



HAL
open science

Candidoses invasives en réanimation : données épidémiologiques, élaboration d'un score prédictif et mise au point de PCR pour le diagnostic

Milène Sasso

► **To cite this version:**

Milène Sasso. Candidoses invasives en réanimation : données épidémiologiques, élaboration d'un score prédictif et mise au point de PCR pour le diagnostic. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT008 . tel-01583954

HAL Id: tel-01583954

<https://theses.hal.science/tel-01583954>

Submitted on 8 Sep 2017

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'Université de Montpellier

**Préparée au sein de l'école doctorale
Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé
Et de l'unité de recherche UMR MiGEVEC**

Spécialité : Parasitologie-Mycologie

Présentée par Milène Sasso

**Candidoses invasives en réanimation :
données épidémiologiques, élaboration
d'un score prédictif et mise au point de
PCR pour le diagnostic**

Soutenue le 10 juillet 2017 devant le jury composé de

Mme F. BOTTEREL-CHARTIER, PU-PH, Université Paris-XII

Rapporteur

M. G. CHANQUES, PU-PH, Université de Montpellier

Examineur

Mme L. LACHAUD, MCU-PH, Université de Montpellier

Directeur

M. P. LE PAPE, PU-PH, Université de Nantes

Président du jury

M. S. RANQUE, MCU-PH, Université Aix-Marseille

Rapporteur



A Cyril et Gabriel,

A ma famille,

A mes amis.

Remerciements

A Madame le Professeur Françoise Botterel-Chartier et Monsieur le Docteur Stéphane Ranque,
pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

A Messieurs les Professeurs Gérald Chanques et Patrice Le Pape,
pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

A Madame le Docteur Laurence Lachaud,
pour m'avoir encadré pour ce travail et m'avoir accordé sa confiance. Merci pour ta disponibilité, tes conseils et ton soutien pendant mon assistantat et tout au long de la thèse. C'est un immense, immense plaisir de travailler avec toi.

A Madame le Docteur Nathalie Bourgeois,
pour son aide précieuse pendant ce travail.

A l'ensemble des personnes ayant contribué à ce travail,

Merci au Dr Sophie Bastide pour l'énorme travail sur les statistiques, à Anne-Cécile Normand pour son aide sur les microsatellites, à Axelle Cadière et son équipe, au Dr Philippe Rispaïl pour ces conseils avisés pendant la rédaction du manuscrit, au Dr Hélène Poujol, ainsi qu'à l'ensemble du personnel des réanimations des CHU de Montpellier et Nîmes.

A tous les membres du Laboratoire de Microbiologie du CHU de Nîmes,

pour leur présence et leur bonne humeur. Un grand merci plus particulièrement à Marie-Jo pour son aide précieuse en biologie moléculaire, à Alix ainsi qu'à Guillaume pour avoir géré le secteur pendant la rédaction du manuscrit. Merci également au Professeur Jean-Philippe Lavigne pour la confiance qu'il m'accorde pour la responsabilité du secteur de parasitologie-mycologie.

Liste des abréviations

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNr : ADN ribosomique

Ag : Antigène

APACHE : Acute Physiology and Chronic Health Evaluation

ASC : Aire sous courbe

ATCC : American Type Culture Collection

ATF : Antifongique

β DG : (1,3)- β -D-Glucane

CAGTA : *Candida albicans* germ tube antibody

CFU : Colony Forming Unit

CHU : Centre hospitalo-universitaire

CJP : Critère de jugement principal

CS : Candida Score

Ct : Cycle threshold

ddPCR : Droplet digital PCR

ECDC: European centre for disease prevention and control

ECMM : European Confederation of Medical Mycology

ELISA : Enzyme-linked immuno sorbent assay

ESCMID : European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

FDR : Facteur de risque

HR : Hazard ratio

IC : Index de colonisation

ICC : Index de colonisation corrigé

IC 95 % : Intervalle de confiance à 95 %

IDSA : Infectious Diseases Society of America

IFI : Infection fongique invasive

IIQ : Intervalle interquantile

ITS : Internal transcribed spacer

IV : Intra-veineuse

LOD : Limite de détection

MLMT : Multilocus microsatellite typing

MLST : Multilocus sequence typing

pb : Paires de bases

PCR : Polymerase chain reaction

PK : Protéinase K

PPI : Pour préparation injectable

qPCR : PCR quantitative

qsp : Quantité suffisante pour

rep-PCR : Repetitive sequence-based PCR

ROC : Receiver operating characteristic

SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë

Se : Sensibilité

Sp : Spécificité

U : Unité

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

VVC : Voie veineuse centrale

Résumé

Les patients de réanimation sont des patients à très haut risque de survenue de candidoses invasives associées à une importante mortalité. Les espèces du genre *Candida* sont retrouvées en troisième position des agents infectieux les plus fréquemment isolés au cours des septicémies. Le diagnostic reste difficile en raison d'une clinique aspécifique et d'une sensibilité médiocre des hémocultures. Des scores prédictifs, des biomarqueurs ou encore des PCR ont été développés de manière à améliorer le diagnostic et l'identification des patients à risque. Dans ce travail, la première partie présente les données de l'évolution de l'écologie fongique et des candidoses invasives, des prescriptions d'antifongiques et des sensibilités aux antifongiques sur une période de dix ans dans un service de réanimation. Au cours de cette période, les changements observés dans la prescription d'antifongiques n'ont pas entraîné de modifications significatives de l'écologie fongique ni d'apparitions de résistances. Dans une deuxième partie, nous présentons les résultats d'une étude prospective observationnelle bicentrique réalisée chez 435 patients non neutropéniques de réanimation. L'analyse de plusieurs variables (facteurs de risque de candidose invasive, colonisation à *Candida* sp., dosages d'antigène mannane et d'anticorps anti-mannane) a permis l'élaboration d'un score prédictif de survenue de candidose invasive. Finalement, la dernière partie du travail présente la mise au point de PCR *Candida* en temps réel dans le sang ainsi qu'une évaluation de la technologie digital PCR.

Mots-clés : Réanimation / Candidose invasive / Épidémiologie / Score prédictif / Biomarqueurs / PCR

Patients in intensive care units (ICU) are at very high risk of invasive candidiasis associated with high mortality rate. *Candida* species are the third cause of septicemia. Clinical signs lack of specificity and blood cultures lack of sensitivity, and therefore the diagnosis remains a challenge. In order to improve the identification of patients with invasive candidiasis, predictive rules, biomarkers and PCR have been developed. The first part of this work describes the evolution over a ten years period in one ICU in *Candida* species distribution, susceptibility to antifungal drugs and consumption of antifungal agents. Changes in antifungal drug consumption were observed but they were not associated with significant changes in fungal ecology or with the emergence of resistant species. In a second part, we present a prospective, observational and bicentric study performed in 435 non-neutropenic patients in ICU. Several variables (risk factors of invasive candidiasis, *Candida* colonization, mannan antigen and anti-mannan antibodies) were analyzed and a predictive score of invasive candidiasis has been developed. Finally, the last part presents the development of *Candida* real-time PCR in blood, as well as the evaluation of a digital PCR.

Key words: Intensive care unit / Invasive candidiasis / Epidemiology / Predictive score / Biomarkers / PCR

Sommaire

Introduction	13
Revue de la littérature sur les candidoses invasives	15
A. Formes cliniques	17
B. Facteurs de risque	18
C. Épidémiologie	21
D. Diagnostic	26
E. Prise en charge thérapeutique	39
Introduction du travail	45
Partie 1 : Épidémiologie à <i>Candida</i> sp. dans le service de réanimation du CHU de Nîmes	49
<i>Article 1</i> : Changes in <i>Candida</i> species distribution of colonizing and infecting isolates, antifungal drug consumption and susceptibility in a French intensive care unit : a 10-year study	51
Partie 2 : Étude prospective bicentrique en réanimation : élaboration d'un score prédictif	75
<i>Article 2</i> : Élaboration d'un score prédictif de candidose invasive chez les patients non neutropéniques de réanimation	77
<i>Analyse supplémentaire 1</i> : Analyse des données de l'étude au septième jour suivant l'admission	103
<i>Analyse supplémentaire 2</i> : Résultats des dosages de β DG	109
Partie 3 : PCR <i>Candida</i>	117
A. Mise au point de PCR <i>Candida</i> sp.	119
B. Évaluation de la technologie droplet digital PCR	145
Travaux supplémentaires	155
<i>Article 3</i> : Rapid emergence of FKS mutations in <i>Candida glabrata</i> isolates in a peritoneal candidiasis	157
<i>Article 4</i> : Evaluation of the DiversiLab® automated repetitive sequence-based PCR system for the characterization of <i>Candida albicans</i> and <i>Candida glabrata</i> isolates	161
Conclusion et perspectives	177
Bibliographie	183

Introduction

Les champignons sont responsables, en milieu hospitalier, d'environ 15 % des infections liées aux soins (Delaloye and Calandra, 2014). Les infections fongiques invasives (IFI) sont en augmentation (Bitar *et al.*, 2013), probablement en raison de l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés.

En réanimation, les IFI sont principalement liées aux espèces du genre *Candida*. Dans l'étude EPIC II (Extended Prevalence of Infection in Intensive Care), une étude multicentrique internationale réalisée en 2007 dans 1265 réanimations concernant 13 796 patients à un jour donné, *Candida sp.* était le troisième agent le plus fréquent (après *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas sp.*), isolé chez 17 % des patients infectés. Le genre *Aspergillus* et d'autres champignons étaient retrouvés respectivement chez 1,4 % et 1 % des patients infectés (Vincent *et al.*, 2009). Des données françaises récentes montrent que 87,3 % des IFI en réanimation sont des candidoses, et principalement des candidémies et des péritonites à *Candida sp.* (Gangneux *et al.*, 2016). L'incidence des candidémies est variable selon les centres. En France, les données disponibles montrent une incidence en réanimation de 6,9 cas pour 1000 admissions, dix fois plus importante que dans l'ensemble de l'hôpital (Renaudat *et al.*, 2013). La mortalité des candidoses invasives est élevée, avec des taux allant de 24 à 51 % (Wisplinghoff *et al.*, 2004; Leroy *et al.*, 2009; Lortholary *et al.*, 2011; Montravers *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 2013; Klingspor *et al.*, 2015). Des études ont montré que la mise en route rapide d'un traitement antifongique est indispensable (dans les 12 à 24 heures) pour réduire la mortalité (Morrell *et al.*, 2005; Garey *et al.*, 2006), hors à ce jour le diagnostic reste difficile et l'initiation du traitement est souvent retardée. En effet, la symptomatologie est aspécifique, les hémocultures possèdent une sensibilité médiocre, de l'ordre de 50 % (Clancy and Nguyen, 2013) et nécessitent un temps de pousse de plusieurs jours. Pour pallier à ce problème, une des options est une prise en charge thérapeutique empirique qui a pour avantage de traiter de manière précoce les patients infectés mais qui cible un nombre trop important de patients, qu'ils soient infectés ou non, avec des conséquences sur le coût financier et potentiellement sur l'écologie fongique. Des stratégies ont été proposées dans le but d'améliorer l'identification des patients les plus à risque de développer une candidose invasive et de traiter de manière plus ciblée les patients. Plusieurs équipes ont ainsi élaboré des scores prédictifs, basés sur les facteurs de risque de candidose invasive et/ou les données de colonisation à *Candida sp.* (Pittet *et al.*, 1994; León *et al.*, 2006; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2007, 2011; Playford *et al.*, 2016). L'utilisation de biomarqueurs (antigène mannane, anticorps anti-mannane, (1,3)- β -D-Glucane, PCR) a également été évaluée (Posteraro *et al.*, 2011; Poissy *et al.*,

2014; León *et al.*, 2016). Cependant, il n'existe toujours pas de consensus sur la stratégie à adopter, et bien que ces tests permettent de mieux identifier la population cible, leur valeur prédictive positive reste médiocre.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à différents aspects de la problématique des candidoses invasives en réanimation. Dans une première partie, nous avons fait le point sur l'évolution de l'écologie fongique, de l'incidence des candidémies, des prescriptions d'antifongiques et de la sensibilité aux antifongiques sur une période de dix ans dans le service de réanimation du centre hospitalier universitaire (CHU) de Nîmes. L'acceptation de notre projet « Évaluation du statut fongique à *Candida* sp. en réanimation » lors d'un appel d'offre interne au CHU de Nîmes nous a permis de mettre en place une étude prospective observationnelle, bicentrique (CHU de Montpellier et Nîmes) chez les patients non neutropéniques de réanimation. L'objectif de cette étude était d'établir et d'évaluer un score prédictif de candidose invasive. Des données cliniques et biologiques ont été recueillies. Les résultats sont présentés dans la deuxième partie de cette thèse. Finalement, nous avons souhaité mettre au point des PCR en temps réel pour la détection d'ADN de *Candida* sp. dans le sang et les évaluer sur un échantillon de patients ayant eu une candidémie. La technologie digital PCR a également été évaluée.

Revue de la littérature

A. Formes cliniques

Les candidoses donnent des tableaux cliniques variés, allant d'atteintes cutané-phanériennes et muqueuses à des atteintes profondes. Si les candidoses superficielles sont fréquentes et habituellement bénignes, les candidoses profondes surviennent chez des patients à risque et peuvent engager le pronostic vital. Les candidoses profondes sont définies par la présence d'une levure du genre *Candida* dans un site normalement stérile. On distingue :

- les candidémies : caractérisées par la présence de *Candida* sp. dans le sang circulant (au moins une hémoculture positive), elles peuvent se compliquer de localisations secondaires (oculaires, cardiaques,...) ;
- les candidoses invasives localisées : pour lesquelles un *Candida* sp. est isolé d'un site normalement stérile (candidoses intra-abdominales, hépatospléniques, ostéo-articulaires,...), avec ou sans candidémie associée ;
- et les candidoses disséminées : définies par la présence de *Candida* sp. dans au moins deux sites non contigus, avec ou sans candidémie associée.

Différents travaux de typage d'isolats de *Candida* sp. ont montré que, dans la grande majorité des cas, les souches isolées d'hémocultures sont identiques aux souches à l'origine de la colonisation (Reagan *et al.*, 1990; Voss *et al.*, 1994; Pfaller *et al.*, 1998; Stéphan *et al.*, 2002). Ceci établit que la plupart des infections sont d'origine endogène. Leur point de départ est principalement gastro-intestinal (Nucci and Anaissie, 2001). En effet, les levures font partie du microbiote digestif et sont considérées comme des agents opportunistes. Sous l'effet de facteurs favorisants, elles vont proliférer, coloniser différents sites, et s'il y a rupture de l'intégrité de la barrière intestinale, transloquer et disséminer par voie hématogène (Eggimann *et al.*, 2003) (Figure 1). Une contamination d'origine endogène à partir de levures présentes sur la peau est également possible, notamment avec *Candida parapsilosis* lors de la rupture de la barrière cutanée en présence de cathéter veineux central (Nucci and Anaissie, 2001). Des contaminations d'origine exogène, telles que des transmissions manuportées par le personnel soignant, ont été rapportées mais restent à ce jour plus rares (Pfaller *et al.*, 1998; Delfino *et al.*, 2014).

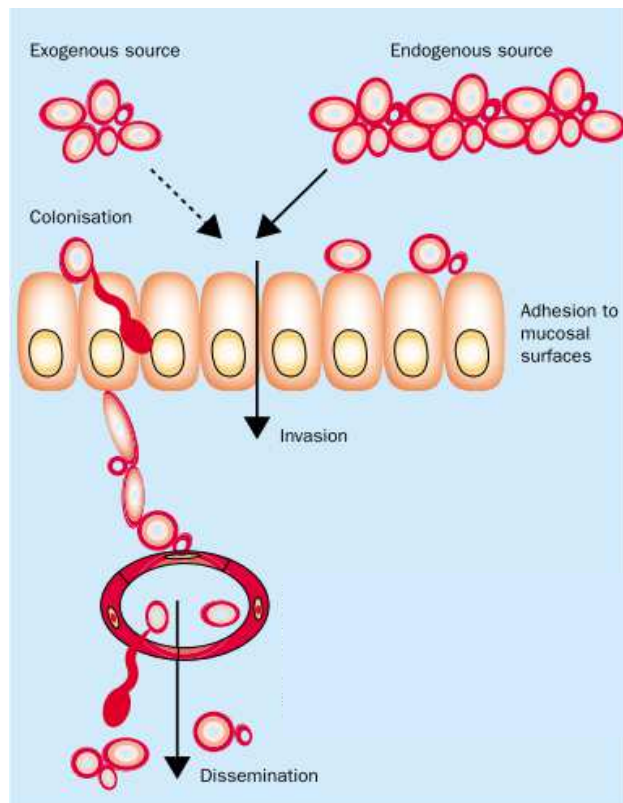


Figure 1. Physiopathologie des candidoses invasives (Eggimann *et al.*, 2003)

Récemment, *Candida auris*, considéré comme un pathogène émergent et caractérisé par sa multirésistance aux antifongiques, a été à l'origine d'épidémies (Calvo *et al.*, 2016; Schelenz *et al.*, 2016). Un hôpital londonien rapporte une épidémie à *C. auris* impliquant 50 patients infectés ou colonisés. La clonalité des souches suggère l'idée d'une transmission nosocomiale. Si la source de la contamination n'a pas été clairement identifiée, *C. auris* a été retrouvé dans l'environnement des patients infectés ou colonisés (Schelenz *et al.*, 2016). Une alerte a été publiée par le CDC (Centers for Disease Control and Prevention) en juin 2016 pour cette espèce.

B. Facteurs de risque

1. Colonisation à *Candida* sp.

La colonisation à *Candida* sp. est un facteur de risque principal de candidose invasive. Il s'agit en effet d'un préalable à l'infection. Des études ont montré que plus de 84 % des souches responsables d'infection sont génétiquement identiques aux souches à l'origine de la colonisation, celles-ci précédant généralement l'infection (Reagan *et al.*, 1990; Voss *et al.*, 1994).

En réanimation, 50 à 86 % des patients sont colonisés à *Candida* sp. durant leur séjour, mais seulement 5 à 30 % développeront une candidose invasive (Petri *et al.*, 1997; Hedderwick *et al.*, 2000; Eggimann *et al.*, 2003; Lau *et al.*, 2015; Liew *et al.*, 2015). À l'admission dans le service, la colonisation concerne 45 à 69 % des patients mais elle augmente avec la durée du séjour (Hedderwick *et al.*, 2000; Piarroux *et al.*, 2004; Charles *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2015). Dans 23 à 61 % des cas, il s'agit d'une colonisation multifocale (Charles *et al.*, 2005; León *et al.*, 2009; Posteraro *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2015), les sites principalement colonisés étant les selles, les urines, l'arbre respiratoire, le pharynx et l'œsophage/estomac (aspirations gastriques) (Rangel-Frausto *et al.*, 1999). Des auteurs ont retrouvé que la colonisation de certains sites était associée à un risque plus important de candidose invasive : risque relatif de 2,33 pour les selles et 1,76 pour les urines (León *et al.*, 2009) ; risque relatif respectivement de 2,25, 2,04 et 1,76 pour les colonisations au niveau des urines, de la gorge et du périnée (Lau *et al.*, 2015).

2. Autres facteurs de risque

De nombreux facteurs de risque, en plus de la colonisation à *Candida* sp., ont été identifiés et sont listés dans le tableau 1. Les principaux sont : l'utilisation d'antibiotiques à large spectre, la neutropénie, la présence d'un cathéter veineux central, la nutrition parentérale, ainsi que la chimiothérapie, une chirurgie récente (gastro-intestinale), une insuffisance rénale aiguë et l'hémodialyse (Blumberg *et al.*, 2001; Eggimann *et al.*, 2003; Pfaller and Diekema, 2007; Leroy *et al.*, 2009; Playford *et al.*, 2016).

Dans des études réalisées en réanimation, d'autres facteurs de risque ont été décrits : séjour prolongé en réanimation, score de réanimation défavorable, ventilation mécanique, choc, utilisation de fortes doses de corticoïdes (Blumberg *et al.*, 2001; McKinnon *et al.*, 2001; Guery *et al.*, 2009; Playford *et al.*, 2016).

3. Services à risque

Les services à haut risque de survenue de candidoses invasives sont les services de chirurgie, de réanimation, d'hémo-oncologie et les services qui prennent en charge les patients transplantés d'organes solides. Selon l'étude réalisée par l'ECMM (European Confederation of Medical Mycology) entre 1997 et 1999 dans six pays européens dont la France, 48,2 % des patients ayant développé une candidémie avaient eu une chirurgie (incluant les transplantations d'organes solides), 40,2 % étaient

hospitalisés en réanimation, 22,5 % avaient une tumeur solide et 12,3 % une pathologie hématologique (Tortorano *et al.*, 2006). Selon de nombreuses études, sur l'ensemble des candidémies diagnostiquées dans un hôpital, elles surviennent chez des patients hospitalisés en réanimation dans 27,7 à 51 % des cas (Marchetti *et al.*, 2004; Wisplinghoff *et al.*, 2004; Pfaller *et al.*, 2011; Lortholary *et al.*, 2014; Tavec *et al.*, 2016).

Tableau 1. Facteurs de risque de candidose invasive (d'après Eggimann *et al.*, 2011)

Facteurs de risque associés aux candidoses invasives
Colonisation multifocale à <i>Candida</i> sp.
Antibiothérapie à large spectre
Immunodépression
Neutropénie
Brûlures
Rupture intégrité barrière gastro-intestinale
Chirurgie abdominale majeure
Chirurgie du tractus urinaire en présence de candidurie
Traumatisme majeur
Nutrition parentérale
Hémodialyse
Score APACHE II > 20
Cathéter veineux central
Candidurie > 10 ⁵ CFU/mL
Âges extrêmes de la vie
Diabète
Insuffisance rénale
Chirurgie récente
Sonde urinaire
Cathéter vasculaire
Séjour en réanimation de plus de sept jours
Transfusions multiples

C. Épidémiologie des candidoses invasives

1. Candidémies

Les espèces du genre *Candida* sont la principale cause d'infections fongiques en milieu hospitalier. Selon les pays, elles sont responsables de 2,9 à 9 % des septicémies et sont retrouvées de la quatrième à la septième place des espèces isolées dans les hémocultures (Marchetti *et al.*, 2004; Wisplinghoff *et al.*, 2004; données ECDC, 2013; Doi *et al.*, 2016).

En réanimation, les fongémies représentent 8,3 % des septicémies selon l'étude EUROBACT (Epidemiology and outcome of hospital-acquired bacteremia) (Paiva *et al.*, 2016). Aux États-Unis, les *Candida* sp. sont à la troisième place des germes responsables des septicémies acquises en réanimation (10,1 % des cas), après les staphylocoques à coagulase négative et *S. aureus* (Wisplinghoff *et al.*, 2004). En Europe, des données allemandes ont trouvé des résultats similaires, les *Candida* sp. sont responsables de 6,5 % des septicémies, *Candida albicans* étant la quatrième espèce la plus fréquemment isolée après les staphylocoques à coagulase négative, *Enterococcus* sp. et *S. aureus* (Meyer *et al.*, 2013).

a. Incidence

L'incidence des candidémies aux États-Unis est estimée entre 0,3 et 0,46 pour 1000 admissions (Wisplinghoff *et al.*, 2004; Zaoutis *et al.*, 2005). En Europe, elle varie selon les pays et les centres de 0,15 à 2,53 pour 1000 admissions (Tableau 2), les taux les plus élevés étant retrouvés dans les pays du sud de l'Europe tels que l'Italie, l'Espagne et le Portugal (Bassetti *et al.*, 2013; Berdal *et al.*, 2014; Faria-Ramos *et al.*, 2014; Caggiano *et al.*, 2015; Barchiesi *et al.*, 2016). En France, peu de données sont disponibles. L'observatoire des levures, mis en place dans la région Île-de-France, a permis de collecter les données de candidémies de 27 hôpitaux de 2002 à 2010, l'incidence a ainsi été estimée à 0,6 pour 1000 admissions (Renaudat *et al.*, 2013). Une étude rétrospective récemment publiée sur les candidémies survenues de 2004 à 2010 au CHU de Nantes montrait une incidence moyenne de 0,38 pour 1000 admissions (Tadec *et al.*, 2016). Ces données françaises sont en accord avec les données européennes et internationales.

L'incidence des candidémies est plus élevée dans les services de réanimation. Elle est de 1,51 à 28 pour 1000 admissions, avec une extrême variabilité selon les études et les pays étudiés (Tableau 2) (Bougnoux *et al.*, 2008; Renaudat *et al.*, 2013; Klingspor *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Barchiesi *et al.*, 2016; Eliakim-Raz *et al.*, 2016; Tadec *et al.*, 2016). Dans l'étude européenne de l'ECMM réalisée en réanimation chirurgicale dans 14 pays entre 2006 et 2008, l'incidence la plus

Tableau 2. Incidence des candidémies à l'hôpital et en réanimation (* services de réanimation chirurgicale)

Références	Période étudiée	Pays (n = nombre de centres)	Taux pour 1000 admissions	Taux pour 10 000 jours d'hospitalisation
Incidence sur l'ensemble de l'hôpital				
Li <i>et al.</i> , 2015	2008-2010	Chine (n = 5)	0,16 (hors réanimation)	/
Berdal <i>et al.</i> , 2014	2002-2012	Norvège (n = 1)	0,23	/
Caggiano <i>et al.</i> , 2015	1998-2013	Italie (n = 1)	0,3 (0,08 à 0,68 selon les ans)	/
Zaoutis <i>et al.</i> , 2005	2000	États-Unis (<i>données nationales</i>)	0,3	/
Tadec <i>et al.</i> , 2016	2004-2010	France (n = 1)	0,38	/
Wisplinghoff <i>et al.</i> , 2004	1995-2002	États-Unis (n = 42)	0,46	/
Renaudat <i>et al.</i> , 2013	2004-2009	France (n = 27)	0,6	/
Eliakim-Raz <i>et al.</i> , 2016	2007-2014	Israël (n = 5)	0,61	/
Faria-Ramos <i>et al.</i> , 2014	2010-2011	Portugal (n = 10)	0,88 (0,15 à 2,4 selon les centres)	/
Barchiesi <i>et al.</i> , 2016	2010-2014	Italie (n = 1)	1,5	/
Bassetti <i>et al.</i> , 2013	2008-2010	Italie et Espagne (n = 5)	1,55 (0,8 à 2,53 selon les centres)	/
Marchetti <i>et al.</i> , 2004	1991-2000	Suisse (n = 17)	/	0,49
Das <i>et al.</i> , 2011	2005-2008	Royaume-Uni (n = 1)	/	1,09
Incidence en réanimation				
Li <i>et al.</i> , 2015	2008-2010	Chine (n = 5)	1,51	/
Barchiesi <i>et al.</i> , 2016	2010-2014	Italie (n = 1)	3,4	/
González de Molina <i>et al.</i> , 2012	2006-2007	Espagne (n = 32), Argentine (n = 5), France (n = 1)	3,43	14,8
Renaudat <i>et al.</i> , 2013	2004-2009	France (n = 27)	6,9	/
Eliakim-Raz <i>et al.</i> , 2016	2007-2014	Israël (n = 5)	7,35	/
Klingspor <i>et al.</i> , 2015	2006-2008	14 pays, étude ECMM (n = 57) *	12 (3 à 28 selon les pays)	/
Tortorano <i>et al.</i> , 2012	2006-2008	Italie (n = 38)	10	19,7
Aguilar <i>et al.</i> , 2015	2012-2013	Espagne (n = 1) *	19,1 (candidose invasive)	/
Meyer <i>et al.</i> , 2013	2006-2011	Allemagne (n = 682)	/	0,6
Ferreira <i>et al.</i> , 2015	2005-2012	France (n = 1) *	/	3,5

faible était retrouvée en Finlande (3 candidémies pour 1000 admissions) et la plus élevée était retrouvée en Espagne et Italie (28 pour 1000 admissions) (Klingspor *et al.*, 2015). Les données françaises disponibles montrent une incidence en réanimation dix fois supérieure à l'ensemble de l'hôpital, avec un taux de 6,9 pour 1000 admissions (Renaudat *et al.*, 2013).

Les disparités observées selon les centres peuvent s'expliquer par des différences sur les populations de patients hospitalisés, les méthodes diagnostiques ou encore sur la prise en charge thérapeutique (mise en place ou non de traitements précoces).

Dans des études réalisées dans les années 1980 à 1990, une tendance à l'augmentation de l'incidence des candidémies était observée, les taux se sont ensuite stabilisés de 1990 à 2000 dans de nombreux centres (Eggimann *et al.*, 2003). Des données plus récentes concernant l'évolution de cette incidence sont discordantes. En France, les données de l'observatoire des levures montrent une augmentation de l'incidence globale des candidémies entre 2004 et 2009 dans l'ensemble des hôpitaux parisiens mais également en réanimation (Lortholary *et al.*, 2014). Une tendance à l'augmentation entre 2005 et 2009 a également été observée par l'équipe de Nantes (Tadec *et al.*, 2016). Des données suisses et italiennes rapportent une stabilité de l'incidence (Marchetti *et al.*, 2004; Bassetti *et al.*, 2013).

b. Épidémiologie

Candida albicans est l'espèce majoritairement retrouvée dans les candidémies, dans 34,3 à 75,9 % des cas selon les études (Tableau 3). Plus de 90 % des candidémies sont dues aux cinq espèces suivantes : *C. albicans*, *Candida glabrata*, *C. parapsilosis*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei*. Des disparités sont observées dans la répartition des espèces selon les zones géographiques (Arendrup, 2010). En Europe, les deux espèces *C. glabrata* et *C. parapsilosis* sont respectivement retrouvées en deuxième et troisième position des germes responsables de candidémies, à l'exception des pays du sud de l'Europe (Italie, Portugal) où la part de *C. parapsilosis* est plus importante (22,9 à 34,8 %), cette espèce y étant retrouvée en deuxième position. En France, *C. tropicalis* est responsable de 9,5 % des candidémies (Tableau 3).

Certaines particularités dans la répartition des espèces responsables de candidémies ont été identifiées selon les populations de patients et les services. La proportion de *C. tropicalis* est importante en hématologie-oncologie (17 % des candidémies), celle de *C. parapsilosis* est élevée en néonatalogie (29 % des cas) (Sendid *et al.*, 2006; Tortorano *et al.*, 2006; Tadec *et al.*, 2016).

Tableau 3. Répartition des principales espèces impliquées dans les candidémies dans l'ensemble de l'hôpital et en réanimation (* : étude internationale)

Références	Période d'étude	Pays (n = nombre de centres)	Espèces isolées (en %)				
			<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
Ensemble de l'hôpital							
Pfaller <i>et al.</i> , 2011	2008-2009	Étude Sentry* (n = 79)	48,7	17,8	17,2	10	2,1
Doi <i>et al.</i> , 2016	2007-2010	Brésil (n = 16)	34,3	10,2	24,1	15,3	1,5
Li <i>et al.</i> , 2015	2008-2010	Chine (n = 5)	41,85	10	15	22,5	11,3
Lortholary <i>et al.</i> , 2014	2002-2010	France (n = 24)	54,9	17,2	13,8	9,5	2,8
Tadec <i>et al.</i> , 2016	2004-2010	France (n = 1)	52,3	9,6	14,2	9,6	4,1
Eliakim-Raz <i>et al.</i> , 2016	2007-2014	Israël (n = 5)	41,1	23,7	15,2	13,6	/
Caggiano <i>et al.</i> , 2015	1998-2013	Italie (n = 1)	44,2	5,6	34,8	4,8	2,8
Barchiesi <i>et al.</i> , 2016	2010-2014	Italie (n = 1)	54	9	23	10	0,7
Berdal <i>et al.</i> , 2014	2002-2012	Norvège (n = 1)	75,9	6,4	9	9	/
Faria-Ramos <i>et al.</i> , 2014	2010-2011	Portugal (n = 10)	40,4	13,3	22,9	6,3	5
Das <i>et al.</i> , 2011	2005-2008	Royaume-Uni (n = 1)	43	33	20	< 5	< 5
Réanimation							
Paiva <i>et al.</i> , 2016	2008	Étude Eurobact* (n = 162)	57,1	15,3	10,3	6,1	1
Pfaller <i>et al.</i> , 2011	2008-2009	Étude Sentry* (n = 79)	50,4	17,5	15,1	10,5	2,1
Meyer <i>et al.</i> , 2013	2006-2011	Allemagne (n = 682)	66	<i>Candida non albicans</i> : 25 %			
Li <i>et al.</i> , 2015	2008-2010	Chine (n = 5)	40	10	15	22,5	11
Bruyère <i>et al.</i> , 2014	2008-2011	France (n = 1)	61,9	23,8	4,8	4,8	/
Lortholary <i>et al.</i> , 2014	2002-2010	France (n = 24)	57,1	20	9,1	9,1	3
Barchiesi <i>et al.</i> , 2016	2010-2014	Italie (n = 1)	55	13	19	9	< 4
Bassetti <i>et al.</i> , 2009	1999-2007	Italie (n = 1)	46	13	22	/	/
Tortorano <i>et al.</i> , 2012	2006-2008	Italie (n = 38)	60,9	13	15,5	5,9	1,7
Faria-Ramos <i>et al.</i> , 2014	2010-2011	Portugal (n = 10)	44,7	12,7	22,3	4,2	5,3

En réanimation, la répartition des espèces est similaire à celle observée dans l'ensemble de l'hôpital (tous services confondus) (Tableau 3). En France, *C. albicans* est retrouvé dans 57,1 % des cas, suivi de *C. glabrata* (20 %), *C. parapsilosis* (9,1 %), *C. tropicalis* (9,1 %) et *C. krusei* (3 %) (Lortholary *et al.*, 2014).

Depuis les années 2000, des études ont montré des tendances à la baisse dans la proportion de *C. albicans* au profit de *C. glabrata* et *C. parapsilosis* (Tortorano *et al.*, 2012; Barchiesi *et al.*, 2016), alors que d'autres rapportent une certaine stabilité des espèces impliquées dans les candidémies (Tadec *et al.*, 2016).

Les données épidémiologiques pouvant être variables d'un pays à un autre mais également d'un centre à un autre, la connaissance de l'épidémiologie propre à chaque hôpital, ainsi que pour chaque service à risque est primordiale.

c. Mortalité

Les candidoses invasives sont associées à une mortalité élevée. Ainsi, le taux de mortalité brute des candidémies varie selon les études de 30 à 61 % dans la population générale (Gudlaugsson *et al.*, 2003; Wisplinghoff *et al.*, 2004; Bassetti *et al.*, 2013; Renaudat *et al.*, 2013; Lortholary *et al.*, 2014; Barchiesi *et al.*, 2016) et de 24 à 51 % en réanimation (Wisplinghoff *et al.*, 2004; Leroy *et al.*, 2009; Lortholary *et al.*, 2011; Tortorano *et al.*, 2012; Bassetti *et al.*, 2013; Meyer *et al.*, 2013; Aguilar *et al.*, 2015; Klingspor *et al.*, 2015; Barchiesi *et al.*, 2016; Paiva *et al.*, 2016).

Peu d'études se sont intéressées à la mortalité directement attribuable aux candidémies, il est en effet difficile de distinguer la mortalité attribuable exclusivement à la candidose de la mortalité principalement liée à la maladie grave sous-jacente. Les données de la littérature sont relativement contradictoires, la mortalité attribuable aux candidémies varie de 14,5 % à 71 % (Gudlaugsson *et al.*, 2003; Zaoutis *et al.*, 2005; Falagas *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2011).

Des études rapportent également des différences de mortalité selon les espèces impliquées. Les candidémies à *C. parapsilosis* ont été associées à une meilleure survie (Pappas *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2009; González de Molina *et al.*, 2012; Pfaller *et al.*, 2012; Lortholary *et al.*, 2014), et celles à *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. krusei* à une mortalité plus élevée (Pappas *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2009; Andes *et al.*, 2012; Lortholary *et al.*, 2014). D'autres facteurs tels qu'un âge ou un score APACHE élevés sont légitimement associés à une mortalité plus importante (Pappas *et al.*, 2003; Dupont *et al.*, 2009; Andes *et al.*, 2012; González de Molina *et al.*, 2012).

Selon une étude publiée par Lortholary *et al.*, une augmentation de la mortalité a été observée dans les réanimations, passant de 42,7 % en 2003 à 53,9 % en 2009, alors qu'elle est restée inchangée dans le reste de la population (Lortholary *et al.*, 2014). Les causes de cette augmentation sont inconnues, mais elle peut être liée à l'hospitalisation de patients plus graves.

2. Autres candidoses invasives

Les candidoses invasives en réanimation sont principalement des candidémies et des candidoses intra-abdominales. L'épidémiologie des candidoses intra-abdominales est superposable à celle des candidémies, avec toutefois une proportion plus faible de *C. parapsilosis*, de l'ordre de 1,1 à 4,8 % (Bassetti *et al.*, 2015; Montravers *et al.*, 2016). Dans le sous-groupe des péritonites à *Candida* sp. de l'étude AmarCAND, une étude prospective multicentrique réalisée dans 180 réanimations françaises, *C. albicans* était retrouvé dans 58,3 % des cas, suivi de *C. glabrata* (20,4 %), *C. krusei* (8,3 %), *Candida kefyr* (4,6 %), *C. tropicalis* (2,8 %) et *C. parapsilosis* (2,8 %) (Montravers *et al.*, 2011). Dans l'étude AmarCAND2 réalisée six ans plus tard, la répartition est sensiblement identique, avec un pourcentage plus important de *C. albicans* (67 %) (Montravers *et al.*, 2016). Les taux de mortalité des candidoses intra-abdominales sont similaires à ceux observés dans les candidémies, compris entre 27 et 52 % (Dupont *et al.*, 2002; Montravers *et al.*, 2006, 2011; Bassetti *et al.*, 2015).

D. Diagnostic des candidoses invasives

Du fait d'une symptomatologie aspécifique, le diagnostic clinique des candidoses invasives demeure difficile. Il est évoqué chez un patient à risque devant toute fièvre prolongée résistante à un traitement antibiotique large spectre adapté.

1. Diagnostic mycologique

Le diagnostic mycologique repose sur la positivité à l'examen direct et/ou en culture d'un site normalement stérile. Pour cela, des prélèvements doivent être réalisés, si possible avant tout traitement antifongique. Si la réalisation d'hémocultures doit être systématique, d'autres sites stériles profonds peuvent être échantillonnés selon le contexte clinique et radiologique.

a. Réalisation d'hémocultures

La réalisation d'hémocultures est la méthode de référence pour le diagnostic des candidémies. Les recommandations 2012 de l'ECSMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) préconisent la réalisation d'hémocultures une fois par jour, prélevées en une seule fois. Le volume total à prélever, réparti entre les flacons aérobie et anaérobie, est dépendant du poids du patient : il est de 40-60 mL pour un adulte, de 2-4 mL pour les enfants de moins de 2 kg, de 6 mL pour ceux avec un poids entre 2 et 12 kg et de 20 mL pour ceux avec un poids compris entre 12 et 36 kg. L'incubation des flacons doit être d'au moins cinq jours (Cuenca-Estrella *et al.*, 2012).

La sensibilité des hémocultures est estimée à 50-75 % (Clancy and Nguyen, 2013). La quantité de levures circulant dans le sang est très faible. Dans 68 % des cas, les hémocultures positives contiennent moins de 5 CFU/mL (53 % des cas avec ≤ 1 CFU/mL) (Pfeiffer *et al.*, 2011). Ainsi, les hémocultures peuvent être négatives en cas de faibles quantités circulantes ou lors de candidémies intermittentes. Un autre problème à prendre en compte est le délai de positivité qui est généralement de deux à trois jours mais qui peut être plus long (Meyer *et al.*, 2004).

L'ajout d'un flacon spécifiquement dédié à la détection de champignons, le flacon Mycosis avec le système Bactec™ (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), présente le principal avantage d'améliorer la détection des *Candida* sp. en cas de septicémies polymicrobiennes. L'ajout de ce flacon, en plus des flacons classiques aérobie et anaérobie, est à recommander pour les patients à haut risque de candidoses invasives tels que les patients de réanimation ou d'hémo-oncologie (Meyer *et al.*, 2004; Chiarini *et al.*, 2008; Klingspor *et al.*, 2012).

b. Prélèvements profonds

Selon les arguments cliniques et radiologiques, divers échantillons pourront être prélevés tels que des liquides biologiques (liquide céphalo-rachidien,...) ou des biopsies (hépatiques, pulmonaires,...).

2. Biomarqueurs

a. Recherche d'antigène mannane et d'anticorps anti-mannane

L'antigène (Ag) mannane est un constituant majeur de la paroi des *Candida* sp. (Klis, 1994). Des tests ont été développés pour détecter dans le sérum l'antigène mannane circulant. Des anticorps (Ac) dirigés contre cet antigène peuvent également être recherchés. Ce sont principalement des tests ELISA qui permettent ces dosages, les kits les plus étudiés étant les kits Platelia *Candida* Ag et Ac

(Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Dans une méta-analyse de Mikulska *et al.* reprenant 14 études réalisées entre 1998 et 2010 avec ces kits, la sensibilité et la spécificité pour le diagnostic de candidose invasive étaient respectivement de 58 et 93 % pour les antigènes, et de 59 et 83 % pour les anticorps (Mikulska *et al.*, 2010). L'équipe de Sendid a montré une alternance dans la circulation de l'antigène mannane et des anticorps anti-mannane, ce qui suggère que la détection combinée est plus performante (Sendid *et al.*, 1999). Cette détection antigène/anticorps permet un gain en sensibilité (83 %) avec une spécificité de 86 % (Mikulska *et al.*, 2010). Des sensibilités différentes ont également été rapportées selon les espèces de *Candida* sp., notamment avec des sensibilités plus faibles pour *C. parapsilosis* ou *Candida guilliermondii* (Mikulska *et al.*, 2010; Held *et al.*, 2013).

Dans des études rétrospectives ayant évalué la performance de ces deux tests chez des patients de réanimation, la sensibilité variait de 42 à 69 % pour l'antigène mannane, de 44 à 78 % pour les anticorps, et de 76 à 94 % pour la combinaison antigène/anticorps, avec des spécificités de 92 à 100 % (Mikulska *et al.*, 2010). Dans une étude prospective multicentrique réalisée entre 2012 et 2014 en réanimation, la sensibilité et spécificité étaient respectivement de 43 et 67 % pour l'antigène mannane, et de 25,8 et 89 % pour les anticorps anti-mannane (León *et al.*, 2016).

L'intérêt de la détection combinée antigène mannane/anticorps anti-mannane réside dans la précocité diagnostique. En effet, ces tests étaient positifs dans 73 % des cas avant l'hémoculture, avec une moyenne de six jours avant pour l'antigène et sept jours avant pour les anticorps (Mikulska *et al.*, 2010).

Ces tests sont essentiellement utilisés en Europe. Seule leur utilisation combinée est recommandée par l'ECSMID pour le diagnostic des candidémies et des candidoses chroniques disséminées (Cuenca-Estrella *et al.*, 2012). Leur utilisation n'est pas préconisée dans les recommandations 2016 de l'IDSA (Infectious Diseases Society of America) (Pappas *et al.*, 2016).

b. Recherche de (1,3)- β -D-Glucane (β DG)

Le β DG est un constituant de la paroi de nombreux champignons, à l'exception des Zygomycètes et de *Cryptococcus* sp. (Hope *et al.*, 2005; Odabasi *et al.*, 2006; Marty and Koo, 2009). Sa détection n'est donc pas spécifique des candidoses invasives.

Le dosage est basé sur l'activation par le β DG d'une cascade de coagulation (Figure 2), avec une révélation colorimétrique ou turbidimétrique selon le test utilisé. Plusieurs kits existent, le plus répandu en Europe et aux États-Unis est le kit Fungitell® (Associates of Cape Cod, Falmouth, États-Unis), dont le principe est présenté dans la figure 2. Le β DG active le facteur G, une sérine protéase extraite du lysat d'amœbocyte de *Limulus polyphemus* pour le kit Fungitell®. Le facteur G

activé convertit l'enzyme inactive de procoagulation en enzyme de coagulation active qui coupe la protéine pNA du substrat peptidique chromogénique, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, créant un chromophore qui absorbe à 405 nm (Odabasi *et al.*, 2004; Hope *et al.*, 2005; Marty and Koo, 2009).

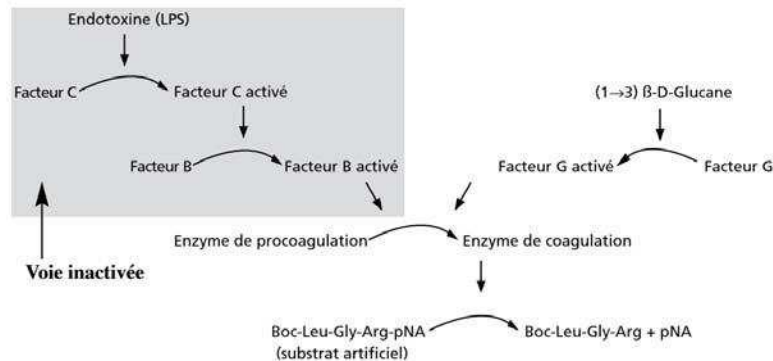


Figure 2. Mécanisme du dosage du β DG avec le kit Fungitell® (notice fournisseur)

Il s'agit d'une technique onéreuse et complexe, nécessitant un équipement particulier. L'interprétation de ce test peut être délicate par l'existence de nombreux faux positifs : lors de bactériémies, d'hémodialyses, d'utilisation d'antibiotiques (amoxicilline-acide clavulanique par voie intraveineuse), d'immunoglobulines, d'albumine ou encore de gazes chirurgicales contenant du glucane,...(Kato *et al.*, 2001; Pickering *et al.*, 2005; Mennink-Kersten *et al.*, 2006; Lo Cascio *et al.*, 2015; Pini *et al.*, 2016).

Dans deux méta-analyses, la sensibilité et la spécificité du β DG étaient respectivement de 76,8 et 85,3 % pour le diagnostic d'infections fongiques invasives, de 81 et 81 % pour le diagnostic de candidoses invasives. Toutefois, l'essentiel des études étaient réalisées chez des patients d'hématologie (Karageorgopoulos *et al.*, 2011; Onishi *et al.*, 2012).

Si l'on s'intéresse à des études réalisées en réanimation (Tableau 4), les performances décrites sont assez variables, avec une sensibilité allant de 66 à 100 % et une spécificité de 30,6 à 89,3 %. La valeur prédictive positive (VPP) est faible, entre 19 et 56 %, l'intérêt de ce test étant sa bonne valeur prédictive négative (VPN), variant entre 78 et 100 % selon les études (León *et al.*, 2009; Tissot *et al.*, 2013; Poissy *et al.*, 2014; Liew *et al.*, 2015; Martín-Mazuelos *et al.*, 2015; León *et al.*, 2016; Posteraro *et al.*, 2016). Des études ont montré une meilleure spécificité et VPP soit en réalisant le dosage deux fois soit en utilisant des seuils d'interprétation différents de ceux proposés par le fournisseur (Tissot *et al.*, 2013; Poissy *et al.*, 2014; Martín-Mazuelos *et al.*, 2015; León *et al.*, 2016).

Un intérêt de ce dosage pourrait être sa précocité diagnostique. En effet, des résultats positifs étaient retrouvés en médiane dix jours avant le diagnostic de candidémies dans l'étude de Poissy *et*

al. (2014) ou cinq jours avant le diagnostic de candidoses intra-abdominales dans l'étude de Tissot *et al.* (2013).

Le dosage du β DG est recommandé par l'ESCMID pour le diagnostic des candidoses invasives (Cuenca-Estrella *et al.*, 2012). Dans les recommandations 2016 de l'IDSA, l'intérêt de ce dosage en réanimation est d'exclure la candidose invasive. Il est en effet recommandé d'arrêter, au bout de quatre à cinq jours, un traitement empirique instauré chez des patients à haut risque de candidose invasive, en l'absence d'amélioration clinique, de preuve de candidose invasive ou en cas de résultat négatif d'un test ayant une forte VPN, tel que la recherche de β DG (Pappas *et al.*, 2016).

c. Autres biomarqueurs

Le test CAGTA (*Candida albicans* germ tube antibody) (Vircell, Grenade, Espagne) a été évalué dans la littérature par des équipes espagnoles (Martínez-Jiménez *et al.*, 2015a, 2015b; León *et al.*, 2016). Il détecte les anticorps dirigés contre les antigènes localisés sur la surface de la paroi cellulaire du mycélium de *C. albicans*. Ce dosage, réalisé initialement par technique d'immunofluorescence, est adapté sur un système automatisé de chimiluminescence (Parra-Sánchez *et al.*, 2017). Dans l'étude publiée par León *et al.* en 2016, réalisée en réanimation chez des patients présentant une affection abdominale sévère, ce test a montré une sensibilité moyenne. Une combinaison des tests CAGTA et β DG a été proposée par cette équipe pour obtenir une sensibilité de 90,3 % et une VPN de 96,9 % (León *et al.*, 2016).

Un nouveau biomarqueur a été récemment publié par une équipe Lilloise. Il s'agit du test MS-DS qui consiste à détecter dans le sérum un dihexasaccharide (DS), molécule panfongique circulant pendant l'infection, par spectrométrie de masse (MS). L'étude rétrospective, réalisée chez 23 patients avec une candidose invasive, a révélé une sensibilité de 83 % et une spécificité de 69 %. Ce test a montré une sensibilité inférieure au dosage des β DG mais supérieure à la recherche d'antigènes mannane. Le dihexasaccharide était détecté en médiane trois jours avant l'hémoculture. Ce test a également montré son intérêt pour le diagnostic des aspergilloses invasives et des mucormycoses (Mery *et al.*, 2016).

