INFECTIONS FONGIQUES CHEZ LES IMMUNODEPRIMES

Chez l'immunodéprimé, l'agent étiologique et le type d'infection différent selon la nature du déficit immunitaire

- ✓ Déficit du système phagocytaire
- ✓ Anomalie du système phagocytaire
- ✓ Déficit de l'immunité cellulaire

Déficit du système phagocytaire

- Traitements des hémopathies malignes
- Greffe de moelle osseuse

Mycoses profondes quand :

Neutropénies profondes (inf. à 500/mm^3)

et prolongées (>15 jours)

Les infections fongiques opportunistes sont dues :

Candida +++ → * Septicémies à levures
* Candidoses systémiques

Aspergillus +++ →* Aspergilloses invasives

Mucorales +
Scedosporium +
Fusarium +

Anomalies du système phagocytaire :

- Granulomatose septique chronique

Aspergillus +++ → pneumopathies → métastases cutanées, osseuses et cérébrales

Candida

Déficit de l'immunité cellulaire

- Les lymphomes : maladie de Hodgkin +++
- Les leucémies
- Les traitements :
  cytotoxiques – immunosupresseurs
  corticoïdes

Les infections fongiques opportunistes sont dues :

Cryptococcus neoformans +++

→ * forme meningée

* forme fébrile disséminée

Pneumocystis jiroveci +++

→ * pneumopathies

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES MYCOSES PROFONDES

- Mycose invasive :
  caractère de haute gravité
  diagnostic sombre

- Diagnostic doit être : rapide et formel

- Diagnostic difficile

- Nécessité de prélèvements biologiques très invasifs (Biopsies tissulaires)

- Clinique parfois très atypique

- Diversité des localisations potentielles :
  avant tout pulmonaires
  très souvent métastases

- Agents fongiques très rares :
  difficulté de leur mise en évidence → erreurs par défaut

- Négativation possible des examens mycologiques :
  - par un traitement antifongique empirique
  - par une prophylaxie médicamenteuse
    - primaire ou secondaire

- Interprétation délicate des résultas
  ex: *Candida spp* : colonisation ou invasion

- Manque de spécificité ou de sensibilité des méthodes indirectes de diagnostic

➔ Comment affirmer une mycose profonde

➔ Préciser les prélèvements à réaliser

➔ Décrire la démarche générale du diagnostic et les méthodes à mettre en œuvre pour détecter ces champignons

➔ Interprétation des résultats.

COMMENT AFFIRMER UNE MYCOSE PROFONDE

1 -Aspergillose invasive :

- Mettre en évidence dans des prélèvements les filaments mycéliens par l'examen direct
- Isoler le champignon en culture
- Détecter l'Ag soluble circulant à un titre significatif.
- Détecter une séroconversion ou une ascension significative des Ac spécifiques.

2- Autres infection à champignons filamenteux:

Mucorales -Fusarium-Scedosporium

- Mettre en évidence dans les prélèvements les filaments mycéliens par l'examen direct

- Isoler le champignon en culture

3- Candidoses invasives:

- Mettre en évidence les levures et les pseudofilaments par examen direct de prélèvements de sites clos

- Mettre en évidence la dissémination hématogène des levures : hémocultures

- Détecter une colonisation candidosique de sites muqueux et périphériques

- Détecter une séroconversion ou ascension significative des titres sérologiques

4- Cryptococcose:

- Mettre en évidence le cryptocoque dans un prélèvement quelqu'il soit : LCR + + +
- Isoler le champignon en culture
- Détecter l'Ag capsulaire (sérum et LCR) à titre significatif

5- Pneumocystose :

- Mettre en évidence le pneumocyste dans les prélèvements broncho-pulmonaires :

kystes et/ou trophozoïtes

QUELS SONT LES PRÉLÈVEMENTS À EFFECTUER

Prélèvement : temps capital

1- Neutropénies et greffe de moelle osseuse :

Aspergillose + + + Candidose + +

- LBA,Aspiration bronchique,biopsie pulmonaire
- Biopsies extra pulmonaires en fonction des points d'appel cliniques et radiologiques
- Sang pour hémoculture répétée sur Sabouraud

- Prélèvements de muqueuses → recherche d'une colonisation candidosique (nez – bouche selles – urine)

- Prélèvements périphériques de matériel à émergence cutanée (drains, cathéters)

- Sang pour sérologie aspergillaire et candidosique et pour recherche d'Ag soluble aspergillaire

