



PCR Mucorales Diagnostic et suivi des mucormycoses

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie

Pr. B. Sendid, Dr. M. Cornu

Pôle de Biologie Pathologie Génétique, CHRU de Lille

Contexte

Les mucormycoses, autrefois appelées zygomycoses, sont des infections fongiques invasives, dues à des moisissures de l'environnement, et responsables d'une morbidité et de mortalité importante. Elles surviennent principalement chez des patients immunodéprimés notamment atteints d'hémopathies malignes, transplantés d'organes solides ou de cellules souches hématopoïétiques, diabétiques, mais également des patients immunocompétents dans un contexte de traumatisme cutané grave (post-opératoire, accident de la voie publique ou brûlures profondes) [1-3]. L'incidence des mucormycoses est estimée à 0,08 cas/10⁵/an et semble en augmentation ces dernières années (+6,4%/an entre 1997 et 2010) [4]. Jusqu'à présent, le diagnostic reposait uniquement sur des méthodes de faible rendement comme l'histologie, l'examen direct ou la culture. Un diagnostic de certitude est rarement posé, ou dans un délai trop long. Le principal diagnostic différentiel de la mucormycose est l'aspergillose invasive dont le traitement de première intention n'est pas adapté à la mucormycose. Le diagnostic précoce est donc essentiel pour une prise en charge thérapeutique optimale. Jusqu'à ce jour, aucun marqueur sérique spécifique n'avait été identifié pour un usage clinique. Récemment, une PCR en temps réel permettant de détecter l'ADN de Mucorales circulant [5], mais également dans les tissus, a été mise au point par l'équipe de mycologie du CHU de Besançon.

Principe de l'analyse

Cette analyse consiste en la réalisation de trois PCR en temps réel reposant sur une technologie TaqMan®. Ces PCR ciblent quatre genres différents de Mucorales parmi ceux les plus fréquemment isolés en France : *Lichtheimia* (anciennement *Absidia*), *Rhizomucor*, *Rhizopus* et *Mucor*, sans distinction possible entre les deux derniers genres dont les séquences génétiques sont très proches. L'ADN peut être extrait à partir de différents prélèvements, notamment les sérums, plasmas, lavages broncho-alvéolaires, biopsies, liquides biologiques divers,....

Performances de la méthode

Les premiers résultats rapportés dans la littérature concernent actuellement des études rétrospectives. La spécificité n'a donc pas pu être évaluée. Cependant, dans une première étude, différentes souches de champignons ont été testées ne révélant pas de faux positifs. Des sérums de patients ont également été testés : 10 patients sains, 10 patients d'onco-hématologie, 17 patients atteints d'aspergillose invasive probable ou prouvée et 14 patients atteints de pneumocystose. Les PCR Mucorales étaient négatives pour l'ensemble de ces sérums [5]. Des résultats négatifs ont également été obtenus au CHU de Lille, sur des sérums de 6 patients atteints d'infections fongiques invasives hors mucormycoses, et de patients à risque de mucormycose (brûlés).

La sensibilité de la PCR sur sérum est estimée à 81%-92% [6]. Des faux négatifs sembleraient essentiellement dus à une circulation aléatoire de l'ADN fongique, ou à l'absence d'ADN dans le fragment tissulaire analysé. La détection d'ADN circulant peut manquer de sensibilité chez les patients ayant une infection très localisée et lorsqu'un volume d'extraction est inférieur à 1 ml [6].

La méthode permet un diagnostic précoce, dans un délai allant de 26 à 68 jours avant le diagnostic mycologique [5][7].

Indications de la PCR

-La PCR Mucorales est indiquée dans le cadre du diagnostic des mucormycoses chez les patients présentant des facteurs de risque (hémopathies malignes, neutropénie profonde et prolongée, diabètes déséquilibrés, brûlures, traumatisme, transplantés d'organes solides, greffés de cellules souches hématopoïétiques, corticothérapie prolongée, surcharge en fer) et présentant des lésions évocatrices (cliniques ou radiologiques) d'infection fongique invasive.

- La détection d'ADN circulant est utilisée dans un but diagnostique et pronostique, lors d'un suivi thérapeutique de mucormycose.

Prélèvements

La recherche d'ADN circulant peut être réalisée sur sérum ou plasma (tubes secs ou EDTA) et nécessite un volume de 1,5 ml décanté stérilement. La recherche d'ADN *in situ* pourra être réalisée sur lavages broncho-alvéolaires, biopsies fraîches et liquides biologiques divers en fonction de la pertinence clinique. Les prélèvements doivent nous parvenir rapidement à 4°C.

Interprétation

Les PCR sont réalisées en duplicate. Une PCR positive évoque fortement une mucormycose. Une PCR négative n'élimine pas définitivement le risque de mucormycose. Le rendu du résultat est qualitatif, cependant le cycle seuil (correspondant au nombre de cycle à partir duquel l'amplification est détectée par le thermocycleur) est associé au résultat permettant un suivi du patient.

Délai de rendu de résultat et nomenclature

L'analyse est réalisée une fois par semaine (adaptation possible en fonction du nombre de demandes), le délai estimé est donc de 8 jours.

La détection d'ADN de Mucorales est un acte hors nomenclature, elle est codée N131+ N151 (BHN 500+ BHN480), soit un coût total de 264,60 €

Références

1. Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. Clin Infect Dis, 2005; 41(5): 634-53.
2. Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G, et al. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007). Clin Infect Dis, 2012; 54 Suppl 1: S35-43.
3. Skiada A, Pagano L, Groll A, et al. Zygomycosis in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. Clin Microbiol Infect, 2011; 17(12): 1859-67.
4. Bitar D, Che D. [Epidemiology of mucormycosis in metropolitan France, 1997-2010]. Med Sci, 2013; 29 Spec No 1: 7-12.
5. Millon L, Larosa F, Lepiller Q, et al. Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. Clin Infect Dis, 2013; 56(10): e95-101.
6. Millon L, Herbrecht R, Grenouillet F, et al. Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF). Clin Microbiol Infect, 2016; 22(9): 810 e1- e8.
7. Legrand M, Gits-Muselli M, Boutin L, et al. Detection of Circulating Mucorales DNA in Critically Ill Burn Patients: Preliminary Report of a Screening Strategy for Early Diagnosis and Treatment. Clin Infect Dis, 2016; 63(10): 1312-7.