Tableau 4. Présentation des études réalisées chez les adultes non neutropéniques en réanimation concernant l'utilisation de biomarqueurs et/ou de scores prédictifs de candidose invasive (* Se : sensibilité, Sp : spécificité, VPP : valeur prédictive positive, VPN : valeur prédictive négative, β DG : (1,3)- β -D-Glucanes en pg/mL, Man : antigène mannane, Anti-Man : anticorps anti-mannane, CS : Candida Score, CAGTA : *C. albicans* germ tube antibody, ATF : antifongique, IC : index de colonisation, ICC : index de colonisation corrigé, FDR : facteurs de risque, OZ : Ostrosky-Zeichner, IAC : candidose intra-abdominale, Ac : anticorps, IFI : infection fongique invasive) (** études en réanimation chirurgicale)

Référence, Type d'étude, Année	Nombre de patients (n) et critères inclusion	Méthodologie	Résultats	Se / Sp / VPP / VPN* (en %)
Etudes évaluant des biomarqueurs				
Poissy <i>et al.</i> , 2014	n = 110	- Dosages : β DG*, Man* et Anti-Man*	Candidémie : n = 43 Colonisation : n = 67	β DG : 97,1 / 30,6 / - / - β DG (seuil 350) : 65 / 74 / - / - Man : 32,3 / 95,8 / - / -
Rétrospective Cas/Contrôle 2005-2010	Cas : patients avec candidémie Contrôles : patients colonisés		Patients candidémiques : β DG positifs plusieurs semaines (médiane 10 j) avant hémoculture, tous les β DG sont positifs (> 250) au moment de l'hémoculture Conclusion : combinaison β DG et Man	Anti-Man : 52,9 / 66,2 / - / - Man + Anti-Man : 58,8 / 64,8 / - / -
Martín-Mazuelos <i>et al.</i> , 2015	n = 107	7 jours après admission puis 1 fois par semaine : - Dépistage colonisation et calcul du CS* - Dosages : β DG, CAGTA*	Candidose invasive : n = 15 (14 %) Colonisation : n = 63 Absence de colonisation/infection : n = 29	β DG (1 dosage) : 80 / 44,6 / 19 / 93,2 β DG (2 dosages) : 80 / 75,7 / 34,9 / 95,9
Prospective 2011-2012	Séjour > 7 jours		CAGTA non utile pour discriminer colonisés et infectés	
Martínez-Jiménez, <i>et al.</i> , 2015b	n = 100	Après début du traitement empirique (J0, J3 et J5) : - Dosages : β DG et CAGTA	Candidose invasive prouvée/probable : n = 42 Absence d'infection : n = 58	performances en réanimation β DG + CAGTA (1 dosage) : 100 / 42,6 / 22,5 / 100 β DG + CAGTA (2 dosages) : 88,9 / 59,3 / 26,7 / 97
Prospective 2012-2014	Patients avec traitement empirique (63 % en réanimation)			

Martínez-Jiménez <i>et al.</i> , 2015a	n = 81 Candidémie ou Bactériémie	- Dosages : β DG, CAGTA, Man et Anti-Man	Candidémie : n = 31 Bactériémie : n = 50	β DG : 83,9 / 91,8 / 86,7 / 90 Man : 64,3 / 95,7 / 90 / 81,8 Anti-Man : 61,5 / 65,8 / 55,2 / 71,4 CAGTA : 58,1 / 92 / 81,8 / 78 Man + Anti-Man : 86,2 / 60,5 / 62,5 / 85,2 β DG + Anti-Man : 96,7 / 59 / 64,4 / 95,8
--	-------------------------------------	--	---	---

León <i>et al.</i> , 2016	n = 233	4 jours après admission puis 2 fois par semaine :	Candidose invasive : n = 31 (11 candidémies et 20 IAC*) (13,3 %) Colonisation : n = 154 Absence de colonisation/infection : n = 48	β DG : 76,7 / 57,2 / 21,7 / 94,1 (seuil 80) β DG : 60 / 79,4 / 30,5 / 92,9 (seuil 200) CAGTA : 53,3 / 64,3 / 18,4 / 90,1 Man : 43,3 / 67,3 / 16,7 / 88,7 Anti-Man : 25,8 / 89 / 26,7 / 88,6 Man + AntiMan : 54,8 / 59,9 / 17,3 / 89,6 PCR : 84 / 32,9 / 26,9 / 87,5 β DG + CAGTA : 90,3 / 42,1 / 19,3 / 96,9
Prospective Multicentrique 2012-2014	Séjour > 7 jours et affection abdominale sévère	- Dépistage colonisation => Calcul du CS - Dosages : β DG, CAGTA, Man, Anti-Man	PCR, Man et anti-Man peu utiles pour distinguer colonisation et infection Meilleure combinaison : β DG + CAGTA	
		Si traitement ATF* : - Hémoculture et PCR <i>Candida</i> multiplexe à J0, J3, J7 et J14		

Etudes évaluant des scores

Pittet <i>et al.</i> , 1994	n = 29	Quotidiennement : suivi de la colonisation	Candidose invasive : n = 11 Colonisation seule : n = 18	IC : 100 / 69 / 66 / 100 ICC : 100 / 100 / 100 / 100
Prospective** 1989	Patients colonisés	Définition d'un IC* et d'un ICC* (cf. tableau 5)	Patients colonisés : IC = 0,47 Patients infectés : IC = 0,7 (dans la totalité des cas : IC \geq 0,5 et ICC \geq 0,4)	
Paphitou <i>et al.</i> , 2005	n = 327	Construction d'une règle basée sur les FDR* (cf. tableau 5)	Candidose invasive prouvée/probable : n = 23 (7,1 %) Candidose invasive possible : n = 13	Règle : 78 / - / - / -
Rétrospective** 2000	Séjour \geq 4 jours		Taux de candidose invasive chez les patients avec la règle positive : 16,6 % (vs 5,1 % chez les patients avec la règle négative)	

León <i>et al.</i> , 2006	n = 1699	A l'admission puis 1 fois par semaine : - Dépistage colonisation	Candidose invasive : n = 97 (5,8 %) Colonisation sans infection : n = 883 Absence de colonisation/infection : n = 719	CS > 2,5 : 81 / 74 / - / - CS > 3 : 61 / 86 / - / -
Prospective Multicentrique 1998-1999	Séjour > 7 jours	Construction d'un modèle basé sur la colonisation et les FDR (cf. tableau 5) : CS	CS > 2,5 : risque 7,75 fois plus élevé d'avoir une candidose invasive	
Ostrosky-Zeichner <i>et al.</i> , 2007	n = 2890 Séjour > 4 jours	Construction d'une règle basée sur les FDR (cf. tableau 5)	Candidose invasive : n = 88 (3 %)	Règle OZ* 2007 : 34 / 90 / 9 / 97
Rétrospective Multicentrique 2000-2002			Taux de candidose invasive chez les patients avec la règle positive : 9,9 % (vs 2,3 % chez les patients avec la règle négative)	
Ostrosky-Zeichner <i>et al.</i> , 2011	n = 597 (80 % en réanimation chirurgicale)	Modification de la règle de 2007 (cf. tableau 5)	Candidose invasive : n = 22 (3,7 %)	Règle OZ 2011 : 50 / 83 / 10 / 98
Rétrospective Multicentrique 2005	Séjour > 4 jours		Taux de candidose invasive chez les patients avec la règle positive : 10,1 % (vs 2,3 % chez les patients avec la règle négative)	
Hermesen <i>et al.</i> , 2011	n = 352 Séjour > 7 jours	Création d'une règle locale basée sur les FDR pondérés (cf. tableau 5)	Candidose invasive : n = 88 Absence de candidose invasive : n = 264	Règle locale : 84,1 / 60,2 / 4,7 / 99,4 Règle Paphitou : 40,9-45,6 / 81 / 5 / 98,3 Règle OZ 2007 : 65,9-73,9 / 60,6-64 / 4,1 / 99
Rétrospective Cas/Contrôle 2003-2008				

Leroy <i>et al.</i> , 2011	n = 94	Deux fois par semaine : -Dépistage colonisation et calcul du CS	Candidose invasive : n = 5 (5,3 %)	CS ≥ 3 : - / - / 23,8 / 100
Prospective Multicentrique 2010-2011	Sepsis sévère/choc septique	Construction d'un modèle basé sur les FDR (cf. tableau 5)	50 patients/94 avec CS ≥ 3 Association entre l'augmentation du CS et l'augmentation du taux de candidose invasive (0 % pour CS ≤ 3, 17,6 % pour CS = 4 et 50 % pour CS = 5)	
Lau <i>et al.</i> , 2015	n = 6015	3 jours après l'admission puis 2 fois par semaine : - Dépistage colonisation	Candidose invasive : n = 73 (1 %)	Performances à J3 : Colonisation à un site : 78 / 40 / 2 / 99 IC ≥ 0,5 : 48 / 71 / 2 / 99
Prospective Multicentrique 2007-2012	Séjour > 3 jours		Parmi les patients infectés : 89 % sont colonisés à J3, 97 % à la 2ème détection, 48 % ont un IC ≥ 0,5	
Playford <i>et al.</i> , 2016	n = 6685	3 jours après l'admission puis 2 fois par semaine : - Dépistage colonisation	Candidose invasive : n = 96 (1,43 %)	Score Playford ≥ 6 : 39,6 / 95,7 / 11,7 / 99,1 Règle OZ 2007 : 53,1 / 70,5 / 2,5 / 99 Règle OZ 2011 : 75 / 50,7 / 2,2 / 99,3
Prospective Multicentrique 2007-2010	Séjour > 3 jours	Construction d'un modèle basé sur les FDR (cf. tableau 5)	Patients infectés : score médian à 5 Patients non infectés : score médian à 3 Score ≥ 6 (risque élevé) : 4,8 % de l'ensemble des patients et 39,6 % de ceux avec candidose invasive (incidence 11,7 %) Score entre 3 et 5 (risque intermédiaire) : 52,1 % de l'ensemble des patients et 53,1 % de ceux avec candidose invasive (incidence 1,46 %) Score ≤ 2 (risque faible) : 43,1 % de l'ensemble des patients (incidence 0,24 %)	

Etudes évaluant scores et biomarqueurs				
León <i>et al.</i> , 2009	n = 1107	7 jours après admission puis 1 fois par semaine :	Candidose invasive : n = 58 (5,2 %) Colonisation : n = 834 Absence de colonisation/infection : n = 215	CS ≥ 3 : 77,6 / 66,2 / 13,8 / 97,7 IC ≥ 0,5 : 72,7 / 47,4 / 8,7 / 96,1 βDG (seuil 75) : 77,8 / 52,7 / - / -
Prospective Multicentrique 2006-2007	Séjour > 7 jours	- Dépistage colonisation => Calcul du CS et IC - Dosages : βDG, Ac* anti- <i>Candida</i> (Syscan)	Association linéaire entre augmentation du CS et augmentation du taux de candidose invasive 13,8 % de candidose invasive chez patients avec CS ≥ 3 vs 8,7 % avec IC ≥ 0,5 Risque de candidose invasive : x5,98 avec CS ≥ 3 vs 2,24 avec IC ≥ 0,5 Candidose invasive : 18 βDG positifs/22	
Posteraro <i>et al.</i> , 2011	n = 95	A l'admission, au J0 de l'inclusion, au J3 puis 1 fois par semaine :	IFI* : n = 16 dont 14 candidoses invasives (16,8 %)	βDG : 92,9 / 93,7 / 72,2 / 98,7 CS ≥ 3 : 85,7 / 88,6 / 57,1 / 97,2 IC ≥ 0,5 : 64,3 / 69,6 / 27,3 / 91,7 βDG + CS ≥ 3 : 100 / 83,5 / 51,8 / 100
Prospective 2010	Séjour > 5 jours et sepsis	- Dépistage colonisation => calcul du CS et IC Au moment du sepsis : hémoculture et dosage βDG	Groupe IFI : taux plus élevé de colonisation multifocale (62,5 % vs 37,9 %), de βDG positifs (93,7 % vs 6,3 %), CS ≥ 3 (75 % vs 11,4 %) et IC ≥ 0,5 (56,3 % vs 30,4 %)	
Caggiano <i>et al.</i> , 2011	n = 51	A l'admission puis tous les 3 jours pendant 2 semaines	Candidose invasive : n = 3 (5,9 %)	Man : 66,6 / 100 / - / - Anti-Man : 100 / 100 / - / -
Prospective 2008	Séjour > 7 jours et neurochirurgie	- Dépistage colonisation => calcul IC et ICC - Dosages : Man et Anti-Man	Chez tous les patients infectés : IC ≥ 0,5, Man et Anti-Man positifs	

León <i>et al.</i> , 2012 Prospective Multicentrique 2009-2010	n = 176 (76,1 % d'origine chirurgicale) Séjour > 7 jours et affection abdominale sévère	3 jours après admission puis 2 fois par semaine - Dépistage colonisation => calcul du CS - Dosages : β DG, CAGTA	Candidose invasive : n = 31 (17,6 %) Colonisation sans infection : n = 84 Absence de colonisation/infection : n = 61 59,3 % patients avec β DG > 259 pg/mL ont une candidose invasive β DG < 259 et CAGTA positif : 30,8 % des patients infectés si β DG < 259 et CAGTA négatif : 93,7 % de probabilité d'absence d'infection	CS \geq 3 : 93,5 / 18,1 / 29,9 / 88,2 β DG > 259 : 51,6 / 86,9 / 59,3 / 83
Tissot <i>et al.</i> , 2013 Prospectif 2007-2010	n = 89 Séjour \geq 3 jours et chirurgie abdominale (perforation gastro-intestinale) ou pancréatite nécrosante aiguë	2 fois par semaine : - Dépistage colonisation => calcul du CS et IC - Dosages : β DG	Candidose intra-abdominale : n = 29 (32,6 %) Colonisation : n = 58 (dont 18 avec ATF) Absence de colonisation/infection : n = 2 Candidose intra-abdominale : 76 % des patients ont des β DG positifs (taux plus élevés que dans le groupe colonisé et le groupe non infecté non colonisé)	Performances à l'inclusion : β DG (1 dosage) : 76 / 59 / 56 / 78 β DG (2 dosages) : 66 / 83 / 73 / 78 CS \geq 3 : 86 / 50 / 54 / 84 IC \geq 0,5 : 26 / 76 / 35 / 67 ICC \geq 0,4 : 14 / 77 / 23 / 65
Liew <i>et al.</i> , 2015 Prospectif** 2010-2011	n = 28 Séjour > 2 jours	3 jours après l'admission puis 1 fois par semaine : - Dépistage colonisation => calcul du CS et IC - Dosages : β DG	30 échantillons Candidose invasive : n = 4 (14,3 %) Colonisation : n = 23 Absence de colonisation/infection : n = 3	β DG : 100 / 38,46 / 20 / 100 IC \geq 0,5 : 75 / 26,92 / 13,64 / 87,50 CS \geq 3 : 100 / 15,38 / 15,38 / 100
Posteraro <i>et al.</i> , 2016 Rétrospectif 2012-2014	n = 198 Séjour > 4 jours avec sepsis et CS \geq 3	- Dosages : β DG	Candidémie : n = 47 β DG positif chez tous les patients candidémiques et chez 16/151 patients non candidémiques	β DG : 97,9 / 89,3 / - / - β DG + CS > 3 : 100 / 83,5 / - / -

3. PCR

Si à l'heure actuelle la recherche d'ADN de *Candida* sp. ne fait pas partie des recommandations pour le diagnostic des candidoses invasives, plusieurs équipes ont développé des techniques de PCR dans le but d'améliorer les performances diagnostiques. Cette partie sera développée de manière approfondie dans la partie consacrée à l'utilisation de la PCR dans le contexte des candidémies (cf. Partie 3 chapitre A).

4. Scores de colonisation

Afin de pallier aux carences du diagnostic biologique, des scores prédictifs ont été développés dans le but d'identifier au mieux les patients de réanimation les plus à risque de développer une candidose invasive et de pouvoir initier des traitements précoces chez ces patients. Ces différents scores sont présentés dans le tableau 5.

Dès 1994, Pittet *et al.* propose un premier score basé uniquement sur la colonisation à *Candida* sp. Il s'agit d'un index de colonisation défini par le ratio entre le nombre de sites colonisés à *Candida* sp. et le nombre de sites prélevés (parmi urines, liquide gastrique, prélèvement respiratoire, échantillon nasal, anal/selles...). Avec un seuil proposé à 0,5, la sensibilité et la VPN de cet index, évalué initialement sur 29 patients de réanimation chirurgicale, étaient de 100 % avec une spécificité et une VPP respectivement de 69 et 66 % (Pittet *et al.*, 1994). D'autres études ont par la suite évalué ce score de colonisation et ont montré une sensibilité allant de 26 à 72,7 %, une spécificité de 26,9 à 76 %, une VPP très basse (de 2 à 35 %) et une VPN de l'ordre de 67 à 96,1 % (Tableau 4) (León *et al.*, 2009; Posteraro *et al.*, 2011; Tissot *et al.*, 2013; Lau *et al.*, 2015; Liew *et al.*, 2015). Un index de colonisation corrigé, ratio entre le nombre de sites fortement colonisés et le nombre de sites prélevés, a été également proposé par Pittet *et al.* dans son étude initiale, avec pour intérêt d'obtenir une VPP et une spécificité de 100 % (Pittet *et al.*, 1994). L'étude réalisée par l'équipe de Tissot en 2013 a montré que l'utilisation de cet index corrigé n'améliorait pas les performances de l'index de colonisation (Tissot *et al.*, 2013).

Le Candida Score (CS), proposé par l'équipe de León, prend en compte, en plus de la colonisation à *Candida* sp., d'autres facteurs de risque : la nutrition parentérale totale, le sepsis sévère et la chirurgie à l'admission. Avec un CS supérieur à 2,5, la sensibilité était de 81 % et la spécificité de 74 %. Ainsi, les patients avec un CS supérieur à 2,5 avaient 7,75 fois plus de risque d'avoir une candidose invasive (León *et al.*, 2006). La même équipe a évalué ce score dans une étude prospective multicentrique, avec un seuil à 3, la sensibilité du score était de 77,6 %, avec une très

Tableau 5. Scores prédictifs de candidose invasive

Score	Définition du score
Index de Colonisation (Pittet <i>et al.</i> , 1994)	Nombre de sites colonisés à <i>Candida</i> sp./Nombre de sites prélevés
Index de Colonisation Corrigé (Pittet <i>et al.</i> , 1994)	Nombre de sites fortement colonisés à <i>Candida</i> sp./Nombre de sites prélevés
Candida Score (León <i>et al.</i> , 2006)	Sepsis sévère (2 points) Chirurgie à l'admission (1 point) Nutrition parentérale totale (1 point) Colonisation multifocale (1 point)
Règle Ostrosky-Zeichner <i>et al.</i> , 2007	1 critère majeur: <i>antibiotiques (J1 à J3) ou présence de cathéter veineux central (J1 à J3)</i> et au moins 2 critères mineurs parmi: <i>chirurgie (J-7 à J0), immunosuppresseurs (J-7 à J0), pancréatite (J-7 à J0), nutrition parentérale totale (J1 à J3), dialyse (J1 à J3), corticoïdes (J-7 à J3)</i>
Règle Ostrosky-Zeichner <i>et al.</i> , 2011	3 critères majeurs: <i>ventilation mécanique depuis au moins 48 h et antibiotiques (J1 à J3) et présence de cathéter veineux central (J1 à J3)</i> et au moins 1 critère mineur parmi: <i>chirurgie (J-7 à J0), immunosuppresseurs (J-7 à J0), pancréatite (J-7 à J0), nutrition parentérale totale (J1 à J3), dialyse (J1 à J3), corticoïdes (J-7 à J0)</i>
Paphitou <i>et al.</i> , 2005	Séjour en réanimation ≥ 4 jours et un des facteurs de risque suivants : <i>diabète</i> <i>hémodialyse de novo (J-7 à J3)</i> <i>nutrition parentérale totale (J-7 à J0)</i> <i>antibiothérapie large spectre (J-7 à J3)</i>
Hermesen <i>et al.</i> , 2011	Antibiothérapie large spectre Cathéter veineux central Nutrition parentérale totale Corticoïdes Chirurgie abdominale Durée de séjour à l'hôpital avant admission en réanimation
Playford <i>et al.</i> , 2016	Chirurgie gastro-intestinale Cathéter veineux central Nutrition parentérale Admission depuis salle d'opération, urgences ou autre hôpital Corticoïdes à forte dose Transfusion sanguine Carbapénèmes ou Tigécycline Céphalosporines de troisième ou quatrième génération Culture positive à <i>Candida</i> sp. dans l'urine Culture positive à <i>Candida</i> sp. dans la gorge <i>1 point par facteur de risque</i>

bonne VPN (97,7 %) mais une spécificité et une VPP respectivement de 66,2 et 13,8 % (León *et al.*, 2009). Dans d'autres études, la sensibilité variait de 85,7 à 100 %, la spécificité de 15,4 à 88,6 %, la VPP de 15,4 à 88,6 % avec toujours une bonne VPN, de 84 à 100 % (Leroy *et al.*, 2009; Posteraro *et al.*, 2011; León *et al.*, 2012; Tissot *et al.*, 2013; Liew *et al.*, 2015) (Tableau 4).

D'autres scores, basés uniquement sur une combinaison de facteurs de risque, ont été proposés : le score de Paphitou, les règles de Ostrosky-Zeichner de 2007 et 2011 ou encore celui proposé par l'équipe de Playford (Paphitou *et al.*, 2005; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2007, 2011; Playford *et al.*, 2016) (Tableau 5). Ces scores, dont les performances sont présentées dans le tableau 4, sont caractérisés par une faible VPP et une VPN de plus de 97 %.

Un autre score, le score de Dupont, a été développé spécifiquement pour les péritonites à *Candida* sp.. Il retient comme critères : un état de choc, l'origine sus-mésocolique de l'infection, le sexe féminin et une antibiothérapie en cours depuis plus de 48 heures (Dupont *et al.*, 2003).

Les scores prédictifs ont été initialement développés dans le but d'avoir une bonne VPP et d'identifier les patients à traiter mais ils sont caractérisés par une faible spécificité et VPP ce qui entraîne un nombre trop important de patients à traiter par antifongiques, avec les conséquences suivantes : effets secondaires, coût des antifongiques, impact potentiel sur l'écologie et l'apparition de résistances. Ces règles, en raison de leur VPN élevée, sont surtout intéressantes pour identifier les patients à très faible risque de candidose invasive, et par conséquent à ne pas traiter.

E. Prise en charge thérapeutique des candidoses invasives

Deux éléments sont particulièrement importants pour la prise en charge des candidoses invasives. Le premier est l'administration d'un traitement antifongique adéquat, il a en effet été associé à une meilleure survie (Bassetti *et al.*, 2007; Parkins *et al.*, 2007). Le deuxième élément est la mise en route rapide d'un traitement antifongique, indispensable de manière à réduire la mortalité. L'équipe de Morrell a montré que l'administration d'un traitement antifongique empirique 12 heures après le prélèvement du premier échantillon sanguin positif est un facteur indépendant de mortalité. La mortalité passe de 11,1 % en cas d'administration du traitement dans les 12 heures à 33,1 % en cas d'administration après 12 heures (Morrell *et al.*, 2005). Une autre étude confirme l'importance de la mise en œuvre rapide du traitement. Le taux de mortalité observé est de 15,4 % si un traitement par fluconazole est initié dans les 24 heures, ce taux augmentant avec le délai d'instauration du traitement, 37 % lors d'une initiation au deuxième jour et 41,4 % en cas d'initiation

au-delà du troisième jour (Garey *et al.*, 2006). La mise en route du traitement antifongique est souvent retardée pour de multiples raisons : sensibilité médiocre des hémocultures, délai nécessaire à la positivité des hémocultures et absence de signes cliniques spécifiques.

Quatre stratégies existent pour la prise en charge des candidoses invasives : le traitement prophylactique, empirique, préemptif et curatif. Les traitements précoces sont destinés aux patients à haut risque, dans le but de réduire la survenue des candidoses invasives.

1. Traitement curatif

Différentes classes d'antifongiques systémiques sont prescrites pour le traitement des candidoses invasives : les polyènes (différentes formulations d'amphotéricine B), les azolés, les échinocandines et la 5-fluorocytosine. Les recommandations présentées ci-dessous sont uniquement celles pour les patients non neutropéniques.

Les trois molécules de la classe des échinocandines, anidulafungine, caspofungine et micafungine, sont positionnées en première ligne des recommandations internationales (ESCMID 2012 et IDSA 2016) (Cornely *et al.*, 2012; Pappas *et al.*, 2016). Cette classe thérapeutique est caractérisée par un spectre antifongique large, une activité fongicide, une bonne tolérance et des interactions médicamenteuses limitées. Les recommandations européennes positionnent cette classe quelque soit la gravité de l'infection, le fluconazole n'étant recommandé que pour les candidémies à *C. parapsilosis*. Les recommandations 2016 de l'IDSA positionnent le fluconazole en alternative pour le traitement des candidoses invasives chez les patients non sévères et sans probabilité d'espèce résistante au fluconazole (absence de pré-exposition aux azolés et patient non colonisé par une espèce résistante). L'utilisation de l'amphotéricine B est en deuxième ligne des recommandations européennes et américaines, le voriconazole n'est positionné que dans les recommandations européennes.

Dans les recommandations européennes, la désescalade est préconisée au bout de dix jours de traitement pour les patients stables et infectés par une espèce sensible. Dans les cas d'infections à *C. parapsilosis*, la désescalade vers le fluconazole a lieu plus précocement. Les recommandations de l'IDSA restent plus vagues quant au moment de la désescalade, signalant qu'elle est habituellement réalisée au bout de cinq à sept jours.

La réalisation d'une hémoculture par jour est préconisée afin de déterminer le jour de négativation. La durée de traitement est de 14 jours après la négativation de l'hémoculture, en cas de clinique favorable et d'absence de localisations secondaires. Le retrait du cathéter veineux central

est recommandé par l'ESCMID. S'il est impossible, un traitement actif sur le biofilm, par échinocandines ou amphotéricine B, sera alors privilégié. Dans les recommandations américaines, le retrait du cathéter est recommandé, s'il est possible et s'il s'agit de la source présumée d'infection. Des localisations secondaires (endophtalmie et endocardite) sont à rechercher par la réalisation d'un fond d'oeil (dans la semaine suivant le diagnostic d'après les recommandations IDSA 2016) et d'une échographie trans-oesophagienne.

D'autres schémas thérapeutiques pour les candidoses à localisations oculaires, cardiaques, ostéo-articulaires et neuro-méningées sont présentés dans les recommandations américaines et européennes.

2. Traitement empirique ou préemptif

Le traitement empirique consiste en l'administration d'antifongiques chez des patients à haut risque de candidose invasive présentant une fièvre persistante, réfractaire à un traitement antibiotique à large spectre. Cette stratégie a pour principal inconvénient d'entraîner le traitement d'un nombre important de patients. La stratégie préemptive a été développée par la suite dans le but d'identifier au mieux les patients les plus à risque et de réduire ainsi le nombre de patients à traiter (Figure 3), en utilisant des données mycologiques : colonisation ou biomarqueurs tels que β DG (Bassetti *et al.*, 2010).

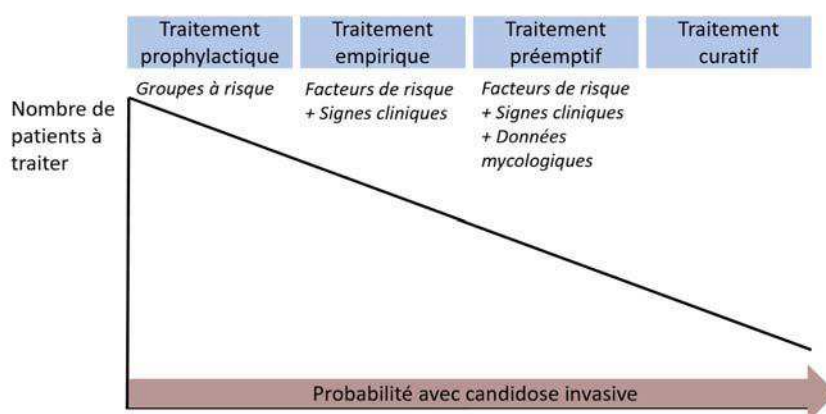


Figure 3. Relation entre les différentes stratégies antifongiques, la probabilité de candidose invasive et le nombre de patients potentiellement traités (d'après Bassetti *et al.*, 2010).

L'équipe de Piarroux a montré l'efficacité d'une stratégie préemptive par fluconazole (en utilisant l'index de colonisation) pour réduire l'acquisition de candidoses invasives en réanimation chirurgicale (Piarroux *et al.*, 2004). La stratégie préemptive, telle que proposée par Bassetti *et al.*, est basée sur la

présence des critères suivants : séjour en réanimation de plus de quatre jours, utilisation d'une antibiothérapie à large spectre, présence d'un autre facteur de risque (sepsis sévère, chirurgie gastro-intestinale, nutrition parentérale,...) et présence d'un argument microbiologique : colonisation multifocale ou dosage positif de β DG (Bassetti *et al.*, 2010).

La stratégie préemptive est recommandée par l'IDSA 2016 pour les patients sévères présentant des facteurs de risque de candidose invasive, une fièvre sans étiologie associée à des données mycologiques. Les molécules recommandées sont identiques à celles utilisées dans les candidémies, la durée préconisée est de 14 jours. Il est toutefois recommandé d'arrêter le traitement en cas d'absence de réponse clinique au bout de quatre à cinq jours, en absence de diagnostic de candidose invasive ou si un test avec une forte VPN est négatif (Pappas *et al.*, 2016).

3. Traitement prophylactique

Un traitement prophylactique consiste à administrer un antifongique à un patient sans signes cliniques d'infection, dans le but de réduire le taux de candidose invasive. Si la stratégie prophylactique est largement validée chez les patients neutropéniques d'hématologie, son utilisation chez les patients non neutropéniques en réanimation est plus discutée. Elle est recommandée uniquement chez les patients ayant eu une chirurgie abdominale avec récurrences de perforation digestive ou de lâchage de sutures dans les recommandations européennes (Cornely *et al.*, 2012). Dans les recommandations américaines, l'utilisation de fluconazole est recommandée chez les patients à haut risque dans les réanimations où le taux de candidose invasive est supérieur à 5 % (Pappas *et al.*, 2016).

Travail personnel

Introduction du travail

Ce travail de thèse a abordé la vaste problématique des candidoses invasives des sujets non neutropéniques en réanimation. Il se décompose en trois parties.

PARTIE 1. Épidémiologie à *Candida* sp. dans le service de réanimation du CHU de Nîmes

Article 1. Changes in *Candida* species distribution of colonizing and infecting isolates, antifungal drug consumption and susceptibility in a French intensive care unit : a 10-year study. Sasso M *et al.* (soumis à *Mycoses*, avec révisions mineures)

L'article 1 présente, sur une période de dix ans (2007-2016), les données concernant l'écologie fongique dans le service de réanimation du CHU de Nîmes ainsi que l'évolution de la consommation en antifongiques et de la sensibilité aux antifongiques. La première partie du travail rapporte les données de l'écologie fongique de manière globale (données de patients colonisés et infectés) ainsi que celles de l'épidémiologie des candidoses invasives. Les données pouvant être variables selon les pays et les centres, il était primordial de connaître l'épidémiologie locale, cette information étant essentielle pour guider le choix de stratégies empiriques. Cette étude a été réalisée sur une période de dix ans, de manière à obtenir un nombre conséquent de souches permettant une analyse des données. Nous avons également évalué l'incidence des candidémies dans le service de réanimation ainsi que les tendances observées concernant l'évolution de cette incidence au cours des dix dernières années. Une autre partie du travail présentée dans cet article concerne la consommation en antifongiques. En effet, durant les dix ans observés, les recommandations internationales de prise en charge des candidoses invasives ont évolué. Dans les recommandations américaines, les échinocandines sont positionnées depuis 2009 en première ligne pour le traitement des candidoses invasives des patients non neutropéniques sévères ou ayant eu une exposition récente aux azolés, le fluconazole restant une alternative pour les patients non sévères (Pappas *et al.*, 2009, 2016). Les recommandations européennes de 2012 approuvent la classe des échinocandines en première ligne (Cornely *et al.*, 2012). Nous avons ainsi analysé l'évolution des prescriptions et mis en parallèle l'évolution de l'écologie fongique. La dernière partie du travail s'intéresse au suivi de la sensibilité aux antifongiques des cinq principales espèces retrouvées.

PARTIE 2. Élaboration d'un score prédictif de candidose invasive au cours d'une étude prospective bicentrique en réanimation

Article 2. Élaboration d'un score prédictif de candidose invasive chez les patients non neutropéniques de réanimation. Sasso M *et al.* (soumission prévue dans Critical Care)

L'article 2 présente les résultats d'une étude observationnelle prospective réalisée dans deux centres : la réanimation médicale et chirurgicale du CHU de Nîmes et le département d'anesthésie et de réanimation B du CHU de Montpellier. Cette étude réalisée entre 2011 et 2014 a inclus 435 patients non neutropéniques séjournant plus de 48 heures en réanimation. Parmi les patients inclus, 44 ont développé une candidose invasive. Au deuxième jour suivant l'admission, des facteurs de risque de candidose invasive ainsi que trois données mycologiques : la colonisation à *Candida* sp., les antigènes mannane et anticorps anti-mannane ont été étudiés en analyse univariée et multivariée. Sept variables ont été sélectionnées et utilisées pour construire un score prédictif de candidose invasive. Les performances de ce score sont présentées de même que celles d'autres scores de la littérature (index de colonisation et Candida Score), ainsi que celles des antigènes mannane et des anticorps anti-mannane.

A la suite de cet article, deux analyses supplémentaires sont présentées. La première rend compte, pour les patients inclus dans le protocole toujours hospitalisés en réanimation au septième jour suivant l'admission, des résultats des mêmes données que celles présentées ci-dessus. La deuxième présente les dosages de β DG réalisés chez un nombre limité de patients, en raison du coût (l'analyse de ce biomarqueur n'avait en effet pas été prévue initialement dans le projet).

PARTIE 3. PCR *Candida*

Un des objectifs de ce travail était de développer des méthodes de PCR pour la détection d'ADN de *Candida* sp. au cours des candidémies. Le travail a débuté par une phase technique de mise au point concernant l'extraction d'ADN fongique et l'évaluation des performances des PCR. Nous avons dessiné des amorces pour développer une PCR « pan-*Candida* » permettant de détecter l'ensemble des *Candida* sp. ainsi que des amorces pour des PCR spécifiques des trois espèces principalement retrouvées dans les candidémies, *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*, et qui représentent dans notre centre 83 % des candidémies. Nous avons ensuite évalué ces PCR sur des échantillons de patients candidémiques afin d'établir si cette méthode permettait un gain de temps pour la prise en

charge des patients. Finalement, nous avons comparé une PCR en temps réel avec une PCR faisant appel à la technologie digital PCR.

TRAVAUX SUPPLÉMENTAIRES

Finalement, nous présentons également deux articles complémentaires en rapport avec la thématique de ce travail. Le premier est un cas clinique qui rapporte l'acquisition très rapide d'une résistance d'un isolat de *C. glabrata* aux échinocandines. Le deuxième évalue la technique de rep-PCR (repetitive sequence-based PCR) automatisée pour la comparaison de souches de *C. albicans* et *C. glabrata*.

1) Cas clinique sur l'apparition rapide de mutations *FKS* chez *C. glabrata*

Article 3. Rapid emergence of *FKS* mutations in *Candida glabrata* isolates in a peritoneal candidiasis. Sasso M *et al.* (publié dans Medical Mycology Case Reports)

Le cas clinique présente l'apparition très rapide de mutations *FKS* d'un isolat de *C. glabrata* chez un patient colonisé puis infecté et traité pendant 12 jours par micafungine. Les souches isolées chez ce patient, responsables de colonisation et d'infection, ont été comparées par MLST (multilocus sequence typing), et séquencées pour rechercher la présence de mutations dans les régions hot spot 1 et 2 des gènes *FKS1* et *FKS2*. La sensibilité aux antifongiques a été évaluée par technique Etest. Dans la discussion de ce cas clinique, nous proposons une stratégie de recherche des mutations *FKS*.

2) Typage de souches de *C. albicans* et *C. glabrata* : comparaison de la rep-PCR DiversiLab® avec les techniques MLST et MLMT (multilocus microsatellite typing)

Article 4. Evaluation of the DiversiLab® automated repetitive sequence-based PCR system for the characterization of *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolates. Sasso M *et al.* (soumis à Journal of Microbiological Methods)

La technique de rep-PCR automatisée avec le système DiversiLab® est largement employée en bactériologie pour typer les souches responsables d'épidémies, les données concernant son utilisation en mycologie sont limitées. L'article présenté ici compare cette technique avec les

techniques de typage MLST et MLMT pour les deux espèces *C. albicans* et *C. glabrata*. Les isolats testés étaient responsables chez un même patient soit de colonisation puis d'infection soit de candidoses profondes survenues à plusieurs reprises au cours du temps.

PARTIE 1

Épidémiologie à *Candida* sp. dans le service de réanimation du CHU de Nîmes

Changes in *Candida* species distribution of colonizing and infecting isolates, antifungal drug consumption and susceptibility in a French intensive care unit: a 10-year study

Milène Sasso,¹ Claire Roger,² Magali Sasso,³ Hélène Poujol,⁴ Saber Barbar,² Jean-Yves Lefrant,² Laurence Lachaud⁵

¹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalo-universitaire, Nîmes, France,

²Service de réanimation, Centre Hospitalo-universitaire, Nîmes, France,

³Ennae, London UK,

⁴Département de Pharmacie Centre Hospitalo-universitaire, Nîmes, France,

⁵Département de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalo-universitaire, Montpellier, France

Short title: Fungal epidemiology in intensive care unit

Key-words: Fungal epidemiology, candidaemia, invasive candidiasis, antifungal susceptibility testing, antifungal consumption

Corresponding author : Laurence Lachaud Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Montpellier, 39 Av. Charles Flahault, 34295 Montpellier cedex 5, France

Tel +33 467 33 23 50 Fax +33 467 33 23 54

laurence.lachaud@umontpellier.fr ; l-lachaud@chu-montpellier.fr

Abstract

Monitoring fungal ecology and resistance to antifungal agents within intensive care units (ICU) is essential for the management of invasive fungal infections. Therefore, a retrospective descriptive study was carried in the ICU of Nimes University Hospital, France, from 2007 to 2016. As the majority of invasive fungal infections in ICU are caused by *Candida* species, the study objectives were to describe *Candida* species distribution, to assess candidaemia incidence and to monitor the antifungal drug susceptibility of *Candida* isolates and the consumption of antifungal agents. Among the recorded invasive *Candida* infections (n=244), 43% were intra-abdominal and 22% bloodstream infections. *Candida albicans* was the most frequent species (55.8%), followed by *C. glabrata* (14.1%), *C. tropicalis* (10%), *C. parapsilosis* (8%) and *C. krusei* (5.3%). Candidaemia incidence was 4.49 per 1000 admissions. The mean consumption of antifungal agents was of 170.5 defined daily doses (DDD) for 1000 hospital days (HD) per year. Changes in antifungal drug consumption were observed, with an increased use of echinocandins (from 17.96 DDD/1000 HD in 2007 to 48.76 DDD/1000 HD in 2016), and the total treatment cost tripled during the study period. No significant change in fungal ecology or in the emergence of resistant species was observed; indeed only 1.1% isolates presented an unusual resistance to antifungal agents.

Introduction

Patients in intensive care units (ICU) are at very high risk of invasive fungal infections, particularly intra-abdominal candidiasis and candidaemia.¹⁻³ Indeed, 35 to 51% of all reported cases of candidaemia occur in ICU,⁴⁻⁷ with a mortality rate between 40 and 51%.^{4,8,9} Moreover, a study using nationwide data on nosocomial bloodstream infections in the USA reported that in intensive care, *Candida* species are the third cause of septicaemia.⁶ However, data on candidaemia incidence trends in recent years are discordant.^{4,10}

During the last 10 years, the development of a new therapeutic class (echinocandins) changed the international recommendations for the management of invasive candidiasis, and currently,

echinocandins are the first-line therapy for invasive candidiasis.^{11,12} Empiric (fever without microbiological evidence of infection) and pre-emptive (microbiological evidence of candidiasis, but not of invasive infection) treatments have been introduced to reduce mortality in patients at high-risk of invasive candidiasis occurrence. This increased use of antifungal agents, particularly of echinocandins, could affect the fungal ecology and cause the appearance of resistant strains. Although *C. albicans* remains the most common species responsible for invasive candidiasis, changes in fungal epidemiology have been observed with an increase of non-*C. albicans* species.^{13,14} Moreover, pre-exposure to antifungal drugs influences the species distribution.¹⁵ Therefore, monitoring fungal ecology and resistance to antifungal agents in hospitals, especially in ICU, is essential for the management of fungal infections.

The objective of this retrospective study was to describe the changes in fungal epidemiology at the medical and surgical ICU of Nimes University Hospital, France, from 2007 to 2016. Data on *Candida* spp. isolates from colonized or infected patients were collected and the temporal changes in *Candida* species distribution, susceptibility to antifungal drugs, candidaemia incidence and consumption of antifungal agents were analysed.

Material and methods

Description of the study. For this retrospective study, the mycological test results of all samples from patients hospitalized at the ICU of Nimes University Hospital (France) from 2007 to 2016 were included. Samples with a positive mycological culture were listed and the fungi identified classified according to the sampling site. When antifungal susceptibility testing was carried out, the minimum inhibitory concentration (MIC) values were recorded. Data on all ICU patients with at least one positive blood culture (fungaemia) were included. Fungaemia in patients from other departments of the hospital were also reported. Duplicate or redundant results were excluded from the study. Subsequent positive blood cultures from a single patient were defined as a new episode if the delay between the two episodes was at least 14 days.

Samples. Mycological testing was carried out in many different samples from superficial and sterile sites, such as urine, faeces, blood, digestive system (gastric fluid, anal/rectal swabs), mouth, nose, throat and skin swabs, vaginal swabs, peritoneal fluid, catheter, abscess surface exudate, tissue biopsies... Invasive candidiasis was defined by a positive culture for *Candida* spp. of blood or sterile sites samples (urines excluded).

ICU description. The ICU of Nimes University Hospital includes two separate services (surgical and medical ICU) with 26 beds (hospital total number of beds = 1979). It accommodates all types of patients requiring intensive care, with the exception of patients after haematopoietic stem cell or solid organ transplantation. Over the study period, the annual average number of admissions was 1158 and of hospitalization days was 9394. Candidaemia preventive measures were introduced in the surgical ICU in 2005, based on the work by Piarroux *et al.*¹⁶ Specifically, for patients at high risk of candidaemia (patients with at least these three risk factors: abdominal surgery, broad-spectrum antibiotherapy and central venous catheter), a colonization index¹⁷ was calculated and initiation of pre-emptive treatment was discussed when this index was ≥ 0.5 .

Mycological culture and species identification. Mycological cultures were done on Sabouraud agar (Becton Dickinson, Claix, France) with chloramphenicol and gentamicin. Cultures were incubated at 27°C or 37°C for 7 to 28 days, depending on the sample type. Blood cultures were performed using the BD BACTEC™ system and the BD BACTEC™ Plus Aerobic/F medium, BD BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F medium, and BD BACTEC™ Mycosis IC/F culture vials (Becton Dickinson). Fungi were identified with the VITEK® 2 YST system (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) until June 2014 and afterwards with the mass spectrometer VITEK® MS (Biomérieux). The API® ID32C (Biomérieux) or sequencing of the ITS region of ribosomal DNA were used in the case of low discrimination.

Biomarkers were not used for the management of antifungal therapy.

Antifungal susceptibility testing. Susceptibility to antifungal drugs was determined with the Etest® method (Biomérieux), according to the manufacturer's instructions. The MIC was read after 48h of incubation (80% inhibition for azoles and echinocandins and 100% inhibition of amphotericin B). All

MICs were interpreted using the CLSI breakpoints.^{18,19} In the absence of defined breakpoints for some *Candida* species and/or antifungal molecules, epidemiological cut-off values (ECV) were used to discriminate wild type (WT) (MIC < ECV) and non-WT (MIC > ECV) isolates. For amphotericin B, isolates with a MIC ≤2 mg/L were considered to be WT. For fluconazole, *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates with MIC ≤2 mg/L and >8 mg/L were categorized as sensitive (S) and resistant (R), respectively; *C. glabrata* isolates with MIC ≤32 mg/L were considered susceptible-dose dependent (SDD) and with MIC ≥64 mg/L as R. All *C. krusei* isolates were R to fluconazole. Voriconazole MIC interpretation for *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates was: MIC ≤0.12 mg/L (S) and ≥1 mg/L (R); for *C. krusei*: MIC ≤0.5 mg/L (S) and ≥2 mg/L (R). *C. glabrata* isolates were considered WT when MIC ≤0.5 mg/L (ECV). For caspofungin, MIC interpretation was: MIC ≤0.25 mg/L (S) and ≥1 mg/L (R) for *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*; MIC ≤2 mg/L (S) and ≥8 mg/L (R) for *C. parapsilosis*; MIC ≤0.12 mg/L (S) and ≥0.5 mg/L (R) for *C. glabrata*.

Consumption of antifungal agents. Data on consumption of antifungal drugs (amphotericin B, fluconazole, voriconazole, caspofungin and micafungin) were recorded over the 10-year period. The annual consumption in milligrams was converted into a defined daily dose (DDD) for 1000 hospital days (HD). For this purpose, the Anatomical Therapeutic Chemical Classification System and the Defined Daily Dose (WHO ATC/DDD) were used (<https://whocC.no>, updated 19/12/16). DDDs are: 35 mg for amphotericin B, 200 mg for fluconazole, 400 mg for voriconazole, 50 mg for caspofungin and 100 mg for micafungin. The cost per year (amounts, including VAT, in euros) was also calculated.

Statistical analysis. First, the temporal changes of each parameter were evaluated using a scatter plot of the values between 2007 and 2016. This scatter plot was used to empirically determine whether during the entire study period (2007-2016), each parameter changed according to a global pattern (progressive increase, decrease or flat), or a local pattern (for instance, first increase and then decrease). Linear regression analysis was then used to compare the parameter changes (increase, decrease or flat) over time. The regression slope test was used to determine whether the

linear regression slope was significantly different from 0. The goodness-of-fit of the linear regression was assessed using the determination coefficient R^2 . Quantitative data (means \pm standard deviation, SD) were compared using unilateral Student's *t*-tests. Categorical data (in percentages) were compared by using the χ^2 or Fisher's exact test, as appropriate. All statistical analyses were performed with the R software. Results with a *p*-value <0.05 were considered significant.

Results

Fungal ecology in intensive care. During the study period, 5572 samples from patients hospitalized in the medical or surgical ICU were analysed by the mycology laboratory. Among the 3013 positive samples (54.1%), 32% were pulmonary samples, 24.8% digestive samples (stool, gastric fluid, anal swabs), 20.7% mouth, nasal, throat and skin swabs, 14.4% urine samples and 8.1% samples from sterile sites. Among the 3682 fungi identified, 96.6% belonged to the *Candida* genus (3557 isolates). *C. albicans* was the most frequent species (57.1%), followed by *C. glabrata* (14.9%), *C. tropicalis* (9%), *C. krusei* (5.4%) and *C. parapsilosis* (Table 1). Depending on the year, the proportion of *Candida* species isolated varied: for *C. albicans* from 49.5 to 64.3%; for *C. glabrata* from 10.7 to 22.8%; for *C. tropicalis* from 6.2 to 11.1%; for *C. parapsilosis* from 2.6 to 10.2%; for *C. kefyr* from 0.8 to 6.2%; and for *C. krusei* from 1 to 9.1% (Fig. 1). However, the only significant change was observed for *C. glabrata* that decreased from 2008 to 2015 ($p = 0.002$). In the last three years (2014-2016), *C. glabrata* (10.8 versus 22.8%, $p = 0.17$) and *C. parapsilosis* (2.6 versus 8.4%, $p = 0.10$) tended to increase and *C. albicans* to decrease (64.3 versus 50.7%, $p = 0.22$). No emerging rare species, such as *C. auris*, was detected during the study period.

Invasive candidiasis epidemiology. During the study period, 244 positive mycological cultures of sterile site samples were recorded (urine samples excluded), among which 43% were from intra-abdominal samples, 22.1% from blood cultures (54 patients), 16.8% from catheters, 3.3% from abscess aspirates, 2.9% from pleural fluids and 11.9% from other sterile sites. Among the 244 positive samples from sterile sites, 273 isolates were identified of which 96% ($n=262$ isolates) were

Candida species, particularly *C. albicans* (55.8%), *C. glabrata* (14.1%), *C. tropicalis* (10%), *C. parapsilosis* (8%), *C. krusei* (5.3%), *C. kefyr* (3.4%) and other *Candida* species (3.4%). Table 1 shows the percentage of the different *Candida* species detected according to the sampling site. Their distribution was not significantly different, except for *C. parapsilosis* that was most frequently isolated from catheters than from other sterile sites (excluding blood cultures) (19.5% vs 4.7%, $p = 0.004$). According to the year, the percentage of the different species ranged from 31.8 to 85.7% for *C. albicans*, 4.7 to 40.9% for *C. glabrata*, 0 to 18.2% for *C. tropicalis*, 0 to 14.3% for *C. parapsilosis*, 0 to 13.3% for *C. kefyr*, 0 to 9.1% for *C. krusei* and 0 to 19% for the other *Candida* species. For *C. albicans*, a significant decrease was observed from 2013 (from 85.7% to 48.6%, $p = 0.03$). On the other hand, *C. parapsilosis* infections significantly decreased between 2007 and 2012 (13.6% to 0%, $p = 0.02$), but then started again to increase between 2012 and 2016 (from 0 to 13.5%, $p = 0.03$).

In the two ICU services, 54 patients developed fungaemia (corresponding to 56 isolates). They represented 23.3% of all hospital patients with fungaemia (54/232), with an average of 5.4 cases per year (range: 2 - 12). The *Candida* genus was involved in 94.6% of fungaemia cases ($n=53$ isolates). *C. albicans* was the *Candida* species most often isolated in these patients (62.2%), followed by *C. glabrata* (11.3%), *C. parapsilosis* (9.4%), *C. tropicalis* (5.7%), *C. krusei* (5.7%) and *C. kefyr* (5.7%) (Blood cultures in Table 1). These percentages varied from one year to another, for example from 28.6 to 83.3% for *C. albicans* and from 0 to 50% for *C. glabrata*. However, due to the low number of data per year, no significant variation in the proportions of isolated species per year was observed. The other isolated fungi were *Geotrichum capitatum* ($n=1$), *Saprochaete clavata* ($n=1$) and *Cryptococcus neoformans* ($n=1$). In two patients, fungaemia was due to an association of the fungi *C. krusei* and *S. clavata* or *C. kefyr* and *C. tropicalis*. Among the 232 hospital fungaemia (237 isolates of which 217 were *Candida* spp.), *C. albicans* was found in 50% of cases, followed by *C. glabrata* (19%), *C. parapsilosis* (14%), *C. tropicalis* (6%), *C. krusei* (3%), *C. kefyr* (2%) and six other *Candida* species (*C. lusitaniae*, 2.7%; *C. famata*, *C. dubliniensis*, *C. sphaerica*, *C. guilliermondii* and *C. norvegensis*). No significant difference was found in the distribution of *Candida* species between

the two ICU services and the entire hospital ($0.09 < p < 1$, according to the *Candida* species). Overall, candidaemia incidence in the ICU was of 4.49/1000 admissions (5.53/10,000 days of hospitalization), with variations ranging from 1.91 to 8.55/1000 admissions according to the year (Fig. 2), without any significant increase over the years, despite a trend in this direction ($p = 0.17$). Otherwise, antibiotic consumption was stable during the studied period, only not significant variation from one year to another was observed.

Antifungal drug susceptibility. Antifungal drug susceptibility testing was routinely performed for isolates recovered from sterile sites and samples from multi-colonized patients (colonization index ≥ 0.5). In total, during the 10 years of the study, antifungal drug susceptibility testing was carried out in 903 isolates. Table 2 presents the obtained MIC values for amphotericin B, fluconazole, voriconazole and caspofungin and their interpretation for the five main *Candida* species. In summary, for amphotericin B, all the tested isolates were WT (MIC ≤ 2 mg/L); for fluconazole, resistant samples were found among the collected *C. albicans* (0.2%), *C. tropicalis* (2.4%), *C. parapsilosis* (7.8%) and *C. glabrata* (57.4%) isolates; for voriconazole, 1.4% of *C. tropicalis* isolates were resistant and 66.9% of *C. glabrata* isolates had a non-WT phenotype (MIC ≥ 0.5 mg/L); caspofungin resistance was observed in 1.8% of *C. krusei* isolates and 0.8% of *C. glabrata* isolates. This latter isolate acquired resistance to caspofungin (mutation F659del in the *FKS2* gene) after a 12-day treatment with micafungin.

Antifungal drug consumption. Overall, the mean antifungal consumption in the two ICU services was of 170.5 DDD/1000 HD (from 121.96 to 290.85, depending on the year) (Fig. 3). It was not significantly different over the entire study period. The average consumption was of 6.8, 18.6, 39 and 105.8 DDD/1000 HD for voriconazole, amphotericin B, echinocandins and fluconazole, respectively. The fluconazole consumption curve followed that of the total consumption, with variations ranging from 45.53 to 205.3 DDD/1000 HD, depending on the year. Voriconazole consumption progressively increased during the study period ($p = 0.03$). Amphotericin B consumption was higher in 2014-2016 than in 2009-2013 (31.73 DDD/1000 HD versus 7.54 DDD/1000 HD, $p = 0.003$). The average

consumption of echinocandins between 2011 and 2016 was higher than between 2007 and 2009 (50.3 DDD/1000 HD versus 12.65 DDD/1000 HD, $p < 10^{-4}$). The percentages of consumption for fluconazole, voriconazole, amphotericin B and echinocandins were 83.4%, 1%, 2.3% and 13.2%, respectively, in 2007 compared with 34.3%, 10.7%, 17.9% and 34.3% in 2016. The average annual cost of antifungal treatments in ICU was € 84,660 for the period 2007-2009 and € 254,926 for the period 2011-2016 ($p < 10^{-3}$). The total antifungal treatment cost was correlated with echinocandin consumption ($r = 0.96$, $p < 10^{-4}$).

Discussion

This retrospective study describes the changes in fungal ecology and invasive candidiasis rates as well as in antifungal drug consumption (most frequently used molecules) and susceptibility of *Candida* spp. at the ICU of Nimes University Hospital, France, between 2007 and 2016.

Fungal ecology. As expected, *Candida* species accounted for most of the fungi isolated in ICU. The majority of invasive candidiasis cases were intra-abdominal infections (43%) followed by candidaemia (22%). In our study, *C. albicans* was the most frequently encountered species in any situation (colonized patients or with invasive infection); and four species (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*) represented more than 86% of the identified fungi. Previous studies reported that *C. albicans* and *C. glabrata* are the causative agent of 40 to 66%^{4,5,10,14,20-25} and 10 to 20%^{3-5,20,24,25}, respectively, of all invasive candidiasis cases in ICU, except in Italy and Portugal, where *C. parapsilosis* is the second species (8.8 to 22.3% of cases).^{14,21-23} As observed by Bassetti *et al.*,²⁴ *C. tropicalis* was the third species isolated in sterile site samples ("Other sterile sites" in Table 1), when not considering blood cultures and catheters. *C. kefyr* was isolated in 5.7% of samples from patients with candidaemia, a higher rate than previously described (2%)^{4,26}, without resistance to antifungals. Similar data on fungal ecology have been reported by previous studies that assessed the colonization of patients in ICU.^{19,27}

Concerning the changes in *Candida* species involved in candidaemia^{14,23}, several studies reported a decrease of *C. albicans* and an increase of *C. parapsilosis*. This was not observed in our study, although a significant decrease of *C. albicans* isolated from sterile site samples (urines excluded) was observed from 2013 to 2016. For *C. parapsilosis*, after a regression from 2007 to 2012, a significant increase between 2012 and 2016 was observed. Considering the overall fungal ecology, during the last three years, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* tended to increase, while *C. albicans* showed a downward trend. These trends remain to be confirmed in the future and will be discussed with the antifungal consumption data below. Regarding the candidaemia incidence, ICU was the most at-risk ward with 23.3% of all the hospital fungaemia cases. This result is comparable to the 27.7% reported by Tavec *et al.* in another French hospital²⁶, but slightly lower than the previously published candidaemia rates (35 to 51%) in patients from ICU.^{4-6,28} This difference could be explained by the absence in our ICU of patients who had a haematopoietic stem cell or solid organ transplant, but also by the prevention measures implemented since 2005. Candidaemia incidence is higher in ICUs and varies, according to the country, from 2 to 15.1 per 1000 admissions.^{14,20,26,29-31} In our study, it was 4.49 per 1000 admissions. This result is in agreement with two other French studies with a candidaemia incidence ranging from 2 to 6.9 per 1000 admissions.^{25,26} The variations can be explained by differences in practices in the prescription of blood cultures and/or the use of antifungal drugs. Data on changes in candidaemia incidence over time are discordant. For instance, in 24 hospitals in the Paris region, France, candidaemia incidence in ICU increased significantly between 2004 and 2009.⁴ Conversely, in Germany, it remained stable during the period 2006-2011.¹⁰ In our study, variations over time were not significant, although an upward trend was observed in recent years. It should be noted that the number of blood cultures performed over the study period remained stable and the supplier identical. Finally, as differences in fungal ecology between countries and centres have been observed in the literature, it is essential to have a precise knowledge of the local epidemiology in order to issue local recommendations for fungal infection prevention. In our case, the distribution of fungal species responsible for candidaemia was similar in

the ICU services and in the entire hospital; therefore, the same recommendations could be implemented everywhere. However, regular fungal epidemiology monitoring is essential.