2- Lymphome :

Cryptococcose + + + Pneumocystose + +

Aspergillose + Candidose +

- En priorité :
  - LBA – Aspiration bronchique → recherche de kystes et/ou trophozoïtes de pneumocystes, de levures et filaments mycéliens
  - LCR → Recherche de cryptocoque et Ag soluble cryptococcique

- Complétés par :
  - Prélèvements des muqueuses et matériel à émergence cutanée
  - Biopsie cutanée et d'organes
  - Sang pour hémoculture (Cryptocoque et Candida)
  - Sérologie candidosique et aspergillaire et recherche d'Ag circulant

3- Granulomatose septique chronique :

Aspergillose + + + Candidose

- LBA – éventuellement biopsie pulmonaire

- Ponctions et/ou Biopsies de points d'appel cliniques et radiologiques

- Sang pour sérologie aspergillaire et recherche d'Ag circulant aspergillaire

DÉMARCHE GÉNÉRALE DU DIAGNOSTIC

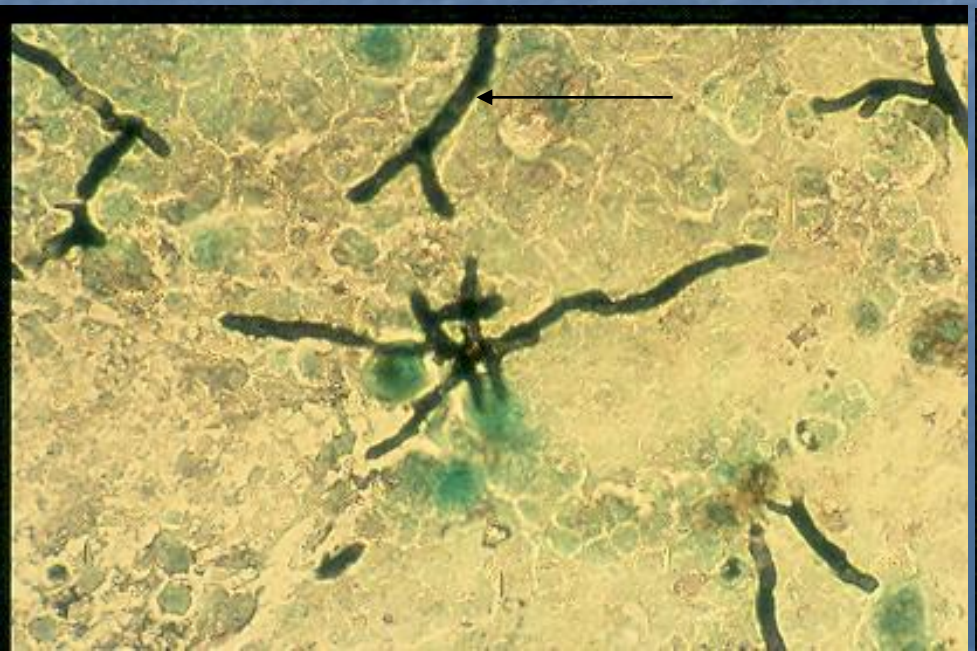
1- Examen direct :

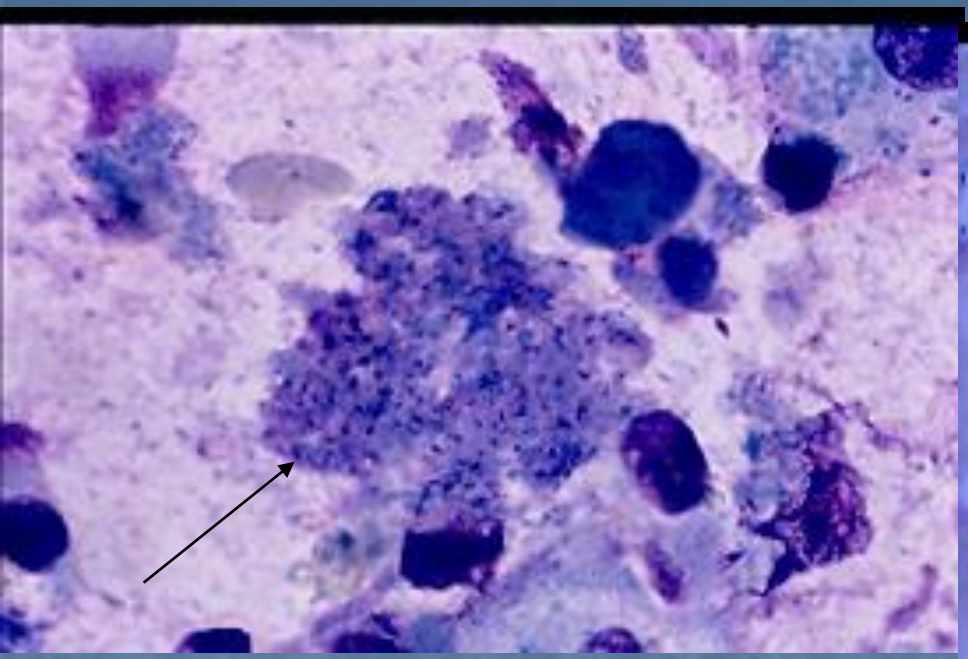
- Étape très importante du diagnostic
- Permet à lui seul de poser le diagnostic
- Nécessité de connaître l'aspect morphologique des différents agents fongiques

