G, Strasen J, Schäfer F, Frosch M, Kurzai O, Abele-Horn M. Evaluation of New Colorimetric Vitek 2 Yeast Identification Card by Use of Different Source Media. *J Clin Microbiol.* nov 2008;46(11):3784-7.
102. Bader O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *PROTEOMICS.* 2013;13(5):788-99.
103. Alanio A. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en mycologie clinique : avantages réels, écueils potentiels. *J Anti-Infect.* juin 2013;15(2):71-82.
104. Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, Meyerd J, Accoceberry I, François N, et al. Identification des levures du genre *Candida* par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF : comparaison des systèmes Andromas® et Bruker/Biotyper v.2®. *J Mycol Médicale J Med Mycol.* mars 2012;22(1):107.
105. Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* sept 2011;17(9):1359-65.
106. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D'Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, et al. Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry Assay of Blood Culture Broths for Rapid Identification of *Candida* Species Causing Bloodstream Infections: an Observational Study in Two Large Microbiology Laboratories. *J Clin Microbiol.* janv 2012;50(1):176-9.
107. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. Performance and Cost Analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry for Routine Identification of Yeast. *J Clin Microbiol.* avr 2011;49(4):1614-6.
108. Bougnoux M-E, Espinasse F. Nouvelles applications des techniques de biologie moléculaire en mycologie médicale. *Rev Fr Lab.* mars 2003;2003(351):67-71.
109. Kofla G, Ruhnke M. Development of a new real-time TaqMan PCR assay for quantitative analyses of *Candida albicans* resistance genes expression. *J Microbiol Methods.* janv 2007;68(1):178-83.

110. Cendejas-Bueno E, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Identification of Pathogenic Rare Yeast Species in Clinical Samples: Comparison between Phenotypical and Molecular Methods. *J Clin Microbiol.* mai 2010;48(5):1895-9.
111. Hall L, Le Febre KM, Deml SM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Evaluation of the Yeast Traffic Light PNA FISH Probes for Identification of Candida Species from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol.* avr 2012;50(4):1446-8.
112. Stone NRH, Gorton RL, Barker K, Ramnarain P, Kibbler CC. Evaluation of PNA-FISH Yeast Traffic Light for Rapid Identification of Yeast Directly from Positive Blood Cultures and Assessment of Clinical Impact. *J Clin Microbiol.* avr 2013;51(4):1301-2.
113. Hanna S, Blancard A, Roziere JC DL, Dumon H, Manelli JC. Diagnostic des candidémies par PCR nichée et comparaison avec les hémocultures. *J Mycol Médicale.* juin 2003;13(2):61-6.
114. McMullan R, Metwally L, Coyle PV, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, et al. A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* mars 2008;46(6):890-6.
115. Lau A, Halliday C, Chen SC-A, Playford EG, Stanley K, Sorrell TC. Comparison of Whole Blood, Serum, and Plasma for Early Detection of Candidemia by Multiplex-Tandem PCR. *J Clin Microbiol.* mars 2010;48(3):811-6.
116. Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol.* févr 2011;49(2):665-70.
117. Wallet F, Nseir S, Baumann L, Herwegh S, Sendid B, Boulo M, et al. Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* juin 2010;16(6):774-9.
118. Associates of Cape Cod Clinical Diagnostics Fungitell Assay [En ligne]. (consulté le 24 janv 2015). Disponible sur: <http://www.acciusa.com/clinical/fungitell/index.html>
119. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME.  $\beta$ -D-Glucan Assay for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections: A Meta-analysis. *Clin Infect Dis.* mars 2011;52(6):750-70.
120. Posteraro B, De Pascale G, Tumbarello M, Torelli R, Pennisi MA, Bello G, et al. Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan assay, Candida score, and colonization index. *Crit Care.* 2011;15(5):R249.

121. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, et al.  $\beta$ -Glucan Antigenemia Assay for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections in Patients With Hematological Malignancies: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies From the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis.* janv 2012;54(5):633-43.
122. Bretagne S. Antigènes fongiques en réanimation : tests disponibles et état des lieux. *Réanimation.* juin 2007;16(3):232-9.
123. Index of /documentation\_fabricants/Biorad diagnostics pasteur [En ligne]. (consulté le 24 jan 2015). Disponible sur: [http://www.techmicrobio.eu/documentation\\_fabricants/Biorad%20diagnostics%20pasteur/](http://www.techmicrobio.eu/documentation_fabricants/Biorad%20diagnostics%20pasteur/)
124. Anane S, Khalfallah F. Diagnostic biologique des candidoses systémiques : difficultés et perspectives. *Pathol Biol.* juin 2007;55(5):262-72.
125. Zaragoza R, Pemán J, Quindós G, Iruetagoiena JR, Cuétara MS, Ramírez P, et al. Clinical significance of the detection of *Candida albicans* germ tube-specific antibodies in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* juin 2009;15(6):592-5.
126. Pemán J, Zaragoza R, Quindós G, Alkorta M, Cuétara MS, Camarena JJ, et al. Clinical factors associated with a *Candida albicans* Germ Tube Antibody positive test in Intensive Care Unit patients. *BMC Infect Dis.* 2011;11(1):60.
127. Letscher-Bru V. Antifongigramme et concentration minimale inhibitrice - EM|Premium. *EMC - Biol Médicale.* 2011;1-7.
128. Datry A, Carriere J, Le Pitre M, Groussin H, Silberstien C, Danis M. Analyse critique des tests de sensibilité in vitro aux antifongiques. *Médecine Mal Infect.* nov 1995;25, Part 2:6-13.
129. Rex JH, Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard M27-A3- 3rd Ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
130. Rex JH, Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard M38-A2, 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
131. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect.* avr 2008;14(4):398-405.
132. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, et al. Comparison of the Broth Microdilution (BMD) Method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-Hour CLSI BMD Method for Testing Susceptibility of *Candida* Species to Fluconazole, Posaconazole, and Voriconazole by Use of Epidemiological Cutoff Values<sup>∇</sup>. *J Clin Microbiol.* mars 2011;49(3):845-50.

133. Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, Bustamante B, Canton E, Fothergill A, Fuller J, et al. Multilaboratory Study of Epidemiological Cutoff Values for Detection of Resistance in Eight *Candida* Species to Fluconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2014;58(4):2006-12.
134. Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skaggs BA, Mellado E, Warnock DW, et al. Comparative Evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2002;46(11):3644-7.
135. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL, et al. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol.* août 2005;43(8):3884-9.
136. Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* mai 2010;48(5):1592-9.
137. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* juin 2005;11(6):486-92.
138. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Wiederhold NP. Multicenter evaluation of the new Vitek 2 yeast susceptibility test using new CLSI clinical breakpoints for fluconazole. *J Clin Microbiol.* juin 2014;52(6):2126-30.
139. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Holliday N, Killian SB. Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* févr 2004;42(2):718-21.
140. Davey KG, Holmes AD, Johnson EM, Szekely A, Warnock DW. Comparative Evaluation of FUNGITEST and Broth Microdilution Methods for Antifungal Drug Susceptibility Testing of *Candida* Species and *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol.* avr 1998;36(4):926-30.
141. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Buitrago MJ, et al. Comparison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility System with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest Techniques for In Vitro Detection of Antifungal Resistance in Yeast Isolates. *J Clin Microbiol.* mai 2010;48(5):17826.

142. Bourgeois N, Dehandschoewercker L, Bertout S, Bousquet P-J, Rispaïl P, Lachaud L. Antifungal Susceptibility of 205 *Candida* spp. Isolated Primarily during Invasive Candidiasis and Comparison of the Vitek 2 System with the CLSI Broth Microdilution and Etest Methods. *J Clin Microbiol.* janv 2010;48(1):154-61.
143. Espinel-Ingroff A, Canton E, Gibbs D, Wang A. Correlation of Neo-Sensitabs Tablet Diffusion Assay Results on Three Different Agar Media with CLSI Broth Microdilution M27-A2 and Disk Diffusion M44-A Results for Testing Susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to Amphotericin B, Caspofungin, Fluconazole, Itraconazole, and Voriconazole. *J Clin Microbiol.* mars 2007;45(3):858-64.
144. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and candida infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* févr 1997;24(2):235-47.
145. Rex JH, Pfaller MA. Has Antifungal Susceptibility Testing Come of Age? *Clin Infect Dis.* 15 oct 2002;35(8):982-9.
146. Dannaoui E. Définitions actuelles : « breakpoints-epidemiological cut-off ». *J Mycol Médicale J Med Mycol.* mars 2013;23(1):70.
147. Granier F. Antifongiques: classes thérapeutiques, mécanismes d'action, problèmes de résistance. *Antibiotiques.* févr 2003;5(1):39-48.
148. SFAR - Prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives de l'adulte (CC 2004) [En ligne]. (consulté le 18 mars 2015). Disponible sur: <http://www.sfar.org/article/247/prise-en-charge-des-candidoses-et-aspergilloses-invasives-de-l-rsquo-adulte-cc-2004>.
149. Haute Autorité de Santé - HAS - Accueil [En ligne]. (consulté le 26 janv 2015). Disponible sur: [http://www.has-sante.fr/portail/jcms/fc\\_1249588/fr/accueil](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/fc_1249588/fr/accueil)
150. Bryskier A. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Paris: Ellipses Editions Marketing; 1999. 1216 p.
151. Taieb F, Méchaï F, Lefort A, Lanternier F, Bougnoux M-E, Lortholary O. Prise en charge des infections systémiques à *Candida* spp. *Rev Médecine Interne.* mars 2011;32(3):173-80.
152. Deray G, Mercadal L, Bagnis C. Nephrotoxicity of amphotericin B. *Néphrologie.* 2002;23(3):119-22.
153. Andrès E, Tiphine M, Letscher-Bru V, Herbrecht R. Nouvelles formes lipidiques de l'amphotéricine B. Revue de la littérature. *Rev Médecine Interne.* févr 2001;22(2):141-50.