Consumption of antifungal agents. As invasive candidiasis represents the majority of invasive fungal infections, the antifungal drug consumption in ICU is mainly related to the *Candida* infection risk. In our study, we monitored the changes in antifungal drug consumption in ICU during 10 years. Although the overall consumption of antifungal agents (expressed as DDD/1000 HD) remained relatively stable, the prescription of voriconazole and echinocandins increased considerably. The increased consumption of echinocandins, also reported by Bailly *et al.*,³² is linked to a change in the recommendations for the management of invasive candidiasis. Echinocandins have been recommended for empirical treatment by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) in 2009,¹¹ and as first-line therapy for invasive candidiasis by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) in 2012.¹²

Changes in antifungal drug prescription may affect the distribution of *Candida* species and their MICs. For instance, Lortholary *et al.*,¹⁵ showed that recent exposure to fluconazole and caspofungin modifies the distribution of *Candida* species. Specifically, pre-exposure to fluconazole led to a decrease of *C. albicans* and an increase of *C. glabrata* and *C. krusei*, whereas pre-exposure to caspofungin resulted in an increase of *C. parapsilosis*. According to the statistical model developed by Bailly *et al.*,³² echinocandin consumption is correlated with higher MICs in *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. albicans*, and amphotericin B consumption increases *C. glabrata* MIC. In our study, the introduction of echinocandins as first-line therapy did not significantly affect the ICU fungal ecology, although an upward trend for *C. glabrata* and *C. parapsilosis* and a downward trend for *C. albicans* were observed during the last 3 years. The risk of fungal ecology modification is often linked to pre-exposure to antifungal agents. At the ICU of Nimes University Hospital, no prophylaxis protocol with echinocandins was introduced during the study period. Echinocandins have been used as a first-line curative therapy in the course of 2012, or as pre-emptive treatment in patients colonized and with unstable clinical condition. Our fungal ecology data are largely based on samples collected before

antifungal treatment, thus in patients where the "endogenous flora or microbiota" was not modified by antifungal treatments. This may explain the absence of significant modifications in the species involved in invasive candidiasis, because the origin of these infections is essentially linked to endogenous *Candida* species.

Antifungal drug susceptibility. During the study period, we did not observe the emergence of resistance to any antifungal molecule in any of the species studied. Resistance to echinocandins has been mainly described in *C. glabrata* and is caused by mutations in the *FKS* genes that encode the target enzyme 1,3-D-glucan synthase. Prolonged exposure to echinocandins is the major factor in the onset of resistance.³³ In our study, despite the increase in echinocandin use over the years, one single *C. glabrata* isolate was resistant. This isolate was from a peritoneal fluid sample of a patient who was treated with micafungin for 12 days, and resistance was due to a deletion of phenylalanine at position 659 of the *FKS2* gene.³⁴ Moreover, one *C. krusei* isolate was categorized as resistant to caspofungine (MIC = 2 mg/L). However, the application of the CLSI breakpoints¹⁸ could lead to a misclassification of *C. krusei* strains tested for caspofungin susceptibility with the Etest technique.³⁵ Thus, in isolates with intermediate MICs or resistant to echinocandins, the presence of *FKS* gene mutations should always be assessed to confirm resistance, after screening by antifungal susceptibility testing.

Conclusion

The occurrence of invasive candidiasis in ICU remains a major issue due to its high mortality. A good knowledge of the fungal ecology and practices can contribute to improve patients' management. Over the last decade, consumption of antifungal agents has been modified due to changes in the international recommendations for the treatment of invasive candidiasis. In our study, the significant increase in echinocandin-based antifungal treatments did not lead to any significant change in fungal ecology, and resistance to this therapeutic class is still rare. Although data from a single center are a limit of the study, the results seem reassuring for ICUs with patients and practices similar to ours (*i.e.*,

without post-transplant patients). Monitoring fungal ecology and resistance to antifungal agents in a hospital, especially in ICUs, remains crucial. Collecting data from different centres with similar patients' profiles might provide more information about the effects of therapeutic changes on fungal ecology.

References

1. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, *et al.* International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 2009;302(21):2323-2329. doi:10.1001/jama.2009.1754.
2. Montagna MT, Caggiano G, Lovero G, *et al.* Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). *Infection*. 2013;41(3):645-653. doi:10.1007/s15010-013-0432-0.
3. Leroy O, Gangneux J-P, Montravers 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*. 2009;37(5):1612-1618. doi:10.1097/CCM.0b013e31819efac0.
4. Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, *et al.* Worrying trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med*. 2014;40(9):1303-1312. doi:10.1007/s00134-014-3408-3.
5. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38(1):65-69. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.02.016.
6. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2004;39(3):309-317. doi:10.1086/421946.
7. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, *et al.* Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2004;38(3):311-320. doi:10.1086/380637.
8. Bassetti M, Merelli M, Righi E, *et al.* Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *J Clin Microbiol*. 2013;51(12):4167-4172. doi:10.1128/JCM.01998-13.
9. Leroy O, Bailly S, Gangneux J-P, *et al.* Systemic antifungal therapy for proven or suspected invasive candidiasis: the AmarCAND 2 study. *Ann Intensive Care*. 2016;6(1):2. doi:10.1186/s13613-015-0103-7.

10. Meyer E, Geffers C, Gastmeier P, Schwab F. No increase in primary nosocomial candidemia in 682 German intensive care units during 2006 to 2011. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2013;18(24).
11. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, *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.* 2009;48(5):503-535. doi:10.1086/596757.
12. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, *et al.* ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;18 Suppl 7:19-37. doi:10.1111/1469-0691.12039.
13. Montagna MT, Lovero G, Borghi E, *et al.* Candidemia in intensive care unit: a nationwide prospective observational survey (GISIA-3 study) and review of the European literature from 2000 through 2013. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(5):661-674.
14. Barchiesi F, Orsetti E, Gesuita R, Skrami E, Manso E, Candidemia Study Group. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia in a tertiary referral center in Italy from 2010 to 2014. *Infection.* 2016;44(2):205-213. doi:10.1007/s15010-015-0845-z.
15. Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, *et al.* Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(2):532-538. doi:10.1128/AAC.01128-10.
16. Piarroux R, Grenouillet F, Balvay P, *et al.* Assessment of preemptive treatment to prevent severe candidiasis in critically ill surgical patients. *Crit Care Med.* 2004;32(12):2443-2449.
17. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg.* 1994;220(6):751-758.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. M27-S4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: 4th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
20. Li C, Wang H, Yin M, *et al.* The Differences in the Epidemiology and Predictors of Death between Candidemia Acquired in Intensive Care Units and Other Hospital Settings. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2015;54(23):3009-3016. doi:10.2169/internalmedicine.54.3744.
21. Faria-Ramos I, Neves-Maia J, Ricardo E, *et al.* Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility profiles of yeast isolates from invasive infections during a Portuguese multicenter survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2014;33(12):2241-2247. doi:10.1007/s10096-014-2194-8.

22. Bassetti M, Ansaldi F, Nicolini L, *et al.* Incidence of candidaemia and relationship with fluconazole use in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(3):625-629. doi:10.1093/jac/dkp251.
23. Tortorano AM, Dho G, Prigitano A, *et al.* Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006-2008). *Mycoses.* 2012;55(1):73-79. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02044.x.
24. Bassetti M, Righi E, Ansaldi F, *et al.* A multicenter multinational study of abdominal candidiasis: epidemiology, outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Med.* 2015;41(9):1601-1610. doi:10.1007/s00134-015-3866-2.
25. Renaudat C, Sitbon K, Desnos-Ollivier M, *et al.* Candidémies en Ile-de-France: données de l'Observatoire des levures (2002-2010). *Bull Epid Hebd Special Issue.* 2013;12-13:125-128.
26. Tadec L, Talarmin J-P, Gastinne T, *et al.* Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of Candidemia at a single French hospital: a 7-year study. *Mycoses.* 2016;59(5):296-303. doi:10.1111/myc.12470.
27. Charles PE, Dalle F, Aube H, *et al.* *Candida* spp. colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study. *Intensive Care Med.* 2005;31(3):393-400. doi:10.1007/s00134-005-2571-y.
28. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, *et al.* Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2004;38(3):311-320. doi:10.1086/380637.
29. Eliakim-Raz N, Babaoff R, Yahav D, Yanai S, Shaked H, Bishara J. Epidemiology, microbiology, clinical characteristics, and outcomes of candidemia in internal medicine wards-a retrospective study. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* 2016;52:49-54. doi:10.1016/j.ijid.2016.09.018.
30. Klingspor L, Tortorano AM, Peman J, *et al.* Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008). *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;21(1):87.e1-87.e10. doi:10.1016/j.cmi.2014.08.011.
31. Bounoux M-E, Kac G, Aegerter P, d'Enfert C, Fagon J-Y, CandiRea Study Group. Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Med.* 2008;34(2):292-299. doi:10.1007/s00134-007-0865-y.
32. Bailly S, Maubon D, Fournier P, *et al.* Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp. - Trends over 10 years. *J Infect.* 2016;72(1):103-111. doi:10.1016/j.jinf.2015.09.041.
33. Shields RK, Nguyen MH, Clancy CJ. Clinical perspectives on echinocandin resistance among *Candida* species. *Curr Opin Infect Dis.* 2015;28(6):514-522. doi:10.1097/QCO.0000000000000215.

34. Sasso M, Roger C, Lachaud L. Rapid emergence of *FKS* mutations in *Candida glabrata* isolates in a peritoneal candidiasis. *Med Mycol Case Rep.* 2017;16:28-30. doi:10.1016/j.mmcr.2017.04.004.
35. Arendrup MC, Pfaller MA, Danish Fungaemia Study Group. Caspofungin Etest susceptibility testing of *Candida* species: risk of misclassification of susceptible isolates of *C. glabrata* and *C. krusei* when adopting the revised CLSI caspofungin breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(7):3965-3968. doi:10.1128/AAC.00355-12.



Figure 1. Distribution of *Candida* sp. isolated in the intensive care unit of Nîmes University Hospital from 2007 to 2016 (n = 3557).

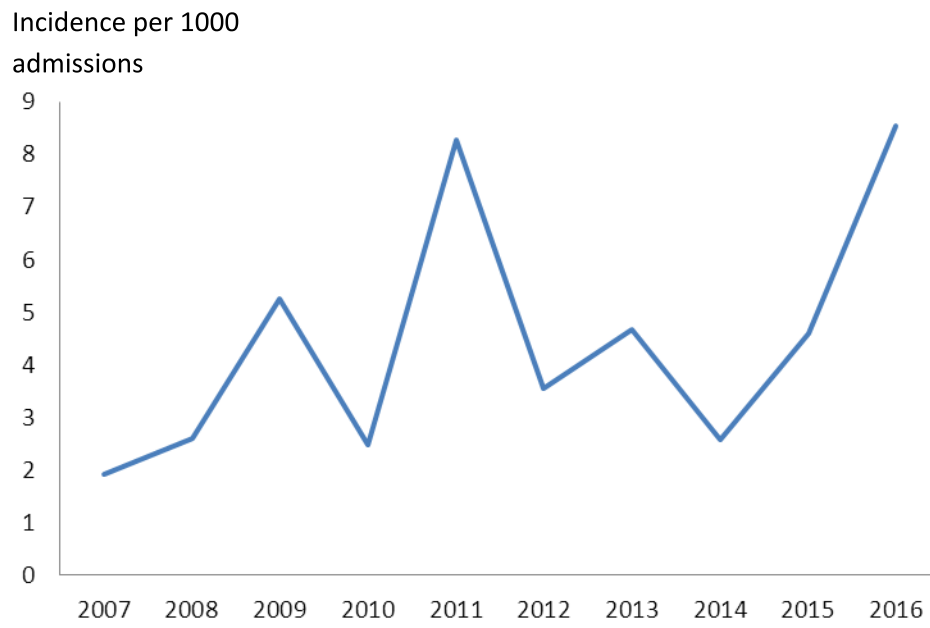


Figure 2. Temporal changes in the incidence of candidaemia in the intensive care unit of Nîmes University Hospital, France.

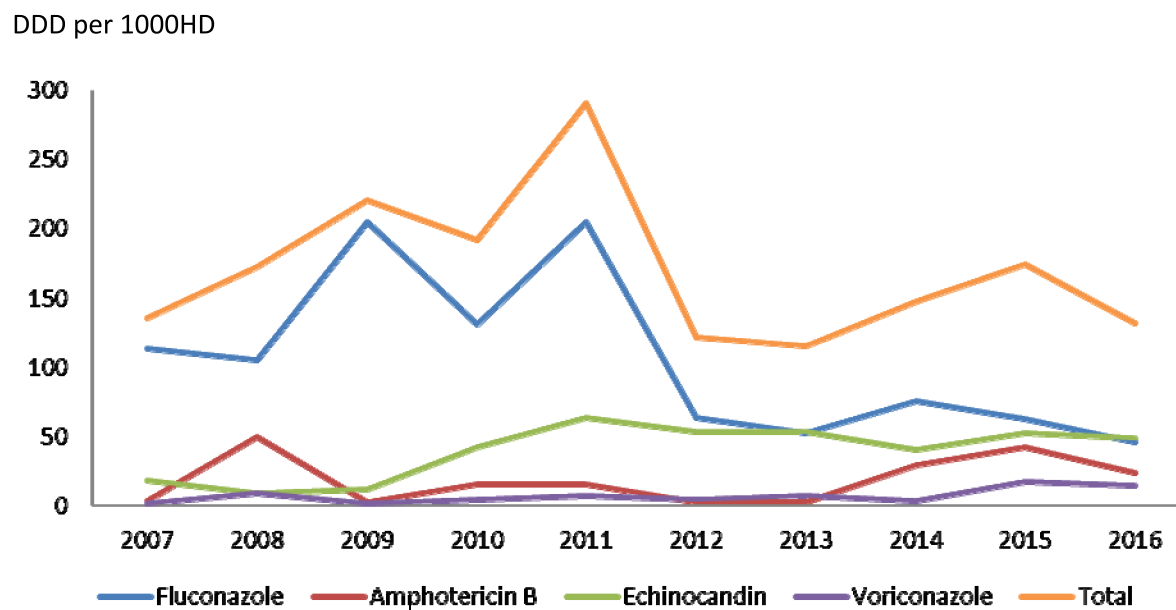


Figure 3. Changes in antifungal consumption from 2007 to 2016 in the intensive care unit of Nimes University Hospital, France, expressed in Daily Defined Dose (DDD) per 1000 hospital days (HD)

<i>Candida</i> species	All samples (n = 3557)	Bloodcultures (n = 53)	Catheter (n = 41)	Other sterile sites* (n = 168)
<i>C. albicans</i>	57.1% (2033)	62.2% (33)	51.2% (21)	54.8% (92)
<i>C. glabrata</i>	14.9% (531)	11.3% (6)	9.8% (4)	16.1% (27)
<i>C. parapsilosis</i>	5.3% (190)	9.4% (5)	19.5% (8)	4.7% (8)
<i>C. tropicalis</i>	9% (319)	5.7% (3)	7.3% (3)	11.9% (20)
<i>C. krusei</i>	5.4% (192)	5.7% (3)	4.9% (2)	5.3% (9)
<i>C. kefyr</i>	3.8% (136)	5.7% (3)	0%	3.6% (6)
Other species	4.4% (156)	0%	7.3% (3)	3.6% (6)

*urine samples excluded

Table 1. Distribution of *Candida* species in the intensive care unit of Nîmes University Hospital, between 2007 and 2016, depending on the sampling site.

		2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	total
<i>C. albicans</i>												
Amphotericin	n	21	34	48	48	58	65	35	47	25	26	407
	MIC range	0.047-0.38	0.064-0.38	0.064-0.5	0.047-0.5	0.125-0.38	0.025-0.5	0.032-0.38	0.064-1	0.094-0.75	0.002-1	
	% WT	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Fluconazole	n	27	37	55	54	74	88	50	59	27	26	497
	MIC range	0.094-3	0.064-4	0.032-1.5	0.047-2	0.023-0.75	0.032-1	0.023-2	0.094-4	0.125-0.5	0.064-32	
	% S	96.3	97.3	100	100	100	100	100	98.4	100	92.3	
	% I	3.7	2.7	-	-	-	-	-	1.7	-	3.85	
	% R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.85	
Voriconazole	n	22	35	51	49	59	65	35	47	25	26	414
	MIC range	0.003-0.064	0.002-0.125	0.003-0.032	0.002-0.094	0.003-0.047	0.002-0.047	0.002-0.094	0.004-0.094	0.003-0.047	0.002-0.125	
	% S	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Caspofungin	n	21	35	49	50	63	88	50	59	33	27	475
	MIC range	0.016-0.5	0.023-0.125	0.008-0.125	0.006-0.125	0.008-0.25	0.012-0.25	0.012-0.19	0.016-0.25	0.006-0.125	0.004-0.125	
	% S	95.2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	% I	4.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. glabrata</i>												
Amphotericin	n	13	11	12	11	16	23	8	14	8	10	126
	MIC range	0.032-1	0.25-1	0.094-0.75	0.125-1	0.38-1	0.064-1	0.25-0.75	0.38-1	0.5-2	0.25-1	
	% WT	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Fluconazole	n	13	11	13	11	16	23	8	14	10	10	129
	MIC range	3->256	12->256	12->256	16->256	16->256	4->256	8->256	3->256	8->256	2->256	
	% SDD	46.1	45.5	46.1	36.4	43.8	39.1	25	42.9	40	60	
	% R	53.9	54.5	53.9	63.6	56.2	60.9	75	57.1	60	40	
Voriconazole	n	13	11	12	11	16	23	8	11	9	10	124
	MIC range	0.032->32	0.125-24	0.16-12	0.25->32	0.38->32	0.047->32	0.25->32	0.047->32	0.38-32	0.012->32	
	% WT	30.7	27.3	41.7	18.2	18.8	47.8	37.5	27.3	22.2	60	
	% non WT	69.3	72.7	58.3	82.8	81.2	52.2	62.5	72.7	77.8	40	
Caspofungin	n	13	11	12	11	16	23	8	14	10	10	128
	MIC range	0.125-0.5	0.094-0.38	0.064-0.19	0.064-0.38	0.064-0.25	0.032-0.38	0.012-0.125	0.047->32	0.047-0.125	0.032-0.125	
	% S	15.4	72.7	75	90.9	68.7	69.6	100	57.2	100	100	

	% I	84.6	27.3	25	9.1	31.3	30.4	-	35.7	-		
	% R	-	-	-	-	-	-	-	7.1	-		
<i>C. parapsilosis</i>												
Amphotericin	n	3	3	2	6	7	10	3	1	1	8	44
	MIC range	0.19-1	0.38-0.75	0.38	0.25-0.75	0.38-1.5	0.25-1	0.38-1.5	1.5	0.38	0.25-1	
	% WT	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Fluconazole	n	3	4	2	7	8	10	4	3	2	8	51
	MIC range	0.19-8	0.25-2	0.094-0.19	0.125-32	0.19-0.75	0.125-32	0.19-0.5	0.38-0.75	0.25-0.5	0.25-1	
	% S	66.7	100	100	85.7	100	60	100	100	100	100	
	% I	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	
	% R	33.3	-	-	14.3	-	20	-	-	-	-	
Voriconazole	n	3	3	2	6	7	10	3	1	2	8	45
	MIC range	0.012-0.19	0.023-0.032	0.004-0.012	0.004-0.75	0.008-0.047	0.008-0.5	0.008-0.032	0.047	0.008-0.016	0.003-0.032	
	% S	66.7	100	100	83.3	100	80	100	100	100	100	
	% I	33.3	-	-	16.7	-	20	-	-	-	-	
Caspofungin	n	3	3	2	6	7	10	4	1	2	8	46
	MIC range	0.38-0.5	0.19-1	0.5-1	0.047-1	0.125-1	0.125-2	0.38-2	1.5	3	0.5-6	
	% S	100	100	100	100	100	100	100	100	-	62.5	
	% I	-	-	-	-	-	-	-	-	100	37.5	
<i>C. tropicalis</i>												
Amphotericin	n	6	5	6	9	6	11	10	9	6	3	71
	MIC range	0.064-0.5	0.25-0.5	0.25-1	0.38-0.75	0.125-1	0.125-0.75	0.094-1	0.38-1	0.38-1.5	0.5-1	
	% WT	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Fluconazole	n	7	5	7	10	9	12	10	11	8	3	82
	MIC range	0.38-6	0.25-16	0.19-128	0.38-3	0.5-4	0.032-6	0.38-1.5	0.38-2	0.5-3	0.5-1	
	% S	71.4	80	85.7	90	88.9	75	100	100	87.5	100	
	% I	28.6	-	-	10	11.1	25	-	-	12.5	-	
	% R	-	20	14.3	-	-	-	-	-	-	-	
Voriconazole	n	6	5	6	10	6	11	10	9	7	3	73
	MIC range	0.012-0.38	0.023-0.25	0.012-24	0.023-0.19	0.032-0.094	0.023-0.38	0.012-0.064	0.016-0.125	0.032-0.125	0.012-0.064	
	% S	83.3	80	83.3	80	100	81.2	100	100	100	100	
	% I	16.7	20	-	20	-	18.2	-	-	-	-	

	% R	-	-	16.7	-	-	-	-	-	-	-	
Caspofungin	n	6	5	6	9	6	12	10	10	8	3	75
	MIC range	0.047-0.25	0.047-0.19	0.064-0.25	0.047-0.125	0.023-0.125	0.047-0.25	0.032-0.5	0.032-0.19	0.047-0.25	0.023-0.094	
	% S	100	100	100	100	100	100	90	100	100	100	
	% I	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	
<i>C. krusei</i>												
Amphotericin	n	1	2	6	4	7	14	9	5	2	1	51
	MIC range	0.38	1-1.5	0.5-2	0.25-2	1-1.5	0.38-2	0.19-1.5	0.5-2	1-2	1	
	% WT	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Fluconazole	n	0	2	6	4	6	13	9	3	4	1	48
	MIC range	-	>256	>256	>256	256->256	128->256	64->256	256->256	128->256	128	
	% R	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Voriconazole	n	1	2	6	4	9	13	9	6	4	1	55
	MIC range	0.38	0.19-1.5	0.25-0.75	0.19-1	0.19-0.75	0.064-1	0.094-0.75	0.38-0.5	0.125-0.75	0.5	
	% S	100	50	50	75	88.9	76.9	77.8	100	75	100	
	% I		50	50	25	11.1	23.7	22.2	-	25	-	
Caspofungin	n	1	2	6	4	9	14	9	4	4	1	54
	MIC range	0.75	0.38	0.38-2	0.38-0.5	0.38-0.75	0.25-1.5	0.19-1	0.38-0.75	0.25-0.5	0.19	
	% S	100	100	-	-	-	14.3	11.1	-	50	100	
	% I	-	-	83.3	100	100	85.7	88.9	100	50	-	
	% R	-	-	16.7	-	-	-	-	-	-	-	

Table 2. MICs and interpretation of the results for amphotericin B, fluconazole, voriconazole, caspofungin in *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. krusei* isolates from 2007 to 2016

PARTIE 2

*Étude prospective bicentrique en réanimation : élaboration d'un score prédictif
de candidose invasive*

Élaboration d'un score prédictif de candidose invasive chez les patients non neutropéniques de réanimation

RÉSUMÉ

Contexte. Élaboration d'un nouveau score prédictif de candidose invasive en réanimation pour identifier les patients à haut risque et évaluation des performances du Candida Score, de l'index de colonisation, des antigènes mannane et anticorps anti-mannane.

Méthodes. Une étude prospective, observationnelle, non interventionnelle, bicentrique incluant 427 patients non-neutropéniques séjournant plus de deux jours en réanimation a été menée dans deux hôpitaux. Les facteurs de risque cliniques ainsi que des données mycologiques (colonisation à *Candida* sp., antigènes mannane et anticorps anti-mannane) ont été recueillis et analysés. Un score prédictif a été construit. Ses performances ont été évaluées, de même que celles du Candida Score, de l'index de colonisation, des antigènes mannane et anticorps anti-Mannane.

Résultats. Quarante-quatre patients (10,3 %) ont développé une candidose invasive au cours de l'étude. Sept variables indépendamment associées à la survenue d'une candidose invasive (cinq facteurs de risque clinique, l'index de forte colonisation et l'antigène mannane) ont été intégrées dans l'élaboration d'un score prédictif. L'aire sous courbe de la courbe ROC était de 0,796. Deux seuils d'interprétation ont été proposés : 0,8 et 1,9. Ainsi, 90,2 % des patients infectés vs 46,2 % des patients non infectés avaient un score $\geq 0,8$; alors que 68,3 % des patients infectés vs 20,6 % des patients non infectés avaient un score $\geq 1,9$. Tous les autres scores ou biomarqueurs analysés avaient des performances inférieures.

Conclusion. La prévention des candidoses invasives en réanimation repose sur une sélection fine des patients les plus à risque. Dans ce travail, nous proposons un score qui intègre des données cliniques et mycologiques, avec deux seuils d'interprétation. Le choix du seuil dépendra de la stratégie choisie par chaque service.

Mots-clés. candidose invasive, réanimation, score prédictif, colonisation, Candida Score, antigène mannane, anticorps anti-mannane

INTRODUCTION

Les infections fongiques chez les patients non neutropéniques en réanimation sont principalement des candidoses invasives (candidémies et candidoses intra-abdominales). Les espèces du genre *Candida* sont à la troisième place des germes responsables de septicémies acquises en réanimation (10,1 % des cas), après les staphylocoques à coagulase négative et *Staphylococcus aureus* (Wisplinghoff *et al.*, 2004). Des données françaises récentes montrent une incidence des candidémies en réanimation de 6,9 pour 1000 admissions (Renaudat *et al.*, 2013). La mortalité demeure élevée, de l'ordre de 24 à 52 % (Dupont *et al.*, 2002; Wisplinghoff *et al.*, 2004; Montravers *et al.*, 2006, 2011; Leroy *et al.*, 2009; Tortorano *et al.*, 2012; Bassetti *et al.*, 2013, 2015; Meyer *et al.*, 2013; Lortholary *et al.*, 2014; Aguilar *et al.*, 2015; Klingspor *et al.*, 2015; Barchiesi *et al.*, 2016; Paiva *et al.*, 2016). Une prise en charge précoce est primordiale. En effet, des études ont montré que la mise en route rapide d'un traitement antifongique était indispensable (dans les 12 à 24 heures) pour réduire la mortalité (Morrell *et al.*, 2005; Garey *et al.*, 2006). L'initiation du traitement est souvent retardée pour de multiples raisons : absence de signes cliniques spécifiques, sensibilité médiocre des hémocultures, de l'ordre de 50 % (Clancy and Nguyen, 2013), et délai de croissance nécessaire à la positivité des hémocultures.

Le diagnostic de candidose invasive doit être évoqué chez un patient à risque devant toute fièvre prolongée résistante à un traitement antibiotique large spectre adapté. Les patients hospitalisés en réanimation présentent de nombreux facteurs de risque de candidose invasive. Il est donc nécessaire d'identifier ceux à plus haut risque pour éviter des traitements inutiles. Des scores prédictifs ont ainsi été proposés dans la littérature pour améliorer l'identification de ces patients. Ils prennent en compte soit uniquement la colonisation à *Candida* sp. (index de colonisation proposé par l'équipe de Pittet en 1994) soit uniquement des facteurs de risque cliniques (règles de Paphitou et de Ostrosky-Zeichner 2007 et 2011) soit une combinaison des données de colonisation aux facteurs de risque cliniques (Candida Score proposé par León en 2006, règle de Playford) (Pittet *et al.*, 1994; Paphitou *et al.*, 2005; León *et al.*, 2006; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2007; Ostrosky-Zeichner, 2011; Playford *et al.*, 2016). L'utilisation de biomarqueurs (antigènes mannane, anticorps anti-mannane, (1,3)- β -D-Glucane, PCR) a également été évaluée (Posteraro *et al.*, 2011; Poissy *et al.*, 2014; León *et al.*, 2016).

Cette étude prospective observationnelle bicentrique avait pour objectif l'amélioration du diagnostic précoce de candidose invasive chez les patients non neutropéniques de réanimation. Pour cela, un score prédictif basé sur le recueil de données cliniques et biologiques au deuxième jour suivant l'admission en réanimation a été élaboré et testé. De plus, les performances de deux scores

précédemment décrits : l'index de colonisation et le Candida Score, ainsi que la valeur des biomarqueurs suivants : antigène mannane et anticorps anti-mannane ont été évaluées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Design de l'étude et population

Il s'agit d'une étude prospective observationnelle, réalisée d'octobre 2011 à octobre 2014, dans deux services de réanimations de deux CHU : la réanimation médicale et chirurgicale du CHU de Nîmes et le Département d'Anesthésie et Réanimation B (DAR B, à dominante chirurgicale) de l'hôpital Saint-Éloi du CHU de Montpellier, France. La réanimation du CHU de Nîmes est composée de 26 lits, tout au long de l'étude, le nombre annuel moyen d'admissions était de 1119. Le service de réanimation DAR B du CHU de Montpellier est composé de 16 lits, avec une moyenne de 700 admissions par an.

435 patients adultes non neutropéniques hospitalisés en réanimation pour une durée supérieure à deux jours ont été inclus dans l'étude. Les critères d'exclusion étaient : âge inférieur à 18 ans, neutropénie ($< 500/\text{mm}^3$), séjour en réanimation de moins de deux jours, infection documentée à *Candida* sp. à l'admission, présence d'un traitement antifongique à l'admission ou transfert depuis une autre réanimation.

L'étude a été approuvée par le comité d'éthique. Le consentement des patients ou de leurs représentants a été recueilli. Une déclaration à la CNIL (Commission nationale de l'informatique et des libertés) a été faite.

Collecte des données

Les données collectées deux jours après l'admission (J2) étaient les suivantes : âge, sexe, motif d'admission, présence d'un traitement antifongique et présence des facteurs de risque de candidose invasive suivants : chirurgie digestive récente (moins de 15 jours), présence d'un dispositif invasif (canule d'intubation, cathéter central, cathéter avec boîtier implantable Port-à-Cath, sonde urinaire), sepsis grave ou choc septique, antibiothérapie de plus de cinq jours, insuffisance rénale et/ou dialyse, diabète insulino-dépendant, nutrition parentérale totale, immunosuppression (corticothérapie $\geq 1\text{mg/kg/j}$ pendant plus d'une semaine, chimiothérapie anticancéreuse lors des trois derniers mois, transplantation d'organe), score de réanimation défavorable (défini par ISS (Injury Severity Score) > 16 , IGSII (Indice de Gravité Simplifié) > 30 ou SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment > 5)), sexe féminin. Le devenir du patient un mois après l'admission était recherché et les paramètres suivants étaient recueillis: décès, sortie de réanimation ou sortie de

l'hôpital, instauration d'un traitement antifongique dans le mois. La survenue d'une candidose invasive a été recherchée jusqu'à 90 jours après l'admission en réanimation quelque soit le devenir du patient.

Examens mycologiques

Détermination de la colonisation.

Pour l'ensemble des patients, un examen mycologique a été réalisé deux jours après l'admission sur cinq échantillons parmi les suivants : urines, liquide gastrique, prélèvement respiratoire, écouvillon anal ou selles, écouvillon buccal ou un autre prélèvement (drain,...).

Les prélèvements ont été pris en charge par le laboratoire de Mycologie de chaque CHU. Ils ont été ensemencés sur milieux Sabouraud/chloramphénicol/gentamicine avec ou sans cycloheximide (Biorad, Marnes-la-Coquette, France), sur milieu chromogène (Chromagar™ *Candida*, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) et incubés à 27°C et 37°C pendant 7 à 28 jours selon le type de prélèvement et les protocoles habituels de réalisation des analyses. *Candida albicans* était directement identifié à partir du milieu chromogène. Pour les autres espèces de champignons, l'identification a été réalisée avec le VITEK®2 YST (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), les galeries ID32C (bioMérieux), le test RTT *Glabrata* (Fumouze Diagnostics, Levallois Perret, France) ou avec le spectromètre de masse Vitek®MS (bioMérieux) pour le CHU de Nîmes et Bruker Microflex LT system (BrukerDaltonics, Bremen, Allemagne) pour le CHU de Montpellier. Une semi-quantification a été faite en fonction du nombre de colonies retrouvées : rares (< 10 colonies), quelques (10 à 50 colonies), nombreuses (50 à 100 colonies), très nombreuses (> 100 colonies en nappe).

L'index de colonisation défini par l'équipe de Pittet a été calculé. Il s'agit du ratio entre le nombre de sites colonisés à *Candida* sp. et le nombre de sites prélevés (Pittet *et al.*, 1994). Un minimum de trois sites prélevés était requis pour calculer cet index. Une valeur $\geq 0,5$ était considérée comme significative. Un index de forte de colonisation a également été défini grâce au dénombrement des colonies en culture, il s'agit du ratio entre le nombre de sites fortement colonisés (de nombreuses à très nombreuses colonies) sur le nombre de sites prélevés.

Le Candida Score (CS) a été calculé lors de l'analyse finale de l'étude à l'aide de la formule suivante : sepsis sévère x2 + nutrition parentérale totale x1 + chirurgie à l'admission x1 + colonisation multifocale à *Candida* sp. (sur au moins deux sites différents) x1 (León *et al.*, 2006). Chaque variable étant notée 0 si absente et 1 si présente. Une valeur ≥ 3 était considérée comme significative.

Dosage des antigènes mannane et anticorps anti-mannane

Les recherches d'anticorps et d'antigènes ont été réalisées à partir de prélèvements sanguins effectués au deuxième jour après l'admission, sur un tube sans anticoagulant (BD Vacutainer® SST™ II ou BD Vacutainer® secs). Après centrifugation 10 min à 1400g, le sérum a été séparé en aliquots congelés à -20°C avant analyse. Les dosages ont été réalisés avec les kits Serion ELISA Antigen pour les antigènes mannane et Serion ELISA classic *Candida albicans* pour les anticorps anti-mannane (Institut Virion/SerionGmbH, Würzburg, Allemagne), selon les recommandations du fournisseur. Les seuils de positivité pour les antigènes mannane et anticorps anti-mannane sont respectivement 2,6 U/mL et 100 U/mL. Les résultats douteux, entre 1,4 et 2,6 U/mL pour les antigènes et entre 40 et 100 U/mL pour les anticorps, ont été considérés positifs. La recherche d'anticorps anti-mannane a été réalisée en temps réel, celle d'antigènes mannane a été réalisée par série dans un seul centre (résultats non disponibles pour les cliniciens).

Définition et critères de classification des groupes

Une candidose invasive était définie par l'isolement de *Candida* sp. à partir de sites normalement stériles (urines exclues). Les patients ont été classés en trois groupes : i) non infectés non colonisés (aucun champignon n'a été isolé), ii) colonisés mais non infectés : détection d'au moins un site colonisé, iii) infectés (cf. définition ci-dessus).

Analyse statistique

L'analyse statistique a été conduite par le BESPIM (Biostatistique, Epidémiologie clinique, Santé Publique, Informations Médicales) du CHU de Nîmes, à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA) version 9.4. Le risque d'erreur de première espèce a été fixé pour toutes les analyses à 5 % sauf mention contraire.

Analyse descriptive de la population. Les variables quantitatives sont présentées sous forme de médianes et intervalles interquartiles (IIQ) (25ème – 75ème percentiles). La normalité de la distribution des variables quantitatives a été explorée à l'aide du test de normalité de Shapiro-Wilks, ainsi que de la méthode graphique de la droite de Henry (ou Q-Q plot). Les variables quantitatives ont été comparées par un test de Student en cas de variables gaussiennes ou par un test de Mann-Whitney en cas de variables non-gaussiennes. Pour les variables qualitatives, les effectifs et les pourcentages associés sont présentés. Elles ont été comparées par un test du χ^2 , ou à défaut si les conditions de réalisation de ce test n'étaient pas respectées, par le test exact de Fisher.

Analyse de la population en trois catégories. Une autre analyse exploratoire de la population a également été réalisée en divisant la population en trois catégories: patients infectés, patients colonisés non infectés et patients ni infectés ni colonisés. Cette analyse a consisté d'une part en une analyse descriptive (avec présentation des résultats sous forme de médianes et IIQ ou effectifs et pourcentages associés selon le type de variable considérée), et d'autre part en la recherche d'association simple entre les trois catégories (à l'aide d'un test du Khi^2 , d'un test exact de Fisher, d'une analyse de variance ou d'un test de Kruskal-Wallis selon le type de la variable considérée et des conditions d'application des tests).

Analyse du critère de jugement principal (CJP). Le CJP était la survenue de candidose invasive. Il s'agissait tout d'abord de rechercher les facteurs pronostiques précoces (à J2) de la survenue d'une candidose invasive et d'établir un score prédictif. Les facteurs pronostiques testés ont été les facteurs de risque clinique ainsi que les résultats des analyses mycologiques (index de colonisation, antigène mannane et anticorps anti-mannane). Pour cela, une analyse de survie suivant les étapes suivantes a été réalisée : (1) recherche exploratoire d'association simple entre toutes les différentes caractéristiques disponibles et le CJP en binaire à l'aide d'un des tests statistiques suivants, celui adapté en fonction du type de la variable considérée et les conditions d'application des tests : test du Khi^2 , test exact de Fisher, test de Student, test de Mann-Whitney, (2) recherche d'association simple entre toutes les différentes caractéristiques disponibles et le CJP en survie à l'aide de courbes de survie de Kaplan-Meier (estimation non paramétrique de la survie) assorties de tests du log-rank. Les facteurs retenus en variables candidates l'étaient à un seuil de 20 %, (3) évaluation en univarié de l'ampleur de l'association entre les variables candidates et le CJP à l'aide d'un modèle de Cox univarié. Les résultats sont présentés sous forme d'HR (Hazard ratio) bruts, (4) sélection des variables à retenir pour le modèle final à partir des variables candidates définies ci-dessus suivant un processus pas à pas descendant (« backward ») et avec un seuil de sélection à 10 %, (5) modélisation multivariée finale à l'aide d'un modèle de Cox multivarié avec présentation des résultats sous forme d'HR ajustés. L'adéquation du modèle final a été évaluée par les résidus martingales, les résidus de Schoenfeld et le tracé des courbes $\ln(-\ln(S(t)))$, (6) création d'un score pronostique simple à partir des résultats du modèle de Cox multivarié final.

Il s'agissait ensuite d'estimer les performances pronostiques du score prédictif créé d'une part globalement et d'autre part en fonction d'un seuil optimal à définir, et de comparer ces performances à celles des critères pronostiques existants (index de colonisation, antigène mannane, anticorps anti-mannane et Candida Score). Globalement, les performances du score pronostique ont été évaluées à l'aide d'une courbe ROC et estimation de l'aire sous courbe (ASC) correspondante avec son intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %). Le seuil optimal a été défini en fonction de la

pertinence et du coût clinique des faux positifs et des faux négatifs. Les sensibilités et spécificités ont été estimées assorties de leurs IC 95 % avec la méthode exacte suivant la loi binomiale. Enfin, une étape de validation interne a été réalisée. L'estimation de l'ASC globale du score pronostique a également été estimée par une méthode de bootstrap avec 500 échantillons.

Recherche des facteurs pronostiques de mortalité à un mois et des facteurs prédictifs de la durée d'hospitalisation (à l'hôpital et en réanimation). La recherche a été réalisée suivant la même méthodologie que l'analyse du CJP (à l'exception de l'étape 6 de construction d'un score). Les facteurs pronostiques testés ont été les mêmes que ceux testés pour l'analyse du critère de jugement principal ainsi que le score pronostique créé lui-même.

RÉSULTATS

Description de la population étudiée

Le diagramme de flux de l'étude est présenté dans la figure 1. Sur les 435 patients inclus initialement, huit (1,8 %) ont été exclus (retrait de consentement, présence d'antifongique à l'admission et hospitalisation de moins de 48 heures) et cinq n'ont pas eu la visite à J2 (un perdu de vue et quatre décès).

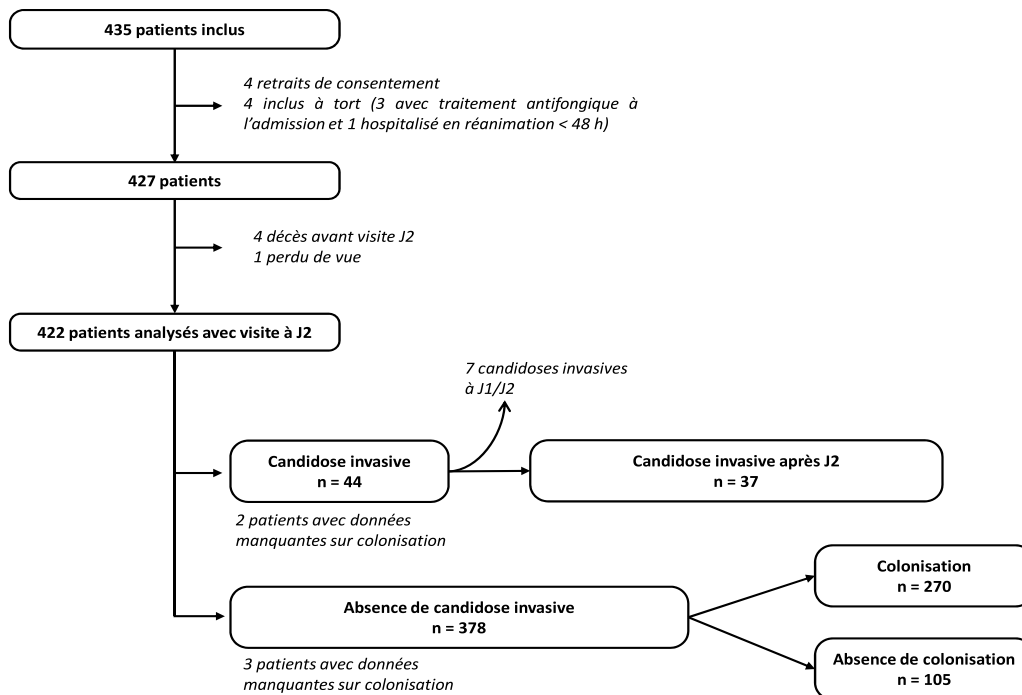


Figure 1. Diagramme des flux de l'étude

Les données des 422 patients ayant eu la visite à J2 sont présentées dans le tableau 1. La population avait un âge médian de 65 ans, elle était composée de 60,7 % d'hommes.

Les motifs d'hospitalisation principaux étaient :

- une chirurgie abdominale (35,1 %) ;
- un sepsis ou choc septique (19,9 %) ;
- un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) (16,8 %).

82 % des patients avaient un score de réanimation défavorable.

Quarante-quatre (10,5 %) patients ont développé une candidose invasive. Parmi les 378 patients non infectés, 270 (64,4 %) présentaient une colonisation à *Candida* sp., 105 (25,1 %) n'étaient ni infectés ni colonisés et trois étaient non catégorisés en l'absence de prélèvements mycologiques réalisés. Les caractéristiques de ces trois groupes sont présentées dans le tableau 1. Parmi ces trois groupes, des différences significatives ont été observées pour les motifs d'hospitalisation : chirurgie abdominale et sepsis/choc septique ainsi que pour les facteurs de risque suivants : présence d'une chirurgie digestive, sepsis grave/choc septique, insuffisance rénale et/ou dialyse, score de réanimation défavorable.

Les patients ayant développé une candidose invasive avaient eu dans 63,6 % des cas une chirurgie abdominale, présentaient un sepsis grave ou un choc septique dans 65,9 % des cas, une insuffisance rénale dans 43,2 % des cas et 88,6 % avaient un score de réanimation défavorable. 25 % présentaient plus de six facteurs de risque.

Concernant les candidoses invasives diagnostiquées chez 44 patients, étaient retrouvées cinq candidémies isolées, 37 candidoses invasives localisées (dont 89,2 % intra-abdominales) et deux candidoses intra-abdominales associées à une candidémie. Le délai médian entre l'admission en réanimation et le diagnostic de la candidose invasive était de 8 jours (IIQ : 3,5 - 13,5 jours). 45,5 % et 66 % des candidoses invasives ont été diagnostiquées respectivement dans les sept et 10 jours suivant l'admission en réanimation. 51 souches ont été isolées, il s'agissait de *C. albicans* (66,7 %, n = 34), *C. glabrata* (13,7 %, n = 7), *C. tropicalis* (5,9 %, n = 3), *C. parapsilosis* (3,9 %, n = 2), *C. krusei* (3,9 %, n = 2), *C. kefyr* (3,9 %, n = 2) et *C. inconspicua* (2 %, n = 1).

La mortalité globale à un mois était de 22,8 % (29,7 % chez les patients infectés, 22,5 % chez les patients colonisés/non infectés et 17,3 % chez les patients non colonisés/non infectés, p = 0,262). En analyse multivariée, les facteurs de risque de mortalité étaient :

- le score de réanimation défavorable (HR 2,798) ;

Tableau 1. Caractéristiques de la population (IIQ : intervalle interquantile, SDRA : syndrome de détresse respiratoire aiguë, FDR : facteurs de risque)

	Population globale	Candidose invasive	Colonisation sans infection	Absence colonisation/infection	p-value
	n = 422	n = 44 (10,5 %)	n = 270 (64,4 %)	n = 105 (25,1 %)	
Âge, médiane [IIQ]	65 [54-75]	65,5 [53-77,5]	66 [55-76]	62 [52-68]	0,071
Homme/Femme (%)	60,7/39,3	65,9/34,1	61,5/38,5	57,1/42,9	0,57
Motif d'hospitalisation, n (%)					
Symptômes cardio-respiratoires	22 (5,2)	0	15 (5,6)	7 (6,7)	0,233
Symptômes digestifs, hépatiques, pancréatiques	33 (7,8)	4 (9,1)	21 (7,8)	8 (7,6)	0,95
Symptômes neurologiques	43 (10,2)	1 (2,3)	31 (11,5)	10 (9,5)	0,166
Chirurgie abdominale	148 (35,1)	25 (56,8)	82 (30,4)	41 (39,1)	0,002
Hémorragie	39 (9,2)	2 (4,6)	26 (9,6)	10 (9,5)	0,543
Insuffisance rénale aiguë	7 (1,7)	1 (2,3)	3 (1,1)	3 (2,9)	0,387
Polytraumatisme	41 (9,7)	0	30 (11,1)	11 (10,5)	0,068
SDRA	71 (16,8)	8 (18,2)	49 (18,2)	13 (12,4)	0,39
Syndrome métabolique	21 (5)	3 (6,8)	13 (4,8)	5 (4,8)	0,845
Sepsis/choc septique	84 (19,9)	15 (34,1)	57 (21,1)	12 (11,4)	0,005
Facteurs de risque, n (%)					
Chirurgie digestive	153 (36,3)	28 (63,6)	82 (30,4)	42 (40)	p < 0,001
Dispositif invasif	417 (98,8)	43 (97,7)	267 (98,9)	104 (99)	0,615
Sepsis grave/choc septique	155 (36,7)	29 (65,9)	105 (38,9)	21 (20)	p < 0,001
Antibiothérapie depuis plus de cinq jours	46 (10,9)	9 (20,4)	26 (9,6)	9 (8,6)	0,072
Insuffisance rénale et/ou dialyse	101 (23,9)	19 (43,2)	62 (23)	20 (19)	0,006
Diabète insulino-dépendant	20 (4,7)	1 (2,3)	14 (5,2)	5 (4,8)	0,703
Nutrition parentérale	140 (33,2)	20 (45,4)	85 (31,5)	34 (32,4)	0,185
Immunosuppression	34 (8,1)	3 (6,8)	22 (8,1)	9 (8,6)	0,938
Score de réanimation défavorable	346 (82)	39 (88,6)	234 (86,7)	72 (68,6)	p < 0,001
Sexe féminin	166 (39,3)	15 (34,1)	104 (38,5)	45 (42,9)	0,57
Présence de ≥ 6 FDR	49 (11,6)	11 (25)	31 (11,5)	7 (6,7)	0,006
Nombre de FDR (médiane, IIQ)	4 [3-5]	4,5 [4-5,5]	4 [3-5]	3 [2-4]	p < 0,001

- l'âge (HR 1,243) ;
- la présence d'urines positive à *Candida* sp. (avec une quantification des germes nombreux à très nombreux) (HR 2,514).

A l'inverse, une chirurgie digestive récente était associée à un risque plus faible de mortalité (HR 0,638).

La durée médiane d'hospitalisation à l'hôpital pour l'ensemble de la population était de 15 jours (IIQ 2-35 jours), en réanimation elle était de sept jours (IIQ 2-34 jours). Les facteurs indépendamment associés à la durée d'hospitalisation à l'hôpital étaient la présence de sepsis grave ou choc septique (HR 1,259) et l'insuffisance rénale/dialyse (HR 1,292). Ceux associés à la durée d'hospitalisation en réanimation étaient la positivité de l'antigène mannane (HR 1,869), l'index de colonisation (HR 1,420), l'insuffisance rénale/dialyse (HR 1,309) et le score de réanimation défavorable (HR 1,445).

Données mycologiques

Colonisation. 417 patients ont bénéficié de prélèvements pour évaluation de la colonisation fongique soit un total de 2081 échantillons biologiques avec 720 échantillons positifs (34,6 %), ce qui correspondait à 309 patients colonisés (74,1 %). Chez 89,6 % des patients, au moins cinq prélèvements ont été réalisés. Les principaux prélèvements réalisés étaient dans 88,7 % des cas des urines, 84 % des écouvillons buccaux, 76,5 % des prélèvements anaux, 61 % des écouvillons nasaux, 48,9 % des prélèvements respiratoires, 42,7 % des liquides gastriques et dans 44,4 % des cas des écouvillons de cathéters. Le pourcentage de positivité des prélèvements était variable, ceux qui étaient positifs chez plus de 50 % des patients étaient les écouvillons buccaux, les liquides gastriques et les prélèvements respiratoires (Tableau 2). Les urines n'étaient positives que dans 9,5 % des cas.

Candida albicans, *C. glabrata* et *C. tropicalis* étaient retrouvés respectivement chez 72,2 % (n = 223), 15,2 % (n = 47) et 10,4 % (n = 32) des patients colonisés. Les trois autres espèces principalement retrouvées étaient *C. krusei* (9,7 %, n = 30), *C. kefyr* (8,7 %, n = 27), *C. parapsilosis* (8,4 %, n = 26).

Un index de colonisation supérieur ou égal à 0,5 était retrouvé chez 32,4 % de l'ensemble des patients étudiés. Cet index, ainsi que l'index de forte colonisation, étaient significativement plus élevés dans le groupe candidose invasive que dans le groupe colonisation sans infection (p < 0,001). Chez les patients infectés, 92,6 % (39/42) étaient colonisés et 30,9 % avaient un index de forte colonisation $\geq 0,5$ vs 12,6 % dans le groupe colonisation sans infection (Tableau 2).

Antigène mannane/anticorps anti-mannane. Des dosages ont été réalisés chez 402 patients pour l'antigène mannane et 407 patients pour les anticorps anti-mannane. Des résultats ont été trouvés

Tableau 2. Résultats des examens mycologiques (colonisation, antigènes mannane et anticorps anti-mannane), du Candida score et du score prédictif
 * prélèvements manquants pour la colonisation chez deux patients infectés et trois non infectés (catégorisation impossible), IIQ : intervalle interquartile, VVC : voie veineuse centrale, Ag : antigène, Ac : anticorps

	Population globale	Candidose invasive	Colonisation sans infection	Absence colonisation/infection	p-value
	n = 417/422*	n = 42/44*	n = 270	n = 105	
Colonisation					
Echantillons biologiques positifs, n = (%)					
Urines	35/370 (9,5)	3/33 (9,1)	32/241 (13,3)		
Prélèvements respiratoires	119/204 (58,3)	13/17 (76,5)	106/141 (75,2)		
Ecouvillon buccal	230/350 (65,7)	31/33 (93,9)	199/234 (85)		
Aspiration gastrique	109/178 (61,2)	10/11 (90,9)	99/124 (79,8)		
Ecouvillon anal	114/319 (35,7)	23/32 (71,9)	91/199 (45,7)		
Ecouvillon VVC	5/185 (2,7)	1/19 (5,3)	4/121 (3,3)		
Drain/redon	3/46 (6,5)	2/8 (25)	1/41 (2,4)		
Ecouvillon nasal	84/257 (32,7)	21/33 (63,6)	63/160 (39,4)		
Ecouvillon axillaire	17/137 (12,4)	7/19 (36,8)	10/88 (11,4)		
Autres	4/35 (11,4)	2/7 (28,6)	2/18 (11,1)		
Index de colonisation $\geq 0,5$	135/416 (32,4)	24 (57,1)	111 (41,1)	0	p < 0,001
Index de forte colonisation $\geq 0,5$	47/416 (11,3)	13 (30,9)	34 (12,6)	0	p < 0,001
Colonisation multifocale	229 (54,9)	35 (83,3)	194 (71,9)	0	
Positivité Ag mannane	21/402 (5,2)	7/42 (16,7)	10/263 (3,8)	4/97 (4,1)	0,002
Positivité Ac anti-mannane	104/407 (25,6)	12/42 (28,6)	80/265 (30,2)	12/100 (12)	0,002
Candida Score ≥ 3	342/417 (82)	38/42 (90,5)	241/270 (89,3)	63/105 (60)	p < 0,001
Candida Score médian [IIQ]	3 [3-4]	4 [3-5]	3 [3-4]	3 [2-3]	p < 0,001
Score prédictif	n = 400	n = 41	n = 263	n = 96	
médiane [IIQ]	0,8 [0,6-1,9]	2,1 [1,4-2,7]	0,7 [0,6-1,5]	0,7 [0-1,3]	p < 0,001
Score $\geq 0,8$	203 (50,7)	37 (90,2)	129 (49)	37 (38,5)	p < 0,001
Score $\geq 1,9$	102 (25,5)	28 (68,3)	61 (23,2)	13 (13,5)	p < 0,001

positifs respectivement chez 5,2 % et 25,6 % des patients pour l'antigène mannane et les anticorps anti-mannane (Tableau 2). Des différences ont été observées entre les trois groupes. Les patients du groupe candidose invasive avaient des antigènes mannane positifs dans 16,7 % des cas vs 3,8 et 4,1 % des cas dans les groupes colonisation sans infection et absence de colonisation/infection ($p = 0,002$). Les anticorps anti-mannane étaient positifs chez 28,6 % des patients infectés, 30,2 % des patients colonisés non infectés et chez seulement 12 % des patients du dernier groupe.