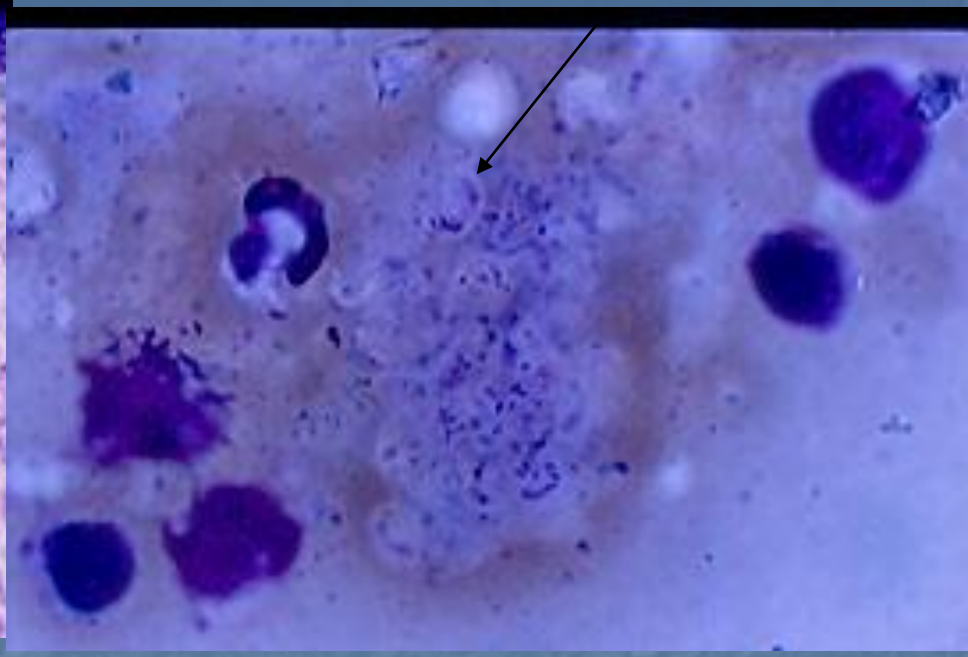
Techniques :

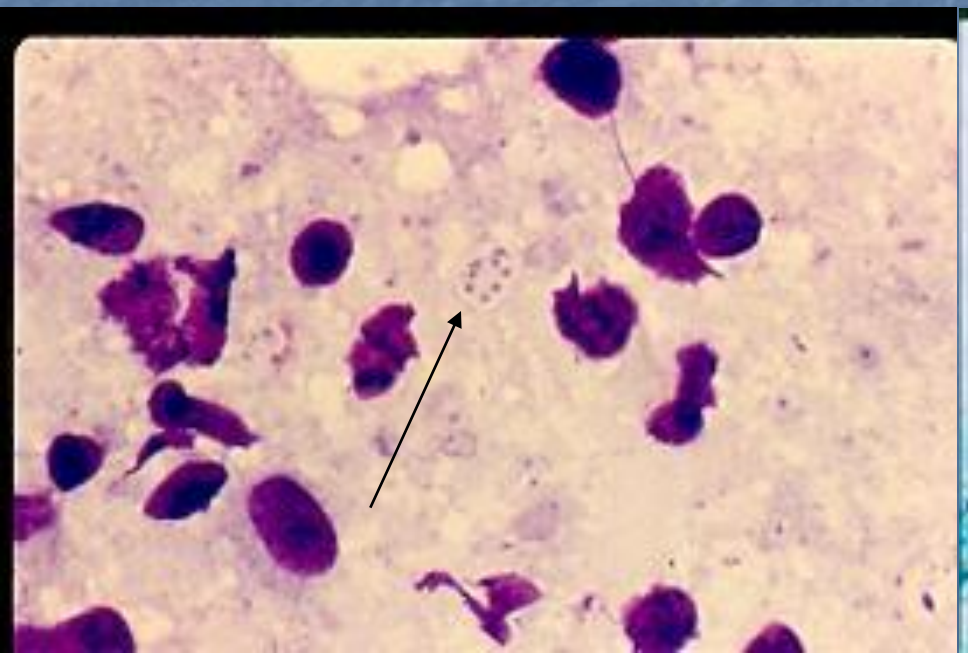
- Préparations à l'état frais (potasse, lactophénol ou encre de chine)

