

INTÉRÊT DE LA SÉROLOGIE FONGIQUE DANS LE DIAGNOSTIC DES CANDIDOSES INVASIVES

MERADJI A⁽¹⁾, MOSBAH N⁽²⁾, MERADJI M⁽³⁾, BELOUAHAR Z⁽⁴⁾, ANNANE N.H⁽⁴⁾, BENMEZDAD A⁽¹⁾, MOULAHEM T⁽¹⁾.

1) Service de Parasitologie et Mycologie Médicales, CHU Constantine, Faculté de Médecine, Université Salah Bounider Constantine 3 (UC3).

2) Service de Réanimation Médicale, CHU Sétif, Faculté de Médecine, Université Ferhat Abbas Sétif 1 (UFAS1).

3) Laboratoire Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL),

Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires, Université Frères Mentouri Constantine 1 (UFMC1).

4) Laboratoire Central, CHU Sétif, Service de Réanimation

Médicale, CHU Sétif, Faculté de Médecine, Université Ferhat Abbas Sétif 1 (UFAS1).

E-mail: Meradji A: assia.meradji@yahoo.fr; Mosbah N : mosbahnbil05@gmail.com; Meradji M : meriem.meradji@umc.edu.dz; Belouahar Z : BELOUAHAR-ZAKIA@hotmail.fr; Annane N.H. : pharmnour2593@gmail.com; Benmezad A : benmezadada@gmail.com; Moulahem T : tmoulahem@gmail.com

RÉSUMÉ :

Le diagnostic des infections invasives à *Candida* demeure problématique compte tenu du manque de spécificité des signes cliniques, le caractère commensal des levures du genre *Candida* et la faible sensibilité de l'hémoculture qui reste l'examen de référence pour le diagnostic des candidémies. La détection des antigènes et des anticorps anti-*Candida* dans le sérum et d'autres liquides organiques est un outil de diagnostic important. L'objectif de ce travail est d'étudier l'intérêt de la sérologie fongique dans le diagnostic des candidémies par la détection d'antigène mannane et anticorps anti-mannane dans le sérum des patients hospitalisés dans les services de réanimation du centre hospitalo-universitaire de Sétif. Les antigènes mannanes et les anticorps anti-mannanes sont recherchés par deux kits commerciaux PLATELIA® *Candida* Ag Plus, *Candida* Ab Plus. Vingt-sept sérums sont testés durant la période d'étude; 20% des patients à hémoculture positive ont une antigénémie positive, les anticorps anti-*Candida* ont été détectés dans la moitié des sérums testés (50%) et 70% des patients à hémoculture positive ont une sérologie positive (antigène et/ou anticorps). Selon nos résultats, l'antigène mannane est très spécifique, aucun patient présentant une hémoculture négative ou colonisée, n'a un antigène. Notre étude a démontré aussi que la recherche des anticorps est plus fréquemment positive que l'antigénémie.

Mots clés : Sérologie fongique, Candidémie, Antigène mannane, Anticorps anti-mannane, PLATELIA® *Candida*.

ABSTRACT : INTERSET OF FUNGAL SEROLOGY IN DIAGNOSIS OF INVASIVE CANDIDAISIS.

The diagnosis of invasive *Candida* infections remains problematic given the lack of specificity of clinical signs, the commensal nature of *Candida* yeasts and the low sensitivity of the blood culture, which remains the reference test for the diagnosis of candidemia. The detection of antigens and anti-*Candida* antibodies in serum and other body fluids is an important diagnostic tool. The objective of this work is to study the interest of fungal serology in the diagnosis of candidemia by the detection of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the serum of patients hospitalized in the intensive care unit of the hospital-university center of Setif. The mannan antigen and anti-mannan antibodies were tested by two commercial PLATELIA® *Candida* Ag Plus, *Candida* Ab Plus kits. Twenty-seven serum were tested during the study period. The sensitivity of the antigens and antibodies alone was 20 and 50% and 70% of the two assays combined. According to our results, the mannan antigen is highly specific, no patient with a negative blood culture or colonized, has an antigen. Our study also showed that antibody testing is more frequently positive than antigen testing.

Key words : Fungal serology, Candidemia, Mannan antigen, Anti-mannan antibodies, PLATELIA® *Candida*.