Candida Score. Le CS médian pour l'ensemble de la population était de 3. Un CS ≥ 3 était retrouvé chez 90,5 % des patients infectés, 89,3 % des patients colonisés non infectés et 60 % des patients non infectés/non colonisés (Tableau 2).

Construction et performances d'un score prédictif

Les facteurs de risque de candidose invasive ainsi que les données de colonisation et des dosages des antigènes mannane et anticorps anti-mannane entre les catégories des patients infectés et non infectés sont présentés dans le tableau 3. Sept patients infectés entre J1 et J2 n'ont pas été pris en compte dans l'élaboration du score.

Tableau 3. Comparaison des variables (facteurs de risque, colonisation, antigène mannane, anticorps anti-mannane) entre le groupe de patients infectés et non infectés

Variables, n (%)	Non infectés n = 378	Infectés n = 37	p-value
Positivité antigène mannane	14/360 (3,9)	5/35 (14,3)	0,019
Positivité anticorps anti-mannane	92/365 (25,2)	11/35 (31,4)	0,421
Index de colonisation $\geq 0,5$	111/374 (29,7)	20/35 (57,1)	0,001
Index de forte colonisation $\geq 0,5$	34/374 (9,1)	11/35 (31,4)	0,001
Urines positives à <i>Candida</i> sp.	32/337 (9,5)	2/27 (7,4)	1
Chirurgie abdominale	125/378 (33,1)	22/37 (59,5)	0,001
Présence d'un dispositif invasif	374/378 (98,9)	37/37 (100)	1
Sepsis grave/choc septique	126/378 (33,3)	23/37 (62,2)	0,001
Antibiothérapie depuis plus de cinq jours	37/378 (9,8)	8/37 (21,6)	0,046
Insuffisance rénale et/ou dialyse	82/378 (21,7)	16/37 (43,2)	0,003
Diabète insulino-dépendant	19/378 (5)	1/37 (2,7)	1
Nutrition parentérale totale	120/378 (31,7)	18/37 (48,6)	0,037
Immunosuppression	31/378 (8,2)	3/37 (8,1)	1
Score de réanimation défavorable	307/378 (81,2)	33/37 (89,2)	0,229
Sexe féminin	151/378 (39,9)	11/37 (29,7)	0,224
Nombre de facteurs de risque ≥ 6	38/378 (10,1)	10/37 (27)	0,005
Âge (médiane, écart-type)	65 (14,6)	66 (15,9)	0,831

Ces variables ont été explorées en analyse univariée et multivariée (Tableau 4). Celles qui étaient indépendamment associées à un risque plus élevé de candidose invasive étaient les suivantes : positivité de l'antigène mannane, index de forte colonisation $\geq 0,5$, chirurgie abdominale récente, sepsis grave/choc septique, antibiothérapie de plus de cinq jours, insuffisance rénale et/ou dialyse, nutrition parentérale totale.

Les variables retenues en analyse multivariée ont été introduites dans la construction du score prédictif, avec une pondération différente selon la variable. Le score prédictif a ainsi été défini selon la formule suivante : (index de forte colonisation $\geq 0,5$ x 1,2) + (positivité de l'antigène mannane x 0,7) + (chirurgie digestive récente x 0,7) + (sepsis grave/choc septique x 0,7) + (antibiothérapie de plus de cinq jours x 0,8) + (insuffisance rénale et/ou dialyse x 0,7) + (nutrition parentérale totale x 0,6). La performance du score a été évaluée à l'aide d'une courbe ROC, l'ASC était de 0,796 [IC 95 % : 0,721-0,872] (Figure 2). La validation interne du score par méthode de bootstrap sur 500 échantillons donnait une ASC ROC de 0,799 [IC95 % : 0,721-0,873].

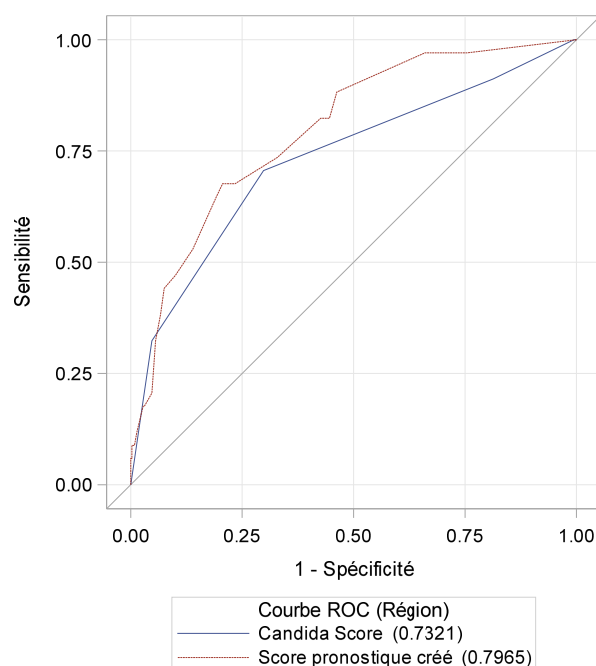


Figure 2. Courbes ROC du score prédictif et du Candida Score

Les performances du score en termes de sensibilité (Se), spécificité (Sp), valeur prédictive positive (VPP) et valeur prédictive négative (VPN) ont été évaluées en fonction de différents seuils (Tableau supplémentaire S1). Deux seuils de positivité ont été retenus pour le score prédictif construit : 0,8 et 1,9. La sensibilité, spécificité, VPP et VPN étaient respectivement de 88,2 %, 53,8 %, 15,3 % et 98 % pour un seuil $\geq 0,8$ et de 66,6 %, 79,4 %, 23,7 % et 96,3 % pour un seuil $\geq 1,9$ (Tableau 5).

Tableau 4. Analyse univariée et multivariée des facteurs de risque de candidose invasive (HR : Hazard ratio, IC : intervalle de confiance) * variable non intégrée dans l'analyse multivariée (car p -value > 0,2 en analyse univariée) ** variable non intégrée dans l'analyse multivariée (car elle est corrélée à la variable « index de forte colonisation » introduite dans le modèle) *** variable non intégrée dans l'analyse multivariée (car elle reprend les autres variables introduites dans le modèle)

Variable	Analyse univariée			Analyse multivariée		
	HR	IC 95 %	p -value	HR	IC 95 %	p -value
Positivité antigène mannane	3,768	1,462 - 9,715	0,006	2,116	0,715 - 6,261	0,176
Positivité anticorps anti-mannane *	1,333	0,653 - 2,721	0,43			
Index de colonisation $\geq 0,5$ **	2,967	1,519 - 5,796	0,002			
Index de forte colonisation $\geq 0,5$	4,111	2,013 - 8,397	< 0,001	3,431	1,656 - 7,108	0,001
Chirurgie digestive récente	2,848	1,477 - 5,489	0,002	1,954	0,946 - 4,035	0,07
Sepsis grave/choc septique	3,069	1,579 - 5,965	0,001	2,001	0,976 - 4,103	0,058
Antibiothérapie depuis plus cinq jours	2,333	1,067 - 5,104	0,034	2,177	0,961 - 4,931	0,062
Insuffisance rénale et/ou dialyse	2,591	1,352 - 4,965	0,004	2,095	1,049 - 4,181	0,036
Nutrition parentérale totale	1,971	1,035 - 3,756	0,039	1,805	0,914 - 3,563	0,089
Score de réanimation défavorable *	1,848	0,655 - 5,217	0,246			
Sexe féminin *	0,651	0,322 - 1,318	0,233			
Nombre de facteurs de risque ≥ 6 ***	3,034	1,468 - 6,268	0,003			

Tableau 5. Performances des scores, index de colonisation et antigènes mannane/anticorps anti-mannane pour le diagnostic de candidose invasive
(VPP : valeur prédictive positive, VPN : valeur prédictive négative, IC 95 % : intervalle de confiance à 95 %, Ag : antigène, Ac : anticorps)

	Sensibilité % [+ IC 95 %]	Spécificité % [+IC 95 %]	VPP % [+ IC 95 %]	VPN % [+ IC 95 %]
Score prédictif $\geq 0,8$	88,24 [72,55 - 96,70]	53,76 [48,45 - 59,01]	15,31 [10,57 - 21,12]	97,97 [94,88 - 99,44]
Score prédictif $\geq 1,9$	67,65 [49,47 - 82,61]	79,39 [74,83 - 83,45]	23,71 [15,66 - 33,42]	96,28 [93,45 - 98,13]
Index de colonisation $\geq 0,5$	55,88 [37,89 - 72,81]	70,19 [65,17 - 74,88]	15,08 [9,33 - 22,54]	94,38 [90,90 - 96,82]
Index de forte colonisation $\geq 0,5$	32,35 [17,39 - 50,53]	91,09 [87,65 - 93,82]	25,58 [13,52 - 41,17]	93,43 [90,30 - 95,79]
Positivité Ag mannane	11,76 [3,30 - 27,45]	96,10 [93,54 - 97,85]	22,22 [6,41 - 47,64]	92,00 [88,78 - 94,54]
Positivité Ac anti-mannane	29,41 [15,10 - 47,48]	74,93 [70,11 - 79,33]	10,00 [4,90 - 17,62]	91,81 [88,06 - 94,68]
Positivité Ag mannane/Ac anti-mannane	41,18 [24,65 - 59,30]	71,87 [66,91 - 76,46]	12,17 [6,82 - 19,58]	92,81 [89,11 - 95,55]
Candida Score ≥ 3	91,18 [76,32 - 98,14]	18,66 [14,77 - 23,09]	9,60 [6,61 - 13,35]	95,71 [87,98 - 99,11]

Le score médian était significativement plus élevé dans la catégorie des patients infectés (2,1 vs 0,7) ($p < 0,001$) (Figure 3). 90,2 % des patients avec une candidose invasive avaient un score $\geq 0,8$ et 68,3 % un score $\geq 1,9$ vs 49 et 23,2 % chez les patients colonisés non infectés et 38,5 et 13,5 % chez les patients non infectés/non colonisés ($p < 0,001$).

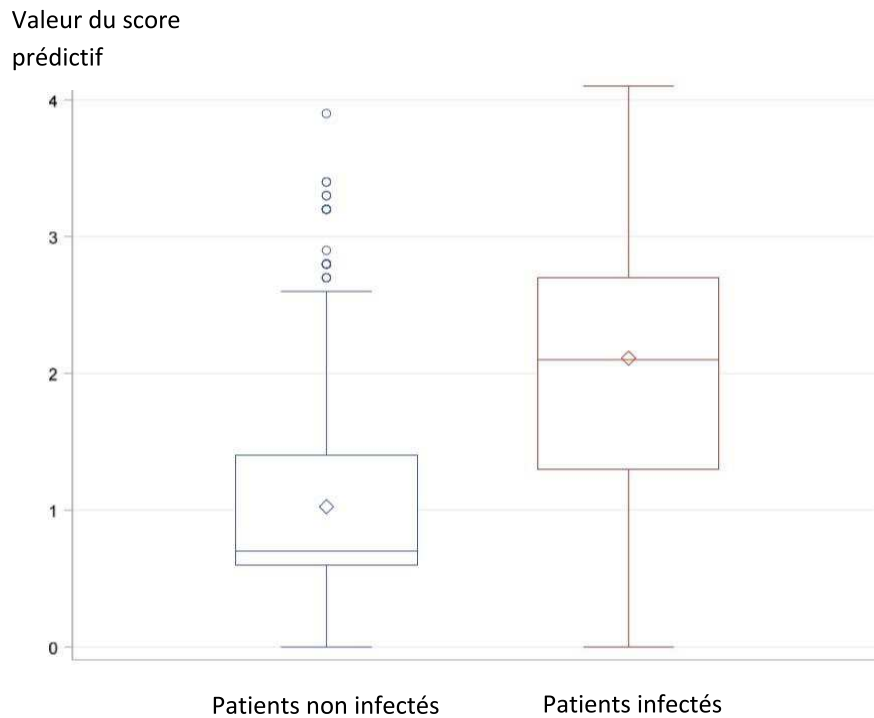


Figure 3. Répartition du score prédictif en fonction des catégories infectés et non infectés

Performances des autres scores et biomarqueurs

Les performances des antigènes mannane et anticorps anti-mannane, de l'index de colonisation et du CS sont présentées dans le tableau 5. Le CS avait une sensibilité semblable à celle retrouvée pour le score construit avec un seuil à 0,8, la spécificité était toutefois largement inférieure (18,66 %). L'ASC de la courbe ROC pour le CS était de 0,732 [IC 95 % : 0,636-0,828] (Figure 2).

Tableau S1. Performances du score prédictif en fonction des seuils

Score prédictif	Sensibilité	Spécificité	Index de Youden	Vrai positifs	Vrai négatifs	Faux positifs	Faux négatifs	Faux positifs + Faux négatifs	Proportion de bien classés	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
0	1.00000	0.00000	0.00000	34	0	359	0	359	0.08651	0.08651	.
0.6	0.97059	0.24513	0.21571	33	88	271	1	272	0.30789	0.10855	0.98876
0.7	0.97059	0.33983	0.31042	33	122	237	1	238	0.39440	0.12222	0.99187
0.8	0.88235	0.53760	0.41996	30	193	166	4	170	0.56743	0.15306	0.97970
1.2	0.82353	0.55432	0.37785	28	199	160	6	166	0.57761	0.14894	0.97073
1.3	0.82353	0.57382	0.39735	28	206	153	6	159	0.59542	0.15470	0.97170
1.4	0.73529	0.67131	0.40660	25	241	118	9	127	0.67684	0.17483	0.96400
1.5	0.67647	0.76602	0.44249	23	275	84	11	95	0.75827	0.21495	0.96154
1.8	0.67647	0.78273	0.45920	23	281	78	11	89	0.77354	0.22772	0.96233
1.9	0.67647	0.79387	0.47034	23	285	74	11	85	0.78372	0.23711	0.96284
2.0	0.64706	0.80780	0.45486	22	290	69	12	81	0.79389	0.24176	0.96026
2.1	0.52941	0.86072	0.39014	18	309	50	16	66	0.83206	0.26471	0.95077
2.2	0.47059	0.89972	0.37031	16	323	36	18	54	0.86260	0.30769	0.94721
2.5	0.44118	0.92479	0.36597	15	332	27	19	46	0.88295	0.35714	0.94587
2.6	0.38235	0.93315	0.31550	13	335	24	21	45	0.88550	0.35135	0.94101
2.7	0.32353	0.94429	0.26782	11	339	20	23	43	0.89059	0.35484	0.93646
2.8	0.20588	0.95265	0.15853	7	342	17	27	44	0.88804	0.29167	0.92683
2.9	0.17647	0.96936	0.14583	6	348	11	28	39	0.90076	0.35294	0.92553
3.2	0.17647	0.97214	0.14862	6	349	10	28	38	0.90331	0.37500	0.92573
3.3	0.11765	0.98607	0.10372	4	354	5	30	35	0.91094	0.44444	0.92188
3.4	0.08824	0.99164	0.07988	3	356	3	31	34	0.91349	0.50000	0.91990
3.5	0.08824	0.99721	0.08545	3	358	1	31	32	0.91858	0.75000	0.92031
3.9	0.05882	0.99721	0.05604	2	358	1	32	33	0.91603	0.66667	0.91795
4.0	0.05882	1.00000	0.05882	2	359	0	32	32	0.91858	1.00000	0.91816
4.1	0.02941	1.00000	0.02941	1	359	0	33	33	0.91603	1.00000	0.91582

DISCUSSION

Le diagnostic des candidoses invasives reste difficile en raison d'une clinique aspécifique et d'une sensibilité médiocre des hémocultures (Clancy and Nguyen, 2013). L'utilisation de scores prédictifs et de biomarqueurs a été proposée de manière à améliorer le diagnostic et l'identification des patients les plus à risque de développer une candidose invasive. Ils sont toutefois caractérisés par des sensibilités moyennes et des très faibles spécificités (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2007, 2011, León *et al.*, 2009, 2016; Lau *et al.*, 2015; Playford *et al.*, 2016). Notre étude observationnelle prospective, réalisée dans deux réanimations chez des patients non neutropéniques, avait pour but d'élaborer un nouveau score prédictif pour identifier les patients à haut risque de candidose invasive. Parmi la cohorte composée de 427 patients séjournant plus de 48 heures en réanimation, 10,5 % des patients ont développé une candidose invasive.

Nous avons choisi d'évaluer les patients au deuxième jour suivant l'admission en réanimation. Ce choix était basé sur des données de la littérature qui retrouvaient entre 37 et 43 % des candidémies diagnostiquées dans les six premiers jours suivant l'admission (Leroy *et al.*, 2009, 2010). Ce choix s'est révélé pertinent car nous avons observé que les patients ayant développé une candidose invasive étaient diagnostiqués dans 45,5 % des cas avant le septième jour et dans 66 % des cas avant le dixième jour suivant l'admission (médiane de 8 jours). Ces observations sont en accord avec d'autres données récentes de la littérature où la médiane de survenue des candidoses invasives était comprise entre sept et dix jours (Tissot *et al.*, 2013; León *et al.*, 2016; Playford *et al.*, 2016) et confirment l'intérêt de la mise en place de tests de dépistage très rapidement après l'admission en réanimation afin d'identifier les patients les plus à risque.

Dans notre étude, les variables significativement associées à un risque plus élevé de survenue de candidose invasive étaient : une chirurgie abdominale récente, un sepsis grave ou choc septique, une antibiothérapie de plus de cinq jours, une insuffisance rénale et/ou dialyse, la nutrition parentérale totale, l'index de colonisation $\geq 0,5$, l'index de forte colonisation $\geq 0,5$ et la présence d'antigène mannane. La prééminence des facteurs de risque cliniques et de la colonisation à *Candida* sp. dans le risque élevé de candidose invasive chez les patients de réanimation a également été mise en avant dans d'autres études récentes (Blumberg *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2015; León *et al.*, 2016; Playford *et al.*, 2016).

A partir de ces données, un score prédictif comprenant sept variables pondérées a été construit (index de colonisation $\geq 0,5$ non intégré dans le score). Ses bonnes performances ont été confirmées par l'ASC de la courbe ROC de 0,796. Nous avons choisi de proposer deux seuils pour l'utilisation de ce score, ce qui permet d'avoir un seuil avec une meilleure sensibilité et un autre avec une meilleure

spécificité, selon les objectifs visés. En effet, 90,2 % des patients avec une candidose invasive et 46,2 % des patients non infectés avaient un score $\geq 0,8$; pour un score $\geq 1,9$, ces proportions étaient respectivement de 68,3 % et 20,6 %. La mise en route d'un traitement antifongique chez les patients ayant un score $\geq 1,9$ permettrait de traiter plus de la moitié des patients infectés, avec seulement 20 % de traitement antifongique préemptif probablement inutile.

Une étude prospective multicentrique récente réalisée chez 6685 patients non neutropéniques a également proposé un score prenant en compte 10 variables (données cliniques et de colonisation) (Playford *et al.*, 2016). L'ASC était semblable à notre résultat (0,82), deux seuils ont été proposés dans les auteurs de manière à répartir les patients en trois catégories : ceux à risque très élevé de candidose invasive (≥ 6 facteurs de risque), ceux à risque intermédiaire (entre 3 et 5 facteurs de risque) et ceux à risque faible (≤ 2 facteurs de risque). Parmi les scores précédemment décrits dans la littérature, notre score est le seul à intégrer le dosage des antigènes mannane dans son calcul.

Afin d'évaluer la supériorité du score créé dans notre étude, nous avons choisi d'évaluer également les performances de l'index de colonisation, du Candida Score ainsi que des antigènes mannane et anticorps anti-mannane.

L'index de colonisation, avec un seuil proposé à 0,5 par Pittet en 1994, évalué initialement sur seulement 29 patients de réanimation chirurgicale, présentait une sensibilité et une VPN de 100 % avec une spécificité et une VPP respectivement de 69 et 66 % (Pittet *et al.*, 1994). Les autres études ayant évalué cet index montraient des performances moindres et très variables (Se de 26 à 72,7 %, Sp de 26,9 à 76 %, VPN de 67 à 96,1 %) avec cependant toujours une VPP très basse (de 2 à 35 %) (León *et al.*, 2009; Posteraro *et al.*, 2011; Tissot *et al.*, 2013; Lau *et al.*, 2015; Liew *et al.*, 2015). Nos résultats (Se 56 %, VPP 15 % et VPN 94 %) sont similaires à ceux rapportés dans la littérature. Bien que l'index de forte colonisation améliore la VPP (25,5 %) avec une VPN similaire, cet index seul n'est pas suffisant pour une sélection précise des patients les plus à risque. L'utilisation de ces index de colonisation doit être basée sur la VPN et permet de sélectionner les patients pour lesquels une prescription d'antifongiques n'est pas justifiée.

Le Candida score (CS), proposé par l'équipe de León *et al.* (2006) a des performances, avec un seuil à 3, qui varient selon les études (Se de 77,6 à 100 % ; Sp de 15,4 à 88,6 %, VPP de 13,8 à 88,6 % et VPN de 84 à 100 %) (León *et al.*, 2009, 2012; Leroy *et al.*, 2011; Posteraro *et al.*, 2011; Tissot *et al.*, 2013; Bruyère *et al.*, 2014; Liew *et al.*, 2015). Parmi les tests et scores que nous avons évalué dans notre étude, il est celui qui possède la pire spécificité (18,7 %).

Concernant les performances des antigènes mannane et anticorps anti-mannane, nos résultats confirment l'augmentation de la sensibilité par l'utilisation combinée de ces marqueurs, seule utilisation préconisée dans les recommandations européennes de diagnostic des candidoses invasives (Cuenca-Estrella *et al.*, 2012). Les sensibilités obtenues ici sont inférieures à celles rapportées dans la méta-analyse publiée par Mikulska *et al.* (2010) ou dans l'étude de León *et al.* (2016) (42 à 69 % pour l'antigène mannane ; 26 à 78 % pour les anticorps ; 55 à 94 % pour la combinaison mannane/anti-mannane).

Notre étude possède un certain nombre de limites et la validité de ce score devra être confirmée sur un plus grand nombre de patients dans une démarche prospective. Le score a été établi avec les données de nombreuses variables collectées au deuxième jour après l'admission. Si la grande majorité des candidoses invasives survient dans les dix jours suivant l'admission, la réalisation du score à J2 peut être trop précoce pour le diagnostic de certaines candidoses invasives survenant plus tardivement, ce qui pourrait biaiser les performances du score. Les mêmes données des patients toujours présents en réanimation à J7 ont été également recueillies dans cette étude. Toutefois, en raison d'un nombre important de patients décédés ou sortis de réanimation, l'effectif à J7 était uniquement de 229 patients. Pour cette raison, nous n'avons pas utilisé les données de J7 pour l'élaboration du score prédictif. Une autre limite était la présence d'un traitement antifongique qui pouvait avoir eu un impact sur les résultats. C'est pour cela que la présence d'antifongiques à l'admission (J0) était un critère d'exclusion de l'étude. Seulement 4,5 % des patients avaient un traitement antifongique à J2, ce qui n'a probablement pas impacté les résultats. Dans le score proposé, les données concernant la colonisation à *Candida* sp. sont nécessaires. Ceci présente l'inconvénient du délai de mise en culture et du temps de pousse des levures et donc de différer le calcul du score d'environ 24 à 48 heures. Toutefois, comme dans plus de 84 % des cas, les souches retrouvées en cas d'infection invasive sont celles à l'origine de la colonisation (Reagan *et al.*, 1990; Voss *et al.*, 1994), cela permet d'avoir par anticipation la sensibilité de la souche aux antifongiques. Enfin, les performances évaluées dans cette étude concernent l'ensemble des candidoses invasives, les effectifs trop faibles ne nous ont pas permis de pouvoir analyser les performances selon le type de candidose invasive : candidémies vs autres candidoses invasives.

De nombreuses études utilisent le dosage des (1,3)- β -D-Glucanes comme aide au diagnostic des candidoses invasives en réanimation. L'intérêt de ce test réside dans sa bonne VPN qui varie entre 78 et 100 % selon les études (León *et al.*, 2009, 2016; Tissot *et al.*, 2013; Poissy *et al.*, 2014; Liew *et al.*, 2015; Martín-Mazuelos *et al.*, 2015; Posteraro *et al.*, 2016). La recherche, non prévue dans l'étude initiale, a toutefois été réalisée dans une faible proportion de patients (13,3 %)(en raison du coût). Les résultats préliminaires ne sont cependant pas encourageants (données non présentées), en effet

ce marqueur est négatif pour 33 % des sérums prélevés dans les cinq jours précédant le diagnostic de candidose invasive. De plus, des taux positifs ont également été retrouvés chez 62,9 % des patients non infectés, comme observé par d'autres équipes (Tissot *et al.*, 2013; Poissy *et al.*, 2014). En effet, ce test peut être d'interprétation délicate en raison de nombreux résultats positifs lors de bactériémies, d'hémodialyse, d'utilisation d'antibiotiques (amoxicilline-acide clavulanique IV), d'immunoglobulines, d'albumine ou de gazes chirurgicales contenant du glucane (Kato *et al.*, 2001; Pickering *et al.*, 2005; Mennink-Kersten *et al.*, 2006; Lo Cascio *et al.*, 2015; Pini *et al.*, 2016).

L'utilisation de techniques de PCR a aussi été proposée par certains auteurs (Avni *et al.*, 2011; Clancy and Nguyen, 2013; León *et al.*, 2016). En l'absence de standardisation de la méthode et devant la variabilité des résultats obtenus, nous avons choisi de ne pas évaluer cette technique.

CONCLUSION

Actuellement, afin de prévenir la survenue de candidoses invasives, de nombreux tests ou scores ont été développés pour sélectionner les patients les plus à risque. Le but était d'avoir une bonne VPP afin d'identifier les patients à traiter précocement. Malheureusement, l'application de ces scores sélectionne un nombre trop important de patients à traiter par antifongiques, ce qui peut avoir des conséquences sur l'écologie fongique du service et générer l'apparition de résistances. Le surcoût de prise en charge doit aussi être pris en compte. L'intérêt de ces outils réside d'avantage dans leur VPN élevée qui permet l'identification des patients à très faible risque de candidose invasive ne nécessitant pas la mise sous traitement antifongique. Dans ce travail, nous proposons un score qui intègre des données cliniques et mycologiques, avec deux seuils d'interprétation possédant des sensibilités et spécificités différentes. Le choix du seuil dépendra de la stratégie choisie par chaque service. L'utilisation du score peut sembler un peu rébarbative en pratique quotidienne (pondération différente en fonction du facteur de risque), mais l'utilisation d'un fichier pour le recueil de données avec la mise en place d'un calcul automatique est tout à fait envisageable.

La mise en place d'une étude à plus grande échelle permettra d'affiner les critères de ce score et de l'évaluer dans des services de réanimation avec des profils de patients non neutropéniques pouvant être différents.

BIBLIOGRAPHIE

- Aguilar G, Delgado C, Corrales I, Izquierdo A, Gracia E, Moreno T, Romero E, Ferrando C, Carbonell JA, Borrás R, Navarro D, and Belda FJ (2015) Epidemiology of invasive candidiasis in a surgical intensive care unit: an observational study. *BMC Res Notes* 8:491.
- Avni T, Leibovici L, and Paul M (2011) PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 49:665–670.
- Barchiesi F, Orsetti E, Gesuita R, Skrami E, Manso E, and Candidemia Study Group (2016) Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia in a tertiary referral center in Italy from 2010 to 2014. *Infection* 44:205–213.
- Bassetti M, Merelli M, Righi E, Diaz-Martin A, Rosello EM, Luzzati R, Parra A, Treçarichi EM, Sanguinetti M, Posteraro B, Garnacho-Montero J, Sartor A, Rello J, and Tumbarello M (2013) Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *J Clin Microbiol* 51:4167–4172.
- Bassetti M, Righi E, Ansaldi F, Merelli M, Scarparo C, Antonelli M, Garnacho-Montero J, Diaz-Martin A, Palacios-Garcia I, Luzzati R, Rosin C, Lagunes L, Rello J, Almirante B, Scotton PG, Baldin G, Dimopoulos G, Nucci M, Munoz P, Vena A, Bouza E, de Egea V, Colombo AL, Tascini C, Menichetti F, Tagliaferri E, Brugnaro P, Sanguinetti M, Mesini A, Sganga G, Viscoli C, and Tumbarello M (2015) A multicenter multinational study of abdominal candidiasis: epidemiology, outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Med* 41:1601–1610.
- Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, Rangel-Frausto MS, Rinaldi MG, Saiman L, Wiblin RT, Wenzel RP, and National Epidemiology of Mycoses Survey(NEMIS) Study Group (2001) Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 33:177–186.
- Bruyère R, Quenot J-P, Prin S, Dalle F, Vigneron C, Aho S, Leon C, and Charles P-E (2014) Empirical antifungal therapy with an echinocandin in critically-ill patients: prospective evaluation of a pragmatic Candida score-based strategy in one medical ICU. *BMC Infect Dis* 14:385.
- Clancy CJ, and Nguyen MH (2013) Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 56:1284–1292.
- Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikani-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, Jensen HE, Lass-Flörl C, Richardson MD, Akova M, Bassetti M, Calandra T, Castagnola E, Cornely OA, Garbino J, Groll AH, Herbrecht R, Hope WW, Kullberg BJ, Lortholary O, Meersseman W, Petrikos G, Roilides E, Viscoli C, Ullmann AJ, and ESCMID Fungal Infection Study Group (2012) ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 18 Suppl 7:9–18.
- Dupont H, Paugam-Burtz C, Muller-Serieys C, Fierobe L, Chosidow D, Marmuse J-P, Mantz J, and Desmots J-M (2002) Predictive factors of mortality due to polymicrobial peritonitis with *Candida* isolation in peritoneal fluid in critically ill patients. *Arch Surg Chic Ill* 1960 137:1341–1346; discussion 1347.

- Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, and Bearden DT (2006) 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* 43:25–31.
- Kato A, Takita T, Furuhashi M, Takahashi T, Maruyama Y, and Hishida A (2001) Elevation of blood (1-->3)-beta-D-glucan concentrations in hemodialysis patients. *Nephron* 89:15–19.
- Klingspor L, Tortorano AM, Peman J, Willinger B, Hamal P, Sendid B, Velegraki A, Kibbler C, Meis JF, Sabino R, Ruhnke M, Arikian-Akdagli S, Salonen J, and Dóczy I (2015) Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008). *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 21:87.e1-87.e10.
- Lau AF, Kabir M, Chen SC-A, Playford EG, Marriott DJ, Jones M, Lipman J, McBryde E, Gottlieb T, Cheung W, Seppelt I, Iredell J, and Sorrell TC (2015) *Candida* colonization as a risk marker for invasive candidiasis in mixed medical-surgical intensive care units: development and evaluation of a simple, standard protocol. *J Clin Microbiol* 53:1324–1330.
- León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Alvarez-Lerma F, Garnacho-Montero J, León MA, and EPCAN Study Group (2006) A bedside scoring system (“*Candida* score”) for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Crit Care Med* 34:730–737.
- León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Castro C, Loza A, Zakariya I, Úbeda A, Parra M, Macías D, Tomás JI, Rezusta A, Rodríguez A, Gómez F, Martín-Mazuelos E, and Cava Trem Study Group (2016) Contribution of *Candida* biomarkers and DNA detection for the diagnosis of invasive candidiasis in ICU patients with severe abdominal conditions. *Crit Care Lond Engl* 20:149.
- León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Castro C, Ubeda A, Loza A, Martín-Mazuelos E, Blanco A, Jerez V, Ballús J, Alvarez-Rocha L, Utande-Vázquez A, and Fariñas O (2012) Value of β -D-glucan and *Candida albicans* germ tube antibody for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in patients with severe abdominal conditions. *Intensive Care Med* 38:1315–1325.
- León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Galván B, Blanco A, Castro C, Balasini C, Utande-Vázquez A, González de Molina FJ, Blasco-Navalproto MA, López MJ, Charles PE, Martín E, Hernández-Viera MA, and Cava Study Group (2009) 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* 37:1624–1633.
- Leroy G, Lambiotte F, Thévenin D, Lemaire C, Parmentier E, Devos P, and Leroy O (2011) Evaluation of “*Candida* score” in critically ill patients: a prospective, multicenter, observational, cohort study. *Ann Intensive Care* 1:50.
- Leroy O, Gangneux J-P, Montravers P, Mira J-P, Gouin F, Sollet J-P, Carlet J, Reynes J, Rosenheim M, Regnier B, Lortholary O, and AmarCand Study Group (2009) 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* 37:1612–1618.
- Leroy O, Mira J-P, Montravers P, Gangneux J-P, Lortholary O, and AmarCand Study Group (2010) Comparison of *albicans* vs. non-*albicans* candidemia in French intensive care units. *Crit Care Lond Engl* 14:R98.

- Liew YX, Teo J, Too IA-L, Ngan CC-L, Tan AL, Chlebicki MP, Kwa AL-H, and Lee W (2015) *Candida* Surveillance in Surgical Intensive Care Unit (SICU) in a Tertiary Institution. *BMC Infect Dis* 15:256.
- Lo Cascio G, Koncan R, Stringari G, Russo A, Azzini A, Ugolini A, Ligozzi M, Polati E, Cornaglia G, Concia E, and Schweiger V (2015) Interference of confounding factors on the use of (1,3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive candidiasis in the intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 34:357–365.
- Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoeud-Ndam L, Wolff M, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F, and French Mycosis Study Group (2014) Worrying trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med* 40:1303–1312.
- Martín-Mazuelos E, Loza A, Castro C, Macías D, Zakariya I, Saavedra P, Ruiz-Santana S, Marín E, and León C (2015) β -D-Glucan and *Candida albicans* germ tube antibody in ICU patients with invasive candidiasis. *Intensive Care Med* 41:1424–1432.
- Mennink-Kersten MASH, Warris A, and Verweij PE (2006) 1,3-beta-D-glucan in patients receiving intravenous amoxicillin-clavulanic acid. *N Engl J Med* 354:2834–2835.
- Meyer E, Geffers C, Gastmeier P, and Schwab F (2013) No increase in primary nosocomial candidemia in 682 German intensive care units during 2006 to 2011. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 18.
- Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C, and Third European Conference on Infections in Leukemia Group (2010) 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 Lond Engl* 14:R222.
- Montravers P, Dupont H, Gauzit R, Veber B, Auboyer C, Blin P, Hennequin C, and Martin C (2006) *Candida* as a risk factor for mortality in peritonitis. *Crit Care Med* 34:646–652.
- Montravers P, Mira J-P, Gangneux J-P, Leroy O, Lortholary O, and AmarCand study group (2011) A multicentre study of antifungal strategies and outcome of *Candida* spp. peritonitis in intensive-care units. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 17:1061–1067.
- Morrell M, Fraser VJ, and Kollef MH (2005) 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* 49:3640–3645.
- Ostrosky-Zeichner L (2011) Clinical prediction rules for invasive candidiasis in the ICU: ready for prime time? *Crit Care Lond Engl* 15:189.
- Ostrosky-Zeichner L, Pappas PG, Shoham S, Reboli A, Barron MA, Sims C, Wood C, and Sobel JD (2011) Improvement of a clinical prediction rule for clinical trials on prophylaxis for invasive candidiasis in the intensive care unit. *Mycoses* 54:46–51.
- Ostrosky-Zeichner L, Sable C, Sobel J, Alexander BD, Donowitz G, Kan V, Kauffman CA, Kett D, Larsen RA, Morrison V, Nucci M, Pappas PG, Bradley ME, Major S, Zimmer L, Wallace D, Dismukes WE, and Rex JH (2007) Multicenter retrospective development and validation of a clinical

- prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 26:271–276.
- Paiva J-A, Pereira JM, Tabah A, Mikstacki A, de Carvalho FB, Koulenti D, Ruckly S, Çakar N, Misset B, Dimopoulos G, Antonelli M, Rello J, Ma X, Tamowicz B, and Timsit J-F (2016) Characteristics and risk factors for 28-day mortality of hospital acquired fungemias in ICUs: data from the EUROBACT study. *Crit Care Lond Engl* 20:53.
- Paphitou NI, Ostrosky-Zeichner L, and Rex JH (2005) Rules for identifying patients at increased risk for candidal infections in the surgical intensive care unit: approach to developing practical criteria for systematic use in antifungal prophylaxis trials. *Med Mycol* 43:235–243.
- Pickering JW, Sant HW, Bowles CAP, Roberts WL, and Woods GL (2005) Evaluation of a (1→3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 43:5957–5962.
- Pini P, Bettua C, Orsi CF, Venturelli C, Forghieri F, Bigliardi S, Faglioni L, Luppi F, Serio L, Codeluppi M, Luppi M, Mussini C, Girardis M, and Blasi E (2016) Evaluation of serum (1 → 3)-β-D-glucan clinical performance: kinetic assessment, comparison with galactomannan and evaluation of confounding factors. *Infection* 44:223–233.
- Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, and Auckenthaler R (1994) *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 220:751–758.
- Playford EG, Lipman J, Jones M, Lau AF, Kabir M, Chen SC-A, Marriott DJ, Seppelt I, Gottlieb T, Cheung W, Iredell JR, McBryde ES, and Sorrell TC (2016) Problematic Dichotomization of Risk for Intensive Care Unit (ICU)-Acquired Invasive Candidiasis: Results Using a Risk-Predictive Model to Categorize 3 Levels of Risk From a Multicenter Prospective Cohort of Australian ICU Patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 63:1463–1469.
- Poissy J, Sendid B, Damiens S, Ichi Ishibashi K, François N, Kouv M, Favory R, Mathieu D, and Poulain D (2014) Presence of *Candida* cell wall derived polysaccharides in the sera of intensive care unit patients: relation with candidaemia and *Candida* colonisation. *Crit Care Lond Engl* 18:R135.
- Posteraro B, De Pascale G, Tumbarello M, Torelli R, Pennisi MA, Bello G, Maviglia R, Fadda G, Sanguinetti M, and Antonelli M (2011) Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1→3)-β-D-glucan assay, *Candida* score, and colonization index. *Crit Care Lond Engl* 15:R249.
- Posteraro B, Tumbarello M, De Pascale G, Liberto E, Vallecocchia MS, De Carolis E, Di Gravio V, Treccarichi EM, Sanguinetti M, and Antonelli M (2016) (1,3)-β-d-Glucan-based antifungal treatment in critically ill adults at high risk of candidaemia: an observational study. *J Antimicrob Chemother* 71:2262–2269.
- Reagan DR, Pfaller MA, Hollis RJ, and Wenzel RP (1990) Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. *J Clin Microbiol* 28:2733–2738.
- Renaudat C, Sitbon K, Desnos-Ollivier M, Fontanet A, Bretagne S, Lortholary O, and Dromer F (2013) Candidémies en Ile-de-France: données de l'Observatoire des levures (2002-2010). *Bull Epid Hebd Special Issue* 12–13:125–128.

- Tissot F, Lamoth F, Hauser PM, Orasch C, Flückiger U, Siegemund M, Zimmerli S, Calandra T, Bille J, Eggimann P, Marchetti O, and Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS) (2013) β -glucan antigenemia anticipates diagnosis of blood culture-negative intraabdominal candidiasis. *Am J Respir Crit Care Med* 188:1100–1109.
- Tortorano AM, Dho G, Prigitano A, Breda G, Grancini A, Emmi V, Cavanna C, Marino G, Morero S, Ossi C, Delvecchio G, Passera M, Cusumano V, David A, Bonaccorso G, Corona A, Favaro M, Vismara C, Garau MG, Falchi S, Tejada MR, and ECMM-FIMUA Study Group (2012) Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006-2008). *Mycoses* 55:73–79.
- Voss A, Hollis RJ, Pfaller MA, Wenzel RP, and Doebbeling BN (1994) Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. *J Clin Microbiol* 32:975–980.
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, and Edmond MB (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 39:309–317.

PARTIE 2 : Étude prospective bicentrique en réanimation : élaboration d'un score prédictif de candidose invasive

Analyse supplémentaire 1 : Analyse des données de l'étude au septième jour suivant l'admission

Parmi les 422 patients analysés au deuxième jour suivant l'admission (J2), 229 (54,3 %) étaient toujours hospitalisés en réanimation au septième jour (J7). 44 patients de l'étude (10,4 %) sont décédés entre J2 et J7, les autres patients étaient sortis de réanimation à J7.

Concernant les patients analysés à J7, 30 patients faisaient partie du groupe candidose invasive (dont la moitié diagnostiquée avant la visite du J7), 151 faisaient partie du groupe colonisation sans infection et 48 du groupe absence de colonisation/infection (Figure 1).

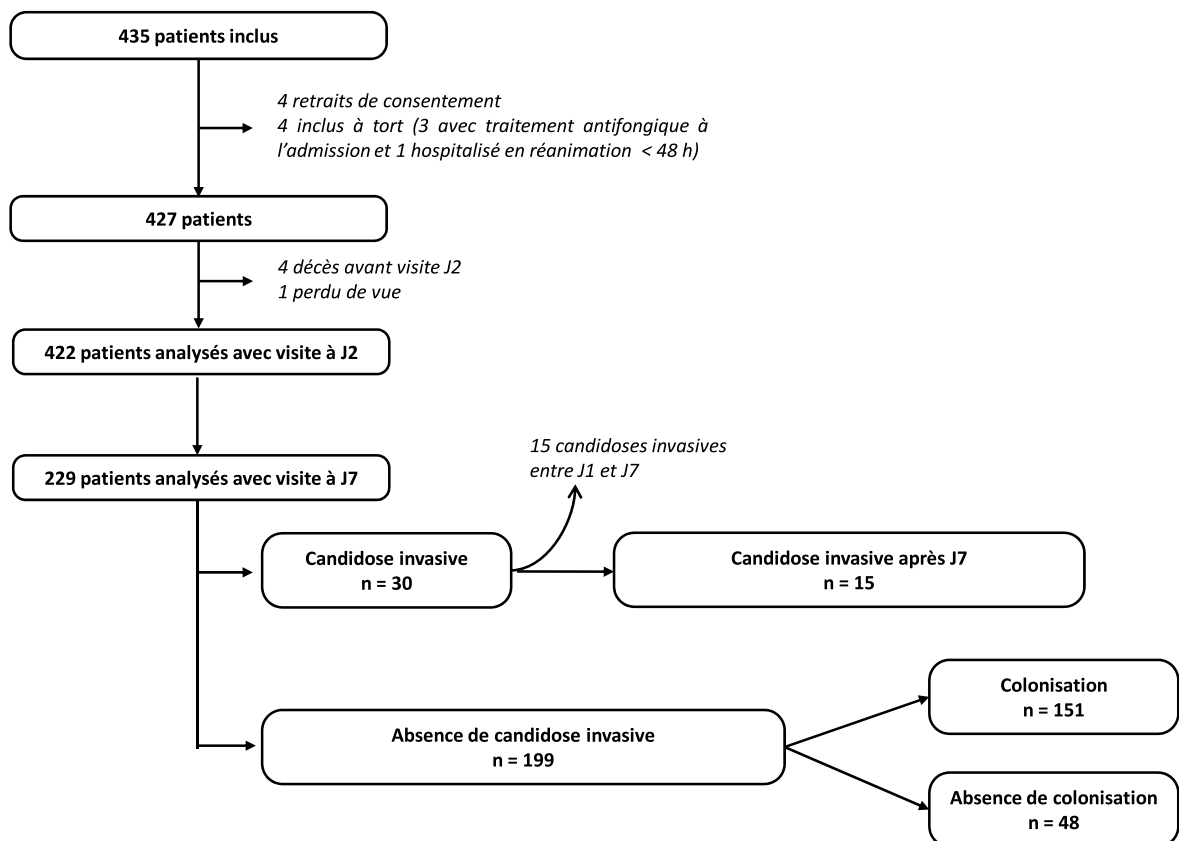


Figure 1. Diagramme de flux des patients toujours hospitalisés en réanimation à J7

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A J7, la recherche de la colonisation à *Candida* sp. a été réalisée et du sérum a été prélevé pour doser les antigènes mannane et anticorps anti-mannane. Des données, identiques à celles de la visite à J2, ont également été collectées. La partie matériel et méthodes est identique à celle de la visite à J2 (présentée dans l'article précédent). L'applicabilité du score prédictif créé a été réalisée à J7 après actualisation des variables prises en compte dans le score. Les performances ont été évaluées globalement et après binarisation suivant le seuil optimal. L'évolution des données mycologiques entre J2 et J7 a été analysée de manière descriptive sous forme de profils.

RÉSULTATS

Facteurs de risque. Les facteurs de risque des patients à J7 sont présentés dans le tableau 1. Au total, 22,7 % des patients présentaient plus de six facteurs de risque (46,7 % dans le groupe candidose invasive). 83,4 % des patients avaient un score de réanimation défavorable, 66,8 % étaient sous antibiothérapie depuis plus de cinq jours et 47,2 % des patients présentaient un sepsis grave ou choc septique.

Parmi les trois catégories de patients, des différences significatives ont été observées pour les facteurs de risque suivants :

- chirurgie digestive récente ($p < 0,001$) ;
- sepsis grave/choc septique ($p < 0,001$) ;
- insuffisance rénale et/ou dialyse ($p = 0,001$).

Les patients infectés avaient eu une chirurgie digestive récente dans 73,3 % des cas, avaient un sepsis grave ou choc septique dans 80 % des cas et une insuffisance rénale/dialyse dans 53,3 % des cas.

Données mycologiques.

Colonisation. Parmi l'ensemble des patients, 211 ont bénéficié de prélèvements pour évaluation de la colonisation fongique à J7 soit un total de 1097 échantillons biologiques avec 475 échantillons positifs (43,3 %), ce qui correspondait à 179 patients colonisés (84,8 %). Chez 96,2 % des patients, au moins cinq prélèvements ont été réalisés. Les principaux prélèvements réalisés étaient dans 90,5 % des cas des urines, 90 % des écouvillons buccaux, 79,6 % des prélèvements anaux, 57 % des écouvillons nasaux, 52,9 % des prélèvements respiratoires, 44,3 % des liquides gastriques et dans

Tableau 1. Facteurs de risque (FDR) de candidose invasive des patients analysés à J7 (IIQ : intervalle interquartile)

	Population globale	Candidose invasive	Colonisation sans infection	Absence colonisation/infection	p-value
	n = 229	n = 30	n = 151	n = 48	
Facteurs de risque, n (%)					
Chirurgie digestive récente	81 (35,3)	22 (73,3)	42 (27,8)	17 (35,4)	< 0,001
Dispositif invasif	219 (95,6)	30 (100)	144 (95,4)	45 (93,8)	0,464
Sepsis grave/choc septique	108 (47,2)	24 (80)	62 (41,1)	22 (45,8)	< 0,001
Antibiothérapie > cinq jours	153 (66,8)	19 (63,3)	97 (64,2)	37 (77,1)	0,219
Insuffisance rénale et/ou dialyse	61 (26,6)	16 (53,3)	36 (23,8)	9 (18,8)	0,001
Diabète insulino-dépendant	13 (5,7)	2 (6,7)	8 (5,3)	3 (6,3)	0,756
Nutrition parentérale	59 (25,8)	13 (43,3)	35 (23,2)	11 (22,9)	0,059
Immunosuppression	27 (11,8)	3 (10)	17 (11,3)	7 (14,6)	0,776
Score de réanimation défavorable	191 (83,4)	25 (83,3)	131 (86,8)	35 (72,9)	0,102
Sexe féminin	85 (37,1)	8 (26,7)	56 (37,1)	21 (43,8)	0,316
Présence de ≥ 6 FDR	52 (22,7)	14 (46,7)	27 (17,9)	11 (22,9)	0,003
Nombre de FDR, médiane [IIQ]	4 [3-5]	5 [5-6]	4 [3-5]	4 [3-5]	< 0,001

Tableau 2. Résultats de la colonisation, des antigènes mannane, anticorps anti-mannane et du Candida Score à J7 (IIQ : intervalle interquartile)

	Population globale	Candidose invasive	Colonisation sans infection	Absence colonisation/infection	p-value
Colonisation					
Index de colonisation ≥ 0,5	102/221 (46,2)	21/29 (72,4)	81/145 (55,9)	0	< 0,001
Index de forte colonisation ≥ 0,5	29/221 (13,1)	9/29 (31)	20/145 (13,8)	0	0,002
Colonisation multifocale	139/221 (62,9)	25/29 (86,2)	114/145 (78,6)	0	< 0,001
Positivité antigène mannane	17/215 (7,9)	7/29 (24,1)	9/143 (6,3)	1/43 (2,3)	0,004
Positivité anticorps anti-mannane	86/219 (39,3)	12/29 (41,4)	61/144 (42,4)	13/46 (28,3)	0,227
Candida Score ≥ 3	174/227 (76,7)	26/28 (92,9)	126/151 (83,4)	22/48 (45,8)	< 0,001
médiane du Candida Score [IIQ]	3 [3-4]	4 [4-4,5]	3 [3-4]	2 [2-3]	< 0,001

34,5 % des cas des écouvillons de cathéters. Selon le type d'échantillon, le pourcentage de positifs était variable. Les écouvillons buccaux, les liquides gastriques, les prélèvements respiratoires et les prélèvements anaux étaient positifs chez plus de 50 % des patients. Les urines n'étaient positives que dans 15,5 % des cas.

Candida albicans, *C. glabrata* et *C. tropicalis* étaient isolés respectivement chez 74,9 % (n = 134), 11,7 % (n = 21) et 10,6 % (n = 19) des patients colonisés. Les trois autres espèces principalement isolées étaient *C. krusei* (8,9 %, n = 16), *C. kefyr* (8,4 %, n = 15) et *C. parapsilosis* (8,4 %, n = 15).

Un index de colonisation supérieur ou égal à 0,5 était retrouvé chez 46,2 % de l'ensemble des patients étudiés, 72,4 % des patients du groupe candidose invasive et 55,9 % du groupe colonisation sans infection. 31 % des patients du groupe candidose invasive avaient un index de forte colonisation $\geq 0,5$ versus 13,8 % des patients du groupe colonisation sans infection (Tableau 2).

Antigène mannane/anticorps anti-mannane. La recherche d'antigène mannane et d'anticorps anti-mannane était positive respectivement chez 7,9 % et 39,3 % des patients (Tableau 2). Des différences significatives ont été observées entre les trois groupes pour l'antigène mannane. Les patients du groupe candidose invasive avaient des antigènes mannane positifs dans 24,1 % des cas vs 6,3 % et 2,3 % des cas pour les groupes colonisation sans infection et absence de colonisation/infection ($p = 0,002$). Aucune différence significative n'a été observée concernant les pourcentages de patients avec des anticorps anti-mannane ($p = 0,227$).

Candida Score (CS). Le CS médian pour l'ensemble de la population était de 3. Un CS ≥ 3 était retrouvé chez 92,9 % des patients infectés, 83,4 % des patients colonisés non infectés et 45,8 % des patients non infectés/non colonisés (Tableau 2).

Evolution des données mycologiques entre J2 et J7. Des différences de résultats d'index de colonisation, d'antigène mannane et d'anticorps anti-mannane ont été observées entre J2 et J7 pour 104 patients. 44 patients ont vu l'index de colonisation devenir égal ou supérieur à 0,5, alors qu'il est devenu inférieur à 0,5 pour 23 patients. Les antigènes mannane se sont positivés chez 11 patients et négativés chez sept patients. Les anticorps anti-mannane se sont positivés chez 24 patients et négativés chez cinq patients. Ainsi, le pourcentage des patients avec un index de colonisation $\geq 0,5$ est passé de 32,4 % à J2 à 46,2 % à J7, les antigènes mannane positifs concernaient 5,2 % des patients à J2 vs 7,9 % des patients à J7 et les anticorps 25,6 % des patients à J2 vs 39,3 % à J7. Ces évolutions entre J2 et J7 ont été observées quelque soit la catégorie de patients. L'index de forte colonisation est resté stable : 11,3 % à J2 vs 13,1 % à J7.

Score prédictif

Le score prédictif créé a pu être évalué à J7 sur 197 patients, 14 patients avec une candidose invasive diagnostiquée après J7 (50 % survenues entre J7 et J17) et 183 patients non infectés. La médiane du score était significativement plus élevée dans la catégorie des patients infectés (2,65 vs 1,4) ($p < 0,001$) (Tableau 3 et Figure 2). 100 % des patients avec une candidose invasive avaient un score $\geq 0,8$ et 85,7 % un score $\geq 1,9$ vs 78,7 % et 38,3 % chez les patients non infectés.