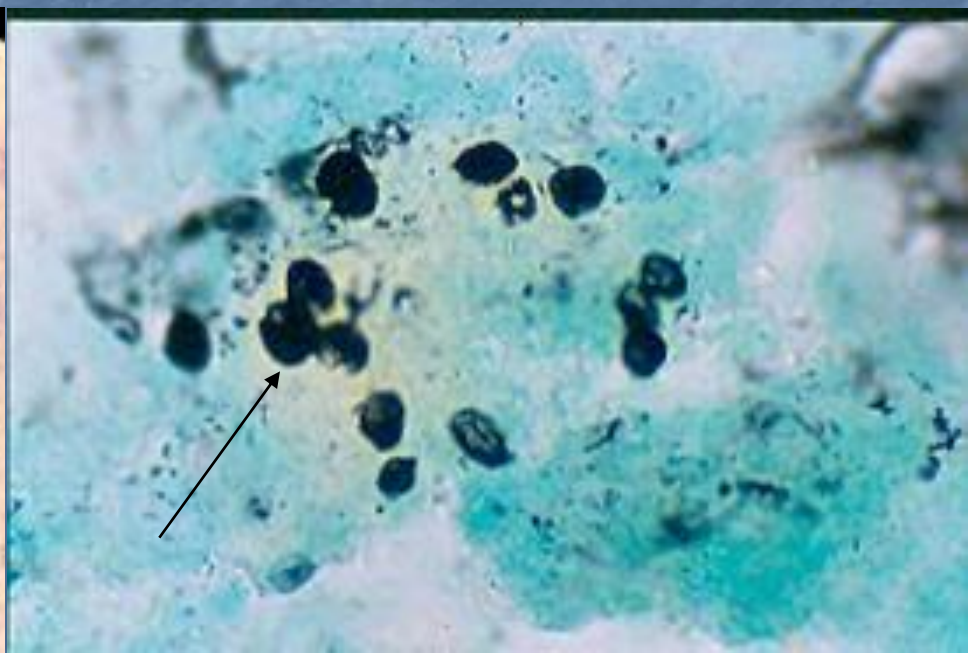
- Etalements sur lame fixés et colorés (MGG, Gomori Grocott)