154. Moen MD, Lyseng-Williamson KA, Scott LJ. Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs*. 2009;69(3):361-92.
155. Lanternier F, Lortholary O. Liposomal amphotericin B: what is its role in 2008? *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. mai 2008;14 Suppl 4:71-83.
156. Kettani A, Belkhadir ZH, Mosadik A, Faroudy M, Ababou A, Lazreq C, et al. Traitement antifongique des candidoses systémiques en réanimation. *J Mycol Médicale J Med Mycol*. mars 2006;16(1):16-25.
157. Dupont H. Levures en réanimation. Congrès national d'anesthésie et de réanimation 2007 Les Essentiels [En ligne]. Elsevier Masson SAS. (consulté le 26 janv 2015); Disponible sur: [http://www.sfar.org/acta/dossier/archives/ca07/html/ca07\\_32/ca07\\_32.htm](http://www.sfar.org/acta/dossier/archives/ca07/html/ca07_32/ca07_32.htm)
158. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. mars 2009;48(5):503-35.
159. Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, Azoulay E, Borges Sá M, Johnson EM, et al. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. *Intensive Care Med*. janv 2009;35(1):55-62.
160. Nolla-Salas J, Sitges-Serra A, León-Gil C, Martínez-González J, León-Regidor MA, Ibáñez-Lucía P, et al. Candidemia in non-neutropenic critically ill patients: analysis of prognostic factors and assessment of systemic antifungal therapy. Study Group of Fungal Infection in the ICU. *Intensive Care Med*. janv 1997;23(1):23-30.
161. Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. juill 2006;43(1):25-31.
162. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother*. sept 2005;49(9):3640-5.
163. Massanet P, Jung B, Molinari N, Villiet M, Moulaire V, Roch-Torreilles I, et al. Traitements antifongiques en réanimation au cours des infections fongiques invasives documentées ou suspectées. *Ann Fr Anesth Réanimation*. avr 2014;33(4):232-9.
164. Segal BH, Almyroudis NG, Battiwalla M, Herbrecht R, Perfect JR, Walsh TJ, et al. Prevention and Early Treatment of Invasive Fungal Infection in Patients with Cancer and Neutropenia and in Stem Cell Transplant Recipients in the Era of Newer Broad-Spectrum Antifungal Agents and Diagnostic Adjuncts. *Clin Infect Dis*. janv 2007;44(3):402-9.