INTRODUCTION

Le diagnostic des infections invasives à *Candida* demeure problématique compte tenu du manque de spécificité des signes cliniques, le caractère commensal des levures du genre *Candida* et la faible sensibilité de l'hémoculture qui reste l'examen de référence pour le diagnostic des candidémies [1]. Ceci a favorisé le développement de méthodes immunologiques qui permettent la détection des marqueurs d'infection fongique comme les anticorps et les antigènes parasitaires [2]. La détection des antigènes *Candida* dans le sérum et d'autres liquides organiques est un outil de diagnostic important, en particulier chez les patients immunodéprimés où la production d'anticorps peut être variable ou inexistante. L'antigène recherché est un mannane, composant majeur de la paroi cellulaire du *Candida* représentant jusqu'à 7 % du poids sec total de la cellule, il est libéré dans la circulation sanguine pendant l'infection. Il résiste à la chaleur, à la protéinase et au pH acide [3]. La dissociation des complexes anticorps/antigènes est nécessaire pour la détection du mannane dans le sérum puisque ces complexes immunitaires masquent les sites antigéniques et réduisent la sensibilité du test [4]. L'intérêt clinique de la détection des anticorps anti *Candida* pour le diagnostic des candidoses invasives a été limité par des résultats faussement négatifs chez des patients immunodéprimés qui produisent des taux faibles ou indétectables d'anticorps et par des résultats faussement positifs chez des patients présentant une colonisation superficielle [5]. L'objectif de ce travail est d'étudier l'intérêt de la sérologie fongique dans le diagnostic des candidémies par la détection d'antigène mannane et anticorps anti-mannane dans le sérum des patients hospitalisés dans les Services de Réanimation du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Sétif.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Population d'étude

Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée chez vingt-sept patients hospitalisés dans les services de réanimation du CHU de Sétif et qui ont bénéficié d'au moins une hémoculture. Vingt-sept sérums ont été analysés entre le 1^{er} novembre 2016 et le 30 novembre 2017.

2. Prélèvement du sang

Pour chaque patient, un prélèvement du sang sur tube sec a été effectué pour la recherche des antigènes mannane et des anticorps anti *Candida*. Après centrifugation, le sérum a été conservé à -20°C.

3. Recherche des antigènes mannanes et des anticorps anti *Candida*

Le dosage des antigènes mannanes (AgMn) et des anticorps anti-mannanes (Ac anti-Mn) dans le sérum des patients a été réalisé à l'aide de deux kits commerciaux :

- Platelia *Candida* Ag Plus;
- Platelia *Candida* Ab Plus.

Platelia *Candida* Ag Plus est une technique immuno-enzymatique ELISA de type sandwich, réalisée sur microplaque, permettant la détermination de l'Ag Mn circulant dans le sérum.

Les échantillons de sérum et les contrôles positif et négatif ont été traités préalablement à la chaleur en présence d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) afin de dissocier les complexes immuns et de précipiter les protéines sériques susceptibles de générer des interférences avec la réaction immuno-enzymatique. Après distribution des échantillons traités et du conjugué, la plaque de microtitration sensibilisée par l'anticorps

monoclonal anti-Mn a été incubée à 37°C pendant 90 min. Un lavage a été réalisé pour éliminer le matériel non fixé. En présence de l'Ag Mn dans l'échantillon, le complexe AC anti-Mn/Mn/ conjugué formé a été révélé par l'ajout de chromogène contenant le substrat de la peroxydase et une incubation à l'obscurité pendant 30 min. Après arrêt de la réaction enzymatique à l'aide d'acide sulfurique, la lecture de la densité optique a été effectuée avec un spectrophotomètre à 450 nm.

Une courbe d'étalonnage représentant la densité optique en fonction de la concentration en Mn (pg/ml) a été tracée en utilisant cinq calibrateurs. Les concentrations exprimées en pg/ml pour chaque échantillon ont été extrapolées à partir de la courbe de calibration.

Platelia *Candida* Ab Plus est une technique immuno-enzymatique ELISA indirecte, réalisée en deux étapes, sur une microplaque de microtitration permettant de mettre en évidence les Ac anti-Mn présents dans le sérum des patients. Les puits de cette microplaque ont été sensibilisés avec du Mn purifié à partir de *Candida albicans*.

Les échantillons des patients pré-dilués et les deux contrôles positif et négatif ont été distribués dans les cupules de la microplaque et incubés à 37°C pendant 60min. Après ajout du conjugué qui est un anticorps polyclonal marqué par une peroxydase, une incubation de la plaque à 37°C pendant 60min a été effectuée. Des étapes de lavage ont été réalisées après chaque incubation pour éliminer le matériel non fixé. En présence des Ac anti-Mn dans le sérum du patient, le complexe Mn/AC anti-Mn/ conjugué a été formé et révélé par l'ajout de chromogène contenant le substrat de la peroxydase avec une incubation à l'obscurité pendant 30 min. Après arrêt de la réaction enzymatique à l'aide d'acide sulfurique, la lecture de la densité optique a été effectuée avec un spectrophotomètre à 450 nm.

Une courbe d'étalonnage indiquant la densité optique en fonction de la concentration en Ac anti-Mn (UI/ml) a été tracée en utilisant cinq calibrateurs. Les concentrations exprimées en UI/l pour chaque échantillon ont été extrapolées à partir de la courbe de calibration.

RÉSULTATS

Dans cette étude, au total vingt-sept sérums provenant de vingt-sept patients ont été analysés. Sur les 27 sérums testés, 10 ont été prélevés à partir des patients présentant des hémocultures positives à *Candida*.