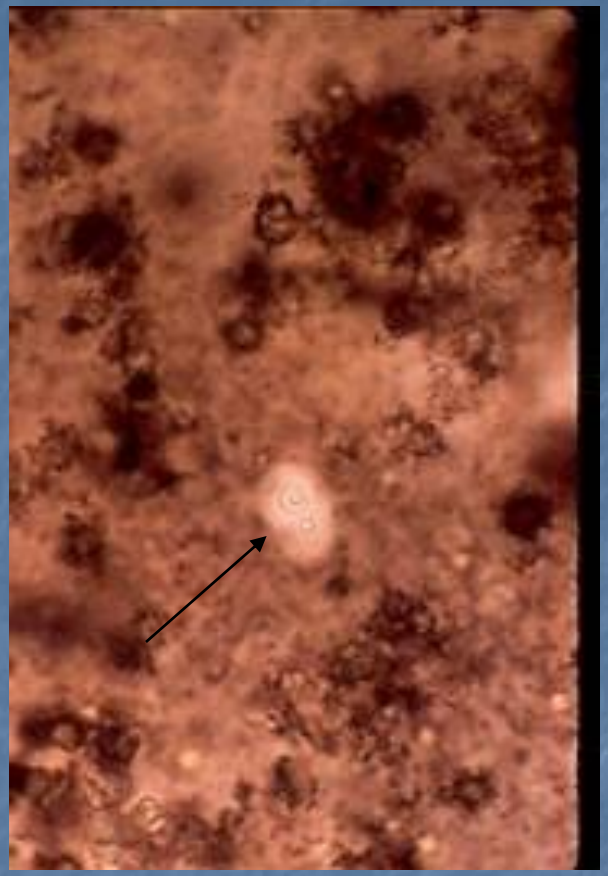


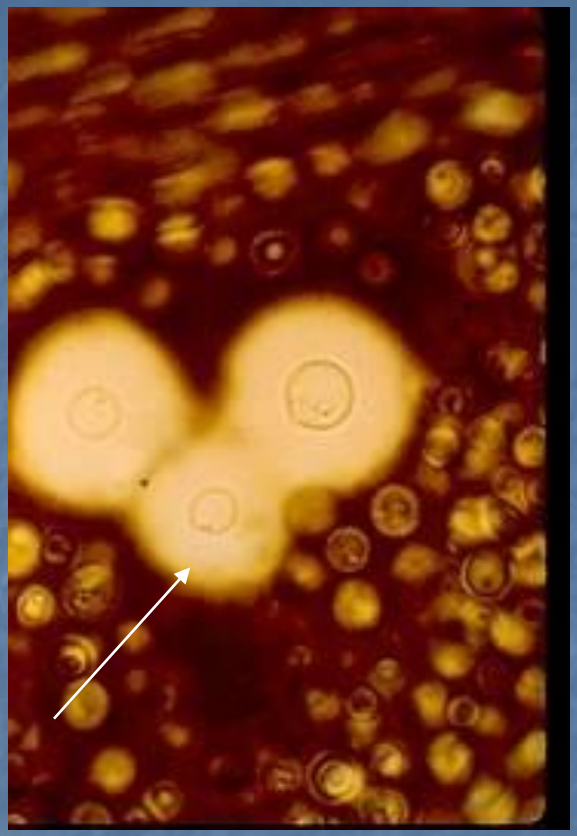












2- Mise en culture des prélèvements :

- Doit toujours être effectuée
- Permet de diagnostiquer une mycose malgré un examen direct négatif
- Apporte la preuve certaine de la présence du champignon dans le prélèvement
- L'espèce responsable peut être identifiée
- Et si nécessaire étude de la sensibilité aux antifongiques

Milieux de culture

- Milieux standards

  Sabouraud chloramphénicol

  Sabouraud chloramphénicol actidione

- Milieux spéciaux

  . Détection sélective de *C.albicans* au sein d'une flore fongique

  . Détection de *Cryptococcus neoformans*

- Détection des fongémies : hémocultures système Bactec

  - Réduction du temps de détection des fongémies de 24 h à 72 h $\rightarrow$ agir plus précocement au plan thérapeutique

  - Améliore la sensibilité de détection des levures de 10 à 27 %

Incubation :

- Température optimale se situe entre 30 et 35°C

- Examiner régulièrement les cultures :
  Suspicion de levures → 2 à 3 jours
  Suspicion de cryptocoque → 4 à 7 jours
  Suspicion de champignons filamenteux :
  Aspergillus → 15 jours

Numération :

- Prélèvements profonds stériles →présence de levures ou autres champignons revêt un caractère anormal quelque soit la quantité à l'isolement

- Prélèvements poly contaminés :
  muqueuse respiratoire
  tractus gastro intestinal