165. Leroy O, Mira J-P, Montravers P, Gangneux J-P, Gouin F, Sollet J-P, et al. Candidoses invasives en réanimation : analyse des traitements antifongiques au cours de l'enquête française AmarCand. *Ann Fr Anesth Réanimation*. déc 2008;27(12):999-1007.
166. Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 1990;34(2):183.
167. Dannaoui É. Résistance des *Candida* aux antifongiques : détection et mécanismes. *Rev Francoph Lab*. mars 2013;2013(450):71-7.
168. Vermes A, Guchelaar H-J, Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother*. 8 janv 2000;46(2):171-9.
169. Noël T. Le point sur les mécanismes de résistance aux antifongiques azolés chez les levures *Candida*. *J Mycol Médicale J Med Mycol*. mars 2012;22(1):96.
170. Datry A, Bart-Delabesse E. La caspofungine : du mécanisme d'action aux applications thérapeutiques. *Rev Médecine Interne*. janv 2006;27(1):32-9.
171. Robert-Gangneux F, Degeilh B, Chevrier S, Guiguen C, Gangneux J-P. Mycoses profondes et transplantation. *Rev Francoph Lab*. 2008;2008(403):41-8.
172. Le Bihan C, Jung B, Bourgeois N, Mahul M, Conseil M, Clavieras N, et al. Apport de la sérologie *Candida* dans le bilan pré-transplantation hépatique. *Ann Fr Anesth Réanimation*. sept 2014;33, Supplément 2:A110-1.
173. Agence de la biomédecine [En ligne]. (consulté le 9 mars 2015). Disponible sur: <http://www.agencebiomedecine.fr/>
174. Persat F., Ranque S. Intérêts et limites du sérodiagnostic fongique. *Lett Infect*. févr 2009;Tome XXIV(1):8-18.
175. Aubert D, Puygauthier-Toubas D, Leon P, Pignon B, Foudrinier F, Marnef F, et al. Characterization of specific anti-*Candida* IgM, IgA and IgE: diagnostic value in deep-seated infections. *Mycoses*. juin 1996;39(5-6):169-76.
176. Arendrup MC, Sulim S, Holm A, Nielsen L, Nielsen SD, Knudsen JD, et al. Diagnostic Issues, Clinical Characteristics, and Outcomes for Patients with Fungemia. *J Clin Microbiol*. juin 2011;49(9):3300-8.
177. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. nov 2003;3(11):685-702.

178. Textoris, Richiardone, Leone. La profondeur et la durée de la lymphopénie sont associées à la survenue d'infection nosocomiale chez le traumatisé grave, 42ème Congrès de SRLF - 2014 - Paris [En ligne]. (consulté le 26 févr 2015). Disponible sur: <http://www.srlf.org/english/congress/abstracts/viewPresentation.phtml>
179. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* juin 2009;48(12):1695-703.
180. Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F. Recent Exposure to Caspofungin or Fluconazole Influences the Epidemiology of Candidemia: a Prospective Multicenter Study Involving 2,441 Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2011;55(2):532-8.
181. Bodey GP, Mardani M, Hanna HA, Boktour M, Abbas J, Girgawy E, et al. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med.* avr 2002;112(5):380-5.
182. Chamilos G, Luna M, Lewis RE, Bodey GP, Chemaly R, Tarrand JJ, et al. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). *Haematologica.* juill 2006;91(7):986-9.
183. Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, Salomoni MA, Hao B, Press EG, et al. Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction,  $\beta$ -D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* mai 2012;54(9):1240-8.
184. Prella M, Bille J, Pugnale M, Duvoisin B, Cavassini M, Calandra T, et al. Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* févr 2005;51(2):95-101.
185. Sendid B, Poirot JL, Tabouret M, Bonnin A, Caillot D, Camus D, et al. Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J Med Microbiol.* mai 2002;51(5):433-42.
186. Ellis M, Al-Ramadi B, Bernsen R, Kristensen J, Alizadeh H, Hedstrom U. Prospective evaluation of mannan and anti-mannan antibodies for diagnosis of invasive *Candida* infections in patients with neutropenic fever. *J Med Microbiol.* mai 2009;58(Pt 5):606-15.
187. Oliveri S, Trovato L, Betta P, Romeo MG, Nicoletti G. Experience with the Platelia *Candida* ELISA for the diagnosis of invasive candidosis in neonatal patients. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* avr 2008;14(4):391-3.



188. Herent P, Stynen D, Hernando F, Fruit J, Poulain D. Retrospective evaluation of two latex agglutination tests for detection of circulating antigens during invasive candidosis. *J Clin Microbiol.* août 1992;30(8):2158-64.
189. Lunel FMV, Donnelly JP, van der Lee HAL, Blijlevens NMA, Verweij PE. Performance of the new Platelia Candida Plus assays for the diagnosis of invasive Candida infection in patients undergoing myeloablative therapy. *Med Mycol.* nov 2011;49(8):848-55.
190. Verduyn Lunel FM, Donnelly JP, van der Lee H a. L, Blijlevens NMA, Verweij PE. Circulating Candida-specific anti-mannan antibodies precede invasive candidiasis in patients undergoing myelo-ablative chemotherapy. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* avr 2009;15(4):380-6.
191. Rimek D, Singh J, Kappe R. Cross-Reactivity of the PLATELIA CANDIDA Antigen Detection Enzyme Immunoassay with Fungal Antigen Extracts. *J Clin Microbiol.* juill 2003;41(7):3395-8.
192. Werle E, Kappe R, Fiehn W, Sonntag HG. [Detection of anti-Candida antibodies of the classes IgM, IgG and IgA using enzyme immunoassay in sequential serum samples of hospitalized patients]. *Mycoses.* 1994;37 Suppl 1:71-8.
193. Verduyn Lunel FM, Mennink-Kersten MASH, Ruegebrink D, van der Lee HAL, Donnelly JP, Blijlevens NMA, et al. Value of Candida serum markers in patients with invasive candidiasis after myeloablative chemotherapy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* août 2009;64(4):408-15.
194. Chumpitazi B, Lebeau B, Faure O, Hamidfar-Roy R, Pavese P, Thiebaut-Bertrand A, et al. Évaluation de l'antigénémie Candida dans le diagnostic biologique de la candidose chez les patients hospitalisés au CHU de Grenoble. *J Mycol Médicale J Med Mycol.* sept 2012;22(3):286-7.
195. Persat F, Topenot R, Piens MA, Thiebaut A, Dannaoui E, Picot S. Evaluation of different commercial ELISA methods for the serodiagnosis of systemic candidosis. *Mycoses.* 2002;45(11-12):455-60.