Tableau 3. Résultats du score prédictif à J7 (IIQ : intervalle interquartile)

	Population globale	Patients infectés	Patients non infectés	p-value
	n = 197	n = 14	n = 183	
médiane [IIQ]	1,5 [0,8-2,2]	2,65 [2,1-2,9]	1,4 [0,8-2,2]	< 0,001
score $\geq 0,8$	158 (80,2 %)	14 (100 %)	144 (78,7 %)	
score $\geq 1,9$	82 (41,6 %)	12 (85,7 %)	70 (38,3 %)	

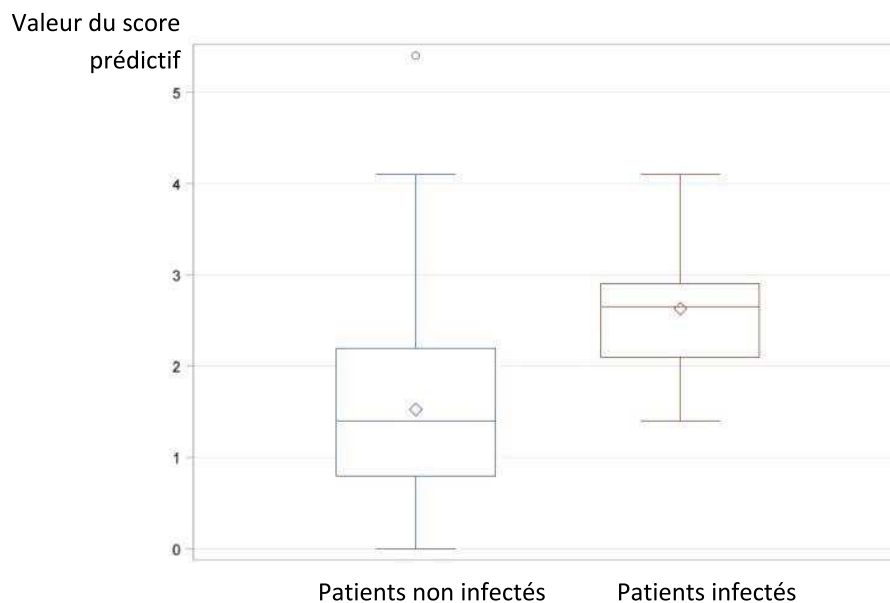


Figure 2. Répartition du score prédictif à J7 selon les deux catégories : patients non infectés et infectés

L'ASC de la courbe ROC du score évalué à J7 était de 0,794 [IC 95 % : 0,702-0,886]. Les performances en termes de sensibilité, spécificité, VPP et VPN sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4. Performances du score prédictif à J7 (VPP : valeur prédictive positive, VPN : valeur prédictive négative, IC 95 % : intervalle de confiance à 95 %)

	Sensibilité en % [+ IC 95 %]	Spécificité en % [+ IC 95 %]	VPP en % [+ IC 95 %]	VPN en % [+ IC 95 %]
score \geq 0,8	100 [76,84 - 100]	21,31 [15,62 - 27,96]	8,86 [4,93 - 14,42]	100 [90,97 - 100]
score \geq 1,9	85,71 [57,19 - 98,22]	61,75 [54,29 - 68,82]	14,63 [7,80 - 24,17]	98,26 [93,86 - 99,79]

COMMENTAIRES CONCERNANT L'ANALYSE A J7

Au septième jour suivant l'admission, 22,7 % des patients présentaient plus de six facteurs de risque vs 11,6 % à J2, 47,16 % avaient un sepsis grave ou choc septique vs 36,7 % à J2 et 66,8 % une antibiothérapie depuis plus de cinq jours vs 10,9 % à J2. Les facteurs de risque présentant des différences significatives chez les trois catégories de patients à J2 étaient identiques à J7 (chirurgie digestive récente, sepsis/choc septique, insuffisance rénale/dialyse, présence de plus de six facteurs de risque), hormis pour le score de réanimation défavorable où une différence significative entre les trois groupes n'a été observée qu'à J2.

La colonisation à *Candida* sp. concernait 84,8 % des patients à J7 vs 74,1 % des patients à J2. Si l'index de colonisation \geq 0,5 concernait un nombre plus important de patients à J7 (46,2 % vs 32,4 % à J2), l'index de forte colonisation est resté inchangé. Une augmentation dans la proportion de patients avec une sérologie *Candida* positive a été également observée entre J2 et J7 (39,3 vs 25,6 %), avec toutefois une absence de différence entre les groupes infectés et colonisés non infectés.

Les performances du score prédictif créé lors de la visite à J2 ont été évaluées au septième jour. Si l'analyse a été réalisée sur un nombre de patients largement inférieur à celui de J2, l'ASC de la courbe ROC est similaire avec toutefois, pour les deux seuils choisis, une meilleure sensibilité mais une spécificité inférieure. Le score construit est donc applicable au septième jour suivant l'admission, mais en raison du nombre important de candidoses invasives diagnostiquées avant la visite à J7, il semble important de réaliser le score de manière précoce.

PARTIE 2 : Étude prospective bicentrique en réanimation : élaboration d'un score prédictif de candidose invasive

Analyse supplémentaire 2 : Résultats des dosages de β DG

Le dosage des β DG n'avait pas été prévu dans le protocole initial. En raison de l'intérêt croissant pour ce biomarqueur, nous avons décidé de le doser. Toutefois, étant donné le coût élevé de ce dosage, il a été réalisé sur un nombre limité de patients (n = 60) de l'étude.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

107 sérums prélevés au deuxième jour (J2) ou au septième jour (J7) suivant l'admission, conservés à -20 °C avant analyse, ont été dosés en double avec le kit Fungitell® (Associates of Cape Cod, États-Unis) selon les recommandations du fournisseur. Le seuil de positivité est 80 pg/mL. Les taux douteux (entre 60 et 79 pg/mL) ont été considérés positifs pour l'analyse des résultats. Les résultats supérieurs à 523,4 pg/mL n'ont pas été dilués.

La comparaison des résultats entre les patients infectés et non infectés a été effectuée à l'aide d'un test du χ^2 , d'un test exact de Fisher, d'un test de Student ou d'un test de Mann-Whitney selon le type de variable considérée et les conditions d'application des tests.

RÉSULTATS

L'analyse des résultats a consisté d'une part en une analyse descriptive (avec présentation des résultats sous forme d'effectifs et pourcentages associés), et d'autre part en la comparaison des résultats entre les patients infectés et non infectés. Parmi les 107 sérums analysés, 57 correspondaient à des prélèvements à J2 et 50 à des prélèvements à J7.

Résultats à J2. Sur les 57 patients testés à J2, 34 (59,6 %) avaient des β DG positifs. Vingt deux patients ont développé une candidose invasive, parmi eux 54,5 % avaient un test positif. Il n'a pas été observé de différence significative avec le groupe des patients non infectés ($p = 0,534$) (Tableau 1).

Tableau 1. Résultat des dosages de β DG à J2 chez les patients infectés et non infectés.

	Patients non infectés	Patients infectés	<i>p</i> -value
β DG positifs	22/35 (62,9 %)	12/22 (54,5 %)	0,534

Dans le groupe des patients ayant développé une candidose invasive (n = 22), les sérums positifs avaient été prélevés en moyenne 9,5 jours (médiane 3,5 jours) avant le diagnostic de candidose invasive. Les dix échantillons négatifs avaient été prélevés en moyenne 13,1 jours (médiane 7,5 jours) avant le diagnostic (Figure 1). Un seul patient sur les dix était sous traitement antifongique au moment du prélèvement.

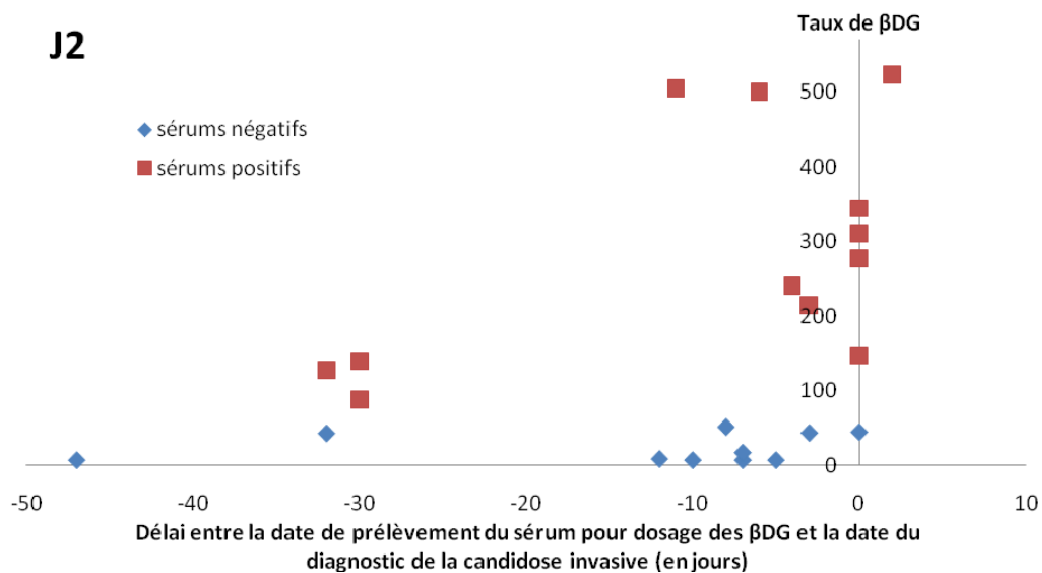


Figure 1. Résultats du dosage à J2 des β DG (en pg/mL) en fonction du délai entre la date de prélèvement du sérum et la date du diagnostic de la candidose invasive (en jours)

Résultats à J7. Sur les 50 patients testés à J7, 33 (66 %) avaient un test positif. Il n’y avait pas de différence significative entre les patients infectés et non infectés ($p = 0,375$) (Tableau 2).

Tableau 2. Résultat des dosages de β DG à J7 chez les patients infectés et non infectés.

	Patients non infectés	Patients infectés	<i>p</i> -value
β DG positifs	23/34 (67,6 %)	10/16 (62,5 %)	0,375

Dans le groupe des patients infectés, les dix sérums positifs avaient été prélevés en moyenne 0,7 jours avant et en médiane 2,5 jours après le diagnostic de candidose invasive. Par contre, les six échantillons négatifs avaient été prélevés en moyenne 13,2 jours (médiane 14 jours) avant le diagnostic (Figure 2). Un seul patient sur ces six était sous traitement antifongique au moment du prélèvement.

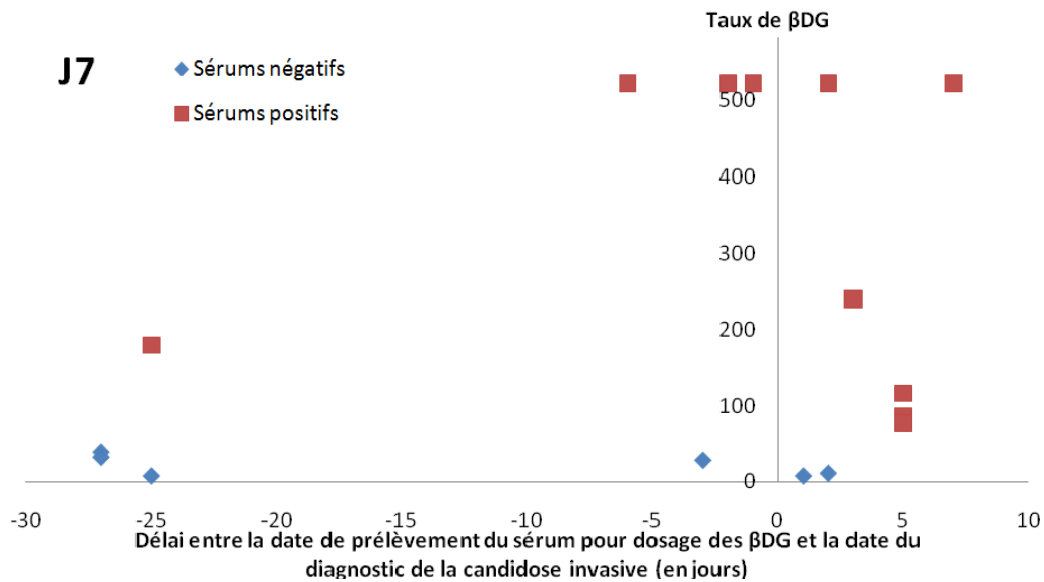


Figure 2. Résultats du dosage à J7 des βDG (en pg/mL) en fonction du délai entre la date de prélèvement du sérum et la date du diagnostic de la candidose invasive (en jours)

Évolution entre J2 et J7

Parmi les patients ayant développé une candidose invasive, 15 patients ont été dosés à J2 et à J7. Les résultats de ces dosages sont présentés dans le tableau 3, de même que les dates de diagnostic de la candidose invasive et la présence de traitement antifongique au moment des prélèvements. Pour neuf patients, les résultats n'ont pas évolué entre J2 et J7 (trois patients avaient des résultats négatifs et six des résultats positifs à J2 et J7). Pour un patient, le test était positif à J2 et douteux à J7, il s'agissait d'un patient diagnostiqué à J2, sous traitement antifongique au moment du deuxième prélèvement à J7. Pour deux patients, les dosages étaient négatifs à J2 et positifs à J7, il s'agissait de patients pour lesquels le diagnostic de candidose invasive avait été posé respectivement à J2 et J9. Pour trois autres patients, les dosages étaient positifs à J2 et négatifs à J7. Le diagnostic de candidose invasive avait été posé à J6 pour un patient, sous antifongique au moment des prélèvements réalisés à J2 et J7. Pour les deux autres patients, les diagnostics de candidose invasive avaient eu lieu tardivement (à J32 et J34) par rapport aux prélèvements des sérums.

Tableau 3. Résultats des dosages de β DG réalisés à J2 et à J7 dans le groupe des patients infectés, avec les dates du diagnostic de la candidose invasive (en jours après l'admission) ainsi que la présence d'antifongique à J2 et J7 (* patient avec candidémie)

N° Patient	Sérums prélevés à J2		Sérums prélevés à J7		Date du diagnostic par rapport à l'admission (en jours)	Traitement antifongique	
	Résultat β DG	Taux (en pg/mL)	Résultat β DG	Taux (en pg/mL)		à J2	à J7
C02P175	Négatif	43,5	Négatif	11,4	J5	non	non
C01P113	Négatif	51,3	Négatif	28,4	J10	non	non
C02P029*	Négatif	42,9	Négatif	39,2	J34	non	non
C02P060	Positif	523,4	Positif	> 523,4	J0	oui	non
C01P188	Positif	277,9	Douteux	75,8	J2	non	oui
C02P005	Positif	147,6	Positif	86	J2	non	oui
C02P016*	Positif	215,7	Positif	> 523,4	J5	non	oui
C01P159	Positif	500,2	Positif	> 523,4	J8	non	non
C02P039*	Positif	504,7	Positif	> 523,4	J13	non	non
C01P198	Positif	88,7	Positif	179,2	J32	non	non
C02P090	Négatif	44,6	Positif	116,1	J2	oui	oui
C02P105	Négatif	17,6	Positif	> 523,4	J9	non	non
C01P154	Positif	240,9	Négatif	7,8	J6	oui	oui
C02P086	Positif	140,3	Négatif	7,8	J32	non	non
C02P184	Positif	129	Négatif	32,4	J34	non	non

Relation entre l'index de colonisation et le résultat de β DG sur l'ensemble des sérums (J2 + J7)

Les index de colonisation (IC) ont été relevés à J2 et J7 pour l'ensemble des patients pour lesquels les β DG ont été dosés. Une seule donnée d'IC est manquante. Le résultat de β DG a été comparé à la valeur de l'IC obtenue le même jour que le prélèvement du sérum.

Dans 50 cas sur 106, l'IC était inférieur à 0,5. Le test de β DG était positif pour 56 % (28/50) de ces cas, avec des taux compris entre 81,3 et > 523,4 pg/mL. Parmi les 21 cas avec un IC égal à zéro, 9 (42,9 %) étaient positifs avec des taux compris entre 81,3 et 349,7 pg/mL.

Pour les cas où l'IC était égal ou supérieur à 0,5, le test était positif dans 69,6 % (39/56) des cas avec des taux allant de 81,2 à > 523,4 pg/mL. Aucune corrélation n'a été observée entre les taux de β DG et l'IC (Figure 3).

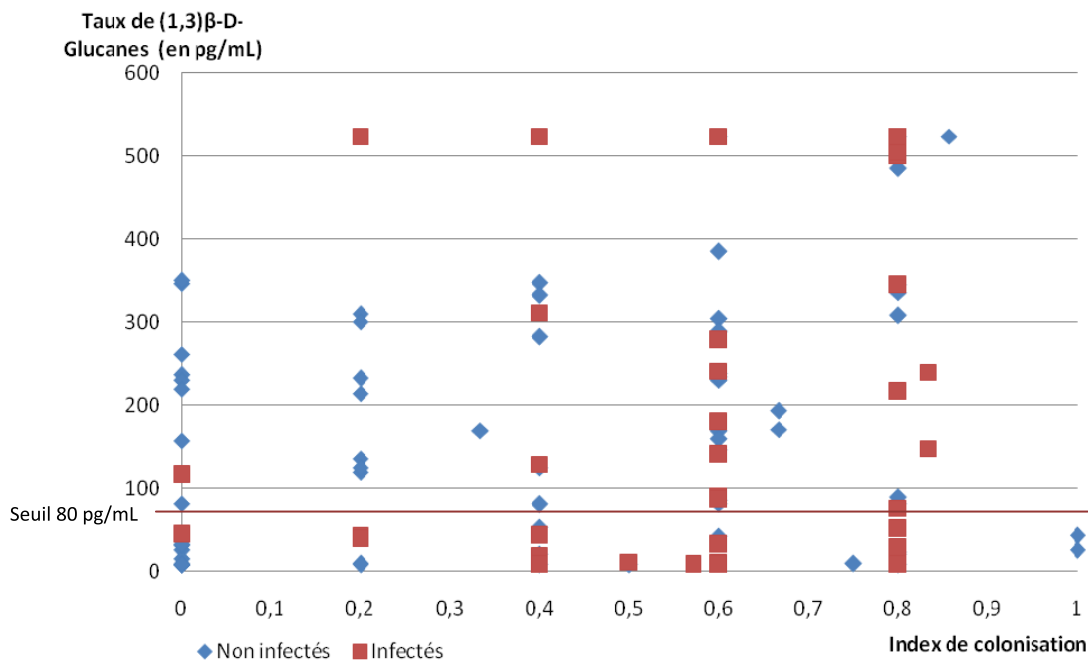


Figure 3. Résultats des dosages de β DG en fonction de l'index de colonisation (*sérum prélevé le même jour que la réalisation de l'index de colonisation*)

DISCUSSION

Le β DG est un constituant de la paroi de nombreux champignons, à l'exception des Zygomycètes et de *Cryptococcus* sp. (Hope *et al.*, 2005; Odabasi *et al.*, 2006; Marty and Koo, 2009). Depuis une dizaine d'années, il est utilisé comme aide au diagnostic des infections fongiques invasives.

Dans notre étude, nous avons dosé ce biomarqueur dans le cadre du diagnostic des candidoses invasives chez les patients non neutropéniques de réanimation. Parmi les patients pour lesquels les β DG ont été dosés, nous avons observé 65 % de tests positifs chez les patients non infectés à *Candida* sp., cette observation est en accord avec des données de la littérature où 50 % des patients de réanimation ont des résultats positifs (Tissot *et al.*, 2013; Poissy *et al.*, 2014). La détection des β DG n'étant pas spécifique des candidoses invasives, elle peut être le témoin d'autres infections fongiques (aspergilloses, pneumocystoses,...) (Onishi *et al.*, 2012). De plus, de nombreux facteurs interférents ont été décrits lors de bactériémies, d'hémodialyse, d'utilisation d'antibiotiques (amoxicilline-acide clavulanique IV), d'immunoglobulines, d'albumine ou de gazes chirurgicales contenant du glucane,...(Kato *et al.*, 2001; Pickering *et al.*, 2005; Mennink-Kersten *et al.*, 2006; Lo Cascio *et al.*, 2015; Pini *et al.*, 2016). Nous n'avons toutefois pas collecté les données concernant la présence d'autres infections fongiques ou de facteurs éventuellement responsables des faux positifs.

Les patients de réanimation sont fortement colonisés à *Candida* sp., nous nous sommes intéressés au lien potentiel entre colonisation et taux de β DG. Une étude a montré que les taux étaient significativement plus élevés chez les patients infectés (médiane à 253 pg/mL) que chez les patients colonisés non infectés (médiane à 99 pg/mL) (Tissot *et al.*, 2013). Dans notre cas, nous n'avons pas comparé les taux obtenus selon le type de patients en raison de l'absence de dilution des résultats supérieurs à 523,4 pg/mL. Cependant, une autre étude n'a pas montré de corrélation entre les résultats de β DG et l'intensité de la colonisation, comme observé dans notre cas (Poissy *et al.*, 2014).

Concernant les données des patients ayant développé une candidose invasive, seulement 58 % ont un dosage de β DG positif (sérums prélevés en moyenne 5,5 jours avant le diagnostic). Ces résultats sont en accord avec l'étude publiée par Angebault *et al.* où la présence de β DG était détectée uniquement dans 64 % des candidémies (Angebault *et al.*, 2016). Les résultats négatifs peuvent aussi s'expliquer par des prélèvements réalisés trop précocement par rapport au diagnostic (en moyenne 13,2 jours avant le diagnostic). Toutefois, des études ont montré un intérêt de ce dosage pour la précocité de détection. Des résultats positifs étaient retrouvés en médiane 10 jours avant le diagnostic de candidémies dans l'étude de Poissy *et al.* ou cinq jours avant le diagnostic de candidoses intra-abdominales dans l'étude de Tissot *et al.* (Tissot *et al.*, 2013; Poissy *et al.*, 2014). Dans notre étude, parmi les échantillons prélevés dans les cinq jours avant le diagnostic, 8/12 (66,7 %) étaient positifs *versus* 10/18 (55,6 %) parmi ceux prélevés dans les 10 jours précédant le diagnostic.

Dans l'ensemble, les performances de ce biomarqueur dans les études réalisées en réanimation sont relativement variables avec une sensibilité allant de 66 à 100 % et une spécificité de 30,6 à 89,3 %. La VPP est faible (19 à 56 %), et la VPN varie entre 78 et 100 % selon les études (León *et al.*, 2009; Tissot *et al.*, 2013; Poissy *et al.*, 2014; Liew *et al.*, 2015; Martín-Mazuelos *et al.*, 2015; León *et al.*, 2016; Posteraro *et al.*, 2016). Plusieurs équipes ont montré que les sensibilités pouvaient varier selon l'espèce responsable de la candidose invasive. Dans l'étude de Angebault *et al.*, une meilleure détection des candidémies à *C. albicans* a été observée par rapport aux candidémies à d'autres espèces, alors que dans l'étude de Martínez-Jiménez *et al.*, c'est l'inverse qui a été observé avec une sensibilité de 66,7 % pour *C. albicans* vs 83 % pour *C. parapsilosis* et 100 % pour *C. tropicalis* (Martínez-Jiménez *et al.*, 2015b; Angebault *et al.*, 2016). Une autre étude a montré une moindre sensibilité pour *C. parapsilosis* (61,1 %) par rapport aux autres espèces (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2005). Ces observations sont toutefois faites sur un nombre limité de patients, ce qui peut expliquer les discordances observées. Dans notre cas, nous n'avons pas observé de différences en fonction des espèces (données non présentées).

Des études ont montré l'intérêt d'étudier les cinétiques de β DG après l'instauration du traitement antifongique. Des taux positifs peuvent persister au moins deux semaines après le diagnostic, voire jusqu'à sept semaines (Poissy *et al.*, 2014; Angebault *et al.*, 2016). Toutefois, une décroissance des taux pendant le traitement a été associée au succès thérapeutique, des taux demeurant élevés ou augmentant ont été observés chez les sujets non répondeurs au traitement (Jaijakul *et al.*, 2012; Tissot *et al.*, 2013).

En conclusion, l'utilisation de ce biomarqueur dans la pratique reste problématique. En effet, si ce dosage a pu montrer son intérêt dans la détection précoce d'infections fongiques, la présence de nombreux résultats positifs chez les patients non infectés ainsi qu'un pourcentage important de tests négatifs chez des patients infectés rend son utilisation délicate. Sa combinaison avec d'autres marqueurs peut néanmoins améliorer la sensibilité du diagnostic des candidoses invasives (Posteraro *et al.*, 2011; León *et al.*, 2016).

PARTIE 3

PCR Candida

A) Mise au point de PCR *Candida* sp.

INTRODUCTION

Le diagnostic biologique des candidémies demeure toujours un challenge. Depuis les années 1990, les performances moyennes des hémocultures ont incité de nombreuses équipes à développer des PCR de manière à améliorer le diagnostic et détecter plus précocement les *Candida* sp. dans le sang.

Cependant, les études publiées sur les PCR divergent sur de nombreux paramètres tels que le type de PCR, la stratégie de détection, le choix de l'ADN cible ou encore le protocole d'extraction et la fraction sanguine à utiliser. En 2011, Avni *et al.* publie une méta-analyse de 54 études publiées entre 1993 et 2009 sur le diagnostic des candidoses invasives par PCR (Avni *et al.*, 2011). Les méthodes de PCR étaient des PCR conventionnelles, des PCR nichées et, dans 30% des cas, des PCR en temps réel. Elles ciblaient dans 77,8 % des cas les gènes codant pour l'ADN ribosomique (ADNr), et essentiellement les régions 18S mais aussi 5,8 et 28S. Les autres gènes cibles étaient le gène *L1A1* du cytochrome P450 (CYP450) et les gènes *SAP*, *EO3*, *HSP*, *ERG11*, *CHS1*, *ACT1*. Une meilleure sensibilité était retrouvée avec les gènes codant pour l'ADNr et le CYP450. Les études publiées depuis cette méta-analyse sont essentiellement des PCR en temps réel ciblant l'ADNr (Wellinghausen *et al.*, 2009; Fricke *et al.*, 2010; Lau *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2012). Les stratégies de détection utilisées étaient variables et les amorces le plus souvent utilisées des amorces panfongiques ou spécifiques du genre *Candida*. L'identification du champignon peut alors se faire par séquençage du produit de PCR (Sugawara *et al.*, 2013), ou pour les PCR en temps réel par analyse des courbes de fusion (Jordanides *et al.*, 2005; Dunyach *et al.*, 2008; Fricke *et al.*, 2010) ou par utilisation de sondes spécifiques de certaines espèces (Klingspor and Jalal, 2006; Innings *et al.*, 2007; McMullan *et al.*, 2008; Schell *et al.*, 2012). Plus rarement, le choix était porté sur des amorces ciblant spécifiquement certaines espèces de *Candida* sp. (Bu *et al.*, 2005).

En ce qui concerne la fraction sanguine à tester, les données sont discordantes. *A priori*, le sérum ou le plasma permet la détection d'ADN libre alors que le sang total permet la détection d'ADN provenant de cellules fongiques. Dans la méta-analyse, 24 % des études étaient réalisées à partir de sérum vs 76 % sur du sang total, et les meilleurs résultats étaient obtenus à partir du sang

total (Avni *et al.*, 2011). Cependant, d'autres auteurs ont montré une supériorité du sérum ou du plasma par rapport au sang total (Bougnoux *et al.*, 1999; Metwally 2008b; Lau *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2012). L'étape d'extraction à partir de la fraction choisie est cruciale mais la grande variabilité des protocoles publiés rend difficile les comparaisons. L'extraction sur sérum nécessite moins de mise au point et est plus rapide (Maaroufi *et al.*, 2004; Dunyach *et al.*, 2008; McMullan *et al.*, 2008). Par contre, l'extraction à partir de sang total nécessite de nombreuses étapes : lyse des hématies, des leucocytes et lyse de la paroi fongique pour libérer l'ADN (Einsele *et al.*, 1997; Löffler *et al.*, 1997; Maaroufi *et al.*, 2003). Aucun consensus ne se dégage à l'heure actuelle sur un protocole recommandé pour le diagnostic moléculaire des candidémies.

L'objectif de notre étude était de mettre au point des PCR en temps réel pour la détection de *Candida* sp.. Dans un premier temps, nous avons travaillé sur l'étape de lyse des parois fongiques nécessaire à la libération de l'ADN. Nous avons ensuite évalué les performances de neuf PCR, spécifiques du genre *Candida* ou des trois espèces retrouvées dans 83 % des candidémies de notre centre (*C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*). Quatre PCR présentant les meilleures efficacités et limites de détection ont été sélectionnées : une pan-*Candida* et trois spécifiques de *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*. La limite de détection du couple extraction/PCR a été évaluée. Finalement, des tests ont été réalisés à partir des sérums car nous disposions dans la sérothèque de nombreux échantillons prélevés chez des patients candidémiques ou colonisés à *Candida* sp.. Un total de 47 sérums provenant de 29 patients ayant présenté une candidémie ont été testés avec les PCR sélectionnées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Échantillons

Des échantillons sanguins de 29 patients des CHU de Nîmes et Montpellier ayant présenté une candidémie (entre 2010 et 2016) ont été inclus. Un à trois sérums étaient disponibles par patient, prélevés entre 36 heures avant et 130 heures après celui de la première hémoculture positive. Ainsi, 47 sérums (fonds de tubes) ont été testés, ainsi que 27 sérums de volontaires sains (témoins négatifs). Les échantillons ont été conservés à -20 °C avant extraction.

2. Hémocultures

Les hémocultures ont été réalisées, au CHU de Nîmes, avec le système BD BACTEC™ et les flacons BD BACTEC™ Plus Aerobic/F, BD BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F, BD BACTEC™ Mycosis IC/F (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Au CHU de Montpellier, elles ont été réalisées avec le système BacT/ALERT® 3D et les flacons BacT/ALERT® SA, BacT/ALERT® SN (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

L'identification des espèces de *Candida* sp. isolées des flacons d'hémoculture a été réalisée à l'aide du VITEK® 2 YST (bioMérieux) et/ou de la galerie API® ID32C (bioMérieux) et/ou de la spectrométrie de masse VITEK® MS (bioMérieux).

3. Préparation d'échantillons reconstitués

Trois souches de *Candida* sp. (*C. albicans* ATCC 14053, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 64667) ont été incubées 18 à 24 h à 35 +/- 2 °C sur milieu Sabouraud en vue de la préparation d'échantillons reconstitués dans de l'eau PPI. Les concentrations préparées ont été comptées sur cellule Kova-Slide et vérifiées par rétroculture.

4. Extraction d'ADN

a. Tests de prétraitement avant extraction

Divers prétraitements avant extraction ont été testés sur des échantillons reconstitués avec une souche de *C. albicans* ATCC 14053 à une concentration de l'ordre de 10 000 levures/mL. Les différents prétraitements testés, seuls ou en association, étaient les suivants :

- incubation de l'échantillon avec 250 U de lyticase (non recombinante) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Allemagne) 30 min à 30 °C ;
- incubation avec 20 µL de protéinase K (PK) (Qiagen, Courtaboeuf, France) 2 h à 56 °C ;
- ajout de 5 µL de RNacarrier (Qiagen) ;
- centrifugation de l'échantillon au MagNALyser (Roche, Meylan, France) 90 s à 6600 tours/min dans des tubes contenant des billes de céramique (MagNALyser Green Beads, Roche) ;
- étapes de congélation/décongélation : trois cycles de cinq minutes alternant congélation à -80 °C et décongélation à 95 °C.

Les extractions ont été réalisées avec le kit DNEasy Tissue (Qiagen) sur l'extracteur automatique Biorobot® EZ1 (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. La prise d'essai était de 200 µL et le volume d'élution de 100 µL.

b. Extraction des échantillons reconstitués et des sérums de patients

Les protocoles d'extraction retenus pour ces échantillons sont présentés dans la partie Résultats (paragraphe 1c).

c. Extraction d'ADN à partir de cultures de champignons et bactéries

Pour tester la spécificité des PCR, de l'ADN a été extrait à partir de cultures des champignons et bactéries suivantes : *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida famata*, *Candida dubliniensis*, *Candida sphaerica*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*, *Candida bracarensis*, *Candida nivariensis*, *Candida inconspicua*, *Candida norvegensis*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon asahii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium* sp., *Geotrichum* sp., *Aspergillus fumigatus*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*. Les extractions ont été réalisées sur l'automate Biorobot® EZ1 (Qiagen) à l'aide du kit EZ1 DNEasy Tissue (Qiagen), avec une élution dans 100 µL. Pour les bactéries à Gram positif, une pré-incubation avec de la lysostaphine (Sigma) à 37 °C pendant 30 min a été réalisée avant l'extraction.

L'ensemble des ADN extraits ont été conservés congelés à -20 °C avant analyse.

5. PCR en temps réel

a. Amorces et sondes

Différentes PCR ont été testées: des PCR pan-*Candida* ainsi que des PCR spécifiques des espèces *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*. Les amorces et sondes utilisées sont présentées dans le tableau 1. Ce tableau précise également la localisation des amorces et la longueur du fragment amplifié selon les PCR utilisées.

Excepté pour l'amorce ITS4-R et la sonde SAlBITS2 déjà publiées (Elie *et al.*, 1998), les amorces et sondes ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer Express® version 3.0.1 (AppliedBiosystems, Carlsbad, USA) selon les recommandations du fournisseur et synthétisées par Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne). Pour le choix des amorces et sondes (soit spécifiques à une espèce soit communes à plusieurs espèces), les séquences des régions de l'ADNr (18S, 5,8S, 28S, ITS1 et ITS2) de nombreux champignons ont été répertoriées à partir de la banque de données GenBank

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) puis alignées à l'aide du logiciel BioEdit. Les séquences répertoriées pour les différents champignons étaient les suivantes : *C. albicans* (accession GU319991.1), *C. glabrata* (accession KU729056.1), *C. parapsilosis* (accession FJ872015.1), *C. tropicalis* (accession AY939810.1), *C. krusei* (accession KC601852.1), *C. kefyr* (accession GU256755.1), *C. lusitanae* (accession KU729100.1), *C. guilliermondii* (accession KU729068.1), *C. famata* (accession GQ458041.1), *C. dubliniensis* (accession KC146361.1), *C. sphaerica* (accession KU729077.1), *C. orthopsilosis* (accession EU564208.1), *C. metapsilosis* (accession EU564207.1), *C. bracarensis* (accession KP674833.1), *C. nivariensis* (accession KJ957824.1), *C. inconspicua* (KT207004.1), *C. norvegensis* (accession JQ070096.1), *S. cerevisiae* (accession KC881067.1), *Fusarium oxysporum* (FJ196767.1), *A. fumigatus* (accession KC689332.1), *Geotrichum capitatum* (accession KU729102.1), *C. neoformans* (accession FJ914794.1), *T. asahii* (accession KX859682.1), *Rhizopus oryzae* (accession GU327637.1).

Les spécificités ont également été vérifiées à l'aide du programme BLAST sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

b. PCR en temps réel

Les PCR en temps réel ont été réalisées sur l'automate Viia7 (Applied Biosystems). La concentration en amorces et sonde, le programme d'amplification ainsi que le mix réactionnel ont été testés de manière à optimiser les PCR. Pour les PCR utilisant un intercalant comme système de détection, le mélange réactionnel retenu était composé des amorces sens et anti-sens (250 nM), de 10 µL de mix réactionnel Eurobiogreen qPCR Mix 2X Lo-ROX (Eurobio, Les Ulis, France), de 5 µL d'extrait d'ADN et d'eau qsp 20 µL. Pour les PCR utilisant une détection par sonde, le mélange réactionnel retenu était composé des amorces sens et anti-sens (250 nM), de la sonde (250 nM), de 10 µL du mix réactionnel Eurobioprobe (Eurobio), de 5 µL d'extrait d'ADN et d'eau qsp 20 µL. Le programme d'amplification retenu était le suivant : activation de la *Taq* polymérase 10 min à 95 °C, suivi de 10 cycles 95 °C 15 s / 65 °C 40 s puis de 35 cycles 95 °C 15 s / 60 °C 40 s (et pour les PCR utilisant un intercalant, réalisation d'une courbe de fusion : 95 °C 15 s puis 60 °C 1 min et passage à 95 °C).

Les réactions de PCR ont été réalisées en triplicate. Le Ct (cycle threshold) a été relevé pour les PCR positives. Un contrôle positif et un contrôle négatif ont été ajoutés à chaque manipulation. Un contrôle d'extraction et d'inhibition a été réalisé en amplifiant le gène humain du TPA (activateur tissulaire du plasminogène).

Tableau 1. Amorces et sondes sélectionnées (pb : paires de bases, ADNr : ADN ribosomique)

Nom de la PCR	Amorce ou sonde	Séquence nucléotidique (5'-3')	Localisation	Longueur du fragment amplifié
PCR pan-<i>Candida</i>				
5,8S	5,8S F	GATCTCTGGTTCTCGCATC	ADNr 5,8S	143 pb
	5,8S R	AAAYGACGCTCAAACAGG	ADNr 5,8S	
	Sonde 5,8S	FAM-TCATCGAATCTTTGAACGCACATTG-BHQ1	ADNr 5,8S	
ITS1	18SCsp2 F	GTAGGTGAACCTGCGGAAG	ADNr 18S	variable (selon taille région ITS1)
	PanCsp R	ACCAAGAGATCCYTTGTTGA	ADNr 5,8S	
PCR spécifique de <i>C. albicans</i>				
ITS2CA	ITS2CA F	AGCAATACGACTTGGGTTTGC	région ITS2 de <i>C. albicans</i>	182 pb
	ITS4 R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ADNr 28S	
	Sonde SA1bITS2	HEX-ATTGCTTGC GGCGGTAACGTCC-BHQ2	région ITS2 de <i>C. albicans</i>	
ITS1CA	ITS1CA F	CTGATTTGCTTAATTGCACCA	région ITS1 de <i>C. albicans</i>	122 pb
	ITS1CA R	TCTGGTGTGACAAGTTGATAAAAA	région ITS1 de <i>C. albicans</i>	
	Sonde SA1bITS1	HEX-CCAGAGGTCTAAACTTCAAACCAAT-BHQ2	région ITS1 de <i>C. albicans</i>	
CA1b2	CA1b2 F	AAGACGGTAGTGGTAAGGC	région ITS2 de <i>C. albicans</i>	107 pb
	CA1b2 R	GAGGTCAAAGTTTGAAGATATACG	région ITS2 de <i>C. albicans</i>	
PCR spécifique de <i>C. glabrata</i>				
ITS2CG	ITS2CG F	GCCATATCAGTATGTGGGACA	région ITS2 de <i>C. glabrata</i>	142 pb
	ITS2CG R	CACGCACAAAACACTCACTT	région ITS2 de <i>C. glabrata</i>	
PCR spécifique de <i>C. parapsilosis</i>				
ITS1CP	ITS1CP F	CAGAATGAAAAGTGCTTAAGT	région ITS1 de <i>C. parapsilosis</i>	134 pb
	ITS1CP R	CGGTTGACATTAATAAAATTTGG	région ITS1 de <i>C. parapsilosis</i>	
ITS2CP	ITS2CP F	GGTTTGGTGTGAGCGATAC	région ITS2 de <i>C. parapsilosis</i>	106 pb
	ITS2CP R	TGGAAGAAGTTTTGGAGTTTGT	région ITS2 de <i>C. parapsilosis</i>	

7. Efficacité et limite de détection (LOD) des PCR

Efficacité. Pour déterminer les efficacités de PCR, cinq dilutions d'ADN (de raison 10) ont été utilisées (avec trois réplicats pour chaque dilution). Pour les PCR pan-*Candida* et spécifiques de *C. albicans*, des dilutions d'ADN génomique purifié, isolé de *C. albicans* ATCC 14053 (LGS Standards, Molsheim, France), ont été utilisées (de 1 ng à 100 fg). Pour les PCR spécifiques de *C. parapsilosis* et *C. glabrata*, des dilutions d'ADN à partir d'extraits d'échantillons reconstitués ont été utilisées. Une régression linéaire a été utilisée pour déterminer la linéarité (coefficient R^2) et l'efficacité (selon la formule : $E = 10^{-1/\text{pente}}$).

LOD des PCR. Pour déterminer la LOD de chaque PCR, 10 réplicats des dilutions de faible concentration ont été testés (cf. paragraphe précédent). La LOD a été définie comme étant la dilution pour laquelle au moins 90 % des réplicats étaient positifs.

LOD du couple extraction/PCR CALb2. 200 μL d'eau ou de sérum (volontaire sain) ont été additionnés de différentes dilutions d'ADN purifié de *C. albicans* avant l'extraction. La LOD du couple extraction/PCR a été définie comme étant la dilution pour laquelle au moins 90 % des réplicats étaient positifs.

8. Calcul de la correspondance en équivalent génome

La correspondance entre la quantité en grammes et l'équivalent génome (n) a été calculée à l'aide de la formule suivante: $n = (m \times 6,023 \cdot 10^{23}) / (\text{pb} \times 660)$ où m est la masse (en grammes), $6,023 \cdot 10^{23}$ le nombre d'Avogadro, pb le nombre de paires de bases ($32 \cdot 10^6$ pour *C. albicans*) et 660 la masse moléculaire moyenne d'une paire de bases (g/mol). Ainsi, pour *C. albicans*, un équivalent génome correspond à 35 fg.

9. Séquençage

Lorsque cela a été nécessaire, les produits de PCR ou les extraits ont été séquencés. Les amorces utilisées pour le séquençage étaient les suivantes : V9D 5'-TTAAGTCCCTGCCCTTTGTA-3' et LS266 5'-GCATTCCCAAACAACACTCGACTC-3' (amorces décrites par le centre national de référence des mycoses invasives et amplifiant les régions ITS1-5,8S-ITS2) et les amorces 5,8S F et 5,8S R (amplification d'une région de 143 pb de l'ADNr 5,8S). Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 μL contenant 1 μL de chaque amorce (10 μM), 5 μL de dNTP (2 mM), 0,5 μL of HotStarTaq[®] DNA Polymerase (Qiagen), 5 μL de MgCl_2 (25 mM), 5 μL de tampon PCR 10X (Qiagen), 27,5 μL d'eau et 5 μL d'ADN extrait (ou de produit de PCR). Les PCR ont été réalisées sur le thermocycler Biometra[®], avec le programme suivant : activation de la *Taq* à 94 °C pendant 15 min, 40 cycles de dénaturation (94 °C

1 min), hybridation (58 °C 30 s), élongation (72 °C 1 min), et élongation finale à 72 °C pendant 7 min. Les amplifications ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %, les amplicons ont ensuite été purifiés à l'aide du kit Agencourt® AMPure XP (Beckman Coulter). Les réactions de séquence ont été réalisées à l'aide du kit BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing (AppliedBiosystems) selon les recommandations du fournisseur, et avec les mêmes amorces que celles utilisées lors de la première PCR. Les réactions de séquence ont été réalisées sur le thermocycler Biometra® avec le programme suivant : dénaturation à 96 °C pendant 1 min, suivie de 40 cycles de dénaturation (98 °C 20 s), hybridation (50 °C 10 s) et élongation (60 °C 4 min). Les produits de PCR, après purification avec le kit Agencourt® CleanSEQ (Beckman Coulter), ont été analysés sur le séquenceur AppliedBiosystems® 3130xl.

Les séquences obtenues ont été alignées à l'aide du logiciel SeqScape® (LifeTechnologies), vérifiées visuellement puis soumises sur le site <http://fr.mycobank.org/> de manière à chercher une homologie avec les séquences contenues dans la banque de données. Pour l'identification au champignon au niveau de l'espèce, des similarités de séquence ≥ 99 % étaient requises.

RÉSULTATS

1. Extraction à partir de levures : choix du protocole

L'extraction des levures requiert une lyse de la paroi fongique, nécessaire à la libération de l'ADN. Les différents tests de prétraitement avant extraction ont été évalués sur des échantillons reconstitués. La PCR utilisée pour tester les extractions était une PCR pan-*Candida* (PCR 5,8Si) qui amplifie une région de 143 pb de l'ADNr 5,8S. Les Ct obtenus pour les PCR positives ont été comparés pour évaluer les différents protocoles d'extraction.

a. Extractions avec de la lyticase.

Les premiers tests de prétraitement réalisés utilisaient de la lyticase. Les échantillons reconstitués étaient préalablement incubés avec 250 U de lyticase 30 min à 30 °C puis avec 20 μ L de PK 2 h à 56 °C avant l'extraction.

Un témoin négatif prétraité et extrait selon le même protocole s'est révélé positif avec la PCR 5,8Si (Ct = 24,6). Les produits d'extraction et de PCR ont été séquencés. Le séquençage a identifié *S. cerevisiae*.

Afin de trouver l'origine de *S. cerevisiae*, différentes extractions ont été réalisées sur l'eau seule ou additionnée soit de lyticase soit de PK. Une PCR positive a été retrouvée uniquement pour l'extrait pour lequel de la lyticase avait été rajoutée (Ct = 24,7), et le séquençage a confirmé la présence d'ADN de *S. cerevisiae* dans cet échantillon.

La lyticase utilisée était contaminée par *S. cerevisiae*. En raison de l'absence de lyticase recombinante commercialisée, cette enzyme n'a pas été utilisée par la suite. D'autres tests d'extraction sans utilisation de lyticase ont été réalisés.

b. Extraction sans utilisation de lyticase

Différents protocoles ont été comparés sur les échantillons reconstitués :

- incubation avec de la PK 2 h à 56 °C ;
- centrifugation de l'échantillon au MagNALyser dans des tubes contenant des billes de céramique, avec ou sans ajout de 5 µL de RNAcarrier ;
- prétraitement de l'échantillon avec des étapes de congélation/décongélation.

Les résultats des PCR obtenus avec les différents protocoles sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2. Résultats des prétraitements testés sans utilisation de lyticase

Prétraitement	Résultat PCR (Ct moyen)
Echantillon incubé avec de la PK 2 h	Positive (Ct 31)
Echantillon centrifugé avec MagNALyser Green Beads puis incubation avec de la PK 2 h	Positive (Ct 32,7)
Echantillon centrifugé avec MagNALyser Green Beads puis incubation avec de la PK 2 h et ajout de 5 µL de RNA carrier avant extraction	Positive (Ct 29)
Echantillon prétraité avec étapes de congélation/décongélation	Positive (Ct > 35)

L'étape avec congélation/décongélation a été jugée inutile, les Ct obtenus étaient > 35. Les Ct obtenus avec les échantillons incubés avec de la PK (2h) étaient inférieurs à ceux obtenus avec des échantillons prétraités avec centrifugation au MagNALyser et incubation avec de la PK. Cette étape de centrifugation n'a pas été retenue. Les Ct obtenus pour les échantillons prétraités avec

centrifugation au MagNALyser, incubation avec de la PK (2h) et ajout de RNA carrier étaient inférieurs (de 3,7 Ct) à ceux obtenus dans les mêmes conditions sans ajout de RNA carrier. L'ajout de RNA carrier a été considéré comme utile pour améliorer les extractions.

c. Protocole d'extraction retenu

Au terme de cette étape d'optimisation des extractions de levures, le protocole retenu pour l'extraction était le suivant :

- incubation avec 20 µL de PK pendant 2 h à 56 °C ;
- ajout de 5 µL de RNACarrier avant extraction ;
- extraction automatique avec le kit DNEasy Tissue (Qiagen) avec un volume d'élution de 100 µL.

Pour le sérum, il est admis qu'il contient essentiellement de l'ADN libre, les levures étant principalement éliminées lors de la centrifugation du tube sec. Toutefois, nous avons observé la présence de levures dans le sérum, principalement lorsqu'il y a de fortes concentrations circulantes (données non présentées). L'extraction présentée ci-dessus a donc été celle utilisée pour les sérums. La prise d'essai de l'extraction automatique était de 200 µL. Dans l'éventualité d'une présence de levures dans le sérum, nous avons centrifugé au préalable 1 mL de sérum à 5 000 g pendant 10 min (étape de centrifugation des levures) puis retiré 800 µL de manière à obtenir un volume adapté à l'extracteur. Le reste de l'extraction suit le protocole exposé précédemment (incubation avec PK puis ajout de RNA carrier).

2. Évaluation des performances des PCR

a. PCR pan-Candida

Trois PCR pan-*Candida* ont été testées. Deux PCR testées utilisaient une détection par un agent intercalant avec une efficacité de 98,6 % ($R^2 = 0,998$) pour la PCR 5,8S et de 72,2 % pour la PCR ITS1. La PCR 5,8S avec une révélation par sonde avait une efficacité de 90,7 % ($R^2 = 0,999$). A ce stade, les deux PCR pan-*Candida* sélectionnées étaient la PCR 5,8S avec révélation par intercalant (PCR 5,8Si) et la PCR 5,8S avec sonde (PCR 5,8Ss).

La LOD de ces deux PCR, réalisées sur l'ADN génomique purifié de *C. albicans*, était de 10 fg par PCR soit 0,294 équivalent genome/PCR (concentration détectée 10 fois sur 10 avec la PCR 5,8Si et 9 fois

sur 10 avec la PCR 5,8Ss). La LOD, évaluée sur la gamme issue d'échantillons reconstitués, était de 1 levure par PCR pour *C. parapsilosis* et 10 levures par PCR pour *C. glabrata*.

Les espèces fongiques détectées par ces deux PCR sont présentées dans le tableau 3. Aucune des deux PCR n'amplifiaient les autres pathogènes testés.

Tableau 3. Détection des champignons testés avec les PCR 5,8Si et 5,8Ss

Espèces fongiques détectées	Espèces fongiques non détectées
PCR 5,8Si	
<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. kefyri</i> , <i>C. sphaerica</i> , <i>C. nivariensis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i> , <i>C. inconspicua</i> , <i>C. norvegensis</i> , <i>C. bracarensis</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>Geotrichum</i> sp., <i>A. fumigatus</i> , <i>T. asahii</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp.
PCR 5,8Ss	
<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. kefyri</i> , <i>C. sphaerica</i> , <i>C. nivariensis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i> , <i>C. bracarensis</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>C. krusei</i> , <i>C. inconspicua</i> , <i>C. norvegensis</i> , <i>Geotrichum</i> sp., <i>A. fumigatus</i> , <i>T. asahii</i> , <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.

Les deux PCR possédaient des LOD équivalentes. La PCR 5,8Ss avait une efficacité légèrement inférieure à la PCR 5,8Si, et elle ne permettait pas l'amplification de *C. krusei*, espèce qui constitue une des six espèces les plus fréquemment rencontrées dans les candidoses invasives. C'est donc la PCR 5,8Si qui a été sélectionnée pour la suite.

b. PCR spécifiques de C. albicans

La PCR CALb2, avec révélation par intercalant, possédait une très bonne efficacité de 101 % ($R^2 = 1$). Parmi les PCR avec une détection par sonde, ITS1CA avait une efficacité de 111,2 % ($R^2 = 0,991$) et ITS2CA de 100 % ($R^2 = 0,992$). Les PCR finalement sélectionnées pour *C. albicans* étaient CALb2 (intercalant) et ITS2CA (sonde).

La LOD était de 10 fg par PCR (soit 0,294 équivalent génomes) pour CALb2 (concentration détectée 10 fois/10) et de 50 fg par PCR (soit 1,47 équivalent génomes) pour ITS2CA (concentration détectée 10 fois/10).

Les tests de spécificité à partir des ADN extraits des autres agents infectieux confirmaient la spécificité de ces deux PCR pour *C. albicans* uniquement.

La PCR CALb2, en raison de sa meilleure LOD, a été sélectionnée pour réaliser les tests sur les échantillons de patients.

c. PCR spécifiques de C. glabrata

La PCR ITS2CG testée, avec révélation par intercalant, possédait une efficacité moyenne de 113 % ($R^2 = 0,997$). Sa LOD était de 10 levures par PCR (concentration détectée 10 fois/10), la concentration à 1 levure par PCR était détectée dans 50 % des cas. Les tests de spécificité à partir des ADN extraits des autres agents infectieux confirmaient la spécificité de cette PCR pour *C. glabrata sensu stricto*. Les espèces du complexe *glabrata*, *C. nivariensis* et *C. bracarensis* n'étaient pas amplifiées.

d. PCR spécifiques de C. parapsilosis

Deux PCR testées, ITS1CP et ITS2CP, avec révélation par un agent intercalant, avaient une très bonne efficacité, respectivement de 101,2 % ($R^2 = 0,999$) et de 95,9 % ($R^2 = 0,999$). La LOD pour ces deux PCR était de 1 levure par PCR (concentration détectée 10 fois/10). Les tests de spécificité confirmaient la spécificité pour *C. parapsilosis sensu stricto*. Les autres espèces du complexe *parapsilosis*, *C. orthopsilosis* et *C. metapsilosis* étaient amplifiées très tardivement avec ces deux PCR. La PCR ITS1CP a été sélectionnée pour la suite.

3. Limite de détection du couple extraction/PCR

La limite de détection du couple extraction/PCR a été déterminée avec une seule PCR, la PCR CALb2. Différentes concentrations d'ADN génomique de *C. albicans* ont ainsi été rajoutées, avant extraction, dans 200 μ L d'eau ou de sérum. Cette limite de détection était de 125 fg par PCR (Tableau 4).

Tableau 4. Limite de détection du couple extraction/PCR CALb2

Quantité ADN par PCR	Nombre de répliquats positifs/Nombre de répliquats testés	
	eau + ADN	sérum + ADN
5 pg	3/3	3/3
500 fg	3/3	3/3
250 fg	10/10	10/10
125 fg	10/10	9/10
50 fg	4/7	7/10
25 fg	3/7	1/7
5 fg	0/3	1/3

4. PCR testées sur des sérums de patients candidémiques

a. Echantillons testés

47 échantillons ont été testés avec quatre PCR, la PCR pan-*Candida* (PCR 5,8Si) et les trois PCR préalablement sélectionnées, spécifiques de *C. albicans* (PCR CALb2), *C. glabrata* (PCR ITS2CG) et *C. parapsilosis* (PCR ITS1CP).

Ces échantillons correspondaient à 29 patients présentant une candidémie : 12 à *C. albicans*, cinq à *C. glabrata*, sept à *C. parapsilosis*, deux à *C. tropicalis*, un à *C. sphaerica*, un avec une association *C. albicans/C. tropicalis* et un avec une association *C. glabrata/C. parapsilosis*. Les délais de positivité des flacons d'hémoculture ainsi que les délais entre le prélèvement de l'hémoculture et celui du sérum sont présentés dans le tableau 5. Les hémocultures se sont positivées en moyenne en 33,3 heures (de 12 à 70 heures).

b. Résultats de la PCR pan-*Candida*

Sur l'ensemble des échantillons testés (n = 47), 33 (70,2 %) étaient positifs avec la PCR pan-*Candida*, avec un Ct moyen de 33,7 [20 à 39,3] (Résultats cf. tableau 5). Pour ces échantillons positifs, dans 45,4 % des cas (15/33) les trois répliquats étaient positifs, dans 21 % des cas (7/33) seulement deux répliquats étaient positifs et dans 33,3% des cas (11/33) un seul répliquat était positif.