→ une appréciation globale de la flore fongique à l'isolement est suffisante

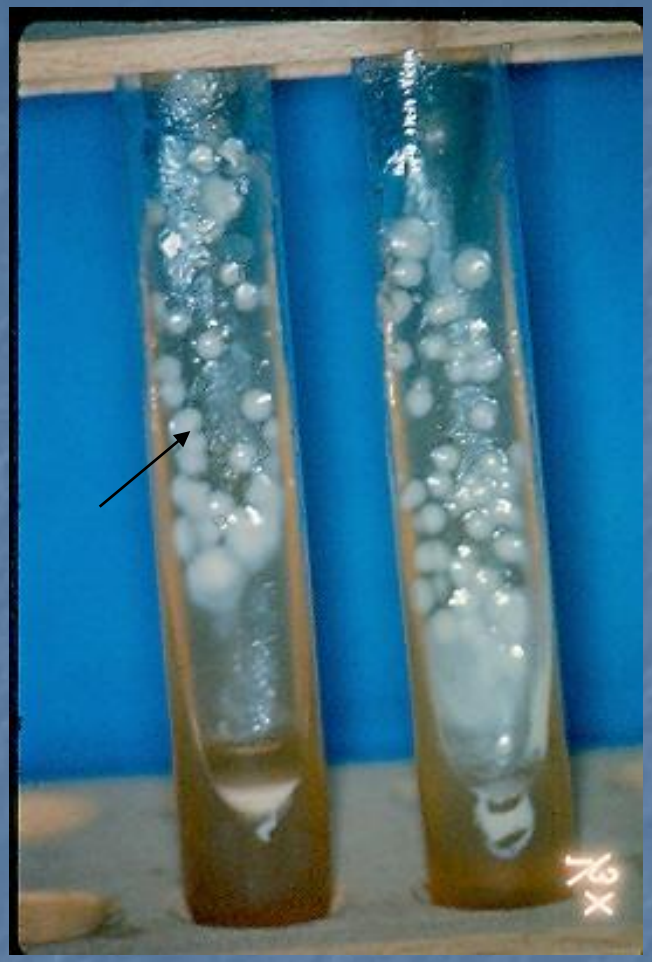
3- Identification des champignons isolés :

levures :

→ tests morphologiques (croissance sur milieu pauvre PCB ou RAT)

→ tests biochimiques (assimilation de glucides, hydrolyse de l'urée)

→ délai nécessaire depuis l'ensemencement
→ identification 4 à 5 jours

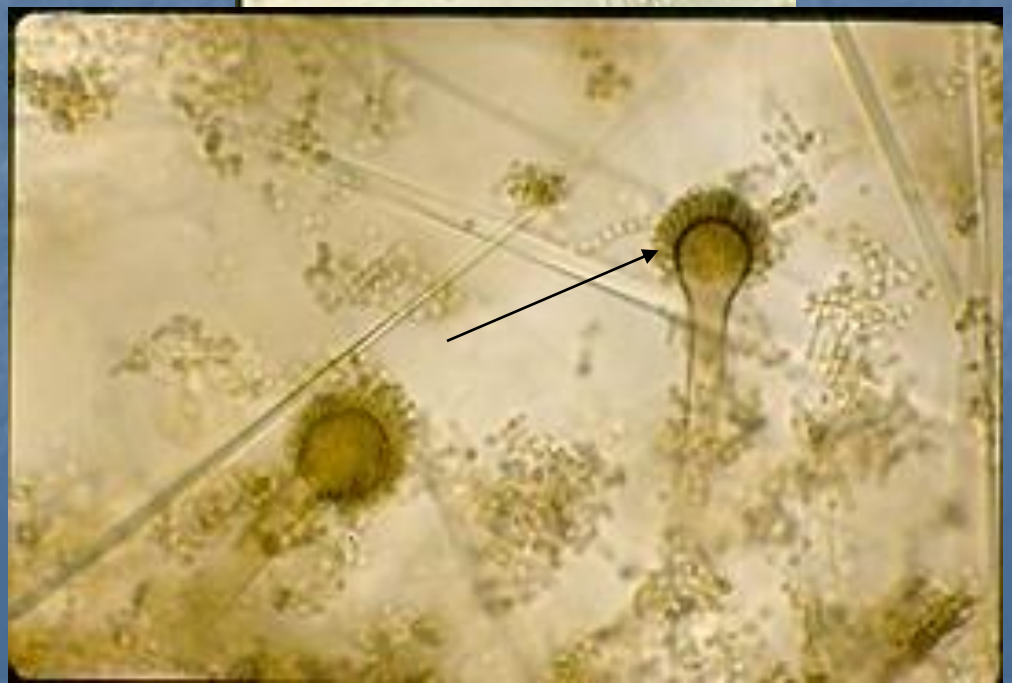


Champignons filamenteux :

→ Délai de croissance

→ Examen macroscopique : aspect des colonies

→ Examen microscopique : observation des filaments mycéliens et des fructifications



4- Antifongigramme :

Techniques :

ATB fungus

Fungitest

- standardisation de l'inoculum
- standardisation du milieu
- système prêt à l'emploi

E TEST

technique de détermination de CMI

simple, rapide, reproductible

Antifongiques testés :

Amphotericine B – 5 Fluorocytosine – Kétoconazole – Fluconazole – Itraconazole

Indications :