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 09/04/2015

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN PHARMACIE

présenté par : PIANETTI Cynthia

Sujet : Place du sérodiagnostic dans les infections fongiques invasives à *Candida*. Enquête sur la prescription des sérologies *Candida* au CHU de Nancy et comparaison de deux kits commerciaux ELISA pour la détection des antigènes mannane et anticorps anti-mannane

Jury :

Président : Mme Chantal FINANCE, PU-PH  
 Directeur : Mme Anne DEGOURGOGNE, MCU-PH  
 Juges : Mme Marie MACHOUART, PU-PH  
 Mme Sandrine HENARD, MCU-PH

Vu,

Nancy, le 09/03/2015

Le Président du Jury

Directeur de Thèse

Mme. FINANCE

Mme DEBOURGOGNE




Vu et approuvé,

Nancy, le 10.03.2015

Doyen de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université de Lorraine,

Vu,

Nancy, le

16 MARS 2015

Le Président de l'Université de Lorraine,

Pour le Président et par délégation  
Le Vice-Président
  
Martial DELIGNON

Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 6851



N° d'identification :

**TITRE**

Place du sérodiagnostic dans les infections fongiques invasives à *Candida*. Enquête sur la prescription des sérologies *Candida* au CHU de Nancy et comparaison de deux kits commerciaux ELISA pour la détection des antigènes mannanes et anticorps anti-mannanes

**Thèse soutenue le 09 avril 2015**

**Par Cynthia PIANETTI**

**RESUME :**

Le diagnostic des candidoses invasives demeure difficile et souvent trop tardif malgré le développement de nouvelles méthodes de diagnostic. Une enquête sur la prescription des sérologies *Candida* au CHU de Nancy a d'abord été réalisée. L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la sérologie *Candida* pour le diagnostic des candidoses invasives en termes de précocité par rapport aux hémocultures. Une comparaison de deux techniques de sérodiagnostic a ensuite été effectuée. Trente-neuf patients hospitalisés dans divers services du CHU de Nancy entre le 1 janvier 2012 et le 30 janvier 2015 présentant une candidose invasive documentée sur la base d'au moins une hémoculture positive à *Candida* et possédant des sérums prélevés à proximité de l'épisode de candidémie dans la sérothèque de la plateforme d'immunoanalyse du CHU de Brabois étaient inclus.

Les antigènes mannanes et anticorps anti-mannanes étaient recherchés par deux kits commerciaux PLATELIA® *Candida* Ag Plus, *Candida* Ab Plus et SERION ELISA® *antigen Candida, classic Candida albicans* IgG respectivement.

Notre étude a montré qu'un suivi sérologique régulier pourrait présenter un argument supplémentaire faisant évoquer une candidose profonde débutante et permettrait de débiter un traitement pré-emptif plus précocément.

**MOTS CLES :** Infections invasives à *Candida*, Candidoses invasives, Candidémie, sérodiagnostic, Sérologie *Candida*, Mannane

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
<b><u>Dr DEBOURGOGNE A.</u></b>	<b><u>Laboratoire de parasitologie-mycologie, Brabois, CHU Nancy</u></b>	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
<b><u>Pr FINANCE C.</u></b> (Co-directeur)	<b><u>Faculté de pharmacie Nancy</u></b>	Bibliographique <input type="checkbox"/>
		Thème <input type="checkbox"/> 5

**Thèmes**    1 – Sciences fondamentales    2 – Hygiène/Environnement  
                  3 – Médicament                    4 – Alimentation – Nutrition  
                  5 – Biologie                            6 – Pratique professionnelle