Parmi les patients avec une candidémie à *C. albicans*, 10/12 (83,3 %) avait au moins un échantillon positif avec la PCR 5,8Si. Deux patients sur 5 (40 %) avec une candidémie à *C. glabrata*, six patients sur sept (85,7 %) avec une candidémie à *C. parapsilosis* ainsi que le patient avec une association

C. glabrata/*C. parapsilosis* avaient au moins un échantillon positif en PCR 5,8Si. Pour les autres patients (une candidémie à *C. albicans*/*C.tropicalis*, deux à *C. tropicalis* et une à *C. sphaerica*), tous les échantillons testés étaient positifs avec la PCR 5,8Si. Pour six patients, l'ensemble des échantillons testés était négatif.

Parmi les sérums prélevés avant que la pousse de levures soit détectée dans le flacon d'hémoculture, 18/23 (78,3 %) étaient positifs avec la PCR 5,8Si. Ces PCR étaient positives en moyenne 21,5 heures avant la détection de la pousse dans le flacon d'hémoculture (entre 1 et 66 heures avant). Parmi ces sérums positifs prélevés avant le résultat positif pour l'hémoculture, un a été prélevé avant l'hémoculture, six ont été prélevés au même moment, quatre dans les 24 heures suivant le prélèvement de l'hémoculture et sept dans les 24 à 48 heures après. Parmi les échantillons prélevés après la positivité de l'hémoculture (n = 24), 15 avaient une PCR 5,8Si positive (62,5 %), les prélèvements étaient réalisés en moyenne 36,5 heures après que le flacon d'hémoculture devienne positif.

c. Résultats des PCR spécifiques d'espèces

Concernant les 12 patients candidémiques à *C. albicans*, huit avaient au moins un échantillon positif avec la PCR spécifique de *C. albicans*. Deux patients retrouvés positifs avec la PCR 5,8Si (Ct de 35 et 39,3) avaient une PCR CALb2 négative. Le patient avec une candidémie associant *C. albicans* et *C. tropicalis* avait une PCR CALb2 positive.

Pour seulement deux patients parmi les cinq avec une candidémie à *C. glabrata*, de l'ADN était détecté à la fois avec la PCR 5,8Si et la PCR ITS2CG.

Quatre des sept patients avec une candidémie à *C. parapsilosis* avaient la PCR 5,8Si et la PCR spécifique ITS1CP positive. Deux patients étaient positifs avec la PCR 5,8Si (Ct 38 et 38,2) et négatifs avec la PCR ITS1CP.

Concernant le patient avec une association *C. glabrata* et *C. parapsilosis*, un échantillon était retrouvé positif avec les deux PCR spécifiques ITS2CG et ITS1CP et un autre uniquement avec ITS2CG.

Comme attendu, les PCR spécifiques testées étaient négatives pour les trois patients avec des candidémies à *C. tropicalis* et *C. sphaerica*.

Tableau 6. Résultats des PCR pan-*Candida* (5,8Si) et spécifiques de *C. albicans* (CALb2), *C. glabrata* (ITS2CG) et *C. parapsilosis* (ITS1CP) réalisés dans les sérums de 29 patients candidémiques (Ct : cycle threshold)

Patient	Hémoculture		Délai entre prélèvement sérum et hémoculture	Résultats PCR			
	Identification	Temps de pousse hémoculture		PCR 5,8Si	PCR CALb2	PCR ITS2CG	PCR ITS1CP
P1	<i>C. albicans</i>	28 h	+ 40 h	positive (Ct 29,4) 3/3	positive (Ct 30,3) 3/3	négative	négative
P2	<i>C. albicans</i>	47 h	+ 43 h	positive (Ct 35) 1/3	négative	négative	négative
			+ 67 h	négative	négative	négative	négative
P3	<i>C. albicans</i>	30 h	- 1 h	négative	négative	négative	négative
			+ 22 h	négative	négative	négative	négative
P4	<i>C. albicans</i>	31 h	+ 62 h	positive (Ct 32,9) 3/3	positive (Ct 34) 3/3	négative	négative
			+ 86 h	positive (Ct 36,5) 2/3	négative	négative	négative
P5	<i>C. albicans</i>	33 h	+ 28 h	positive (Ct 35,3) 3/3	positive (Ct 35,5) 3/3	négative	négative
			+ 39 h	positive (Ct 32,3) 3/3	positive (Ct 34) 3/3	négative	négative
P6	<i>C. albicans</i>	22 h	0 h	positive (Ct 34) 2/3	positive (Ct 35,2) 3/3	négative	négative
			+ 43 h	négative	négative	négative	négative
P7	<i>C. albicans</i>	28 h	+ 10 h	négative	négative	négative	négative
			+ 21 h	négative	négative	négative	négative
P8	<i>C. albicans</i>	37 h	0 h	positive (Ct 34,2) 3/3	positive (Ct 33,7) 3/3	négative	négative
			+ 44 h	positive (Ct 34) 2/3	positive (Ct 34) 2/3	négative	négative
P9	<i>C. albicans</i>	46 h	0 h	positive (Ct 39,3) 1/3	négative	négative	négative
P10	<i>C. albicans</i>	13 h	0 h	positive (Ct 32,7) 3/3	positive (Ct 32,6) 3/3	négative	négative
P11	<i>C. albicans</i>	22 h	+ 72 h	positive (Ct 29,1) 3/3	positive (Ct 29,1) 3/3	négative	négative
P12	<i>C. albicans</i>	17 h	0 h	positive (Ct 33,4) 3/3	positive (Ct 32,4) 3/3	négative	négative
P13	<i>C. albicans + C. tropicalis</i>	27 h	+ 12 h	positive (Ct 27,4) 3/3	positive (Ct 35) 1/3	négative	négative
			+ 24 h	positive (Ct 20) 3/3	positive (Ct 21) 3/3	négative	négative
P14	<i>C. glabrata</i>	35 h	+ 66 h	négative	négative	négative	négative
			+ 90 h	négative	négative	négative	négative

P15	<i>C. glabrata</i>	77 h	+ 86 h	négative	négative	négative	négative
P16	<i>C. glabrata</i>	47 h	+ 46 h	positive (Ct 32) 3/3	négative	positive (Ct 34,9) 2/3	négative
			+ 94 h	négative	négative	négative	négative
P17	<i>C. glabrata</i>	38 h	0 h	positive (Ct 32) 3/3	négative	positive (Ct 35,3) 1/3	négative
			+ 12 h	positive (Ct 33,6) 1/3	négative	positive (Ct 36) 1/3	négative
P18	<i>C. glabrata</i>	19 h	+ 3 h	négative	négative	négative	négative
			+ 20 h	négative	négative	négative	négative
P19	<i>C. glabrata</i> + <i>C. parapsilosis</i>	21 h	+ 58 h	négative	négative	négative	négative
			+ 106 h	positive (Ct 32,7) 2/3	négative	positive (Ct 32,7) 1/3	positive (Ct 36,5) 1/3
			+ 130 h	positive (Ct 36,9) 1/3	négative	positive (Ct 31) 2/3	négative
P20	<i>C. parapsilosis</i>	33 h	0 h	positive (Ct 34) 2/3	négative	négative	positive (Ct 35,3) 3/3
			+ 24 h	positive (Ct 35) 2/3	négative	négative	positive (Ct 36) 2/3
			+ 48 h	positive (Ct 35) 2/3	négative	négative	positive (Ct 36,6) 1/3
P21	<i>C. parapsilosis</i>	30 h	- 36 h	positive (Ct 35) 1/3	négative	négative	positive (Ct 36,9) 1/3
P22	<i>C. parapsilosis</i>	37 h	+ 52 h	positive (Ct 32,2) 3/3	négative	négative	positive (Ct 31,1) 3/3
			+ 83 h	positive (Ct 38,2) 1/3	négative	négative	positive (Ct 36,2) 1/3
			+ 86 h	positive (Ct 37,1) 1/3	négative	négative	positive (Ct 36,3) 1/3
P23	<i>C. parapsilosis</i>	70 h	+ 96 h	positive (Ct 38) 1/3	négative	négative	négative
P24	<i>C. parapsilosis</i>	31 h	+ 34 h	négative	négative	négative	négative
P25	<i>C. parapsilosis</i>	52 h	+ 24 h	positive (Ct 38,2) 1/3	négative	négative	négative
P26	<i>C. parapsilosis</i>	48 h	+ 24 h	positive (Ct 37,9) 1/3	négative	négative	positive (Ct 36) 1/3
P27	<i>C. tropicalis</i>	14 h	+ 20 h	positive (Ct 30) 3/3	négative	négative	négative
P28	<i>C. tropicalis</i>	12 h	+ 47 h	positive (Ct 38,5) 1/3	négative	négative	négative
P29	<i>C. sphaerica</i>	22 h	+ 21 h	positive (Ct 30) 3/3	négative	négative	négative

DISCUSSION

L'objectif de notre étude était de mettre au point des PCR en temps réel pour la détection de *Candida* sp. au cours des candidémies.

1. Choix de l'échantillon

Les données concernant la cinétique de circulation des levures dans le sang ou de relargage d'ADN de *Candida* sp. au cours des candidémies sont limitées. La fraction de sang à utiliser semble dépendre de l'origine de l'ADN que l'on veut détecter. Il est communément admis que les levures sont éliminées lors de la centrifugation, la réalisation de PCR sur le plasma ou sérum permet alors la détection de l'ADN libre (la formation du caillot lors de prélèvements dans des tubes sans anticoagulant peut également concourir à l'élimination des levures) (Bougnoux *et al.*, 1999; Kasai *et al.*, 2006). De l'ADN libre et intracellulaire est retrouvé dans le sang total. Toutefois, lors des étapes de lyse et lavage des cellules sanguines nécessaires à l'extraction, l'ADN libre est éliminé, seul l'ADN intracellulaire est alors disponible pour les PCR réalisées sur le sang total.

Dans la littérature, les différentes fractions ont été étudiées (sang total, plasma, sérum) mais les données concernant la supériorité d'une fraction sont limitées et contradictoires. Les PCR revues dans la méta-analyse de Avni *et al.* présentant les meilleures performances étaient celles réalisées à partir de sang total (Avni *et al.*, 2011). A l'inverse, d'autres études ont montré une supériorité du sérum ou plasma par rapport au sang total. Une comparaison des fractions sanguines prélevées simultanément chez des patients non neutropéniques candidémiques retrouve une supériorité du sérum par rapport au sang total (Metwally 2008b). D'autres auteurs confirment ce résultat, avec 57 % de PCR positives dans le plasma vs 14 % dans le sang total (Nguyen *et al.*, 2012), et 71, 75 et 54 % de PCR positives respectivement dans le sérum, le plasma et le sang total (Lau *et al.*, 2010). Sur un modèle animal de candidémie, la sensibilité sur le sérum était de 93 % vs 86 % pour le sang total (différence non significative), toutefois la fraction sérum a été recommandée en raison d'une clairance plus lente de l'ADN libre (Bougnoux *et al.*, 1999). Il a également été démontré que l'ADN libre était stable au moins 72 heures dans le plasma (Kasai *et al.*, 2006). L'extraction à partir de sérum ou de plasma présente l'avantage d'être plus rapide, de ne pas nécessiter toutes les étapes de lyse des hématies et leucocytes, et ces fractions contiennent moins d'inhibiteurs de PCR.

Dans l'ensemble, les comparaisons sont extrêmement complexes en raison d'une importante variabilité des protocoles d'extraction et des volumes d'échantillons à prétraiter et extraire. Ce dernier élément semble déterminant. Une meilleure sensibilité a été obtenue en partant de 5 mL vs 1 mL de sang total, avec deux systèmes Polaris et MolYsis permettant de lyser les cellules humaines

et fongiques, et de dégrader l'ADN humain (Loonen *et al.*, 2013). Il faut également être prudent sur l'interprétation des sensibilités comparant les types d'échantillons car les volumes de départ peuvent être très différents, par exemple, Innings *et al.* a montré une supériorité du sang total mais dans son étude, l'extraction était faite à partir de 3 à 4 mL de sang total vs 400 µL de plasma (Innings *et al.*, 2007). La quantité circulante de levures étant faible, l'utilisation d'un volume important d'échantillon devrait permettre d'améliorer la sensibilité, comme observé dans des études réalisées sur l'extraction d'*Aspergillus* sp. (Suarez *et al.*, 2008; White *et al.*, 2011; Loeffler *et al.*, 2015).

Dans notre étude, nous avons travaillé sur le sérum car il s'agissait de la fraction dont nous disposions pour réaliser des tests et des données de la littérature montraient une supériorité de cette fraction. Dans des résultats préliminaires non présentés, nous avons confirmé l'élimination d'une grande majorité des levures lors de la centrifugation du tube sec, comme décrit dans la littérature. Toutefois, une présence de levures dans le sérum était observée pour de fortes concentrations, elle était aléatoire pour de faibles concentrations. Ainsi, nous avons choisi d'utiliser tout de même une extraction pouvant lyser la paroi fongique même si les levures sont principalement éliminées lors de l'étape de formation de caillot ou de centrifugation. L'intérêt de travailler sur des volumes initiaux plus importants a été montré mais ceci était incompatible avec l'automate que nous avons utilisé.

2. Prétraitement et extraction.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus sur les techniques d'extraction à utiliser. Idéalement, la méthode d'extraction doit avoir un bon rendement, être adaptée à une utilisation en routine, être rapide, facile à réaliser, et si possible commune à plusieurs pathogènes. En raison de la charge fongique souvent faible dans le sang des patients candidémiques, il est nécessaire d'avoir une méthode d'extraction efficace afin de limiter le risque de faux négatifs. L'efficacité dépend du protocole d'extraction, du type et de la quantité d'échantillon mais également du nombre de cellules fongiques.

Pour l'extraction d'ADN à partir des cellules fongiques, un prétraitement de lyse de la paroi est nécessaire. Il s'agit d'une étape complexe en raison de la présence d'une paroi fongique peptidopolysidique épaisse. Ce prétraitement peut être enzymatique ou mécanique. Pour la lyse enzymatique, plusieurs enzymes ont montré leur efficacité : protéinase K, zymolyase et lyticase (Casanova and Chaffin, 1991; Goldschmidt *et al.*, 2014). Cette dernière est une enzyme produite par une bactérie, *Arthrobacter luteus*, capable d'hydrolyser les liaisons poly-β-(1-3)-glucose et de générer

des sphéroplastes (Scott and Schekman, 1980). Cette lyse enzymatique de la paroi fongique est communément intégrée aux protocoles d'extraction décrits, la lyticase étant l'enzyme la plus utilisée (Loeffler *et al.*, 2000; Maaroufi *et al.*, 2003; Pryce *et al.*, 2003; Tirodker *et al.*, 2003; White *et al.*, 2003; Dunyach *et al.*, 2008; Metwally *et al.*, 2008a). Dans notre travail, l'utilisation de la lyticase (non recombinante) a été problématique. En effet, nous avons prouvé qu'elle était « contaminée » par *S. cerevisiae* lors de sa production. La contamination de la zymolyase par *Saccharomyces* sp. avait été précédemment décrite (Loeffler *et al.*, 1999; Rimek *et al.*, 1999) ainsi qu'une contamination de la lyticase par de l'ADN fongique avec une origine non spécifiée (Loeffler *et al.*, 1999). Il est donc indispensable de tester en amont l'ensemble des réactifs, particulièrement en cas d'utilisation de PCR panfongiques. L'utilisation d'enzymes recombinantes peut être une alternative, toutefois la lyticase recombinante n'était plus disponible. Ainsi, dans notre étude, malgré l'efficacité démontrée de la lyticase, nous avons été contraints d'abandonner son utilisation au profit de la protéinase K. La lyse mécanique à l'aide de microsphères (billes, verre) est une alternative pour l'extraction d'ADN à partir de levures (Jeddi *et al.*, 2013). Ici, l'utilisation de billes de céramique avec le MagNALyser n'a pas permis d'améliorer l'efficacité de la lyse.

Les protocoles d'extraction d'ADN publiés sont nombreux et divergents selon l'échantillon de départ (sérum, plasma ou sang total). L'extraction sur sang total est souvent longue car elle associe plusieurs étapes de lyse (des globules rouges, des leucocytes et pour finir de la paroi fongique) (Einsele *et al.*, 1997; Löffler *et al.*, 1997; Maaroufi *et al.*, 2003). Ces étapes sont destinées à réduire le risque d'inhibition des PCR en éliminant l'hémoglobine érythrocytaire et diminuant le fort taux d'ADN humain. L'extraction sur sérum ou plasma est moins complexe et plus rapide (Maaroufi *et al.*, 2003; Dunyach *et al.*, 2008; McMullan *et al.*, 2008).

Depuis une quinzaine d'années, les extractions commerciales ont supplanté les extractions conventionnelles (Loeffler *et al.*, 2000; Maaroufi *et al.*, 2003; Pryce *et al.*, 2003; Alam *et al.*, 2007; Innings *et al.*, 2007; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2007; McMullan *et al.*, 2008; Metwally *et al.*, 2008a; Fricke *et al.*, 2010). Des comparaisons des techniques conventionnelles vs des kits commerciaux ont montré que les kits avaient des performances différentes entre eux mais similaires aux techniques conventionnelles (sensibilités allant de 10 à 1000 CFU/mL) (Löffler *et al.*, 1997; Maaroufi *et al.*, 2004; Metwally *et al.*, 2008a). Les extractions sur automate se développent également et sont idéales pour un usage quotidien en raison de leur rapidité (Klingspor and Jalal, 2006; Lau *et al.*, 2010; Goldschmidt *et al.*, 2014). Un inconvénient des systèmes automatisés est le volume de prise d'essai d'échantillon qui peut être limité selon les automates, par exemple il est de 200 µL pour l'automate Biorobot® EZ1 (Qiagen) que nous avons utilisé dans notre étude. Nous avons choisi d'utiliser un extracteur

automatique en raison de sa simplicité d'utilisation et de la possibilité d'extraction en série des échantillons.

Nous avons utilisé du RNA carrier dans le protocole d'extraction et obtenu de meilleurs résultats (gain de 3,7 Ct) sur les extraits pour lesquels du RNA carrier a été rajouté. L'intérêt du RNA carrier, également utilisé par d'autres équipes (McMullan *et al.*, 2008; Metwally *et al.*, 2008a), a été démontré avec le système Biorobot® EZ1, il permet une meilleure récupération de l'ADN (Kishore *et al.*, 2006).

Dans notre travail, nous avons déterminé la limite de détection du couple extraction/PCR à l'aide d'une gamme d'ADN ajoutée dans de l'eau ou du sérum. La LOD obtenue pour le couple extraction/PCR était environ dix fois supérieure à la LOD de la PCR seule. Cette donnée témoigne d'une efficacité d'extraction non optimale (perte d'ADN au cours du protocole). Un autre problème est la reproductibilité de l'extraction sur des échantillons contenant de faibles concentrations de levures (10 CFU/mL) (Schell *et al.*, 2012).

Au total, lors des tests initiaux de lyse de la paroi fongique, nous avons observé la contamination de la lyticase par *S. cerevisiae*. Etant donné l'absence de disponibilité de lyticase recombinante et l'utilisation d'une PCR pan-*Candida* amplifiant ce champignon, nous avons utilisé, à la place, de la protéinase K dont l'efficacité avait été démontrée dans la littérature. Ce travail préliminaire possède toutefois des limites. Nous n'avons pas utilisé de contrôle interne lors de l'extraction. Nous n'avons pas testé un volume d'élution inférieur (50 µL) en raison de la volonté de tester plusieurs PCR avec trois réplicats à partir d'un échantillon strictement identique. La limite de détection du couple extraction/PCR, inférieure à la celle de la PCR, témoigne d'une extraction non optimale. De plus, l'utilisation de l'automate Biorobot® EZ1 (Qiagen) limite la prise d'essai à 200 µL mais l'utilisation de RNA carrier s'est révélée intéressante pour accroître la quantité d'ADN récupérée. Les efforts doivent se porter sur cette étape qui est cruciale. Le choix d'un automate permettant de travailler avec des volumes initiaux supérieurs semble indispensable.

3. PCR

Dans notre étude, nous avons testé uniquement des PCR en temps réel, méthodes de choix pour une mise en place en routine. Nous avons choisi de développer une PCR pan-*Candida* ainsi que trois PCR spécifiques d'espèces ciblant les trois espèces responsables de 83 % des candidémies dans notre centre : *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*. Notre objectif était en effet d'utiliser la PCR pan-*Candida* en dépistage puis de réaliser une identification de l'espèce responsable à l'aide des PCR

spécifiques. La cible choisie était l'ADNr présent en multicopies. Cette cible, très fréquemment utilisée dans les études (Wellingshausen *et al.*, 2009; Fricke *et al.*, 2010; Lau *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2012), est celle présentant la meilleure sensibilité d'après une méta-analyse (Avni *et al.*, 2011). Nous avons choisi d'utiliser soit une détection à l'aide d'un agent intercalant soit une détection par des sondes spécifiques. Lors de l'évaluation des performances, la PCR pan-*Candida* avec sonde possédait une sensibilité identique à celle avec un intercalant mais une efficacité inférieure et elle n'amplifiait pas *C. krusei* ; la PCR spécifique de *C. albicans* avec sonde possédait une sensibilité inférieure à celle avec un intercalant. Pour ces raisons, ces PCR avec sondes n'ont pas été sélectionnées par la suite. Toutefois, l'utilisation de PCR avec révélation par intercalant peut poser des soucis (détection de fluorescences non spécifiques). Différentes optimisations ont donc été réalisées de manière à réduire les signaux non spécifiques (concentrations en amorces, mix de PCR et programme de PCR avec les dix premiers cycles d'amplification à 65 °C). Les quatre PCR sélectionnées présentaient l'avantage de travailler la même température d'hybridation/élongation.

De manière générale, l'utilisation de PCR amplifiant plusieurs espèces ou de PCR panfongiques nécessite une grande rigueur pour limiter les risques de contamination. Il est absolument nécessaire de tester l'ensemble des réactifs utilisés lors du prétraitement, de l'extraction et de la PCR. L'extraction d'un témoin négatif (eau) en parallèle de l'extraction des échantillons permet de vérifier l'absence de contamination du système. La PCR que nous avons utilisé n'amplifie pas l'ADN d'*Aspergillus* sp., ce qui limite le risque de contamination lié à des spores présentes dans l'air.

Finalement, les PCR sélectionnées présentaient des très bonnes efficacités et des sensibilités techniques similaires à celles de la littérature (Pryce *et al.*, 2003; Innings *et al.*, 2007; Dunyach *et al.*, 2008; Fricke *et al.*, 2010). Les sensibilités sont cependant inférieures lorsque l'on teste le couple extraction/PCR, ce qui rend compte de l'importance de la qualité de l'extraction.

Dans la littérature, la limite de détection varie de 1 à 200 CFU/mL, une limite de détection inférieure ou égale à 10 CFU/mL semble optimale pour obtenir la meilleure sensibilité analytique (revue dans Avni *et al.*, 2011).

Après une étape de mise au point et d'évaluation, nous avons testé les PCR choisies sur les sérums de patients candidémiques. Malgré une extraction vraisemblablement non optimale, nous avons obtenu avec la PCR pan-*Candida* des résultats positifs pour 70,2 % des échantillons de patients avec une moyenne des Ct de 33,7 [20-39,3], ce qui témoigne d'une charge fongique faible et/ou d'une extraction pas assez efficace. Nous avons vu qu'il apparaît indispensable de tester les échantillons au moins en deux ou trois réplicats de manière à augmenter les chances de détecter les faibles concentrations d'ADN, la répétabilité étant mauvaise sur les faibles quantités (Schell *et al.*,

2012; Loeffler *et al.*, 2015). La synthèse de 54 études publiées entre 1993 et 2009 retrouvait une sensibilité analytique globale des PCR de 95 %, avec une spécificité de 92 % (Avni *et al.*, 2011). Des études plus récentes retrouvaient des performances inférieures, avec des sensibilités de 58 à 80 % et de spécificités de 70 à 97 % (Wellinghausen *et al.*, 2009; Lau *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2012). Les performances étaient parfois variables selon la population étudiée, avec une sensibilité de 100 % pour les patients de réanimation alors qu'elle n'était que de 29 % chez les patients immunodéprimés (Wellinghausen *et al.*, 2009). La moindre sensibilité des PCR par rapport aux hémocultures et les variations de performances observées dans la littérature pourraient s'expliquer par le moment de prélèvement de l'échantillon par rapport au moment du diagnostic. Une meilleure sensibilité de la PCR a été retrouvée quand le prélèvement était réalisé dans les 24 heures avant ou après celui de l'hémoculture (Lau *et al.*, 2010). Les cinétiques de circulation d'ADN ou de levures lors des candidémies restent peu connues. Des résultats négatifs de PCR lors de candidoses invasives sont en rapport avec, soit une circulation transitoire d'ADN ou de levures, soit des quantités trop faibles pour permettre leur détection. Si la sensibilité des PCR n'est pas excellente dans les dernières études publiées, l'intérêt des PCR réside dans la précocité de détection par rapport au diagnostic de la candidémie, établi par les hémocultures. Dans notre étude, parmi les prélèvements réalisés avant le diagnostic de candidémie (moment où le flacon d'hémoculture était positif), 78,3 % étaient positifs avec la PCR pan-*Candida* et en moyenne 21,5 heures (entre 1 et 66 heures) avant le diagnostic posé avec l'hémoculture. Pour d'autres auteurs, des résultats positifs de PCR étaient obtenus de un jour à quatre semaines avant le diagnostic (Wellinghausen *et al.*, 2009; Lau *et al.*, 2010; Avni *et al.*, 2011).

Dans notre stratégie, nous avons inclus la réalisation de PCR spécifiques d'espèces. Sur les sérums testés, elles ont montré des sensibilités légèrement inférieures à la PCR pan-*Candida*, l'identification réalisée était toutefois parfaitement concordante avec l'espèce isolée dans le flacon d'hémoculture.

Au final, nous avons sélectionné quatre PCR en temps réel avec révélation par un intercalant (une pan-*Candida* et trois spécifiques d'espèces *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*) qui présentent de bonnes efficacités et sensibilités. Appliquée à une réalité de terrain, la stratégie établie permettait un diagnostic plus précoce que l'hémoculture dans 78,3 % des cas et une identification de l'espèce dans 60,9 % des cas. Ceci concourt à une amélioration de la prise en charge thérapeutique des candidémies. A l'heure d'aujourd'hui, la PCR ne peut pas remplacer les hémocultures mais complète les examens biologiques à mettre en œuvre. Il reste cependant à évaluer la stratégie dans une étude prospective chez les patients non neutropéniques de réanimation, de vérifier l'impact sur la prise en charge et la mortalité. Une étude chez les patients colonisés à *Candida* sp. semble également indispensable.

4. Nouvelles techniques

Au cours des dernières années, les enjeux du diagnostic précoce des candidémies et autres septicémies ont conduit de nombreuses sociétés à développer des kits commerciaux de PCR multiplexes détectant à la fois des bactéries et des champignons : LightCycler® Septifast Test (Roche), SepsiT^{est}[™]-UMD (Molz^{ym}), MagicPlex[™] Sepsis Realtime Test (Seegene), VYOO[™] Sepsis Test (SIRS-Lab GmbH). L'innovation a aussi consisté en deux nouvelles technologies : une PCR associée à la résonance magnétique T2 (T2Candida, T2Biosystems) et une PCR associée la spectrométrie de masse (IRIDICA BAC BSI Assay, Abott).

Les caractéristiques de ces kits commerciaux sont présentées dans le tableau 7. Ils permettent, à partir de 1 à 5 mL de sang total, de rendre un résultat entre 3-4 à 8 heures, avec une limite de détection variant de 1 à 100 CFU/mL. Certains kits détectent uniquement cinq espèces de *Candida* sp. alors que d'autres identifient plus de 65 champignons et jusqu'à 780 bactéries ! Ces trousse^s commerciales détectent en moyenne deux fois plus de germes que les hémocultures (Bloos *et al.*, 2012; Vincent *et al.*, 2015; Metzgar *et al.*, 2016; Nieman *et al.*, 2016; Ziegler *et al.*, 2016). Elles sont toutefois caractérisées, en comparaison avec les hémocultures, par une sensibilité de médiocre à bonne, la spécificité restant relativement bonne. Elles ne détectent pas l'ensemble des germes identifiés par hémoculture, probablement en raison d'un volume de sang total analysé inférieur à celui des hémocultures, de plus des trousse^s ciblent uniquement certaines espèces. Pour ces raisons, elles ne sont donc utilisables qu'en complément des hémocultures. Elles sont présentées comme permettant un diagnostic rapide par rapport aux hémocultures mais nécessitent pour la plupart de nombreuses étapes et ne peuvent être utilisables qu'en semaine par un personnel formé spécifiquement.

Tableau 7. Caractéristiques des PCR multiplexes et nouvelles technologies de PCR. CA : *C. albicans*, CT : *C. tropicalis*, CG : *C. glabrata*, CP : *C. parapsilosis*, CK : *C. krusei*, Af : *Aspergillus fumigatus*, Se : sensibilité, Sp : spécificité, VPP : valeur prédictive positive, VPN : valeur prédictive négative, ESI MS : electrospray ionization-mass spectrometry.

Références : (1) Lehmann *et al.*, 2008, (2) Wallet *et al.*, 2010, (3) Lucignano *et al.*, 2011, (4) Stevenson *et al.*, 2016, (5) Nieman *et al.*, 2016, (6) Ziegler *et al.*, 2016, (7) Bloos *et al.*, 2012, (8) Pfaller *et al.*, 2016, (9) Neely *et al.*, 2013, (10) Mylonakis *et al.*, 2015, (11) Beyda *et al.*, 2013 (12) Bacconi *et al.*, 2014, (13) Metzgar *et al.*, 2013, (14) Metzgar *et al.*, 2016, (15) Vincent *et al.*, 2015, (16) Desmet *et al.*, 2016

Trousse commerciale	Limite de détection	Performances par rapport aux hémocultures	Volume de sang total	Durée
LightCycler Septifast Test (Roche) (CE-IVD)				
PCR multiplexe Détection 19 bactéries, 5 levures (CA, CT, CG, CP, CK) et Af	3-100 CFU/mL 30 CFU/mL pour <i>Candida</i> (CG 100 CFU/mL) (1)	(2) Se 40 % Sp 88 % VPP 27 % VPN 93 % (3) Se 85 % Sp 93,5 % VPP 69,2 % VPN 98,2 %	1,5 mL	6 h
SeptiTest-UMD (Molzym) (CE-IVD)				
PCR (16S ou 18S) suivie de séquençage pour l'identification Détection 200 bactéries et 65 champignons	10-80 CFU/mL (4)	(4) méta-analyse : Se 48 % Sp 86 % (5) Se 33 % Sp 83 %	1 mL	4 h (hors séquençage)
MagicPlex Sepsis RealTime Test (Seegene) (CE-IVD)				
PCR multiplexe Détection 90 pathogènes dont 5 levures (CA, CT, CG, CP, CK), Af et 3 marqueurs de résistance bactérienne	30 CFU/mL (6)	(6) Se 47 % Sp 66 % VPP 23 % VPN 87 %	1 mL	3 h (hors extraction)
VYOO Sepsis Test (SRIS-Lab GmbH)				
PCR multiplexe Détection 34 bactéries, 6 champignons et 5 gènes de résistance bactérienne	non déterminée	(7) Se 60 % Sp 75 %	5 mL	8 h

T2Candida (T2Biosystems)

PCR (région ITS2) associée à la technologie de résonance magnétique T2 pour la détection des amplicons (8) Détection 5 <i>Candida</i> : CA/CT, CG/CK et CP <i>NB: travail sur le tube primaire</i>	1 - 3 CFU/mL (9, 10)	(11) Se 100 % Sp 97,8 % (sur échantillons reconstitués entre 3 et 11 CFU/mL)	2 mL	3-4 h
--	----------------------	--	------	-------

IRIDICA BAC BSI Assay (Abott) (CE-IVD)

PCR/ESI MS : PCR associée à la spectrométrie de masse pour la détection et identification des amplicons Détection 780 bactéries et <i>Candida</i> sp. + 4 gènes de résistance bactérienne	4-80 CFU/mL (12, 13, 14)	(12) Se 83 % Sp 94 % (15) patients de réanimation avec sepsis : Se 81 %, Sp 69 %, VPN 97 % (16) patients neutropéniques fébriles : Se 45 %, Sp 94 %, VPN 80 % (4) méta-analyse : Se 81 % Sp 84 %	5 mL	7 h
--	--------------------------	---	------	-----

Pour conclure, la biologie moléculaire est largement utilisée pour le diagnostic des maladies infectieuses, notamment en virologie. Elle reste toutefois un challenge technique pour le diagnostic des IFI. Une des principales difficultés du développement de cette technique est la faible quantité circulante de levures, qui est généralement inférieure ou proche de la limite de détection des PCR (médiane de 1 CFU/mL dans le sang des patients candidémiques vs LOD des PCR de 1 à 200 CFU/mL) (Pfeiffer *et al.*, 2011). Nous avons vu que l'étape d'extraction est primordiale et c'est sur cette étape que les recherches doivent se focaliser. A l'heure actuelle, aucun protocole standard n'est disponible et aucun consensus n'existe sur la fraction à utiliser ce qui rend les comparaisons difficiles entre les études. Il est probable que l'utilisation combinée de sérum et de sang total soit un bon choix, même si cela augmente le coût. Quoiqu'il en soit, l'optimisation des performances techniques des PCR doit se baser sur le guide technique MIQE « Minimum Information for the publication of real-time Quantitative PCR Experiments » (Bustin *et al.*, 2009). En l'absence de standardisation des techniques et d'essais prospectifs multicentriques, les PCR ne font actuellement pas partie des recommandations dans le diagnostic des candidoses invasives. De plus, des données sur les performances des PCR chez les patients colonisés et les patients sous traitement antifongique demeurent limitées.

Finalement, même si les performances des PCR en temps réel ne sont pas excellentes pour le diagnostic des candidoses invasives, elles sont toutefois plus spécifiques que les biomarqueurs et peuvent permettre, selon le type de PCR utilisée, l'identification de l'espèce impliquée. Elles présentent également l'avantage de pouvoir rendre un résultat rapide. Ceci est intéressant car il a été démontré qu'un retard d'instauration du traitement antifongique de 12 à 24 heures augmentait significativement les taux de mortalité des candidémies (Morrell *et al.*, 2005; Garey *et al.*, 2006).

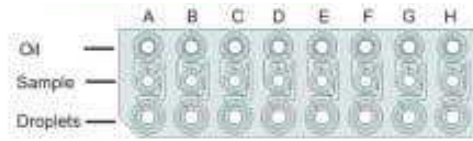
B) Évaluation de la technologie droplet digital PCR

INTRODUCTION

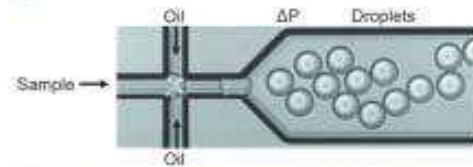
Une nouvelle technique de PCR récemment développée, la digital PCR, est présentée comme une alternative aux PCR en temps réel. Son principe consiste à séparer l'échantillon en des milliers de partitions. Dans chaque partition, la réaction de PCR se fait avec une mesure de la fluorescence en point final. Les résultats sont exprimés par rapport au nombre de partitions dans lesquelles la séquence cible amplifiée est détectée (partition considérée comme positive) et au nombre de partitions dans lesquelles il n'y a pas d'amplification (partition considérée comme négative). La loi de Poisson appliquée à la fraction des partitions positives permet d'estimer la quantité initiale de cibles présentes dans l'échantillon de départ (Huggett *et al.*, 2013). Plusieurs systèmes utilisent cette technologie dont le système Droplet Digital PCR (ddPCR) proposé par Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). Ce système, dont les étapes sont présentées dans la figure 1, utilise une émulsion eau-huile pour partitionner l'échantillon en 20 000 gouttelettes. La ddPCR a été principalement utilisée dans le domaine de l'oncologie où les sensibilités se sont avérées supérieures à celles des PCR en temps réel (Diehl and Diaz, 2007; Sanders *et al.*, 2011; Whale *et al.*, 2012). De plus, elle permet une quantification absolue de l'ADN sans la nécessité d'une courbe d'étalonnage (Hindson *et al.*, 2011).

Etant donné que les données concernant son utilisation dans le domaine de l'infectiologie sont limitées, nous avons choisi d'évaluer cette technologie en comparaison à une PCR en temps réel (qPCR), le but principal était de voir si la ddPCR apportait un gain de sensibilité. Pour comparer ces deux technologies (ddPCR et qPCR), l'utilisation d'amorces identiques était un prérequis. Nous avons sélectionné une PCR spécifique de *C. albicans* avec une révélation par sonde de manière à avoir une meilleure spécificité. Les tests ont été réalisés tout d'abord avec de l'ADN génomique de *C. albicans* puis sur des échantillons de patients ayant présenté une candidémie.

Etape 1 : Dépôt des échantillons et de l'huile dans le système de génération des gouttelettes



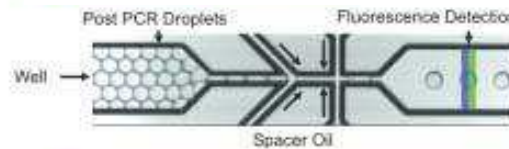
Etape 2 : Génération des gouttelettes



Etape 3 : Transfert des gouttelettes dans une plaque de PCR 96 puits

Etape 4 : Réaction de PCR en point final

Etape 5 : Lecture de la fluorescence des gouttelettes



Etape 6 : Application du seuil et calcul des concentrations

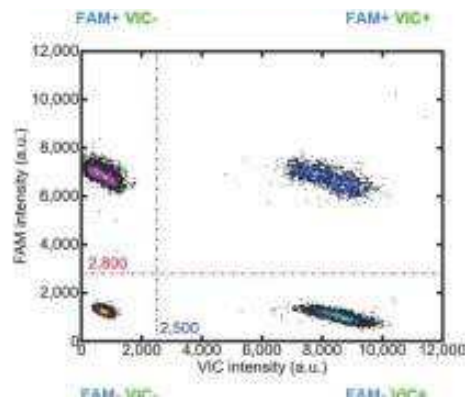


Figure 1. Présentation des étapes de la ddPCR avec le système Bio-Rad (d'après Hindson *et al.*, 2011)

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Echantillons

Onze patients présentant une candidémie à *C. albicans* (dont deux candidémies avec une association *C. albicans/C. tropicalis*, *C. albicans/C. lusitanae*), 17 patients présentant des candidémies à d'autres espèces (huit avec *C. glabrata*, six avec *C. parapsilosis*, un avec *C. tropicalis*, un avec *C. sphaerica* et un avec une association *C. glabrata/C. parapsilosis*) ainsi que 32 témoins (volontaires sains) ont été inclus dans l'étude. Au total, 65 sérums ainsi que 19 échantillons de sang total provenant de fond de tubes ont été testés. Les échantillons étaient conservés à -20°C avant extraction.

2. Hémo-cultures : cf. paragraphe 2 de la partie Matériel et Méthodes du chapitre PCR (Partie 3, A)

3. Extraction d'ADN

Pour les sérums, un millilitre de sérum a été préalablement centrifugé 10 min à 5000 g et 800 µL de surnageant ont été retirés. Les 200 µL de sérums restants ou 200 µL de sang total ont été incubés avec 20 µL de PK (Qiagen) pendant 2 h à 56 °C. Après ajout de 5 µL de RNA carrier (Qiagen), l'extraction d'ADN a été réalisée sur l'automate Biorobot® EZ1 avec le kit EZ1 DNA Tissue (Qiagen), en suivant les recommandations du fournisseur. Le volume d'élution était de 100 µL.

4. PCR

Les mêmes amorces et sonde ont été utilisées pour la qPCR et la ddPCR : ITS2CAF, ITS4-R et sonde SA1bITS2 (cf. tableau 1 de la partie Matériel et Méthodes du chapitre PCR (Partie 3, A). La région amplifiée était la région ITS2 (et une petite portion de la région 28S) de *C. albicans*.

a. PCR en temps réel : pour la description de la PCR, se reporter au paragraphe 5 de la partie Matériel et Méthodes du chapitre PCR (Partie 3, A)

b. Digital PCR

Le mix réactionnel était composé des amorces à 900 nM, de la sonde à 250 nM, de 10 µL de ddPCR Supermix for residual DNA quantification (Bio-Rad) et de 5 µL d'extrait. Après préparation du mix, les gouttelettes ont été générées avec le QX200 Droplet Generator (Bio-Rad) puis transférées dans une plaque de PCR 96 puits. L'amplification a été faite avec le thermocycler C1000 Touch™ (Bio-Rad), avec le programme suivant : 95 °C 10 min, 40 cycles de dénaturation (94 °C 30 s) et hybridation/élongation (60 °C 60 s) avec une rampe de 2 °C/s, puis 98 °C 10 min. Après l'amplification, la plaque a été chargée sur le lecteur QX200 Droplet Reader (Bio-Rad). L'analyse de la fluorescence des gouttelettes a été faite avec le logiciel QuantaSoft Software (Bio-Rad). Les ddPCR ont été réalisées en duplicate. Un contrôle positif et un contrôle négatif ont été ajoutés à chaque manipulation. Seules les réactions avec plus de 10 000 gouttelettes générées sont utilisées pour l'analyse. Les seuils d'interprétation entre les gouttelettes positives et négatives ont été ajustés manuellement.

c. Efficacité et LOD des PCR : pour le principe, se reporter au paragraphe 7 de la partie Matériel et Méthodes du chapitre PCR (Partie 3, A)

5. Calcul de la concordance entre la qPCR et la ddPCR

La concordance entre les deux PCR (pour les résultats sous forme qualitative « PCR positive » ou « PCR négative ») a été évaluée par le coefficient kappa de concordance. Elle a été jugée comme bonne si le coefficient kappa est supérieur à 0,6, excellente si le coefficient kappa est supérieur à 0,8 et comme modérée si le kappa est supérieur à 0,4.

RÉSULTATS

1. Performances des PCR

Les efficacités de la qPCR et de la ddPCR étaient respectivement de 100 % et 101,6 %, avec une très bonne linéarité (respectivement $R^2 = 0,992$ et $R^2 = 0,999$). La LOD, déterminée avec de l'ADN génomique purifié de *C. albicans*, était de 50 fg soit 1,47 équivalent génomes pour la qPCR et de 100 fg soit 2,94 équivalent génomes pour la ddPCR. Pour la ddPCR, qui est une technique permettant une quantification absolue, une saturation a été observée pour de fortes concentrations (> 100 pg soit > 2940 équivalent génomes), ne permettant pas une quantification des fortes concentrations.

2. Résultats des qPCR et ddPCR sur les échantillons de patients

Pour les 11 patients candidémiques à *C. albicans*, les délais de positivité des flacons d'hémoculture étaient compris entre 19 et 47 heures (moyenne de 29,8 heures).

a. résultats de la qPCR

Pour les 11 patients avec une candidémie à *C. albicans*, 26 échantillons ont été testés, six avaient une qPCR positive (quatre sangs totaux et deux sérums correspondant à six patients différents). Les Ct obtenus variaient de 21 à 39,5. Pour les patients présentant une candidémie à une espèce non *albicans*, les 26 échantillons testés étaient négatifs.

b. résultats de la ddPCR

Des témoins négatifs ont été testés en ddPCR pour vérifier l'absence de détection de gouttelettes positives. Sur les 26 témoins réalisés avec de l'eau, aucune gouttelette positive n'a été détectée. Parmi 27 sérums de volontaires sains testés en duplicate : une gouttelette positive a été détectée sur un seul puits sur 54. Cinq échantillons de sang total de volontaires ont été testés en duplicate : une gouttelette positive a été détectée dans un puits sur 10. Pour les 26 échantillons de patients avec une candidémie à *Candida* non *albicans*, un puits sur 52 avait une gouttelette positive. Ainsi, pour la

suite de l'analyse, les puits présentant une seule gouttelette positive n'ont pas été interprétés comme positifs.

Concernant les patients avec une candidémie à *C. albicans*, 24 échantillons sur les 26 testés présentaient un nombre total de gouttelettes satisfaisant (supérieur à 10 000). Les résultats obtenus, présentés dans le tableau 1, retrouvaient :

- 19 échantillons négatifs ;
- deux échantillons positifs sur les deux puits (P1E2 et P2E2) : la quantification absolue observée était très différente selon les puits : 79,8 copies/puits vs 186,9 copies/puits pour le premier échantillon (P1E2) et 210 copies/puits vs 756 copies/puits pour le deuxième échantillon (P2E2) ;
- deux échantillons avec seulement un puits positif sur deux (P5E1 et P9E4) : dans les deux cas, quatre gouttelettes positives étaient observées dans un puits vs une gouttelette positive dans l'autre puits (puits considéré négatif) ; la quantification était de 7,35 copies/puits pour P5E1 et de 6,82 copies/puits pour P9E4 ;
- un échantillon avec un résultat douteux (P5E2) : un puits avec deux gouttelettes positives et l'autre avec une gouttelette positive, par la suite cet échantillon a été considéré négatif.

Pour deux échantillons (P10E1 et P11E1), le nombre total de gouttelettes était inférieur à 10 000 rendant l'analyse difficile. Toutefois, le premier échantillon (P10E1) avait un résultat positif sur les deux puits (quantification à 11 et 19,8 copies/puits), le deuxième (P11E1) avait un résultat positif uniquement sur un puits (trois gouttelettes positives, quantification à 8,4 copies/puits).

c. comparaison qPCR et ddPCR

En prenant en compte seulement les échantillons présentant plus de 10 000 gouttelettes, la concordance entre les deux PCR est modérée (87,5 % avec un coefficient kappa à 0,55) (Tableau 2).

Parmi les résultats concordants avec les deux techniques, deux échantillons étaient positifs sur les deux puits de la ddPCR et positifs en qPCR. Le premier échantillon (P1E2) était quantifié en ddPCR à 79,8 et 186,9 copies/puits, le Ct en qPCR était de 33,2. L'autre échantillon (P2E2) était quantifié en ddPCR à 210 et 756 copies/puits, le Ct en qPCR était de 21. Le troisième échantillon positif avec les deux techniques (P5E1) avait une ddPCR positive dans un seul des deux puits (avec une quantification de 7,35 copies/puits), le Ct en qPCR était de 38,3.

Tableau 1. Résultats des PCR pour les patients avec une candidémie à *C. albicans* : qPCR (avec le Ct, cycle threshold) et ddPCR (avec le nombre de copies par puits, le nombre de gouttelettes positives, négatives et totales). La nature de l'échantillon pour la PCR, le délai de positivité de l'hémoculture ainsi que le délai entre le prélèvement de l'échantillon pour PCR et celui de l'hémoculture sont également présentés. (* : patient avec une candidémie mixte à *C. albicans* et *C. tropicalis*; ** : patient avec une candidémie mixte à *C. albicans* et *C. lusitanae*, SgT : sang total, Sr : sérum)

Patient: P Echantillon: E	Nature	Résultat qPCR	ddPCR					Délai positivité du flacon d'hémoculture	Délai entre le prélèvement de l'échantillon pour PCR et celui de l'hémoculture
			Résultat	Copies par puits	Gouttelettes positives	Gouttelettes négatives	Gouttelettes totales		
P1 E1	SgT	négative	négative	0	0	10 417	10 417	19 h	+ 55 h
				0	0	11 710	11 710		
P1 E2	SgT	positive (Ct 33,2)	positive (2/2)	79,8	41	12 810	12 851	19 h	+ 39 h
				186,9	102	13 455	13 557		
P2* E1	Sr	négative	négative	0	0	14 310	14 310	27 h	+ 12 h
				1,76	1	14 512	14 513		
P2* E2	Sr	positive (Ct 21)	positive (2/2)	210	94	10 474	10 568	27 h	+ 24 h
				756	378	11 563	11 941		
P3 E1	Sr	négative	négative	1,76	1	14 354	14 355	30 h	- 1 h
				0	0	9112	9112		
P3 E2	Sr	négative	négative	0	0	13 753	13 753	30 h	+ 22 h
				0	0	14 599	14 599		
P4 E1	SgT	positive (Ct 39,5)	négative	0	0	13 824	13 824	22 h	0 h
				0	0	16 085	16 085		
P4 E2	Sr	négative	négative	0	0	14 379	14 379	22 h	0 h
				0	0	12 902	12 902		
P4 E3	Sr	négative	négative	0	0	17 234	17 234	22 h	+ 43 h
				1,89	1	12 904	12 905		
P4 E4	SgT	négative	négative	0	0	15 206	15 206	22 h	+ 66 h
				0	0	10 271	10 271		
P5** E1	SgT	positive (Ct 38,3)	positive (1/2)	1,47	1	15 692	15 693	19 h	+ 46 h
				7,35	4	13 412	13 416		

P5** E2	SgT	négative	douteux (1/2)	3,3	2	15 911	15 913	19 h	+ 72 h
				1,76	1	14 947	14 948		
P6 E1	Sr	négative	négative	0	0	12 790	12 790	31 h	+ 62 h
				0	0	10 017	10 017		
P6 E2	Sr	négative	négative	0	0	15 272	15 272	31 h	+ 86 h
				0	0	13 277	13 277		
P7 E1	Sr	négative	négative	0	0	16 424	16 424	35 h	+ 10 h
				0	0	14 923	14 923		
P7 E2	SgT	négative	négative	0	0	12 827	12 827	35 h	+ 21 h
				0	0	16 056	16 056		
P7 E3	Sr	négative	négative	0	0	12 995	12 995	35 h	+ 21 h
				0	0	15 267	15 267		
P8 E1	Sr	négative	négative	0	0	10 723	10 723	37 h	+ 1 h
				0	0	14 051	14 051		
P8 E2	Sr	négative	négative	0	0	12 140	12 140	37 h	+ 44 h
				0	0	13 638	13 638		
P8 E3	SgT	négative	négative	0	0	9849	9849	37 h	+ 44 h
				0	0	16 076	16 076		
P9 E1	Sr	négative	négative	0	0	14 597	14 597	33 h	+ 28 h
				0	0	14 993	14 993		
P9 E2	SgT	positive (Ct 38,4)	négative	0	0	14 378	14 378	33 h	+ 28 h
				1,76	1	14 627	14 628		
P9 E3	Sr	négative	négative	0	0	14 365	14 365	33 h	+ 39 h
				1,76	1	14 630	14 631		
P9 E4	SgT	négative	positive (1/2)	1,98	1	12 582	12 583	33 h	+ 39 h
				6,82	4	15 144	15 148		
P10 E1	Sr	positive (Ct 36,6)	positive (2/2)	11	3	7596	7599	28 h	+ 40 h
				19,8	7	8991	8998		
P11 E1	Sr	négative	positive (1/2)	8,4	3	7924	7927	47 h	+ 43 h
				0	0	5565	5565		

Tableau 2. Concordance de la qPCR et de la ddPCR (sur les 24 échantillons présentant un nombre total de gouttelettes supérieur à 10 000)

		qPCR		
		négative	positive	total
ddPCR	négative	18	2	20
	positive	1	3	4
	total	19	5	24

Parmi les discordances, un échantillon (P9E4) avait une ddPCR positive dans un puits sur deux et une qPCR négative, deux autres échantillons (P4 E1 et P9 E2) étaient positifs en qPCR (Ct respectivement de 39,5 et 38,4) et négatifs en ddPCR.

Concernant les deux échantillons présentant moins de 10 000 gouttelettes, un échantillon (P10E1) était positif en ddPCR sur les deux puits (11 et 19,8 copies/puits) et également positif en qPCR (Ct 36,6), l'autre échantillon (P11E1) était positif en ddPCR sur un seul puits (avec trois gouttelettes), la qPCR était négative.

DISCUSSION

L'objectif de ces expériences était de comparer la qPCR et la ddPCR de manière à voir si cette dernière permettait un gain de sensibilité. La PCR que nous avons sélectionné pour cette comparaison était la PCR ITS2CA spécifique de *C. albicans*, avec une révélation par sonde. Dans la partie précédente, la sensibilité de cette qPCR s'est révélée inférieure à la PCR CALb2 avec intercalant (LOD de 50 fg/PCR pour la PCR ITS2CA vs 10 fg/PCR pour la PCR CALb2). Nous avons malgré tout fait ce choix car nous voulions une spécificité optimale, la technologie ddPCR générant entre 10 000 et 20 000 gouttelettes nous voulions minimiser le risque de signaux non spécifiques.

Les résultats réalisés sur de l'ADN génomique purifié de *C. albicans* ont montré une très bonne efficacité des deux PCR mais une moindre sensibilité de la ddPCR par rapport à la qPCR. Parmi les études réalisées en virologie, les données concernant la sensibilité de la ddPCR sont contradictoires. En effet, Strain *et al.* retrouve une meilleure sensibilité de la ddPCR par rapport à la qPCR, alors que les résultats des travaux des équipes de Kiselina et Hayden montrent l'inverse (Hayden *et al.*, 2013; Strain *et al.*, 2013; Kiselina *et al.*, 2014). Toutefois, dans l'étude de Hayden *et al.*, la comparaison des deux PCR pour la quantification du Cytomégalo virus était réalisée avec 5 µL de prise d'essai pour la ddPCR vs 20 µL pour la qPCR ce qui peut expliquer la différence de sensibilité. Dans notre travail, la

quantité d'échantillon était similaire pour les deux PCR (5 μ L) et la ddPCR s'avère moins sensible. D'autres études ont montré une sensibilité des deux PCR équivalente mais une meilleure précision de quantification avec la ddPCR (Strain *et al.*, 2013; Sedlak *et al.*, 2014; Bosman *et al.*, 2015). Un autre avantage de la ddPCR semble être sa moindre sensibilité aux inhibiteurs de PCR (Rački *et al.*, 2014; Doi *et al.*, 2015). Finalement, la ddPCR appliquée à la détection des pathogènes ne semble pas avoir une meilleure sensibilité que les qPCR.

