

Détection d'ADN Candida par résonance magnétique T2MR Candida

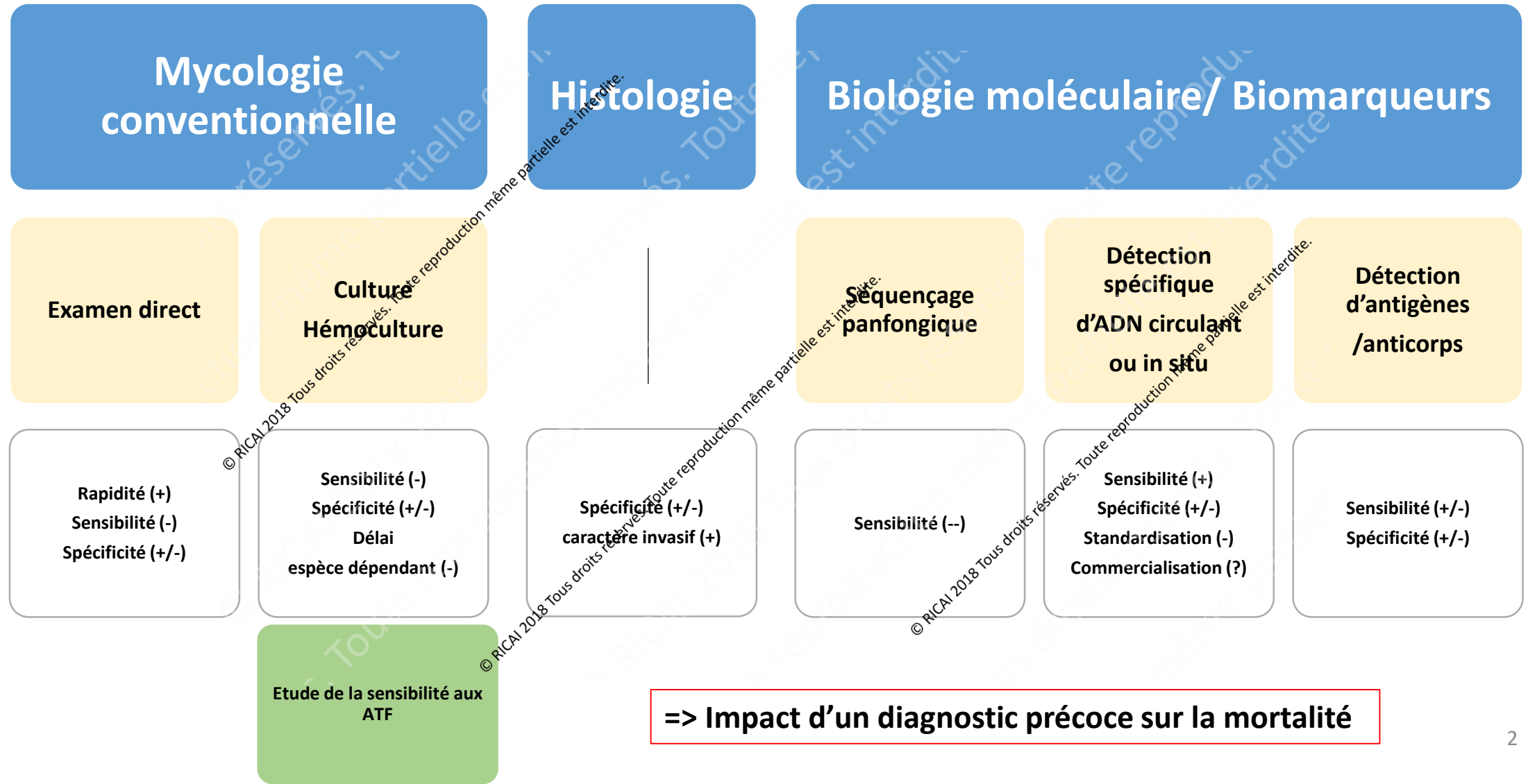
Dr Marjorie Cornu

Laboratoire de Parasitologie Mycologie

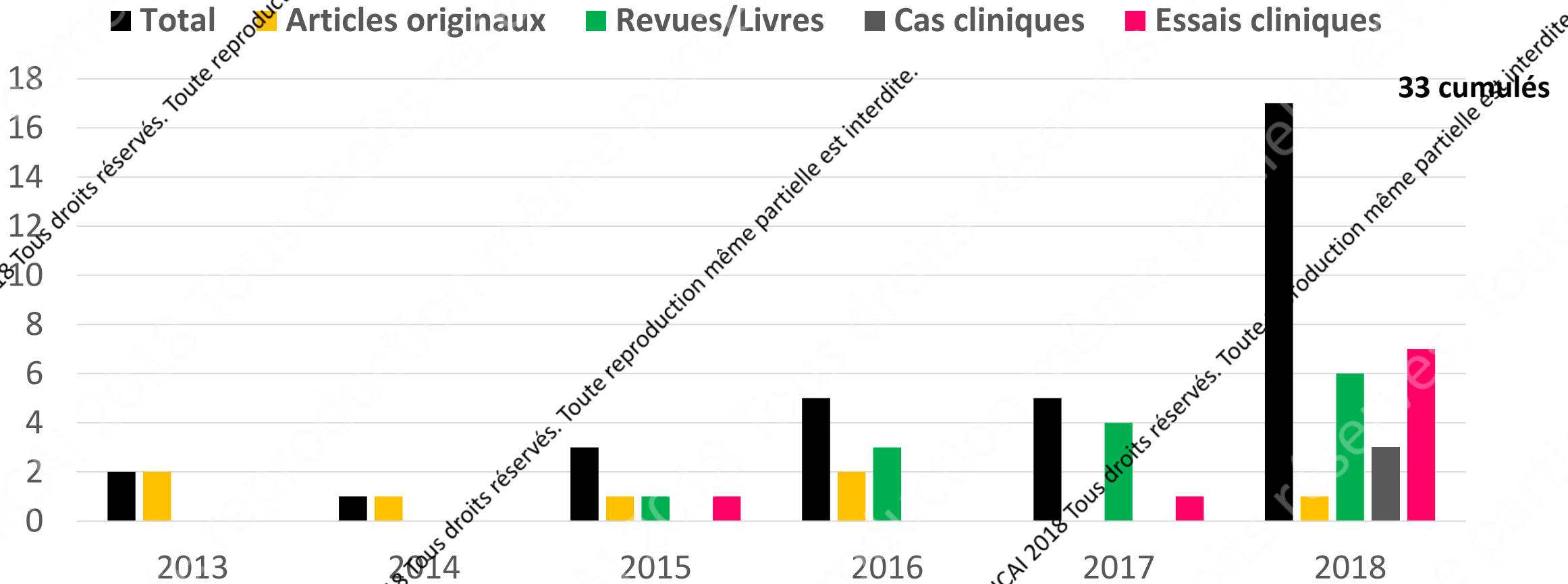
CHU de Lille



Diagnostic des candidoses invasives



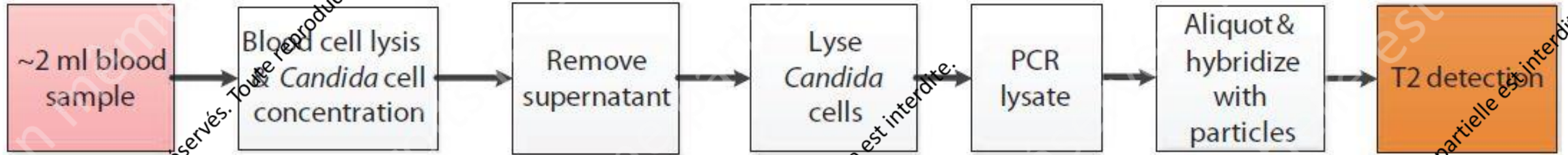
T2Candida: un intérêt croissant



La résonance magnétique T2 au service du diagnostic microbiologique

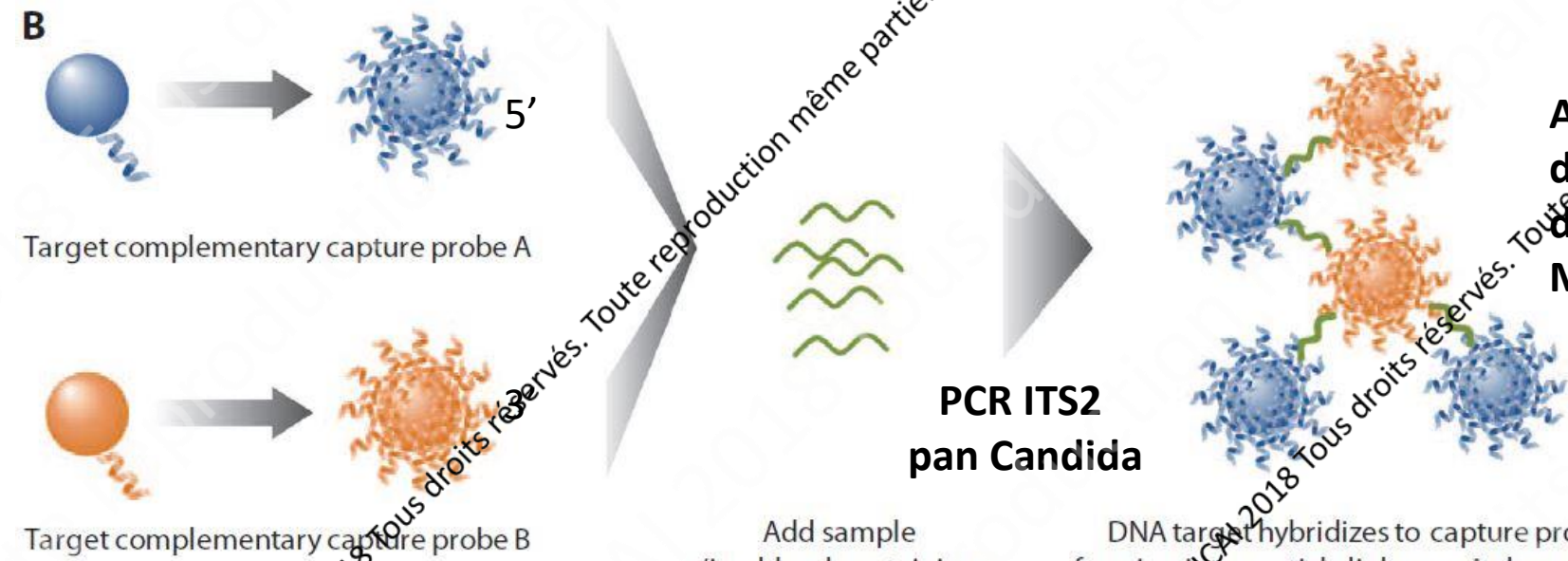
- Utilisation de nano/microparticules superparamagnétiques: interactions moléculaires multiples
- Détection d'un large panel de molécules et de cellules:
 - ions, glucose, peptides, protéines, enzymes, anticorps, ac nucléiques, médicaments, pathogènes (virus, bactéries), autres cellules,