Réservé aux souches isolées de :

- prélèvements profonds
- isolats provenant de malades immunodéprimés

5- Diagnostic sérologique :

- Recherche d'Ac : témoins de l'infection

  - Techniques de précipitation
    - Immunoélectrophorèse
    - Electrosynérèse
  - Immunofluorescence indirecte
  - Elisa

Aspergillose Candidose

- Mise en évidence d'Ag solubles circulant libérés dans l'organisme par le champignon
  - Technique d'agglutination
  - Technique Elisa

Aspergillose - Candidose - Cryptococcose

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1 – Aspergillose invasive :

- Mycose profonde dont le diagnostic de certitude est le plus difficile à établir
- Les prélèvements biopsiques sont les plus performants 53 à 94 % des cas d'A.I. → souvent contre indiqués chez les immunodéprimés
- LBA, aspiration bronchique → sensibilité variable (15 à 80 % selon la littérature)

- Les prélèvements non invasifs (nez, expectoration, trachée) → la mise en évidence d'Aspergillus : à interpréter avec prudence (résultats faussement positifs → inhalation de spores aspergillaires)

- Si malades sous flux laminaire ou en secteur protégé → présence d'Aspergillus dans les expectorations possède une valeur prédictive élevée

- Recherche d'Ac utile chez sujets peu ou pas immunodéprimés
  → toujours associer :
  Electrosynérèse
  Elisa

- Si détection séroconversion
  ou ascension des titres d'Ac
  → réelle valeur d'orientation
  → rechercher l'Aspergillus

- Recherche d'Ag circulant → essentielle pour le diagnostic précoce de l'A.I.

- Ag sécrétés pendant :
  la phase de croissance et
  la phase de lyse des *Aspergillus* dans les tissus

Test ELISA → détection

- limite de détection : 1 ng/ml
- ⇒ une réponse très précoce
- si un prélèvement est positif → confirmer la positivité sur un nouvel échantillon
- deux prélèvements successifs positifs sont le témoin de la présence de galactomannane dans le sérum

- sensibilité varie de 60 à 100 % selon les auteurs

- mais il existe de faux positifs
  - absorption d'aliments contaminés par des *Aspergillus* et *Penicillium*
  - traitement par des antibiotiques (β lactamines semi- synthétiques)

Le diagnostic de l'A.I. est établie sur un ensemble de critères cliniques, radiologiques, mycologiques.

Evaluation de l'antigénémie aspergillaire

Service de Parasitologie – CNGMOT

- 74 patients neutropéniques

  * allogreffés

  * chimiothérapie pour hémopathies malignes

- Prélèvements hebdomadaires pour recherche A A (2 prélèvements J1et J2)

- A A évaluée par technique ELISA

  résultat positif $I \Delta 1,5$

  résultat douteux $1 < I < 1,5$

  Résultat négatif $I < 1$

  * Résultat positifs ou douteux →

    recontrolés sur le serum prélevé à J 2

- Analyse des résultats basée sur la confrontation :
  - * résultats AA
  - * données cliniques et radiologiques
- Critéres retenus pour diagnostic A I basés sur les recommandations de l'EORTC

* A I prouvée : confirmation histologique

isolement d'*Aspergillus*

* A I probable : isolement Asp. ≡ LBA

ou AA positive

et présence ≡ signe radiologique caractéristique

* A I possible : isolement Asp. ≡ LBA

ou AA positive

ou présence ≡ signe radio

→64 patients AA négative

62 ≡ vrais négatifs (aucun signe évocateur d'aspergillose)

2 ≡ faux négatifs

. Fiévre résistant aux antibio+

isolement Asp. d'un nodule sc

. image pulmonaire à la radio du thorax + toux

→AI possible

- 10 patients AA positive

5 ≡ vrais positifs

4 AI probables (signes cliniques et / ou radiologique en faveur de la maladie)

1 AI possible (dans un cas isolement d'*A.fumigatus* dans le LBA)

5 ≡ faux positifs

Absence de tout signe d'appel

Au total

➔ 7 patients ≡ probléme aspergillaire

* neutropénie depuis = 19 jours

* 4 AI probables

2 AI possibles

1 AI non classée

5 patients ≡ AA positive plusieurs semaines de suite avec augmentation du taux

- 67 patients ≡ aucun symptome évoquant une aspergillose

  * 62 ≡ AA négative

    5 ≡ AA positive de façon transitoire

    (1 ou 2 semaines)