Par ailleurs, la technologie ddPCR présente certains inconvénients. En théorie, l'échantillon doit être partitionné en 20 000 gouttelettes. Cependant, après la phase de génération des gouttelettes, il faut transvaser ces gouttelettes dans une plaque PCR 96 puits. Il s'agit d'une étape délicate (nécessité de pipetage lent et avec un certain angle de manière à ne pas détruire les gouttelettes). Nous avons obtenu dans nos tests en moyenne 13 184 gouttelettes par puits (entre 5565 et 16 242), soit 66 % du nombre théorique de 20 000 gouttelettes. Après mesure de la fluorescence, un seuil permet de classer les gouttelettes en positives ou négatives. Le positionnement de ce seuil peut être difficile, notamment s'il existe des gouttelettes avec une fluorescence intermédiaire. Un biais peut alors exister si le seuil est choisi de manière inappropriée (Jones *et al.*, 2014; Bosman *et al.*, 2015). Le risque d'erreur existe surtout pour les échantillons avec un faible nombre de copies pour lesquels le nombre de gouttelettes positives est faible, l'équipe de Jones a ainsi proposé l'utilisation d'une zone grise (Jones *et al.*, 2014). Ici, nous avons observé sur certains témoins négatifs la présence d'une gouttelette positive. Ceci a également été observé par d'autres équipes (Pinheiro *et al.*, 2012; Strain *et al.*, 2013; Kiselina *et al.*, 2014; Bosman *et al.*, 2015). Si par la suite nous avons considéré négatifs les échantillons présentant une à deux gouttelettes positives, ceci pose toutefois des soucis pour l'interprétation des résultats (amplification non spécifique, contamination ?).

Néanmoins, un des avantages de l'utilisation de la ddPCR est sa capacité à obtenir une quantification absolue sans l'utilisation d'une droite d'étalonnage. Cette quantification ne peut toutefois pas se faire, comme nous l'avons observé, pour de fortes concentrations par saturation du système. En raison de l'absence de réalisation d'un plasmide pour la quantification de la qPCR, nous n'avons pas été en mesure de comparer les résultats de la quantification réalisée par la ddPCR à la qPCR. Toutefois, l'objectif principal de ce travail n'était pas de pouvoir quantifier l'échantillon mais d'évaluer la sensibilité de la ddPCR.

En ce qui concerne les résultats obtenus sur les échantillons de patients, l'évaluation s'est faite sur un nombre très limité de patients. Peu d'échantillons se sont révélés positifs avec les deux PCR (ddPCR et qPCR avec sonde). Par rapport aux résultats rapportés dans le chapitre précédent avec la qPCR CAIb2 avec révélation par intercalant, les deux méthodes testées ici s'avèrent moins

performantes. Ceci peut s'expliquer par une perte de sensibilité de la qPCR due à l'utilisation d'une sonde et par une faible quantité d'ADN circulant. Par ailleurs, la concordance entre les deux technologies est modérée, ce résultat est vraisemblablement dû au fait que très peu d'échantillons ont été testés et qu'il s'agit, pour les positifs, d'échantillons avec de faibles charges fongiques. Nous avons également observé un problème de répétabilité des réplicats.

En conclusion, même s'il s'agit d'un résultat préliminaire sur un nombre limité d'échantillons, la technologie de ddPCR ne semble pas apporter un gain par rapport à la PCR en temps réel. Si elle permet une quantification absolue, cette technologie n'améliore pas la sensibilité pour la détection de *Candida* sp.. De plus, elle nécessite des consommables et un équipement spécifique, une certaine technicité (notamment dans les étapes de transfert de gouttelettes) avec de multiples étapes et elle est plus longue que la qPCR (en moyenne une journée). Finalement, cette technologie, séduisante au départ, ne présente aucun avantage dans le contexte de diagnostic des candidémies, où les charges fongiques sont faibles et où les délais de rendus de résultats doivent être courts pour instaurer un traitement rapide.

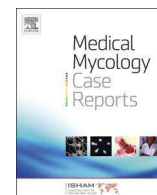
Travaux supplémentaires

Article 3

Rapid emergence of *FKS* mutations in *Candida glabrata* isolates in a peritoneal candidiasis. Sasso M *et al.* (publié dans Medical Mycology Case Reports)

Article 4

Evaluation of the DiversiLab® automated repetitive sequence-based PCR system for the characterization of *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolates. Sasso M *et al.* (soumis à Journal of Microbiological Methods)



Rapid emergence of *FKS* mutations in *Candida glabrata* isolates in a peritoneal candidiasis



Milène Sasso^a, Claire Roger^b, Laurence Lachaud^{c,*}

^a Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalo-universitaire de Nîmes, Nîmes, France

^b Service de réanimation chirurgicale, Centre Hospitalo-universitaire de Nîmes, Nîmes, France

^c Département de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalo-universitaire de Montpellier, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Echinocandin resistance

Candida glabrata

Antifungal susceptibility testing

FKS mutations

MIC interpretation

ABSTRACT

We report a rapid acquisition of echinocandin resistance after 12 days of micafungin treatment, without prior exposure, in a patient with peritoneal candidiasis due to *C. glabrata*. Isolates recovered before and after treatment were compared by multilocus sequence typing. Results of antifungal susceptibility testing and *FKS* mutations were reported. The interest of repeating antifungal susceptibility testing for echinocandin molecules during the treatment is discussed and a strategy to research *FKS* mutations proposed.

1. Introduction

International recommendations for the treatment of invasive candidiasis are now based on an echinocandin molecule as the first line of antifungal therapy [1,2]. This recommendation is well adapted to the second most isolated species, *Candida glabrata*, because of its lesser susceptibility to azole drugs. Intrinsic resistance to echinocandins is rare and mainly observed for *Candida parapsilosis* [3]. Nevertheless, the wide use of echinocandins has led to a decrease in susceptibility or to resistance acquisition in *Candida* strains, mainly for *C. glabrata*. The resistance is conferred by the presence of mutations in hot-spot regions of the *FKS1* and *FKS2* genes encoding β -1,3-D-glucan synthase, the echinocandin target enzyme [4]. Resistances appear after prior or prolonged exposure to echinocandins, with a median time to onset of 100 days [4]. Nevertheless, rare cases of resistance can appear very quickly after echinocandins exposure [5,6]. Here, we report a new case of rapid (12 days) acquisition of resistance to echinocandins in *C. glabrata*, associated to clinical failure in a colonized then infected patient. Comparison of isolates by multilocus sequence typing (MLST), results of *FKS* mutations and antifungal susceptibility testing of all isolates are reported. The interpretation of MIC values of *FKS* mutant strains is discussed and a screening strategy proposed.

2. Case report

Mr P., a 71-year-old man, was hospitalized for a second surgical treatment of a hiatal hernia (day 0). On day +2, the patient presented

an acute respiratory distress syndrome accompanied by fever. He was intubated, ventilated and an empiric broad-spectrum antibiotic therapy was prescribed. His health condition worsened on day +16 with a resumption of sepsis. Blood cultures were positive with *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus mitis*. The antibiotic therapy was reinforced with Piperacillin-Tazobactam, Vancomycin and Gentamicin. On day +22, the transoesophageal echocardiography did not show any cardiac vegetation and the CT scan did not detect any intra-abdominal infection. Nevertheless, as numerous risk factors for candidemia have been identified (supra-mesocolic surgery, broad-spectrum antibiotic therapy, hospital length of stay greater than 7 days, catheter), *Candida* colonization index was done. On day +23, mycological cultures of all samples (urine, anal, throat and gastric fluid samples) were positive with *C. glabrata*. A possible fungal infection after supra-mesocolic surgery was suspected and, in the presence of four colonized sites, micafungin (100 mg daily) was prescribed on day +25. A 2 mg/kg of methylprednisolone was also added to treat fibrosis phase of acute respiratory distress syndrome. After 12 days of administration, micafungin was switched for liposomal amphotericin B because of unfavourable clinical course with appearance of subcutaneous emphysema predominating in the right hemithorax and a right pneumothorax. Blood cultures remained negative. The patient's condition worsened and death occurred on day +45 in a context of sepsis and myocardial incompetence.

Peritoneal samples were taken immediately post-mortem, but no autopsy was performed. Mycological cultures showed numerous colonies of *C. glabrata* with two different color phenotypes (white and pink)

* Corresponding author.

E-mail address: laurence.lachaud@umontpellier.fr (L. Lachaud).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mmcr.2017.04.004>

Received 8 March 2017; Received in revised form 7 April 2017; Accepted 24 April 2017

Available online 25 April 2017

2211-7539/ © 2017 Published by Elsevier B.V. on behalf of International Society for Human and Animal Mycology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

on chromogenic medium (CHROMagar, Becton Dickinson). The four strains isolated at day +23, as well as the two colonies with a different phenotype isolated from the peritoneal fluid at day +45 were identified as *C. glabrata* by MALDI-TOF (VITEK® MS, Biomérieux and Multiflex, Bruker which allows distinction of *C. nivariensis* and *C. bracarensis*), and compared by MLST (Dodgson 2003). Sequences were analyzed on the website <http://pubmlst.org/cglabrata/> (accessed 11.01.2016). The sequence types (ST) of the isolates were identical (ST 7), which confirmed the persistence of the same strain in this patient. Antifungal susceptibility testing for amphotericin B, fluconazole, voriconazole, caspofungin, anidulafungin and micafungin was performed by Etest® method (Biomérieux), according to the manufacturer's instructions. MIC values were interpreted according to current Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints and epidemiological cutoff values (ECVs) [7]. *C. glabrata* isolates of day +45 presenting two different color phenotypes showed higher MIC values for echinocandin molecules than isolates of day +23. Sequencing of hot-spot 1 and 2 regions of the *FKS1* and *FKS2* genes [8,9] brought out modifications of the *FKS2* gene for both isolates of day +45: a mutation (F659S) for one and a deletion (F659del) for the other one. No mutations of the *FKS* hotspots were found in the 4 *C. glabrata* strains isolated at day +23. Mycological results are presented in Table 1.

3. Discussion

The prevalence of strains with an echinocandin resistance remains low, around 4% for *C. glabrata* and less than 1% for *Candida albicans* [10]. However, the number of cases is increasing, particularly in *C. glabrata* where *FKS1* and *FKS2* mutations are responsible for reduced susceptibility to echinocandins and associated with therapeutic failure. Resistances usually appear after prior or prolonged exposure to echinocandins with a median time to onset of 100 days [4], but can appear very quickly after the prescription of echinocandins [5,6]. Indeed, without prior exposure to echinocandins, a rapid emergence of *FKS* mutations, associated with therapeutic failure, was observed after 7 or 8 days of echinocandin treatment for *Candida kefyr* and *C. glabrata* respectively [5,6], and after 12 days of micafungin in our case.

We found modifications of the *FKS2* gene in two isolates recovered from peritoneal fluid, a mutation (F659S) in one and a deletion (F659del) in the other. Changes in the *FKS2* gene encompass the majority of mutations, mainly in the Ser-663 and Phe-659 positions [11]. The deletion of phenylalanine at position 659 has already been associated with clinical failures [5]. The F659S mutation was also described, but the MICs of the strains containing this mutation were heterogeneous and no therapeutic failure has been reported [10–12].

Detection of resistance to echinocandins is carried out in daily practice by the determination of MIC values. The two reference methods are broth microdilution methods of the CLSI and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Since they are not usable on a daily practice, commercial techniques such as Etest® (Biomérieux) or Sensititre® (Trek Diagnostics) are used. However, interpretations of MIC values should be done with caution because clinical breakpoints lack harmonization, are not available for all *Candida* species and are not necessarily transposable to commercial techniques. Technique-specific ECVs could become the best way to interpret MIC values. Caspofungin susceptibility testing, although not recommended by CLSI and EUCAST, would allow a better screening of *FKS* mutant strains. This has been reported in two studies, where 89–100% of the mutant strains were intermediate or resistant to caspofungin versus 57–71% for micafungin and 71–78% for anidulafungin [10,11]. In our case, with the application of CLSI breakpoints for MIC interpretation, all the echinocandins MIC values were interpreted as resistant for isolate with F659del, while only caspofungin MIC value was intermediate for isolate with F659S mutation. Regardless of the anti-fungal agent tested, an increase in MIC was observed for the mutant strains: from 4 to 6 times for the strain with F659S mutation and from 187 to 500 times for the strain with F659del. This corresponds to the observations of Prigent [12] for whom the F659S mutation appeared after 14 days of caspofungin treatment and gave echinocandins MICs 4 times higher than those of the wild-type strain. Thus, the F659S mutation is associated with a low-level resistance while the deletion in F659 has a high-level of resistance. However, as this two isolates were present in culture, they could both be involved in therapeutic failure.

Detection of echinocandin resistance in treated patients is necessary. For this purpose, it seems essential to repeat sampling sterile sites in order to recover the strains potentially resistant to antifungals. For candidemia, one blood culture per day until negativity is required to determine the end of candidemia [1,2]. For other invasive candidiasis, additional controls should also be done at least every 2–3 days. The use of chromogenic medium allows the detection of *Candida* species, but also, as in our case report, the presence of different phenotypes for a same species with the same ST by MLST (see above). A determination of the MIC values for echinocandin molecules for isolates (and for each phenotype) from sterile sites is necessary. Furthermore, a repetition of antifungal susceptibility testing is essential when isolates are still recovered after one week of treatment. An increase in the MICs of at least 4 times, whatever the categorization of the strain (sensible, intermediate or resistant), must lead to the search for *FKS1* and *FKS2* mutations and to close monitoring of the patient. This strategy has the

Table 1
Results of multi-locus sequence typing (MLST), MIC values and *FKS* mutations for all the isolates.

Strain	Origin	<i>FKS</i> genotype	MLST profile (ST ^a)	Etest MIC values (µg/mL)					
				CS	MICA	AND	FL	VO	AB
CG 743 (Day + 23) ^b	Urine	WT	ST7	0,064 (S)	0,012 (S)	0,008 (S)	12 (SDD)	0.19 (WT)	1 (WT)
CG 744 (Day + 23)	Anal swab	WT	ST7	0,094 (S)	0,012 (S)	0,008 (S)	12 (SDD)	0.25 (WT)	0.75 (WT)
CG 745 (Day + 23)	Throat swab	WT	ST7	0,064 (S)	0,012 (S)	0,012 (S)	16 (SDD)	0.25 (WT)	0.75 (WT)
CG 746 (Day + 23)	Gastric fluid	WT	ST7	0,064 (S)	0,008 (S)	0,008 (S)	12 (SDD)	0.19 (WT)	0.75 (WT)
CG 849W (Day + 45)	Peritoneal fluid	<i>FKS2</i> -F659S	ST7	0,38 (I)	0,032 (S)	0,047 (S)	12 (SDD)	0.25 (WT)	0.75 (WT)
CG 864P (Day + 45)	Peritoneal fluid	<i>FKS2</i> -F659del	ST7	> 32 (R)	1,5 (R)	1 (R)	12 (SDD)	0.19 (WT)	0.5 (WT)

CS: caspofungin, MICA: micafungin, AND: anidulafungin, FL: fluconazole, VO: voriconazole, AB: amphotericin B, S: sensible, I: intermediate, SDD: sensible dose-dependent, R: resistant, WT: wild-type

^a ST = sequence type;

^b Day of sampling

advantage of being free from the method used, the molecule tested and the knowledge of breakpoints or ECVs.

Conflict of interest

There are none.

Acknowledgements

No additional acknowledgements.

References

- [1] P.G. Pappas, C.A. Kauffman, D.R. Andes, C.J. Clancy, K.A. Marr, L. Ostrosky-Zeichner, et al., Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases Society of America, *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 62 (2016) e1–50.
- [2] O.A. Cornely, M. Bassetti, T. Calandra, J. Garbino, B.J. Kullberg, O. Lortholary, et al., ESCMID Fungal Infection Study Group, ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: non-neutropenic adult patients, *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18 (Suppl 7) (2012) S19–S37.
- [3] M.C. Arendrup, D.S. Perlin, Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? *Curr. Opin. Infect. Dis.* 27 (2014) 484–492.
- [4] R.K. Shields, M.H. Nguyen, C.J. Clancy, Clinical perspectives on echinocandin resistance among *Candida* species, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 28 (2015) 514–522.
- [5] J.S. Lewis, N.P. Wiederhold, B.L. Wickes, T.F. Patterson, J.H. Jorgensen, Rapid emergence of echinocandin resistance in *Candida glabrata* resulting in clinical and microbiologic failure, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013) 4559–4561.
- [6] A. Fekkar, I. Meyer, J.Y. Brossas, E. Dannaoui, M. Palous, M. Uzunov, et al., Rapid emergence of echinocandin resistance during *Candida* kefir fungemia treatment with caspofungin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013) 2380–2382.
- [7] M.A. Pfaller, D.J. Diekema, Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods, 2010 to 2012, *J. Clin. Microbiol.* 50 (2012) 2846–2856.
- [8] M.T. Durán-Valle, S. Gago, A. Gómez-López, M. Cuenca-Estrella, L. Jiménez Díez-Canseco, J.L. Gómez-Garcés, et al., Recurrent episodes of candidemia due to *Candida glabrata* with a mutation in hot spot 1 of the FKS2 gene developed after prolonged therapy with caspofungin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (2012) 3417–3419.
- [9] A.J. Zimbeck, N. Iqbal, A.M. Ahlquist, M.M. Farley, L.H. Harrison, T. Chiller, et al., FKS mutations and elevated echinocandin MIC values among *Candida glabrata* isolates from U.S. population-based surveillance, *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (2010) 5042–5047.
- [10] R.K. Shields, M.H. Nguyen, E.G. Press, R. Cumbie, E. Driscoll, A.W. Pasculle, et al., Rate of FKS mutations among consecutive *Candida* isolates causing bloodstream infection, *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (2015) 7465–7470.
- [11] M. Castanheira, L.N. Woosley, S.A. Messer, D.J. Diekema, R.N. Jones, M.A. Pfaller, Frequency of fks mutations among *Candida glabrata* isolates from a 10-year global collection of bloodstream infection isolates, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 577–580.
- [12] G. Prigent, N. Ait-Ammar, E. Levesque, A. Fekkar, J.-M. Costa, S. El Anbassi, et al., Echinocandin resistance in *Candida* species isolates from liver transplant recipients, *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 (2017).

Evaluation of the DiversiLab[®] automated repetitive sequence-based PCR system for the characterization of *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolates

Milène Sasso (PharmD)¹ , Anne-Cécile Normand (PhD)², Alix Pantel (PharmD, PhD)³ , Nathalie Bourgeois (MD, PhD)⁴ , Laurence Lachaud (MD, PhD)⁴

¹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Nîmes, France,

²Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Timone, Université d'Aix-Marseille, France,

³Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Nîmes, France,

⁴Département de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Montpellier, France

Short title: *C. albicans* and *C. glabrata* typing with the DiversiLab[®] rep-PCR system

Corresponding author: Laurence Lachaud, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Montpellier,

39 Av. Charles Flahault, 34295 Montpellier cedex 5, France

Tel +33 467 33 23 50; Fax +33 467 33 23 54; orcid.org/0000-0001-6761-8161

laurence.lachaud@umontpellier.fr; l-lachaud@chu-montpellier.fr

Abstract

The objective of our study was to assess the DiversiLab[®] automated repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) system for typing *C. albicans* and *C. glabrata* isolates and to compare it with two proven and routinely used typing methods. A total of 39 isolates from 11 patients with candidaemia or tissue candidiasis (two to six isolates per patient) were analysed with three typing methods: DiversiLab[®] rep-PCR, multilocus sequence typing and multilocus microsatellite typing. The results obtained for *C. albicans* with the rep-PCR system were consistent with those obtained using the two other typing methods. All three methods allowed clustering the different *C. albicans* isolates from the same patient. Conversely, the rep-PCR system was ineffective for typing *C. glabrata* isolates. The DiversiLab[®] rep-PCR system is an excellent tool for typing isolates of *C. albicans*, the species that causes more than 60% of candidiasis. Thanks to its simplicity of use, rapidity, standardization and reproducibility, the DiversiLab[®] rep-PCR system is a tool of choice to investigate *C. albicans* infections.

Key-words: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, typing method, rep-PCR, DiversiLab[®], MultiLocus Sequence Typing, MultiLocus Microsatellite Typing

1. Introduction

The fine characterization of *Candida* isolates is of interest in some clinical and epidemiological situations. Indeed, isolate typing within the same *Candida* sp. is essential for the investigation of epidemics, the comparison between colonizing and infecting strains, the assessment of nosocomial transmission, the identification of a shared origin or common source of infection among patients' isolates, the study of strains during the emergence of resistance, and for epidemiological surveillance (Garcia-Hermoso *et al.*, 2016; McManus and Coleman, 2014). To this aim, many different techniques with variable performance and costs are available (Foxman *et al.*, 2005). In the past ten years, the most commonly used methods for *Candida* sp. typing have been based on DNA sequence comparison (Alanio *et al.*, 2017). For instance, multilocus sequence typing (MLST) is a reproducible technique that allows the comparison between laboratories, and the exchange of sequences via Internet. Moreover, online databases are available for many microorganisms. However, MLST is a time-consuming and costly technique. In addition, sequence interpretation for diploid organisms, such as *C. albicans*, may be difficult due to the risk of misinterpretation of double peaks at heterozygous positions. Multilocus microsatellite typing (MLMT) is an easy and fast technique, but can be less reproducible (linked to the electrophoresis conditions) and is less suitable for inter-laboratory comparisons than MLST (Garcia-Hermoso *et al.*, 2016; McManus and Coleman, 2014). Repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) using the DiversiLab[®] system (bioMérieux) is a fast, easy to implement and inexpensive method, based on the PCR amplification of repeat sequences dispersed in the genome. The automated approach of the DiversiLab[®] system allows its standardization. This system shows good reproducibility and allows reliable inter-laboratory comparisons, for instance by archiving profiles and creating libraries to compare strains (Healy *et al.*, 2005). It has been validated in bacteriology to study strain clonality in suspected outbreaks (Göttig *et al.*, 2015; Sidjabat *et al.*, 2015). However, data on its use in mycology are limited and differences were observed according to the fungus under study. The DiversiLab[®] rep-PCR system has been used to identify species of the genus *Aspergillus* (Healy *et al.*, 2004) or the genus *Candida* (Wise *et al.*, 2007), and for typing strains

of *Cryptococcus* sp. (H. Dou *et al.*, 2015; H.-T. Dou *et al.*, 2015). Nevertheless, few data are available on its discriminatory power for *Candida albicans* and *Candida glabrata* (Klotz *et al.*, 2016).

Therefore, the aim of this study was to evaluate the performance of this technique for typing *C. albicans* and *C. glabrata* isolates from colonized patients who developed invasive candidiasis or from patients with persistent tissue candidiasis. The results obtained with the DiversiLab[®] rep-PCR system were then compared with those obtained using MLST and MLMT, two well proven methods for typing *C. albicans* and *C. glabrata* isolates (Enache-Angoulvant *et al.*, 2010; Garcia-Hermoso *et al.*, 2016, 2007; L'ollivier *et al.*, 2012; Lott *et al.*, 2010; McManus and Coleman, 2014).

2. Materials and methods

2.1. Patients and isolates.

For this study, 11 patients admitted to the university hospital centre of Montpellier (patients P1, P2, P5, P6, P7, and P8) or Nîmes (patients P3, P4, P9, P10, and P11) who presented one or more episodes of candidaemia or tissue candidiasis over time were retrospectively selected. All the cryopreserved isolates available for each patient were used for the analysis. Cultures were performed in Sabouraud agar (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) at 37°C. Species were identified using VITEK[®] 2 YST ID cards (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) or the API[®] ID32C method (bioMérieux) and confirmed by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) using the Bruker Microflex LT™ system (BrukerDaltonik, Bremen, Germany).

2.2. Typing methods. Three techniques were compared: MLST, MLMT and automated rep-PCR (DiversiLab[®] system; bioMérieux).

For MLST of *C. albicans* isolates, seven housekeeping genes were analysed, according to Bougnoux *et al.* (2003): aspartate aminotransferase (*AAT1a*), acetyl-coenzyme A carboxylase (*ACC1*), ATP-dependent permease (*ADP1*), mannose phosphate isomerase (*MPIb*), alanyl-tRNA synthetase (*SYA1*), vacuolar protein sortin-associated protein 13 (*VPS13*) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (*ZWF1b*). For MLST of *C. glabrata* isolates, six loci were analysed, according to

Dodgson *et al.* (2003): 1,3-beta-glucan synthase component FKS1 (*FKS*), 3-isopropylmalate dehydrogenase (*LEU2*), myristoyl-CoA protein N-myristoyltransferase (*NMT1*), phosphoribosyl-anthranilate isomerase (*TRP1*), UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (*UGP1*) and orotidine-5-phosphate decarboxylase (*URA3*). Primers for these genes were described in Bounoux *et al.* (2003) and Dodgson *et al.* (2003). DNA was extracted with the EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) using the Biorobot[®] EZ1 workstation (Qiagen), according to the manufacturer's recommendations. For PCR amplification, 5 µL of each DNA sample was mixed with 1 µL of 10µM primers, 5 µL of 2mM dNTP, 0.5 µL of HotStarTaq[®] DNA Polymerase (Qiagen), 5 µL of 25mM MgCl₂, 5 µL of 10x PCR buffer (Qiagen), and 27.5 µL H₂O for a total reaction volume of 50 µL. PCR assays were performed on a Biometra[®] thermocycler with the following conditions: 94°C for 15min and 40 cycles of 94°C for 60s, 58°C for 30s and 72°C for 60s, followed by 72°C for 7min. PCR products were visualized under UV light after electrophoresis in 2% agarose gels and purified using the ExoSap-IT kit (Affymetrix, Santa Clara, US), according to the manufacturer's recommendations. Sequencing was performed using the BigDye[®] Terminator v3.1 cycle sequencing kit (AppliedBiosystems, Carlsbad, US), according to the manufacturer's instructions. Cycle sequencing reactions were performed with the primers used for PCR amplification and the following conditions: 94°C for 60s and 40 cycles of 98°C for 20s, 50°C for 10s and 60°C for 4min, followed by 72°C for 7min. Sequencing reactions were then purified with the Agencourt CleanSEQ[®] kit (Beckman Coulter, Brea, US), and analysed with an Applied Biosystems 3130xl sequencer. For each gene, forward and reverse sequences were aligned with the SeqScape[®] software (Thermofisherscientific, Waltham, US), visually inspected and corrected if necessary. As *C. albicans* is diploid, sequence inspection was done to determine homozygosity or heterozygosity. For heterozygous sites, the sequence was corrected by using the universal code of the International Union of Pure and Applied Chemistry nomenclature. Allele numbers were assigned for each gene by using the database from the <https://pubmlst.org> website (<https://pubmlst.org/calbicans/> or <https://pubmlst.org/cglabrata/>). MLST profiles were defined, and

then a sequence type (ST) was assigned to each *C. glabrata* isolate, and a diploid sequence type (DST) to each *C. albicans* isolate.

For MLMT, DNA was extracted from a colony suspension using the NucliSENS easyMAG V2 system (bioMérieux). Nine microsatellite markers for *C. albicans* (CA1, CA3, CA7, Carebeme, CDC3, CEF3, HIS3, LOC4 and ZNF1) and seven microsatellite markers for *C. glabrata* (GLA3, GLA4, GLA5, GLA6, GLA7, GLA8 and GLA9) were tested according to the conditions published by Al-Yasiri *et al.* (2016) and Dhieb *et al.* (2015), respectively. PCR amplifications were performed on a Lightcycler™ 480 (Roche Diagnostics, GmbH, Germany) instrument with 1x Light-Cycler™ 480 Probes Master mix (Roche Diagnostics, France) and 1 µL of each genomic DNA sample. Then, 1 µL of a 1/100 dilution of the PCR product was added to 25 µL of deionized formamide (Applied Biosystems) containing 0.5 µL of GeneScan™ 500 Liz™ (Applied Biosystems). The fragment length for each locus was determined by capillary electrophoresis using an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and analysed with the GeneMapper software v4.0 (Applied Biosystems). For each of the nine *C. albicans* and seven *C. glabrata* microsatellites, the raw allele sizes were extracted from GeneMapper and homogenized according to the size of the DNA fragment without any microsatellite and the size of the microsatellite based on the number of repeats. As *C. albicans* can be diploid, two sizes were assigned for each microsatellite. If only one microsatellite was detected by the software, the same size was assigned to both alleles. The lists containing the size of all microsatellites of each isolate were analysed using the UPGMA application at <http://genomes.urv.cat/UPGMA> with the following parameters: Pearson coefficient, transformation $d=(1-r)*100$, and 100 bootstraps.

For the automated rep-PCR (DiversiLab® system), DNA was extracted using the Ultraclean® Microbial DNA Isolation Kit (Mo-Bio Laboratories, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration was adjusted between 25 and 50 ng/µL using a NanoDrop instrument (Thermo Fisher Scientific). DNA was then amplified with the DiversiLab® *Candida* kit for DNA fingerprinting according to the manufacturer's recommendations. Rep-PCR products were separated and detected using microfluidics chips with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent

technologies, Santa Clara, US). The electrophoresis profiles were analysed with the DiversiLab[®] software, v3.4 employing Pearson correlation. The similarity index between each isolate profile was calculated and a virtual gel image of the fingerprint for each DNA sample was created. The relatedness of isolates was displayed with a dendrogram.

3. Results

3.1. Origin of isolates.

In total, 15 isolates of *C. albicans* from four patients (P1 to P4) and 24 isolates of *C. glabrata* from seven patients (P5 to P11) were tested. Two to six isolates were available for each patient, except for patients P7 and P8, a mother/new-born pair with only one isolate/each (vaginal sample for the mother and blood sample for the baby). In all patients, the diagnosis of invasive candidiasis was confirmed by *Candida* growth in culture. Five previously colonized patients (P3, P4, P9, P10, P11) developed candidaemia or tissue candidiasis. In the four patients with invasive candidiasis (P1, P2, P5, P6), several isolates were collected over time. The interval between sampling in the same patient varied from the same day to 8 months. For each patient, the isolate sampling site and date are presented in Table 1.

3.2. MLST analysis.

The MLST results for *C. albicans* and *C. glabrata* are presented in Table 2. MLST analysis of the *C. albicans* isolates showed that the four patients were infected with strains characterized by four different DSTs. The MLST profiles of all isolates recovered from the same patient were identical. For *C. glabrata*, five different STs were identified. The same ST was found in all isolates from the same patient. For the mother/new-born pair (P7 and P8), the MLST profiles were identical, but no ST number was assigned because the allele of the *FKS* gene was not previously described and submissions at <https://pubmlst.org/cglabrata/> are currently suspended. Finally, the MLST profiles of

two unrelated patients (P6 and P11), admitted to different hospitals and at different times, were identical (ST3).

3.3. MLMT analysis.

For *C. albicans*, analysis of the dendrogram obtained with the nine microsatellite markers showed the presence of four distinct clones, of which one was particularly unrelated to the others. Each clone corresponded to a patient (Fig. 1a). For *C. glabrata*, six clones were identified by analysis of the seven microsatellite markers and each corresponded to a different patient, with the exception of the one that included the isolates from the mother/new-born pair (CG16 and CG17) (Fig. 1b). Two large clones, which included the isolates from patients P11 and P6, were close to each other (CG756-CG757-CG758-CG760-CG774 and CG6-CG7-CG8-CG9).

3.4. Rep-PCR results

The percentage of similarity between *C. albicans* isolates ranged from 89 to 99.8%. By setting a cut-off of similarity higher than 95%, as proposed for bacteria in many studies (Göttig *et al.*, 2015; Sidjabat *et al.*, 2015), isolates were divided in three clones. However, by setting a cut-off of similarity higher than 98%, isolates were divided in four clones, each of them including all samples from the same patient (Fig. 2a). For the *C. glabrata* isolates, similarities between isolates ranged from 84.1 to 99.7% (Fig. 2b). By setting a cut-off of similarity of 98%, isolates were divided in five clones and four singletons. Two clones included all the isolates from a single patient (P9) and the mother/new-born pair (P7-P8), respectively. The other isolates did not cluster together to distinguish single patients. For example, for P6 (CG6, CG7, CG8 and CG9), isolate CG7 had a similarity percentage of 98.9% with CG9 and of 94.1% with CG8 and thus were classified in two different clones.

4. Discussion

In this work, we evaluated the DiversiLab[®] automated rep-PCR system for the characterization of *C. albicans* and *C. glabrata* isolates and compared its results with those obtained with two routinely

used techniques: MLST and MLMT. For this, we selected 39 *Candida* sp. samples that were responsible for colonization and/or deep-seated candidiasis and were isolated from 11 patients at different times. Our results suggest a poor discriminatory power of the DiversiLab[®] system for *C. glabrata* typing, as previously reported for *Candida parapsilosis* (Diab-Elschahawi *et al.*, 2012). Conversely, for *C. albicans*, the results obtained are very encouraging (100% agreement with the other two typing methods).

In our work, the results obtained with the MLST and MLMT techniques confirmed that the strains responsible for colonization and infection were identical in all isolates from a given patient and also in the mother/new-born pair, in agreement with the literature data. Indeed, colonization by *Candida* sp. is a significant risk factor for the occurrence of invasive candidiasis and a prerequisite for infection. Studies have shown that more than 84% of the infecting strains are genetically identical to the colonizing strains, and that colonization usually precedes infection (Reagan *et al.*, 1990; Voss *et al.*, 1994). The MLST and MLMT results also highlighted that in patient P1, secondary bone localization, detected 5 months after an episode of candidaemia, was caused by the same strain. Similarly, in patient P2, two episodes of candidaemia at 8 months of interval involved the same *C. albicans* strain. Two patients (P6 and P11) were infected with *C. glabrata* isolates with the same MLST profile (ST3). As they were in different hospitals and at different times, this similarity probably reflects the high frequency of this clone in the general population.

Concerning the DiversiLab[®] system, there is no consensus on the similarity threshold to be used. For *C. albicans*, by choosing a similarity threshold of 98%, the results obtained were perfectly consistent with those of the two reference methods. This indicates that the DiversiLab[®] system allows distinguishing the different clones that correspond to the different patients. Conversely, for the *C. glabrata* strains, the results obtained with the DiversiLab[®] system were consistent with the MLST and MLMT findings only in one patient and the mother/new-born pair. For the other patients infected by *C. glabrata*, the different isolates from the same patient did not gather in one clone, as

observed with the other two techniques. The strain distribution was random without any apparent logic.

The major weakness of this study is the limited number of isolates studied that were, nevertheless, representative of the epidemiological situations for which the use of molecular typing is necessary. In order to recommend the rep-PCR DiversiLab[®] system for the typing of *C. albicans* strains, a study with a larger number of isolates needs to be carried out to confirm the 98% threshold and its discriminatory power. Validation in other species, such as *Candida tropicalis* and *Candida krusei*, although less frequently involved in candidiasis, could also be considered.

5. Conclusion.

The DiversiLab[®] system based on rep-PCR is an excellent tool for typing *C. albicans* isolates that are responsible for more than 60% of the superficial or deep candidiasis. Due to its simplicity of use, standardization and reproducibility, it could become a typing tool of choice.

Funding: This work was supported by the Nîmes University Hospital

Conflict of Interest: None

Ethical approval: The study was approved by the ethic committee of Nîmes University Hospital

Informed consent: This work was done only on *Candida* sp. isolates and no clinical data was collected.

References

- Alanio, A., Desnos-Ollivier, M., Garcia-Hermoso, D., Bretagne, S., 2017. Investigating Clinical Issues by Genotyping of Medically Important Fungi: Why and How? *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 671–707. doi:10.1128/CMR.00043-16
- Al-Yasiri, M.H., Normand, A.-C., L'Ollivier, C., Lachaud, L., Bourgeois, N., Rebaudet, S., Piarroux, R., Mauffrey, J.-F., Ranque, S., 2016. Opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata* circulates between humans and yellow-legged gulls. *Sci. Rep.* 6, 36157. doi:10.1038/srep36157
- Bougnoux, M.-E., Tavanti, A., Bouchier, C., Gow, N. a. R., Magnier, A., Davidson, A.D., Maiden, M.C.J., D'Enfert, C., Odds, F.C., 2003. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5265–5266.
- Dhieb, C., Normand, A.C., L'Ollivier, C., Gautier, M., Vranckx, K., El Euch, D., Chaker, E., Hendrickx, M., Dalle, F., Sadfi, N., Piarroux, R., Ranque, S., 2015. Comparison of MALDI-TOF mass spectra with microsatellite length polymorphisms in *Candida albicans*. *J. Mass Spectrom.* JMS 50, 371–377. doi:10.1002/jms.3538
- Diab-Elschahawi, M., Forstner, C., Hagen, F., Meis, J.F., Lassnig, A.M., Presterl, E., Klaassen, C.H.W., 2012. Microsatellite genotyping clarified conspicuous accumulation of *Candida parapsilosis* at a cardiothoracic surgery intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3422–3426. doi:10.1128/JCM.01179-12
- Dodgson, A.R., Pujol, C., Denning, D.W., Soll, D.R., Fox, A.J., 2003. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5709–5717.
- Dou, H., Xu, Y., Li, T., 2015. Application of the DiversiLab system for tracing the source of the mixed infections caused by *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from a patient with systemic lupus erythematosus. *Mycoses* 58, 149–159. doi:10.1111/myc.12291
- Dou, H.-T., Xu, Y.-C., Wang, H.-Z., Li, T.-S., 2015. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in China between 2007 and 2013 using multilocus sequence typing and the DiversiLab system. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 34, 753–762. doi:10.1007/s10096-014-2289-2
- Enache-Angoulvant, A., Bourget, M., Brisse, S., Stockman-Pannier, C., Diancourt, L., François, N., Rimek, D., Fairhead, C., Poulain, D., Hennequin, C., 2010. Multilocus microsatellite markers for molecular typing of *Candida glabrata*: application to analysis of genetic relationships between bloodstream and digestive system isolates. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4028–4034. doi:10.1128/JCM.02140-09
- Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J.S., Manning, S.D., Marrs, C.F., 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol. Perspect. Innov. EPI* 2, 10. doi:10.1186/1742-5573-2-10
- Garcia-Hermoso, D., Cabaret, O., Lecellier, G., Desnos-Ollivier, M., Hoinard, D., Raoux, D., Costa, J.-M., Dromer, F., Bretagne, S., 2007. Comparison of microsatellite length polymorphism and multilocus sequence typing for DNA-Based typing of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3958–3963. doi:10.1128/JCM.01261-07

- Garcia-Hermoso, D., Desnos-Ollivier, M., Bretagne, S., 2016. Typing *Candida* Species Using Microsatellite Length Polymorphism and Multilocus Sequence Typing. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1356, 199–214. doi:10.1007/978-1-4939-3052-4_15
- Göttig, S., Gruber, T.M., Stecher, B., Wichelhaus, T.A., Kempf, V.A.J., 2015. *In vivo* horizontal gene transfer of the carbapenemase OXA-48 during a nosocomial outbreak. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 60, 1808–1815. doi:10.1093/cid/civ191
- Healy, M., Huong, J., Bittner, T., Lising, M., Frye, S., Raza, S., Schrock, R., Manry, J., Renwick, A., Nieto, R., Woods, C., Versalovic, J., Lupski, J.R., 2005. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J. Clin. Microbiol.* 43, 199–207. doi:10.1128/JCM.43.1.199-207.2005
- Healy, M., Reece, K., Walton, D., Huong, J., Shah, K., Kontoyiannis, D.P., 2004. Identification to the species level and differentiation between strains of *Aspergillus* clinical isolates by automated repetitive-sequence-based PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4016–4024. doi:10.1128/JCM.42.9.4016-4024.2004
- Klotz, U., Schmidt, D., Willinger, B., Steinmann, E., Buer, J., Rath, P.-M., Steinmann, J., 2016. Echinocandin resistance and population structure of invasive *Candida glabrata* isolates from two university hospitals in Germany and Austria. *Mycoses* 59, 312–318. doi:10.1111/myc.12472
- L’ollivier, C., Labruère, C., Jebrane, A., Bougnoux, M.-E., d’Enfert, C., Bonnin, A., Dalle, F., 2012. Using a Multi-Locus Microsatellite Typing method improved phylogenetic distribution of *Candida albicans* isolates but failed to demonstrate association of some genotype with the commensal or clinical origin of the isolates. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 12, 1949–1957. doi:10.1016/j.meegid.2012.07.025
- Lott, T.J., Frade, J.P., Lockhart, S.R., 2010. Multilocus sequence type analysis reveals both clonality and recombination in populations of *Candida glabrata* bloodstream isolates from U.S. surveillance studies. *Eukaryot. Cell* 9, 619–625. doi:10.1128/EC.00002-10
- McManus, B.A., Coleman, D.C., 2014. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 21, 166–178. doi:10.1016/j.meegid.2013.11.008
- Reagan, D.R., Pfaller, M.A., Hollis, R.J., Wenzel, R.P., 1990. Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2733–2738.
- Sidjabat, H.E., Townell, N., Nimmo, G.R., George, N.M., Robson, J., Vohra, R., Davis, L., Heney, C., Paterson, D.L., 2015. Dominance of IMP-4-producing enterobacter cloacae among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Australia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 4059–4066. doi:10.1128/AAC.04378-14
- Voss, A., Hollis, R.J., Pfaller, M.A., Wenzel, R.P., Doebbeling, B.N., 1994. Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. *J. Clin. Microbiol.* 32, 975–980.
- Wise, M.G., Healy, M., Reece, K., Smith, R., Walton, D., Dutch, W., Renwick, A., Huong, J., Young, S., Tarrand, J., Kontoyiannis, D.P., 2007. Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. *J. Med. Microbiol.* 56, 778–787. doi:10.1099/jmm.0.47106-0

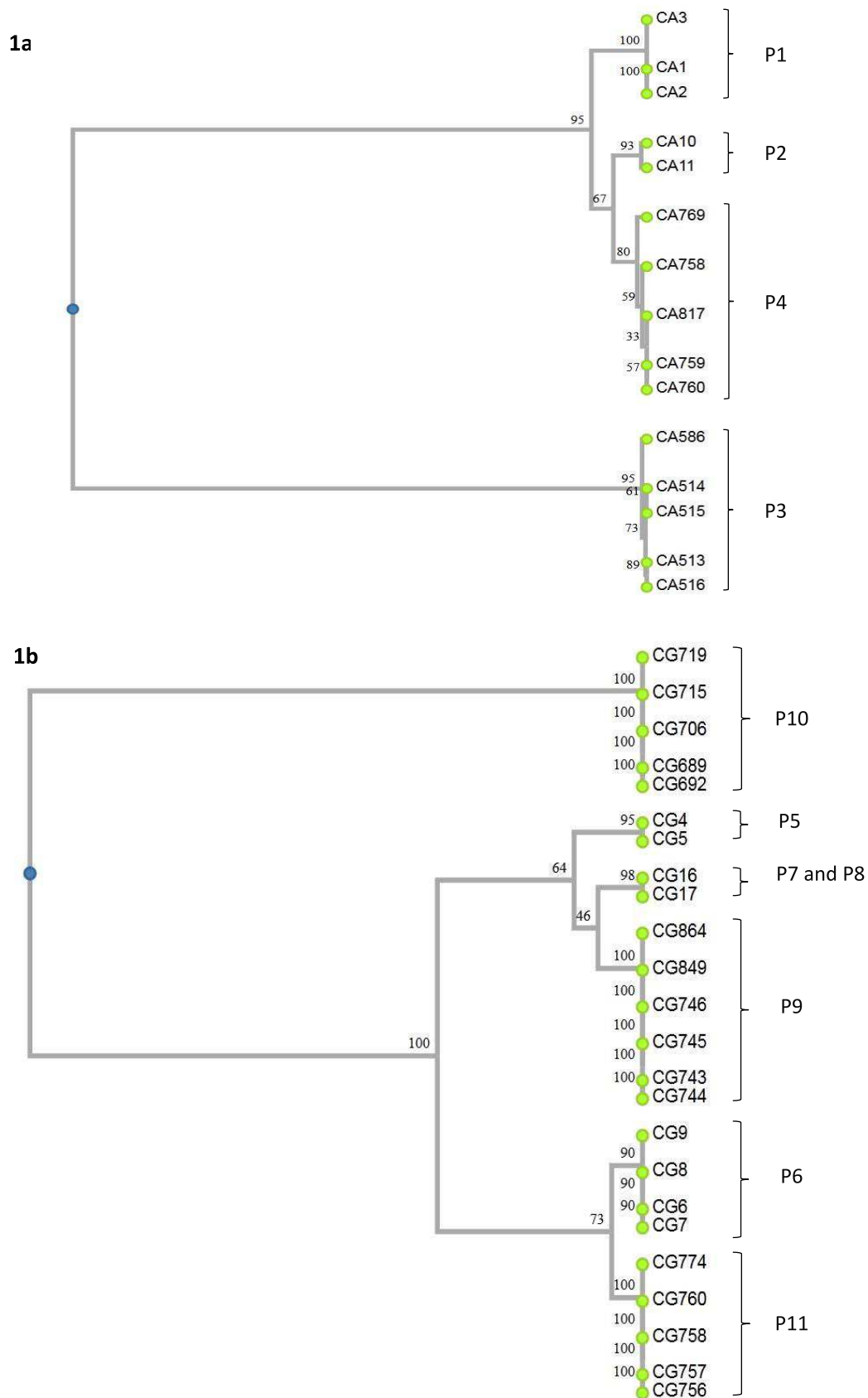


Figure 1. Dendrograms generated using the results obtained by MLMT analysis of microsatellite markers in *C. albicans* (a) and *C. glabrata* (b) isolates (see Table 1, for isolate description). Numbers indicate the percentage of similarity between isolates.

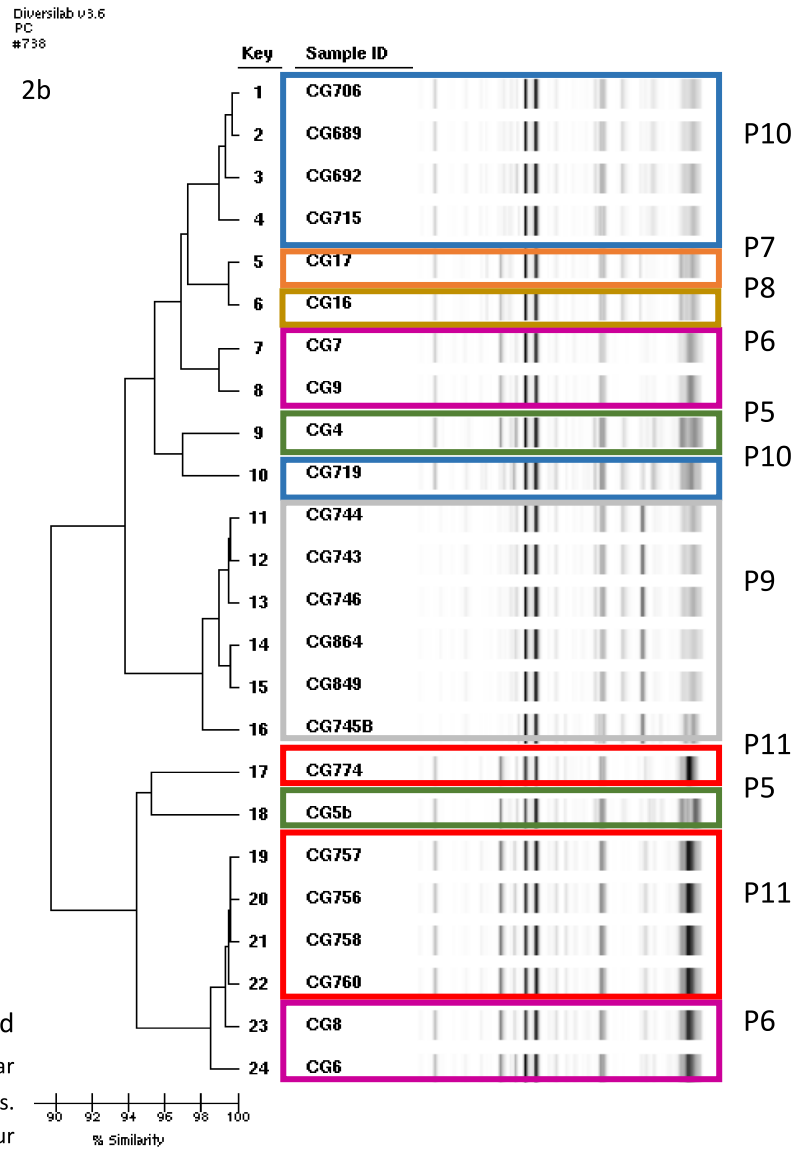
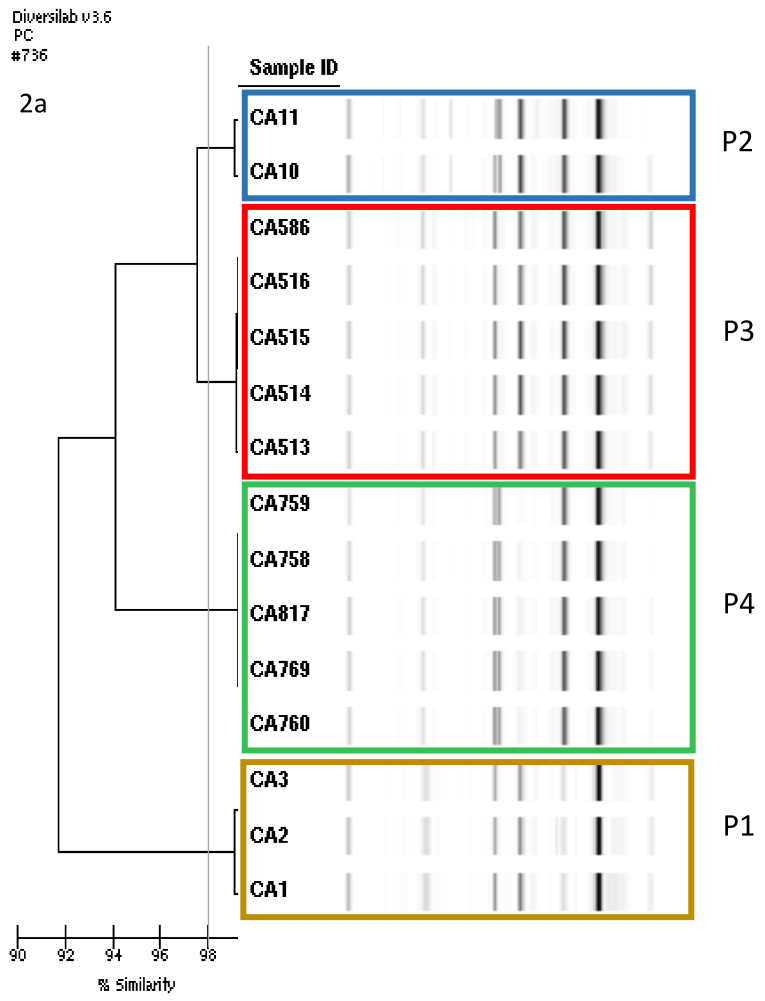


Figure 2. Dendrograms and virtual-gel images for the *C. albicans* (a) and *C. glabrata* (b) isolates obtained using the DiversiLab[®] system. The horizontal bar at the bottom left of the dendrogram indicates the percentage of similarity between isolates. The virtual-gel image of all isolates from the same patient are outlined with the same colour (see Table 1, for isolate description).

Table 1. *Candida* isolates under study.

Patient	Isolate ID	<i>Candida</i> species	Sampling date	Sampling site
P1	CA3	<i>C. albicans</i>	04/03/2013	blood
P1	CA2	<i>C. albicans</i>	15/03/2013	blood
P1	CA1	<i>C. albicans</i>	14/08/2013	thoracic vertebra (bone biopsy)
P2	CA10	<i>C. albicans</i>	07/11/2014	blood
P2	CA11	<i>C. albicans</i>	16/07/2015	blood
P3	CA513	<i>C. albicans</i>	26/04/2012	anus
P3	CA514	<i>C. albicans</i>	26/04/2012	mouth
P3	CA515	<i>C. albicans</i>	26/04/2012	nose
P3	CA516	<i>C. albicans</i>	26/04/2012	skin
P3	CA586	<i>C. albicans</i>	04/05/2012	soft tissue*(biopsy)
P4	CA758	<i>C. albicans</i>	07/07/2014	gastric wall
P4	C759	<i>C. albicans</i>	07/07/2014	mouth
P4	CA760	<i>C. albicans</i>	07/07/2014	bronchus
P4	CA769	<i>C. albicans</i>	07/07/2014	broncho-alveolar lining
P4	CA817	<i>C. albicans</i>	18/07/2014	pleura (pleural liquid)
P5	CG5	<i>C. glabrata</i>	31/07/2014	gastric wall
P5	CG4	<i>C. glabrata</i>	08/09/2014	blood
P6	CG6	<i>C. glabrata</i>	11/08/2014	urine
P6	CG7	<i>C. glabrata</i>	15/09/2014	blood
P6	CG8	<i>C. glabrata</i>	21/09/2014	blood
P6	CG9	<i>C. glabrata</i>	30/09/2014	scrotum (skin biopsy)
P7 (mother)	CG16	<i>C. glabrata</i>	29/03/2016	vagina
P8 (child)	CG17	<i>C. glabrata</i>	22/03/2016	blood
P9	CG743	<i>C. glabrata</i>	03/07/2014	urine
P9	CG744	<i>C. glabrata</i>	03/07/2014	anus
P9	CG745	<i>C. glabrata</i>	03/07/2014	throat
P9	CG746	<i>C. glabrata</i>	03/07/2014	gastric wall
P9	CG849	<i>C. glabrata</i>	25/07/2014	peritoneum
P9	CG864	<i>C. glabrata</i>	25/07/2014	peritoneum
P10	CG689	<i>C. glabrata</i>	20/06/2014	gastric wall
P10	CG692	<i>C. glabrata</i>	20/06/2014	bronchus
P10	CG715	<i>C. glabrata</i>	25/06/2014	mouth
P10	CG719	<i>C. glabrata</i>	25/06/2014	gastric wall
P10	CG706	<i>C. glabrata</i>	27/06/2014	blood
P11	CG756	<i>C. glabrata</i>	22/06/2012	mouth
P11	CG757	<i>C. glabrata</i>	22/06/2012	nose
P11	CG758	<i>C. glabrata</i>	22/06/2012	anus
P11	CG760	<i>C. glabrata</i>	22/06/2012	peritoneum
P11	CG774	<i>C. glabrata</i>	25/06/2012	abdominal wall (skin biopsy)

*patient with necrotizing fasciitis involving the leg

Table 2. Results of MLST typing of the *C. albicans* and *C. glabrata* isolates under study (see Table 1 for a description of the isolates). *DST, diploid sequence types; ** ST, sequence types; ***For P7 (mother) and P8 (child), X represents a new ST and a new *FKS* allele for which no number has been assigned yet by the curator of the MLST database.