Comme représenté dans le tableau I, parmi les 10 patients à hémoculture positive, 8 ont eu une antigénémie négative et les AC anti-*Candida* ont été détectés dans la moitié des sérums analysés. 70% des patients ont eu au moins une sérologie positive et uniquement un patient a eu des antigènes et des anticorps positifs en même temps.

Tableau I. Résultat des sérologies pour les patients à hémoculture positive.

	Négatif	Intermédiaire	Positif
Antigène mannane	8(80%)	0(0%)	2(20%)
Anticorps anti-mannane	4(40%)	1(10%)	5(50%)

Le tableau II représente les résultats des sérologies pour les patients avec une hémoculture négative. Sur les 17 sérums analysés, la sérologie a été positive chez deux patients (11.8%). Trois patients ont présenté une sérologie intermédiaire et aucun patient n'a eu des antigènes mannanes dans le sang.

Tableau II. Résultat des sérologies pour les patients à hémoculture négative.

	Négatif	Intermédiaire	Positif
Antigène mannane	16(94.1%)	1(5.9%)	0 (0%)
Anticorps anti mannane	13(76.4%)	2(11.8%)	2(11.8%)

DISCUSSION

L'ELISA Platelia reste la technique la plus utilisée, elle permet la recherche des antigènes de type mannane et les anticorps anti mannanes. Le test platelia *Candida* Ag (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) est un test ELISA en sandwich qui détecte la présence de résidus d'oligomannose libérés par les cellules *Candida* dans le sérum et autres liquides organiques. La sensibilité et la spécificité globale de ce test sont respectivement 58 % et 93 %. Comme le mannane est rapidement éliminé de la circulation, ce test nécessite de multiples prélèvements sériques [4].

La détection des antigènes et des anticorps anti *Candida* dans le sérum et d'autres liquides organiques est un outil de diagnostic important. Cependant, ce test manque de sensibilité, mais la recherche conjointe de l'antigénémie et de la réponse en anticorps peut fournir un aperçu de l'évolution de l'infection candidosique et permet un gain de sensibilité considérable. C'est ce qui a été démontré par notre étude, où la sensibilité des deux tests combinés était de 70%. Dans l'étude de Sendid et al., qui a été réalisée sur 162 échantillons de sérum de 43 patients atteints de candidose mycologiquement et cliniquement prouvée, la sensibilité du test de détection des anticorps et des antigènes seuls étaient respectivement 53% et 40%, alors que ces valeurs sont passées à 80% lorsqu'une combinaison de tests de détection des anticorps et des antigènes a été utilisée [6]. Une autre étude réalisée au CHU de Nice en France sur 39 échantillons de sérum, provenant de patients atteints de candidémie a rapporté une sensibilité des antigènes et des anticorps de 26,92% et 46,15% respectivement et la sensibilité des deux tests Ag Mn et Ac anti-Mn combinés était de 66,66% [7]. Il a été suggéré qu'une combinaison des deux tests pourrait être plus utile pour le diagnostic de la candidose invasive que les deux tests utilisés séparément [5].

Selon nos résultats, l'antigène mannane est très spécifique, aucun patient présentant une hémoculture négative ou colonisée, n'a un antigène. Ceci démontre le pouvoir discriminant de l'antigénémie entre les patients infectés et colonisés. Notre étude a démontré aussi que la recherche des anticorps est plus fréquemment positive que l'antigénémie.

CONCLUSION

La recherche des Ag Mn et des Ac anti-Mn a un intérêt dans le diagnostic des infections fongiques invasives à *Candida* et aussi dans le suivi des patients à risque, mais ces techniques sont rarement utilisées dans nos laboratoires de diagnostic mycologique. D'autres études prospectives sont nécessaires pour déterminer l'intérêt de la sérologie fongique dans le diagnostic de ces infections en Algérie et l'impact de la sérologie positive sur la prise en charge des patients à risque.

DATE D'ENVOI : 09/07/2021.

DATE D'ACCEPTATION : 11/10/2021.

DATE DE PUBLICATION : 22/12/2021.

RÉFÉRENCES

1. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikian-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis

and management of Candida diseases 2012: diagnostic procedures. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2012;18 Suppl 7:9-18.

2. Eggimann P, Pittet D. Candidémie et candidose généralisée. EMC - Anesthésie-Réanimation 2010;1-25

3. Bretagne S. Antigènes fongiques en réanimation: tests disponibles et état des lieux. Réanimation. 2007;16(3):232-9.

4. Deorukhkar SC, Saini S. Laboratory approach for diagnosis of candidiasis through ages. Int J Curr Microbiol App Sci. 2014;3(1):206-18.

5. Ellepola AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. Journal of microbiology (Seoul, Korea). 2005;43 Spec No:65-84.

6. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. J Clin Microbiol. 1999;37(5):1510-7.

7. Hasseine L, Delaunay P, Marty P, Gari-Toussaint M. Apport de la sérologie dans le diagnostic des candidémies étude rétrospective au CHU de Nice. Journal de Mycologie Médicale. 2014;24(2):e80.