- Différentes matrices possibles:
 - milieu de culture, lysat cellulaire, urine, sérum, plasma, expectoration, cytoponction, sang
- Applications: oncologie, infectiologie, hémostase
- Avantages: Réduction de la complexité des tests et du délai de résultat, totalement automatisé

T2 Candida: Quel est le principe? Nanoparticules (NP) couplées à la PCR



© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

NP superparamagnétiques couplées à des sondes spécifiques d'« espèce »



**Agglomération spécifique des NP en présence d'amplicons
Modification du signal T2**

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

T2Candida: Comment ça marche en pratique?

Répétabilité: CV 0,23%
 Fidélité intermédiaire: CV 0,45%
 Reproductibilité inter-instrument: CV 2,57%



Gain de temps x 10 vs. Hémoculture
 LOD: 1 à 3 CFU/mL vs. 1 à 100 CFU/mL
 vs. 100 à 1000 PCR

CA/CT
 ? CG/CK
 CP



Module support de l'échantillon



Module Tampon de lyse



Module de réactifs



Assemblage



Introduction dans le tiroir de la machine

T2Candida: Etudes pré-cliniques

	HC pos	HC neg
T2 pos	88	0
T2 neg	2	43

	Candidémie (8; 3)	Bactériémie (8; 8)	HC neg (8; 8)
T2 pos	8	0	0
T2 neg	0	8	8

133 échantillons spikés
 Agrément positif: 97,8%
 Agrément négatif: 100%

Détection prolongée, pas d'interférence des ATF (levures viables/non viables)
 Avantages par rapport à une PCR classique:
 meilleures performances, plus rapide, sang total, ADN circulant?