MLST results for <i>C. albicans</i>									
Patients	Isolates	DST*	Allelic profiles						
			<i>AAT1a</i>	<i>ACC1</i>	<i>ADP1</i>	<i>MP1b</i>	<i>SYA1</i>	<i>VPS13</i>	<i>ZWF1b</i>
P1	CA3, CA2, CA1	37	2	5	5	2	2	21	5
P2	CA10, CA11	1863	8	7	6	4	7	10	8
P3	CA513, CA514, CA515, CA516, CA586	820	3	3	5	3	2	100	6
P4	CA758, CA759, CA760, CA769, CA817	461	60	10	21	1	7	11	15

MLST results for <i>C. glabrata</i>									
Patients	Isolates	ST**	Allelic profiles						
			<i>FKS</i>	<i>LEU2</i>	<i>NMT1</i>	<i>TRP1</i>	<i>UGP1</i>	<i>URA3</i>	
P5	CG5, CG4	55	3	6	22	2	3	9	
P6	CG6, CG7, CG8, CG9	3	5	7	8	7	3	6	
P7***	CG16	X	X	5	6	12	1	8	
P8***	CG17	X	X	5	6	12	1	8	
P9	CG743, CG744, CG745, CG746, CG849, CG864	7	3	4	4	3	3	4	
P10	CG689, CG692, CG715, CG719, CG706	59	7	13	17	9	3	19	
P11	CG756, CG757, CG758, CG760, CG774	3	5	7	8	7	3	6	

Conclusion et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'est intéressé à différents aspects de la problématique des candidoses invasives en réanimation : épidémiologie, développement d'outils diagnostiques et résistances aux antifongiques. Les candidoses invasives sont les principales IFI retrouvées en réanimation, avec essentiellement des candidémies et des candidoses intra-abdominales. Ces infections restent, à ce jour, associées à une importante mortalité.

Dans la première partie du travail, nous nous sommes préoccupés du suivi de l'écologie fongique dans un service de réanimation mixte (médicale et chirurgicale) sur une période de dix ans. Pendant cette durée, les recommandations internationales sur la prise en charge thérapeutique des candidoses invasives ont été modifiées et ont positionné en première ligne la classe des échinocandines. Dans le service ciblé, cette modification s'est accompagnée d'une augmentation importante du coût des antifongiques (multipliée par trois en dix ans), corrélée à l'augmentation de la prescription d'échinocandines. Dans la littérature, des modifications de l'écologie fongique avec une baisse de la part de *C. albicans* au profit d'autres espèces ont été rapportées. Dans notre étude, malgré le changement des pratiques de prescription, nous n'avons pas observé de changements significatifs au niveau de l'écologie des *Candida* sp.. Sur les trois dernières années, nous avons toutefois observé certaines tendances, à la baisse pour *C. albicans* et à la hausse pour *C. glabrata* et *C. parapsilosis*, qui seront à confirmer par la suite. Concernant l'incidence des candidémies, les données récentes de la littérature sont contradictoires, avec soit une stabilité soit une augmentation, mais en aucun cas une baisse de l'incidence. Nous avons observé une incidence moyenne de 4,49 pour 1000 admissions. Sur l'ensemble de la période étudiée, nous n'avons pas observé d'augmentation significative, avec toutefois une hausse sur les trois dernières années. Le suivi des sensibilités aux antifongiques, réalisé au cours des dix années, n'a pas mis en évidence d'émergence de résistances. Cependant, une apparition rapide de résistance aux échinocandines est toujours à suspecter en cas d'échec thérapeutique, comme nous l'avons rapporté chez un patient de réanimation colonisé puis infecté à *C. glabrata*.

L'augmentation du nombre de patients sous traitements immunosuppresseurs laisse présager que l'incidence des IFI va demeurer un sujet de préoccupation pour les cliniciens. Les avancées thérapeutiques et la mise en route de traitements précoces permettent une meilleure prise en charge, avec toutefois un coût important. Dans ce contexte, il est indispensable que chaque service à risque surveille régulièrement son écologie fongique ainsi que l'apparition de résistance aux antifongiques. Nous sommes nombreux à participer à des réseaux collaboratifs qui colligent ces

données, tels que le réseau national de surveillance des mycoses invasives mis en place par le centre national de référence des mycoses invasives et antifongiques (RESSIF) ou ConsoRes. Ceci donne une cartographie de l'écologie fongique en France et permet de confronter les pratiques, en particulier sur les stratégies de traitement préemptif.

Le diagnostic des candidoses invasives demeure à ce jour un challenge, en raison d'un manque de spécificité de la symptomatologie clinique et d'une sensibilité médiocre des hémocultures. La stratégie empirique est largement utilisée chez les patients à risque. Elle cible cependant un nombre trop important de patients à traiter, avec des inconvénients potentiels sur l'écologie fongique et le coût financier. Pour ces raisons, nous avons mené une étude afin de déterminer un score prédictif qui permettrait une sélection plus fine des patients à très haut risque de survenue de candidose invasive. Notre travail visait également le développement de techniques de PCR qui complèteraient les outils diagnostiques des candidémies et amélioreraient la sensibilité du diagnostic biologique.

Le score élaboré prenait en compte sept variables : cinq cliniques et deux mycologiques (index de forte colonisation et antigènes mannane). Les performances de ce score sont satisfaisantes en comparaison aux autres scores prédictifs (index de colonisation et Candida Score) et aux biomarqueurs évalués (antigène mannane, anticorps anti-mannane, β DG). Nous avons proposé deux seuils d'utilisation de ce score, un qui permet de cibler 90 % des patients infectés mais qui englobe également 46 % de patients non infectés et un autre qui cible seulement 68 % des patients infectés mais qui permet de réduire le nombre de patients non infectés à 20 %. La recherche de la colonisation, même si elle nécessite un délai pour permettre le calcul du score, est tout de même intéressante. Connaître l'identification et la sensibilité aux antifongiques des souches responsables de la colonisation peut permettre de réaliser un traitement préemptif adapté, ces souches étant généralement celles à l'origine de l'infection. Les scores et biomarqueurs, qui avaient pour objectif de mieux identifier les patients à risque de candidose invasive, sont cependant caractérisés par une faible spécificité et VPP mais par une forte VPN (la meilleure pour le score élaboré). Ceci permet au moins d'éviter un traitement inutile à un groupe de patients. L'utilisation seule des biomarqueurs n'a pas fait la preuve de son efficacité ni pour la sélection des patients à risque ni pour un diagnostic fiable de candidoses invasives.

Dans l'objectif d'améliorer le diagnostic biologique des candidémies, nous avons souhaité développer le diagnostic moléculaire. Nous avons été confrontés à plusieurs écueils pour la mise au point de ces PCR en temps réel. En effet, la contamination de la lyticase commerciale par *S. cerevisiae*, les difficultés pour obtenir une extraction optimale, les charges fongiques très faibles ne nous ont pas permis de tester l'ensemble des échantillons des patients inclus dans l'étude Statut

fongique, comme prévu au départ. A l'heure actuelle, l'élément déterminant et limitant reste l'étape d'extraction. Il n'existe pas de consensus ni sur la fraction sanguine ni sur le protocole d'extraction à utiliser. La quantité circulante de levures est souvent proche de la limite de détection des PCR, ce qui explique les sensibilités analytiques moyennes de cet outil diagnostique. Finalement, nous avons réussi à tester quatre PCR en temps réel, une pan-*Candida* et trois spécifiques d'espèces. L'évaluation s'est faite à partir de sérums de patients ayant eu une candidémie. La stratégie testée permettait un diagnostic plus précoce que l'hémoculture dans plus de deux tiers des cas et une identification de l'espèce dans plus de la moitié. L'utilisation de la technologie ddPCR n'a pas amélioré la sensibilité du diagnostic moléculaire. De nouvelles technologies de PCR sont en cours de développement et d'évaluation, les premiers résultats sont toutefois assez contrastés. Finalement, bien qu'imparfaite, l'utilisation de PCR en temps réel en complément des hémocultures présente l'avantage d'un diagnostic un peu plus précoce.

Le manque de sensibilité des examens biologiques pour le diagnostic d'IFI contraint les réanimateurs à prescrire des traitements antifongiques empiriques, qui représentent jusqu'à deux tiers des prescriptions d'antifongiques, avec des conséquences potentielles sur l'écologie fongique. Si la surveillance de l'écologie et de l'apparition de résistances demeure indispensable, les efforts doivent porter sur l'amélioration du diagnostic de certitude. L'avenir réside probablement dans la combinaison de scores et/ou biomarqueurs, voire le développement de techniques ultrasensibles pour la détection d'ADN fongique.

Bibliographie

- Aguilar G, Delgado C, Corrales I, Izquierdo A, Gracia E, Moreno T, Romero E, Ferrando C, Carbonell JA, Borrás R, Navarro D, and Belda FJ (2015) Epidemiology of invasive candidiasis in a surgical intensive care unit: an observational study. *BMC Res Notes* **8**:491.
- Alam FF, Mustafa AS, and Khan ZU (2007) Comparative evaluation of (1, 3)-beta-D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. *BMC Infect Dis* **7**:103.
- Andes DR, Safdar N, Baddley JW, Playford G, Reboli AC, Rex JH, Sobel JD, Pappas PG, Kullberg BJ, and Mycoses Study Group (2012) Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **54**:1110–1122.
- Angebault C, Lanternier F, Dalle F, Schrimpf C, Roupie A-L, Dupuis A, Agathine A, Scemla A, Paubelle E, Caillet D, Neven B, Frange P, Suarez F, d'Enfert C, Lortholary O, and Bournoux M-E (2016) Prospective Evaluation of Serum β -Glucan Testing in Patients With Probable or Proven Fungal Diseases. *Open Forum Infect Dis* **3**:ofw128.
- Arendrup MC (2010) Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* **16**:445–452.
- Avni T, Leibovici L, and Paul M (2011) PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* **49**:665–670.
- Bacconi A, Richmond GS, Baroldi MA, Laffler TG, Blyn LB, Carolan HE, Frinder MR, Toleno DM, Metzgar D, Gutierrez JR, Massire C, Rounds M, Kennel NJ, Rothman RE, Peterson S, Carroll KC, Wakefield T, Ecker DJ, and Sampath R (2014) Improved sensitivity for molecular detection of bacterial and *Candida* infections in blood. *J Clin Microbiol* **52**:3164–3174.
- Barchiesi F, Orsetti E, Gesuita R, Skrami E, Manso E, and Candidemia Study Group (2016) Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia in a tertiary referral center in Italy from 2010 to 2014. *Infection* **44**:205–213.
- Bassetti M, Ansaldi F, Nicolini L, Malfatto E, Molinari MP, Mussap M, Rebesco B, Bobbio Pallavicini F, Icardi G, and Viscoli C (2009) Incidence of candidaemia and relationship with fluconazole use in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* **64**:625–629.
- Bassetti M, Merelli M, Righi E, Diaz-Martin A, Rosello EM, Luzzati R, Parra A, Treçarichi EM, Sanguinetti M, Posteraro B, Garnacho-Montero J, Sartor A, Rello J, and Tumbarello M (2013) Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *J Clin Microbiol* **51**:4167–4172.
- Bassetti M, Mikulska M, and Viscoli C (2010) Bench-to-bedside review: therapeutic management of invasive candidiasis in the intensive care unit. *Crit Care Lond Engl* **14**:244.
- Bassetti M, Righi E, Ansaldi F, Merelli M, Scarparo C, Antonelli M, Garnacho-Montero J, Diaz-Martin A, Palacios-Garcia I, Luzzati R, Rosin C, Lagunes L, Rello J, Almirante B, Scotton PG, Baldin G, Dimopoulos G, Nucci M, Munoz P, Vena A, Bouza E, de Egea V, Colombo AL, Tascini C, Menichetti F, Tagliaferri E, Brugnaro P, Sanguinetti M, Mesini A, Sganga G, Viscoli C, and Tumbarello M (2015) A multicenter multinational study of abdominal candidiasis: epidemiology, outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Med* **41**:1601–1610.

- Bassetti M, Treccarichi EM, Righi E, Sanguinetti M, Bisio F, Posteraro B, Soro O, Cauda R, Viscoli C, and Tumbarello M (2007) Incidence, risk factors, and predictors of outcome of candidemia. Survey in 2 Italian university hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* **58**:325–331.
- Berdal J-E, Haagensen R, Ranheim T, and Bjørnholt JV (2014) Nosocomial candidemia; risk factors and prognosis revisited; 11 years experience from a Norwegian secondary hospital. *PloS One* **9**:e103916.
- Beyda ND, Alam MJ, and Garey KW (2013) Comparison of the T2Dx instrument with T2Candida assay and automated blood culture in the detection of *Candida* species using seeded blood samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* **77**:324–326.
- Bitar D, Lortholary O, Dromer F, Coignard B, and Che D (2013) Mycoses invasives en France métropolitaine, PMSI 2001-2010 : incidence, létalité et tendances. *Bull Epid Hebd Special Issue* **12–13**:109–114.
- Bloos F, Sachse S, Kortgen A, Pletz MW, Lehmann M, Straube E, Riedemann NC, Reinhart K, and Bauer M (2012) Evaluation of a polymerase chain reaction assay for pathogen detection in septic patients under routine condition: an observational study. *PloS One* **7**:e46003.
- Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, Rangel-Frausto MS, Rinaldi MG, Saiman L, Wiblin RT, Wenzel RP, and National Epidemiology of Mycoses Survey(NEMIS) Study Group (2001) Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **33**:177–186.
- Bosman KJ, Nijhuis M, van Ham PM, Wensing AMJ, Vervisch K, Vandekerckhove L, and De Spiegelaere W (2015) Comparison of digital PCR platforms and semi-nested qPCR as a tool to determine the size of the HIV reservoir. *Sci Rep* **5**:13811.
- Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, and Nicolas-Chanoine M (1999) Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol* **37**:925–930.
- Bougnoux M-E, Kac G, Aegerter P, d’Enfert C, Fagon J-Y, and CandiRea Study Group (2008) Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Med* **34**:292–299.
- Bruyère R, Quenot J-P, Prin S, Dalle F, Vigneron C, Aho S, Leon C, and Charles P-E (2014) Empirical antifungal therapy with an echinocandin in critically-ill patients: prospective evaluation of a pragmatic *Candida* score-based strategy in one medical ICU. *BMC Infect Dis* **14**:385.
- Bu R, Sathiapalan RK, Ibrahim MM, Al-Mohsen I, Almodavar E, Gutierrez MI, and Bhatia K (2005) Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *J Med Microbiol* **54**:243–248.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, and Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55**:611–622.

- Caggiano G, Coretti C, Bartolomeo N, Lovero G, De Giglio O, and Montagna MT (2015) *Candida* Bloodstream Infections in Italy: Changing Epidemiology during 16 Years of Surveillance. *BioMed Res Int* **2015**:256580.
- Caggiano G, Puntillo F, Coretti C, Giglio M, Alicino I, Manca F, Bruno F, and Montagna MT (2011) *Candida* colonization index in patients admitted to an ICU. *Int J Mol Sci* **12**:7038–7047.
- Calvo B, Melo ASA, Perozo-Mena A, Hernandez M, Francisco EC, Hagen F, Meis JF, and Colombo AL (2016) First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. *J Infect* **73**:369–374.
- Casanova M, and Chaffin WL (1991) Cell wall glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods. *J Gen Microbiol* **137**:1045–1051.
- Charles PE, Dalle F, Aube H, Doise JM, Quenot JP, Aho LS, Chavanet P, and Blettery B (2005) *Candida* spp. colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study. *Intensive Care Med* **31**:393–400.
- Chiarini A, Palmeri A, Amato T, Immordino R, Distefano S, and Giammanco A (2008) Detection of bacterial and yeast species with the Bactec 9120 automated system with routine use of aerobic, anaerobic, and fungal media. *J Clin Microbiol* **46**:4029–4033.
- Clancy CJ, and Nguyen MH (2013) Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **56**:1284–1292.
- Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, Meersseman W, Akova M, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Castagnola E, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Groll AH, Herbrecht R, Hope WW, Jensen HE, Lass-Flörl C, Petrikos G, Richardson MD, Roilides E, Verweij PE, Viscoli C, Ullmann AJ, and ESCMID Fungal Infection Study Group (2012) ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* **18 Suppl 7**:19–37.
- Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, Jensen HE, Lass-Flörl C, Richardson MD, Akova M, Bassetti M, Calandra T, Castagnola E, Cornely OA, Garbino J, Groll AH, Herbrecht R, Hope WW, Kullberg BJ, Lortholary O, Meersseman W, Petrikos G, Roilides E, Viscoli C, Ullmann AJ, and ESCMID Fungal Infection Study Group (2012) ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* **18 Suppl 7**:9–18.
- Das I, Nightingale P, Patel M, and Jumaa P (2011) Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis* **15**:e759-763.
- Delaloye J, and Calandra T (2014) Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence* **5**:161–169.
- Delfino D, Scordino F, Pernice I, Lo Passo C, Galbo R, David A, Barberi I, Criseo G, Cascio A, and Romeo O (2014) Potential association of specific *Candida parapsilosis* genotypes, bloodstream infections and colonization of health workers’ hands. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* **20**:O946-951.

- Desmet S, Maertens J, Bueselinck K, and Lagrou K (2016) Broad-Range PCR Coupled with Electrospray Ionization Time of Flight Mass Spectrometry for Detection of Bacteremia and Fungemia in Patients with Neutropenic Fever. *J Clin Microbiol* **54**:2513–2520.
- Diehl F, and Diaz LA (2007) Digital quantification of mutant DNA in cancer patients. *Curr Opin Oncol* **19**:36–42.
- Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, da Mota VP, and Colombo AL (2016) Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS One* **11**:e0146909.
- Doi H, Takahara T, Minamoto T, Matsuhashi S, Uchii K, and Yamanaka H (2015) Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species. *Environ Sci Technol* **49**:5601–5608.
- Dunyach C, Bertout S, Phelipeau C, Drakulovski P, Reynes J, and Mallié M (2008) Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* **60**:263–271.
- Dupont BF, Lortholary O, Ostrosky-Zeichner L, Stucker F, and Yeldandi V (2009) Treatment of candidemia and invasive candidiasis in the intensive care unit: post hoc analysis of a randomized, controlled trial comparing micafungin and liposomal amphotericin B. *Crit Care Lond Engl* **13**:R159.
- Dupont H, Bourichon A, Paugam-Burtz C, Mantz J, and Desmots J-M (2003) Can yeast isolation in peritoneal fluid be predicted in intensive care unit patients with peritonitis? *Crit Care Med* **31**:752–757.
- Dupont H, Paugam-Burtz C, Muller-Serieys C, Fierobe L, Chosidow D, Marmuse J-P, Mantz J, and Desmots J-M (2002) Predictive factors of mortality due to polymicrobial peritonitis with *Candida* isolation in peritoneal fluid in critically ill patients. *Arch Surg Chic Ill 1960* **137**:1341–1346; discussion 1347.
- ECDC (2013) Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. *European Centre for Disease Prevention and Control*.
- Eggimann P, Bille J, and Marchetti O (2011) Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU. *Ann Intensive Care* **1**:37.
- Eggimann P, Garbino J, and Pittet D (2003) Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* **3**:685–702.
- Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, Bowden RA, van Burik J, Engelhard D, Kanz L, and Schumacher U (1997) Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* **35**:1353–1360.
- Eliakim-Raz N, Babaoff R, Yahav D, Yanai S, Shaked H, and Bishara J (2016) Epidemiology, microbiology, clinical characteristics, and outcomes of candidemia in internal medicine wards—a retrospective study. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis* **52**:49–54.
- Elie CM, Lott TJ, Reiss E, and Morrison CJ (1998) Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. *J Clin Microbiol* **36**:3260–3265.

- Falagas ME, Apostolou KE, and Pappas VD (2006) Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* **25**:419–425.
- Faria-Ramos I, Neves-Maia J, Ricardo E, Santos-Antunes J, Silva AT, Costa-de-Oliveira S, Cantón E, Rodrigues AG, and Pina-Vaz C (2014) Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility profiles of yeast isolates from invasive infections during a Portuguese multicenter survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* **33**:2241–2247.
- Ferreira D, Grenouillet F, Blasco G, Samain E, Hénon T, Dussaucy A, Millon L, Mercier M, and Pili-Floury S (2015) Outcomes associated with routine systemic antifungal therapy in critically ill patients with *Candida* colonization. *Intensive Care Med* **41**:1077–1088.
- Fricke S, Fricke C, Schimmelpfennig C, Oelkrug C, Schönfelder U, Blatz R, Zilch C, Faber S, Hilger N, Ruhnke M, and Rodloff AC (2010) A real-time PCR assay for the differentiation of *Candida* species. *J Appl Microbiol* **109**:1150–1158.
- Gangneux J-P, Bougnoux M-E, Hennequin C, Godet C, Chandenier J, Denning DW, Dupont B, and LIFE program, the Société française de mycologie médicale SFMM-study group (2016) An estimation of burden of serious fungal infections in France. *J Mycol Med* **26**:385–390.
- Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, and Bearden DT (2006) 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* **43**:25–31.
- Goldschmidt P, Degorge S, Merabet L, and Chaumeil C (2014) Enzymatic treatment of specimens before DNA extraction directly influences molecular detection of infectious agents. *PLoS One* **9**:e94886.
- González de Molina FJ, León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, and CAVA I Study Group (2012) Assessment of candidemia-attributable mortality in critically ill patients using propensity score matching analysis. *Crit Care Lond Engl* **16**:R105.
- Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, and Diekema D (2003) Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **37**:1172–1177.
- Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, Azoulay E, Borges Sá M, Johnson EM, Müller E, Putensen C, Rotstein C, Sganga G, Venditti M, Zaragoza Crespo R, and Kullberg BJ (2009) Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. *Intensive Care Med* **35**:55–62.
- Hayden RT, Gu Z, Ingersoll J, Abdul-Ali D, Shi L, Pounds S, and Caliendo AM (2013) Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* **51**:540–546.
- Hedderwick SA, Lyons MJ, Liu M, Vazquez JA, and Kauffman CA (2000) Epidemiology of yeast colonization in the intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* **19**:663–670.
- Held J, Kohlberger I, Rappold E, Busse Grawitz A, and Häcker G (2013) Comparison of (1->3)- β -D-glucan, mannan/anti-mannan antibodies, and Cand-Tec *Candida* antigen as serum biomarkers for candidemia. *J Clin Microbiol* **51**:1158–1164.

- Hermesen ED, Zapapas MK, Maiefski M, Rupp ME, Freifeld AG, and Kalil AC (2011) Validation and comparison of clinical prediction rules for invasive candidiasis in intensive care unit patients: a matched case-control study. *Crit Care Lond Engl* **15**:R198.
- Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, Kitano TK, Hodel MR, Petersen JF, Wyatt PW, Steenblock ER, Shah PH, Bousse LJ, Troup CB, Mellen JC, Wittmann DK, Erndt NG, Cauley TH, Koehler RT, So AP, Dube S, Rose KA, Montesclaros L, Wang S, Stumbo DP, Hodges SP, Romine S, Milanovich FP, White HE, Regan JF, Karlin-Neumann GA, Hindson CM, Saxonov S, and Colston BW (2011) High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* **83**:8604–8610.
- Hope WW, Walsh TJ, and Denning DW (2005) Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* **5**:609–622.
- Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang C-H, and Webster KM (2009) 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* **48**:1695–1703.
- Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, Hellemans J, Kubista M, Mueller RD, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT, and Bustin SA (2013) The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin Chem* **59**:892–902.
- Innings A, Ullberg M, Johansson A, Rubin CJ, Noreus N, Isaksson M, and Herrmann B (2007) Multiplex real-time PCR targeting the RNase P RNA gene for detection and identification of *Candida* species in blood. *J Clin Microbiol* **45**:874–880.
- Jaijakul S, Vazquez JA, Swanson RN, and Ostrosky-Zeichner L (2012) (1,3)- β -D-glucan as a prognostic marker of treatment response in invasive candidiasis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **55**:521–526.
- Jeddi F, Piarroux R, and Mary C (2013) Application of the NucliSENS easyMAG system for nucleic acid extraction: optimization of DNA extraction for molecular diagnosis of parasitic and fungal diseases. *Parasite Paris Fr* **20**:52.
- Jones M, Williams J, Gärtner K, Phillips R, Hurst J, and Frater J (2014) Low copy target detection by Droplet Digital PCR through application of a novel open access bioinformatic pipeline, “definetherain.” *J Virol Methods* **202**:46–53.
- Jordanides NE, Allan EK, McLintock LA, Copland M, Devaney M, Stewart K, Parker AN, Johnson PRE, Holyoake TL, and Jones BL (2005) A prospective study of real-time panfungal PCR for the early diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Bone Marrow Transplant* **35**:389–395.
- Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, and Falagas ME (2011) β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **52**:750–770.
- Kasai M, Francesconi A, Petraitiene R, Petraitis V, Kelaher AM, Kim H-S, Meletiadiis J, Sein T, Bacher J, and Walsh TJ (2006) Use of quantitative real-time PCR to study the kinetics of extracellular

- DNA released from *Candida albicans*, with implications for diagnosis of invasive Candidiasis. *J Clin Microbiol* **44**:143–150.
- Kato A, Takita T, Furuhashi M, Takahashi T, Maruyama Y, and Hishida A (2001) Elevation of blood (1->3)-beta-D-glucan concentrations in hemodialysis patients. *Nephron* **89**:15–19.
- Kiselinova M, Pasternak AO, De Spiegelaere W, Vogelaers D, Berkhout B, and Vandekerckhove L (2014) Comparison of droplet digital PCR and seminested real-time PCR for quantification of cell-associated HIV-1 RNA. *PLoS One* **9**:e85999.
- Kishore R, Reef Hardy W, Anderson VJ, Sanchez NA, and Buoncristiani MR (2006) Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the BioRobot EZ1 and BioRobot M48. *J Forensic Sci* **51**:1055–1061.
- Klingspor L, and Jalal S (2006) Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* **12**:745–753.
- Klingspor L, Muhammed SA, and Ozenci V (2012) 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* **31**:2983–2987.
- Klingspor L, Tortorano AM, Peman J, Willinger B, Hamal P, Sendid B, Velegriaki A, Kibbler C, Meis JF, Sabino R, Ruhnke M, Arikian-Akdagli S, Salonen J, and Dóczy I (2015) Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008). *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* **21**:87.e1-87.e10.
- Klis FM (1994) Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast Chichester Engl* **10**:851–869.
- Lau A, Halliday C, Chen SC-A, Playford EG, Stanley K, and Sorrell TC (2010) Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR. *J Clin Microbiol* **48**:811–816.
- Lau AF, Kabir M, Chen SC-A, Playford EG, Marriott DJ, Jones M, Lipman J, McBryde E, Gottlieb T, Cheung W, Seppelt I, Iredell J, and Sorrell TC (2015) *Candida* colonization as a risk marker for invasive candidiasis in mixed medical-surgical intensive care units: development and evaluation of a simple, standard protocol. *J Clin Microbiol* **53**:1324–1330.
- Lehmann LE, Hunfeld K-P, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoeft A, and Stüber F (2008) A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **197**:313–324.
- León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Alvarez-Lerma F, Garnacho-Montero J, León MA, and EPCAN Study Group (2006) A bedside scoring system (“*Candida* score”) for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Crit Care Med* **34**:730–737.
- León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Castro C, Loza A, Zakariya I, Úbeda A, Parra M, Macías D, Tomás JI, Rezusta A, Rodríguez A, Gómez F, Martín-Mazuelos E, and Cava Trem Study Group (2016) Contribution of *Candida* biomarkers and DNA detection for the diagnosis of invasive candidiasis in ICU patients with severe abdominal conditions. *Crit Care Lond Engl* **20**:149.

- León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Castro C, Ubeda A, Loza A, Martín-Mazuelos E, Blanco A, Jerez V, Ballús J, Alvarez-Rocha L, Utande-Vázquez A, and Fariñas O (2012) Value of β -D-glucan and *Candida albicans* germ tube antibody for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in patients with severe abdominal conditions. *Intensive Care Med* **38**:1315–1325.
- León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Galván B, Blanco A, Castro C, Balasini C, Utande-Vázquez A, González de Molina FJ, Blasco-Navalproto MA, López MJ, Charles PE, Martín E, Hernández-Viera MA, and Cava Study Group (2009) 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* **37**:1624–1633.
- Leroy G, Lambiotte F, Thévenin D, Lemaire C, Parmentier E, Devos P, and Leroy O (2011) Evaluation of “Candida score” in critically ill patients: a prospective, multicenter, observational, cohort study. *Ann Intensive Care* **1**:50.
- Leroy O, Gangneux J-P, Montravers P, Mira J-P, Gouin F, Sollet J-P, Carlet J, Reynes J, Rosenheim M, Regnier B, Lortholary O, and AmarCand Study Group (2009) 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* **37**:1612–1618.
- Li C, Wang H, Yin M, Han H, Yue J-F, Zhang F, Shan T-C, Guo H-P, and Wu D-W (2015) The Differences in the Epidemiology and Predictors of Death between Candidemia Acquired in Intensive Care Units and Other Hospital Settings. *Intern Med Tokyo Jpn* **54**:3009–3016.
- Liew YX, Teo J, Too IA-L, Ngan CC-L, Tan AL, Chlebicki MP, Kwa AL-H, and Lee W (2015) *Candida* Surveillance in Surgical Intensive Care Unit (SICU) in a Tertiary Institution. *BMC Infect Dis* **15**:256.
- Lo Cascio G, Koncan R, Stringari G, Russo A, Azzini A, Ugolini A, Ligozzi M, Polati E, Cornaglia G, Concia E, and Schweiger V (2015) Interference of confounding factors on the use of (1,3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive candidiasis in the intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* **34**:357–365.
- Loeffler J, Hagemeyer L, Hebart H, Henke N, Schumacher U, and Einsele H (2000) Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in *Candida* species. *Clin Chem* **46**:631–635.
- Loeffler J, Hebart H, Bialek R, Hagemeyer L, Schmidt D, Serey FP, Hartmann M, Eucker J, and Einsele H (1999) Contaminations occurring in fungal PCR assays. *J Clin Microbiol* **37**:1200–1202.
- Loeffler J, Mengoli C, Springer J, Bretagne S, Cuenca-Estrella M, Klingspor L, Lagrou K, Melchers WJG, Morton CO, Barnes RA, Donnelly JP, White PL, and European *Aspergillus* PCR Initiative (2015) Analytical Comparison of *In Vitro*-Spiked Human Serum and Plasma for PCR-Based Detection of *Aspergillus fumigatus* DNA: a Study by the European *Aspergillus* PCR Initiative. *J Clin Microbiol* **53**:2838–2845.
- Löffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, and Einsele H (1997) Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol* **35**:3311–3312.
- Loonen AJM, Bos MP, van Meerbergen B, Neerken S, Catsburg A, Dobbelaer I, Penterman R, Maertens G, van de Wiel P, Savelkoul P, and van den Brule AJC (2013) Comparison of

- pathogen DNA isolation methods from large volumes of whole blood to improve molecular diagnosis of bloodstream infections. *PLoS One* **8**:e72349.
- Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F, and French Mycosis Study Group (2011) Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:532–538.
- Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoeud-Ndam L, Wolff M, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F, and French Mycosis Study Group (2014) Worrying trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med* **40**:1303–1312.
- Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, and Menichella D (2011) Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J Clin Microbiol* **49**:2252–2258.
- Maaroufi Y, Ahariz N, Husson M, and Crokaert F (2004) Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay. *J Clin Microbiol* **42**:3159–3163.
- Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne J-M, Duchateau V, Rodriguez-Villalobos H, Aoun M, and Crokaert F (2003) Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. *J Clin Microbiol* **41**:3293–3298.
- Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, Calandra T, Glauser M-P, Täuber MG, Pittet D, and Fungal Infection Network of Switzerland (2004) Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **38**:311–320.
- Martínez-Jiménez MC, Muñoz P, Valerio M, Alonso R, Martos C, Guinea J, and Bouza E (2015a) *Candida* biomarkers in patients with candidaemia and bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* **70**:2354–2361.
- Martínez-Jiménez MC, Muñoz P, Valerio M, Vena A, Guinea J, and Bouza E (2015b) Combination of *Candida* biomarkers in patients receiving empirical antifungal therapy in a Spanish tertiary hospital: a potential role in reducing the duration of treatment. *J Antimicrob Chemother* **70**:3107–3115.
- Martín-Mazuelos E, Loza A, Castro C, Macías D, Zakariya I, Saavedra P, Ruiz-Santana S, Marín E, and León C (2015) β -D-Glucan and *Candida albicans* germ tube antibody in ICU patients with invasive candidiasis. *Intensive Care Med* **41**:1424–1432.
- Marty FM, and Koo S (2009) Role of (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol* **47 Suppl 1**:S233-240.
- McKinnon PS, Goff DA, Kern JW, Devlin JW, Barletta JF, Sierawski SJ, Mosenthal AC, Gore P, Ambegaonkar AJ, and Lubowski TJ (2001) Temporal assessment of *Candida* risk factors in the surgical intensive care unit. *Arch Surg Chic Ill 1960* **136**:1401–1408; discussion 1409.
- McMullan R, Metwally L, Coyle PV, Hedderwick S, McCloskey B, O’Neill HJ, Patterson CC, Thompson G, Webb CH, and Hay RJ (2008) 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* **46**:890–896.
- Mennink-Kersten MASH, Warris A, and Verweij PE (2006) 1,3-beta-D-glucan in patients receiving intravenous amoxicillin-clavulanic acid. *N Engl J Med* **354**:2834–2835.
- Mery A, Sendid B, François N, Cornu M, Poissy J, Guerardel Y, and Poulain D (2016) Application of Mass Spectrometry Technology to Early Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *J Clin Microbiol* **54**:2786–2797.
- Metwally L, Fairley DJ, Coyle PV, Hay RJ, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, Webb CH, Elbaz W, and McMullan R (2008a) Improving molecular detection of *Candida* DNA in whole blood: comparison of seven fungal DNA extraction protocols using real-time PCR. *J Med Microbiol* **57**:296–303.
- Metwally L, Fairley DJ, Coyle PV, Hay RJ, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, Webb CH, and McMullan R (2008b) Comparison of serum and whole-blood specimens for the detection of *Candida* DNA in critically ill, non-neutropenic patients. *J Med Microbiol* **57**:1269–1272.
- Metzgar D, Frinder M, Lovari R, Toleno D, Massire C, Blyn LB, Ranken R, Carolan HE, Hall TA, Moore D, Hansen CJ, Sampath R, and Ecker DJ (2013) Broad-spectrum biosensor capable of detecting and identifying diverse bacterial and *Candida* species in blood. *J Clin Microbiol* **51**:2670–2678.
- Metzgar D, Frinder MW, Rothman RE, Peterson S, Carroll KC, Zhang SX, Avornu GD, Rounds MA, Carolan HE, Toleno DM, Moore D, Hall TA, Massire C, Richmond GS, Gutierrez JR, Sampath R, Ecker DJ, and Blyn LB (2016) The IRIDICA BAC BSI Assay: Rapid, Sensitive and Culture-Independent Identification of Bacteria and *Candida* in Blood. *PLoS One* **11**:e0158186.
- Meyer E, Geffers C, Gastmeier P, and Schwab F (2013) No increase in primary nosocomial candidemia in 682 German intensive care units during 2006 to 2011. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* **18**.
- Meyer M-H, Letscher-Bru V, Jaulhac B, Waller J, and Candolfi E (2004) Comparison of Mycosis IC/F and plus Aerobic/F media for diagnosis of fungemia by the bactec 9240 system. *J Clin Microbiol* **42**:773–777.
- Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C, and Third European Conference on Infections in Leukemia Group (2010) 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 Lond Engl* **14**:R222.
- Montravers P, Dupont H, Gauzit R, Veber B, Auboyer C, Blin P, Hennequin C, and Martin C (2006) *Candida* as a risk factor for mortality in peritonitis. *Crit Care Med* **34**:646–652.
- Montravers P, Mira J-P, Gangneux J-P, Leroy O, Lortholary O, and AmarCand study group (2011) A multicentre study of antifungal strategies and outcome of *Candida* spp. peritonitis in intensive-care units. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* **17**:1061–1067.
- Montravers P, Perrigault PF, Timsit JF, Mira JP, Lortholary O, Leroy O, Gangneux JP, Guillemot D, Bensoussan C, Bailly S, Azoulay E, Constantin JM, Dupont H, and AmarCAND2 Study Group (2016) Antifungal therapy for patients with proven or suspected *Candida* peritonitis:

- Amarcand2, a prospective cohort study in French intensive care units. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*, doi: 10.1016/j.cmi.2016.10.001.
- Morrell M, Fraser VJ, and Kollef MH (2005) 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* **49**:3640–3645.
- Mylonakis E, Clancy CJ, Ostrosky-Zeichner L, Garey KW, Alangaden GJ, Vazquez JA, Groeger JS, Judson MA, Vinagre Y-M, Heard SO, Zervou FN, Zacharioudakis IM, Kontoyiannis DP, and Pappas PG (2015) T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: a clinical trial. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **60**:892–899.
- Neely LA, Audeh M, Phung NA, Min M, Suchocki A, Plourde D, Blanco M, Demas V, Skewis LR, Anagnostou T, Coleman JJ, Wellman P, Mylonakis E, and Lowery TJ (2013) T2 magnetic resonance enables nanoparticle-mediated rapid detection of candidemia in whole blood. *Sci Transl Med* **5**:182ra54.
- Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, Salomoni MA, Hao B, Press EG, Shields RM, Cheng S, Mitsani D, Vadnerkar A, Silveira FP, Kleiboeker SB, and Clancy CJ (2012) Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, β -D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **54**:1240–1248.
- Nieman AE, Savelkoul PHM, Beishuizen A, Henrich B, Lamik B, MacKenzie CR, Kindgen-Milles D, Helmers A, Diaz C, Sakka SG, and Schade RP (2016) A prospective multicenter evaluation of direct molecular detection of blood stream infection from a clinical perspective. *BMC Infect Dis* **16**:314.
- Nucci M, and Anaissie E (2001) Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **33**:1959–1967.
- Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ketchum PA, Finkelman MA, Rex JH, and Ostrosky-Zeichner L (2004) Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **39**:199–205.
- Odabasi Z, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, McGinnis MR, and Ostrosky-Zeichner L (2006) Differences in beta-glucan levels in culture supernatants of a variety of fungi. *Med Mycol* **44**:267–272.
- Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Morinobu A, Nishimura K, and Kumagai S (2012) Diagnostic accuracy of serum 1,3- β -D-glucan for pneumocystis jiroveci pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* **50**:7–15.
- Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, Ketchum PA, Wingard J, Schiff R, Tamura H, Finkelman MA, and Rex JH (2005) Multicenter clinical evaluation of the (1 \rightarrow 3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **41**:654–659.
- Ostrosky-Zeichner L, Pappas PG, Shoham S, Reboli A, Barron MA, Sims C, Wood C, and Sobel JD (2011) Improvement of a clinical prediction rule for clinical trials on prophylaxis for invasive candidiasis in the intensive care unit. *Mycoses* **54**:46–51.

- Ostrosky-Zeichner L, Sable C, Sobel J, Alexander BD, Donowitz G, Kan V, Kauffman CA, Kett D, Larsen RA, Morrison V, Nucci M, Pappas PG, Bradley ME, Major S, Zimmer L, Wallace D, Dismukes WE, and Rex JH (2007) Multicenter retrospective development and validation of a clinical prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* **26**:271–276.
- Paiva J-A, Pereira JM, Tabah A, Mikstacki A, de Carvalho FB, Koulenti D, Ruckly S, Çakar N, Missel B, Dimopoulos G, Antonelli M, Rello J, Ma X, Tamowicz B, and Timsit J-F (2016) Characteristics and risk factors for 28-day mortality of hospital acquired fungemias in ICUs: data from the EUROBACT study. *Crit Care Lond Engl* **20**:53.
- Paphitou NI, Ostrosky-Zeichner L, and Rex JH (2005) Rules for identifying patients at increased risk for candidal infections in the surgical intensive care unit: approach to developing practical criteria for systematic use in antifungal prophylaxis trials. *Med Mycol* **43**:235–243.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg B-J, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, and Infectious Diseases Society of America (2009) 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* **48**:503–535.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, and Sobel JD (2016) Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **62**:e1-50.
- Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Kauffman CA, Hyslop N, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE, Dismukes WE, and NIAID Mycoses Study Group (2003) A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **37**:634–643.
- Parkins MD, Sabuda DM, Elsayed S, and Laupland KB (2007) Adequacy of empirical antifungal therapy and effect on outcome among patients with invasive *Candida* species infections. *J Antimicrob Chemother* **60**:613–618.
- Parra-Sánchez M, Zakariya-Yousef Breval I, Castro Méndez C, García-Rey S, Loza Vazquez A, Úbeda Iglesias A, Macías Guerrero D, Romero Mejías A, León Gil C, Martín-Mazuelos E, and CAVA Trem Study Group (2017) *Candida albicans* Germ-Tube Antibody: Evaluation of a New Automatic Assay for Diagnosing Invasive Candidiasis in ICU Patients. *Mycopathologia*, doi: 10.1007/s11046-017-0125-9.
- Petri MG, König J, Moecke HP, Gramm HJ, Barkow H, Kujath P, Denhart R, Schäfer H, Meyer N, Kalmar P, Thülig P, Müller J, and Lode H (1997) Epidemiology of invasive mycosis in ICU patients: a prospective multicenter study in 435 non-neutropenic patients. Paul-Ehrlich Society for Chemotherapy, Divisions of Mycology and Pneumonia Research. *Intensive Care Med* **23**:317–325.
- Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche H-U, Quan S-P, and Horn D (2012) Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* **74**:323–331.

- Pfaller MA, and Diekema DJ (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**:133–163.
- Pfaller MA, Messer SA, Houston A, Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Edwards JE, Jarvis W, Martin MA, Neu HC, Saiman L, Patterson JE, Dibb JC, Roldan CM, Rinaldi MG, and Wenzel RP (1998) National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* **31**:289–296.
- Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, and Castanheira M (2011) *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Int J Antimicrob Agents* **38**:65–69.
- Pfaller MA, Wolk DM, and Lowery TJ (2016) T2MR and T2Candida: novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis. *Future Microbiol* **11**:103–117.
- Pfeiffer CD, Samsa GP, Schell WA, Reller LB, Perfect JR, and Alexander BD (2011) Quantitation of *Candida* CFU in initial positive blood cultures. *J Clin Microbiol* **49**:2879–2883.
- Piarroux R, Grenouillet F, Balvay P, Tran V, Blasco G, Millon L, and Boillot A (2004) Assessment of preemptive treatment to prevent severe candidiasis in critically ill surgical patients. *Crit Care Med* **32**:2443–2449.
- Pickering JW, Sant HW, Bowles CAP, Roberts WL, and Woods GL (2005) Evaluation of a (1- \rightarrow 3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* **43**:5957–5962.
- Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, and Emslie KR (2012) Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem* **84**:1003–1011.
- Pini P, Bettua C, Orsi CF, Venturelli C, Forghieri F, Bigliardi S, Faglioni L, Luppi F, Serio L, Codeluppi M, Luppi M, Mussini C, Girardis M, and Blasi E (2016) Evaluation of serum (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan clinical performance: kinetic assessment, comparison with galactomannan and evaluation of confounding factors. *Infection* **44**:223–233.
- Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, and Auckenthaler R (1994) *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* **220**:751–758.
- Playford EG, Lipman J, Jones M, Lau AF, Kabir M, Chen SC-A, Marriott DJ, Seppelt I, Gottlieb T, Cheung W, Iredell JR, McBryde ES, and Sorrell TC (2016) Problematic Dichotomization of Risk for Intensive Care Unit (ICU)-Acquired Invasive Candidiasis: Results Using a Risk-Predictive Model to Categorize 3 Levels of Risk From a Multicenter Prospective Cohort of Australian ICU Patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **63**:1463–1469.
- Poissy J, Sendid B, Damiens S, Ichi Ishibashi K, François N, Kouv M, Favory R, Mathieu D, and Poulain D (2014) Presence of *Candida* cell wall derived polysaccharides in the sera of intensive care unit patients: relation with candidaemia and *Candida* colonisation. *Crit Care Lond Engl* **18**:R135.
- Posteraro B, De Pascale G, Tumbarello M, Torelli R, Pennisi MA, Bello G, Maviglia R, Fadda G, Sanguinetti M, and Antonelli M (2011) Early diagnosis of candidemia in intensive care unit

- patients with sepsis: a prospective comparison of (1→3)-β-D-glucan assay, Candida score, and colonization index. *Crit Care Lond Engl* **15**:R249.
- Posteraro B, Tumbarello M, De Pascale G, Liberto E, Vallecoccia MS, De Carolis E, Di Gravio V, Trecarichi EM, Sanguinetti M, and Antonelli M (2016) (1,3)-β-d-Glucan-based antifungal treatment in critically ill adults at high risk of candidaemia: an observational study. *J Antimicrob Chemother* **71**:2262–2269.
- Pryce TM, Kay ID, Palladino S, and Heath CH (2003) Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* **47**:487–496.
- Rački N, Dreo T, Gutierrez-Aguirre I, Blejec A, and Ravnikar M (2014) Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods* **10**:42.
- Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Saiman L, Patterson J, Rinaldi M, Pfaller M, Edwards JE, Jarvis W, Dawson J, and Wenzel RP (1999) National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **29**:253–258.
- Reagan DR, Pfaller MA, Hollis RJ, and Wenzel RP (1990) Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. *J Clin Microbiol* **28**:2733–2738.
- Renaudat C, Sitbon K, Desnos-Ollivier M, Fontanet A, Bretagne S, Lortholary O, and Dromer F (2013) Candidémies en Ile-de-France: données de l'Observatoire des levures (2002-2010). *Bull Epid Hebd Special Issue* **12–13**:125–128.
- Rimek D, Garg AP, Haas WH, and Kappe R (1999) Identification of contaminating fungal DNA sequences in Zymolyase. *J Clin Microbiol* **37**:830–831.
- Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, Cowen S, Scott DJ, and Foy CA (2011) Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Anal Chem* **83**:6474–6484.
- Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML, Hirschl AM, and Willinger B (2007) Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol* **45**:906–914.
- Schelenz S, Hagen F, Rhodes JL, Abdolrasouli A, Chowdhary A, Hall A, Ryan L, Shackleton J, Trimlett R, Meis JF, Armstrong-James D, and Fisher MC (2016) First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob Resist Infect Control* **5**:35.
- Schell WA, Benton JL, Smith PB, Poore M, Rouse JL, Boles DJ, Johnson MD, Alexander BD, Pamula VK, Eckhardt AE, Pollack MG, Benjamin DK Jr, Perfect JR, and Mitchell TG (2012) Evaluation of a digital microfluidic real-time PCR platform to detect DNA of *Candida albicans* in blood. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* **31**:2237–2245.
- Scott JH, and Schekman R (1980) Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. *J Bacteriol* **142**:414–423.

- Sedlak RH, Cook L, Cheng A, Magaret A, and Jerome KR (2014) Clinical utility of droplet digital PCR for human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* **52**:2844–2848.
- Sendid B, Cotteau A, François N, D’Haveloose A, Standaert A, Camus D, and Poulain D (2006) Candidaemia and antifungal therapy in a French University Hospital: rough trends over a decade and possible links. *BMC Infect Dis* **6**:80.
- Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, and Poulain D (1999) 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* **37**:1510–1517.
- Stéphan F, Bah MS, Desterke C, Rézaiguia-Delclaux S, Foulet F, Duvaldestin P, and Bretagne S (2002) Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **35**:1477–1483.
- Stevenson M, Pandor A, Martyn-St James M, Rafia R, Uttley L, Stevens J, Sanderson J, Wong R, Perkins GD, McMullan R, and Dark P (2016) Sepsis: the LightCycler SeptiFast Test MGRADE®, SepsiTest™ and IRIDICA BAC BSI assay for rapidly identifying bloodstream bacteria and fungi - a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess Winch Engl* **20**:1–246.
- Strain MC, Lada SM, Luong T, Rought SE, Gianella S, Terry VH, Spina CA, Woelk CH, and Richman DD (2013) Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PLoS One* **8**:e55943.
- Suarez F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT, Ghez D, Mahé V, Quesne G, Poirée S, Buzyn A, Varet B, Berche P, and Bougnoux ME (2008) Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. *J Clin Microbiol* **46**:3772–3777.
- Sugawara Y, Nakase K, Nakamura A, Ohishi K, Sugimoto Y, Fujieda A, Monma F, Suzuki K, Masuya M, Matsushima Y, Wada H, Nobori T, and Katayama N (2013) Clinical utility of a panfungal polymerase chain reaction assay for invasive fungal diseases in patients with haematologic disorders. *Eur J Haematol* **90**:331–339.
- Tadec L, Talarmin J-P, Gastinne T, Bretonnière C, Miegerville M, Le Pape P, and Morio F (2016) Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of Candidemia at a single French hospital: a 7-year study. *Mycoses* **59**:296–303.
- Tirodker UH, Nataro JP, Smith S, LasCasas L, and Fairchild KD (2003) Detection of fungemia by polymerase chain reaction in critically ill neonates and children. *J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc* **23**:117–122.
- Tissot F, Lamoth F, Hauser PM, Orasch C, Flückiger U, Siegemund M, Zimmerli S, Calandra T, Bille J, Eggimann P, Marchetti O, and Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS) (2013) β -glucan antigenemia anticipates diagnosis of blood culture-negative intraabdominal candidiasis. *Am J Respir Crit Care Med* **188**:1100–1109.
- Tortorano AM, Dho G, Prigitano A, Breda G, Grancini A, Emmi V, Cavanna C, Marino G, Morero S, Ossi C, Delvecchio G, Passera M, Cusumano V, David A, Bonaccorso G, Corona A, Favaro M, Vismara C, Garau MG, Falchi S, Tejada MR, and ECMM-FIMUA Study Group (2012) Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006-2008). *Mycoses* **55**:73–79.

- Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, and Grillot R (2006) Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* **27**:359–366.
- Vincent J-L, Brealey D, Libert N, Abidi NE, O'Dwyer M, Zacharowski K, Mikaszewska-Sokolewicz M, Schrenzel J, Simon F, Wilks M, Picard-Maureau M, Chalfin DB, Ecker DJ, Sampath R, Singer M, and Rapid Diagnosis of Infections in the Critically Ill Team (2015) Rapid Diagnosis of Infection in the Critically Ill, a Multicenter Study of Molecular Detection in Bloodstream Infections, Pneumonia, and Sterile Site Infections. *Crit Care Med* **43**:2283–2291.
- Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K, and EPIC II Group of Investigators (2009) International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* **302**:2323–2329.
- Voss A, Hollis RJ, Pfaller MA, Wenzel RP, and Doebbeling BN (1994) Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. *J Clin Microbiol* **32**:975–980.
- Wallet F, Nseir S, Baumann L, Herwegh S, Sendid B, Boulo M, Roussel-Delvallez M, Durocher AV, and Courcol RJ (2010) 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* **16**:774–779.
- Wellinghausen N, Siegel D, Winter J, and Gebert S (2009) Rapid diagnosis of candidaemia by real-time PCR detection of *Candida* DNA in blood samples. *J Med Microbiol* **58**:1106–1111.
- Whale AS, Huggett JF, Cowen S, Speirs V, Shaw J, Ellison S, Foy CA, and Scott DJ (2012) Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic Acids Res* **40**:e82.
- White PL, Mengoli C, Bretagne S, Cuenca-Estrella M, Finnstrom N, Klingspor L, Melchers WJG, McCulloch E, Barnes RA, Donnelly JP, Loeffler J, and European *Aspergillus* PCR Initiative (EAPCRI) (2011) Evaluation of *Aspergillus* PCR protocols for testing serum specimens. *J Clin Microbiol* **49**:3842–3848.
- White PL, Shetty A, and Barnes RA (2003) Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. *J Med Microbiol* **52**:229–238.
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, and Edmond MB (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **39**:309–317.
- Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin JA, Walsh TJ, and Feudtner C (2005) The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **41**:1232–1239.
- Ziegler I, Fagerström A, Strålin K, and Mölling P (2016) Evaluation of a Commercial Multiplex PCR Assay for Detection of Pathogen DNA in Blood from Patients with Suspected Sepsis. *PLoS One* **11**:e0167883.