Test:

Sensibilité: 71%

Spécificité: 98%

2- Candidose profonde :

- Son diagnostic repose sur :
  - Mise en évidence de levures et pseudofilaments dans les biopsies
  - Mise en évidence de la dissémination hématogène : hémoculture +
- Tous les autres prélèvements → si positifs → témoin d'une colonisation

- Hémoculture → examen de valeur
  - une seule positive → a le même pronostic que plusieurs positives
  - quelque soit l'espèce isolée : *C.albicans* ou *C. non albicans*
  - la sensibilité des hémocultures : 40à60%

- La recherche d'Ac anti candida → difficilement interprétable (présence d'Ac chez le sujet sain)

- Le suivi sérologique des patients à risque est nécessaire → un examen / semaine

- A pratiquer : Elisa →sensible et quantitative

- Une séroconversion ou une augmentation significative du titre des Ac sur deux prélèvements successifs → argument en faveur d'une colonisation (qui précède l'infection)

- Suivi de l'Antigénémie

→ recherche de l'Ag mannane (sensibilité 0.1 ng/ml : test Elisa)

- Possibilité d'association des deux tests Elisa: recherche Ag et Ac

- sensibilité et spécificité de ces deux tests est respectivement de 80 % et 93 %

- Patients atteints de candidose systémique présentent :
  - soit une antigénémie élevée et absence d'Ac
  - soit des taux significatifs d'Ac et une antigénémie négative

- Dans la majorité des cas l'antigénémie précède la production d'Ac

- Dans plus de 73 % des cas le diagnostic de candidose systémique a été posé avant que la première hémoculture ne soit positive

Infections à levures

Service de Parasitologie – CNGMOT

Etude rétrospective sur 8 ans (1998-2005)

1648 prélèvements chez 452 patients

58 % hommes, 42 % femmes

Espèces	pourcentage
C.albicans	47,1 %
C.glabrata	24,9 %
C.Krusei	9,5 %
C.tropicalis	5,9 %
C.parapsilosis	4,4 %
C.lusitaniae	1,3 %
C.Kefyr	1 %
C.spp	3 %
Saccharomyces	0,9 %
Trichosporon	1,8 %
Geotrichum	0,1 %

Prélèvements	fréquence	Pourcentage
Prélèvements digestifs (Selles, ER)	741	50 %
Prélèvements ORL(gorge, nasal, buccal)	457	27,7 %
Prélèvements respiratoires (crachats, LBA, PTP)	195	11,8 %
Urines	130	8 %
Hémocultures (P/KT)	43	2,6 %
LCR	1	0,06 %
Matériel étranger (KT, SV)	23	1,4 %
Prélèvements vaginaux	21	1,3 %
Divers (pus, E.cutané…)	37	2,3 %

- Etude de la sensibilité aux antifongiques

*54% des souches ≡ sensibles

26,7% ≡ intermediaires

19,3% ≡ résistantes

*14% ≡ résistantes au fluconazole

(*C.albicans,C.glabrata,C.tropicalis,Trichosporon*)

*5 souches ≡ résistantes Ampho B

(*C.krusei, C.albicans,Trichosporon*)

3- Cryptococcose :

- Diagnostic aisé
- LCR : → mise en évidence de cryptocoque :
  - Examen direct à l'encre de chine
  - Culture
- Recherche de l'Ag soluble capsulaire → test d'une grande valeur :
  - Rapide → pratiqué en urgence
  - Excellente sensibilité et spécificité

Cryptococcose neuro-méningée

23 cas diagnostiqués(1990 – 2006)

- 16 cas HIV(+)
- 1 cas Diabéte non insulino dépendant
- 1 cas Cirrhose post hépatite B
- 1 cas Lupus érythémateux disséminé
- 2 cas Greffés rénaux
- 1 cas Déficit de l'immunité cellulaire
- 1 cas Maladie de Hodgkin

4- Pneumocystose :

- Diagnostic → mise en évidence de kystes et/ou trophozoîtes de pneumocystes

- LBA : méthode de référence

- Crachats induits → résultats très variables et de sensibilité nettement inférieure.

Pneumocystose

40 cas diagnostiqués (1990 – 2006)

26 cas HIV (+)

2 cas Greffés rénaux

10 cas Déficit en Ag HLA classe II

1 cas GSC

1 cas LMC allogreffe