Neely et al.. Sci Transl Med. 2013

BACTEC 9050 using Aerobic Plus/F blood culture (J5) vs. T2Candida
 Echantillons spikés 3,1 à 11 CFU/mL (13 à 20 par espèces)

Agrément positif: 98,8%
 Agrément négatif: 100%

Diminution du délai de mise en route du traitement
 Ne remplacent pas les hémocultures!
 Augmentation de l'incidence des candidoses invasives à prévoir

	HC	T2Candida
Détection	100% sauf 0% CG	100%
Délai de résultat	63 ± 30 h (2,6 j)	3 à 5 h
Sensibilité		100%
Spécificité		97,8% (4 FP)

Beyda et al.. DMID. 2013

T2Candida: simulations de Monte Carlo

WHOLE BLOOD METHODS

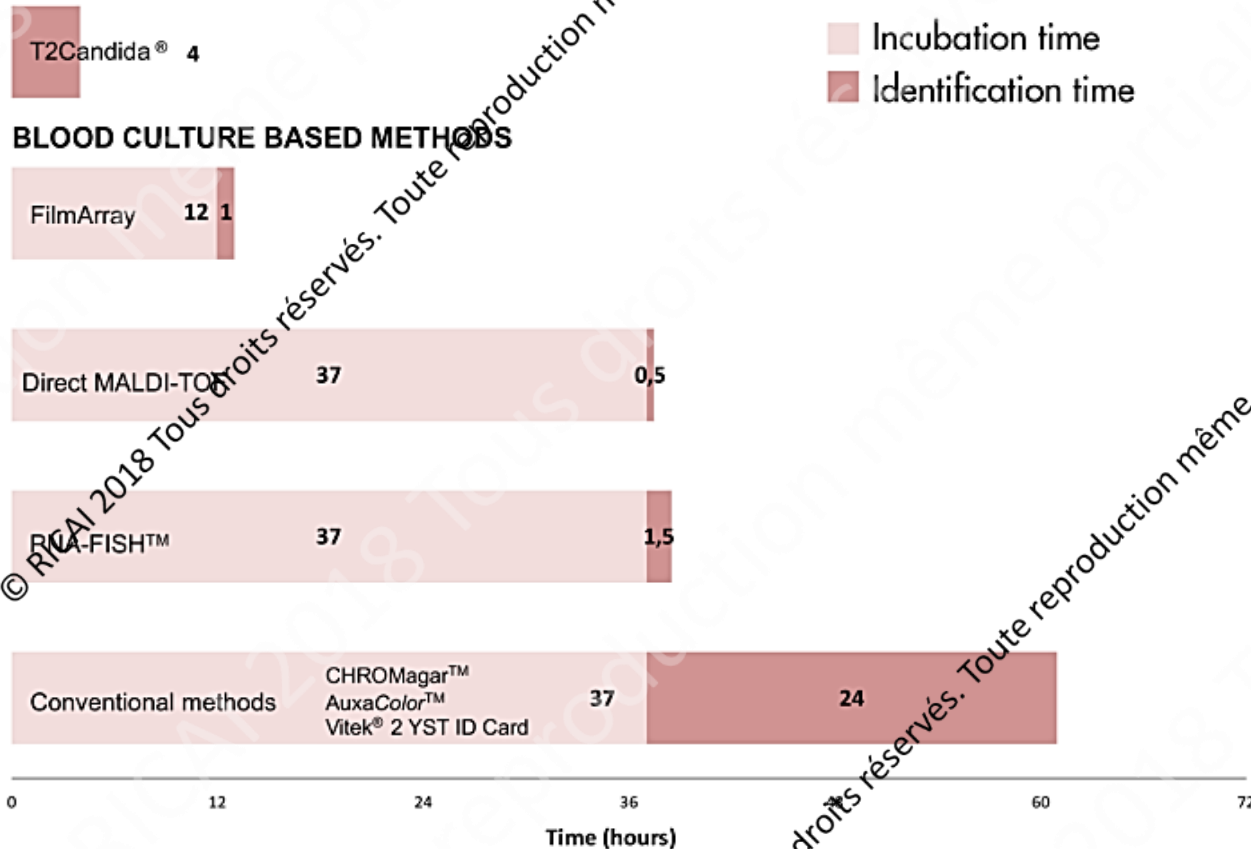


Figure 2 Graphic representation of time (hours) to yeast identification depending on employed technique.

Détection 98% Se 98% Sp 98% VPP 91%
 délai de prescription ATF: 0,6 j

Détection 100% Se 94% Sp 100% VPP 94%
 délai de prescription ATF: 2,5 j

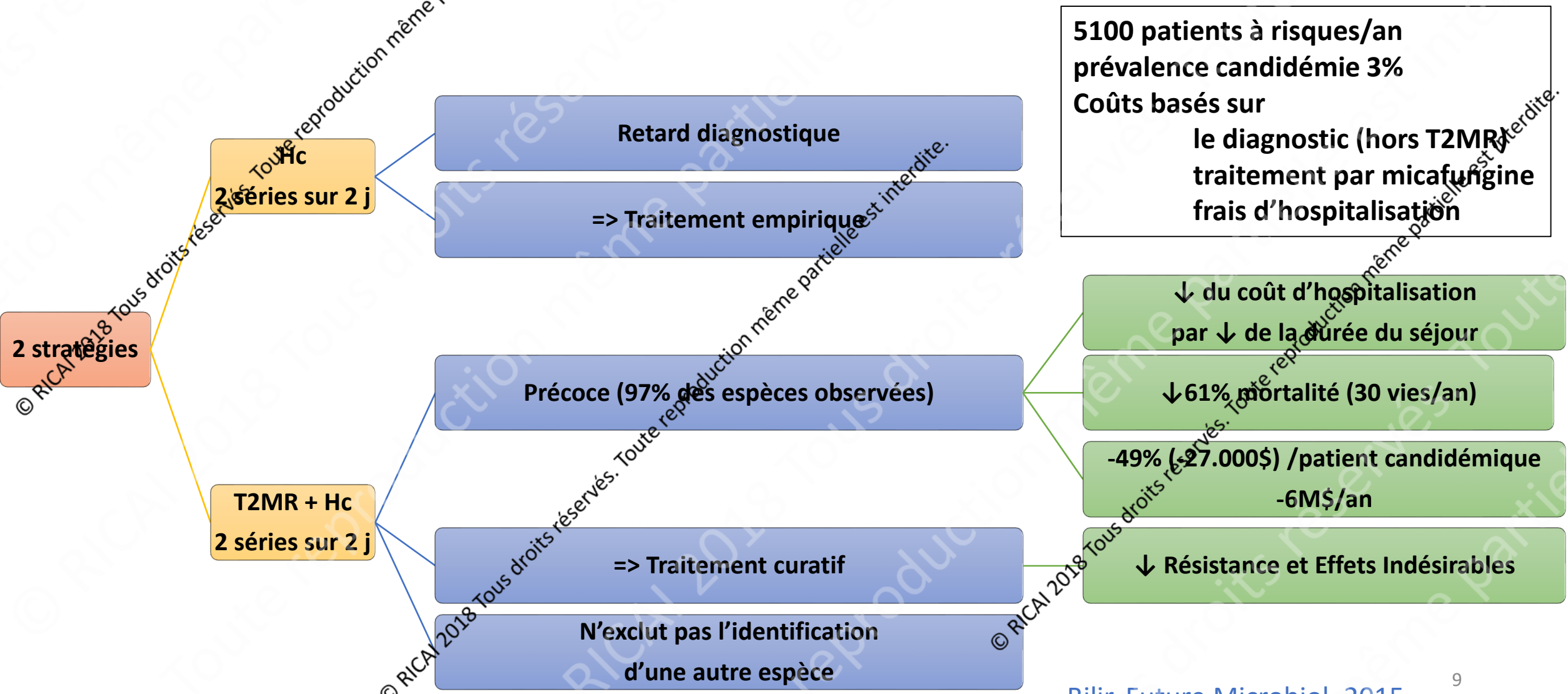
Détection 98% Se 98% Sp 98% VPP 99%
 délai de prescription ATF: 2,6 j

Délai d'identification: 0,6 à 7,9 jours (2,2 j)
 Délai de prescription ATF: 0 à 10 j (3,5 j)

162 candidémies

Basée sur une incidence de 18%, 5000 personnes
Réduction des consommations de candines grâce au T2MR
-700.000\$ à 1,4M\$/an

T2Candida: impact médico-économique



5100 patients à risques/an
 prévalence candidémie 3%
 Coûts basés sur
 le diagnostic (hors T2MR)
 traitement par micafungine
 frais d'hospitalisation

↓ du coût d'hospitalisation
 par ↓ de la durée du séjour

↓ 61% mortalité (30 vies/an)

-49% (-27.000\$) /patient candidémique
 -6M\$/an

↓ Résistance et Effets Indésirables

T2Candida: impact médico-économique

- 10000 patients à risques
=> 300 candidémies
- 3 stratégies
 - T2MR/Hc
 - Hc
 - Traitement empirique (FLC ou Echino)/Hc

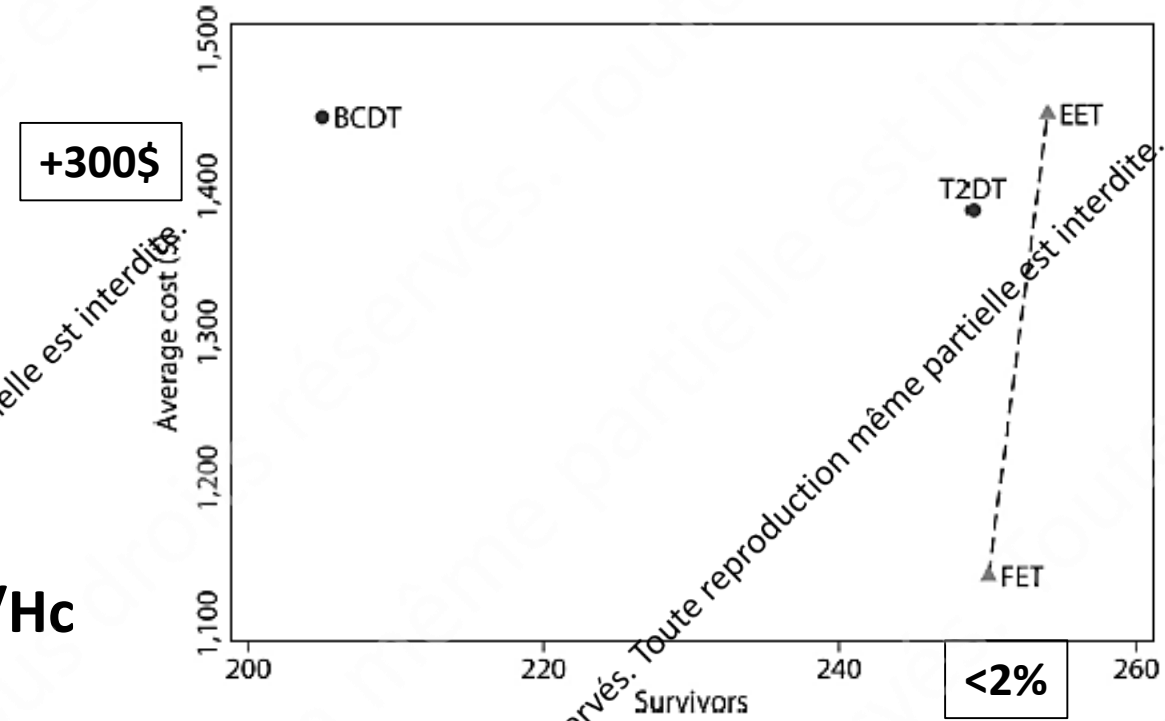
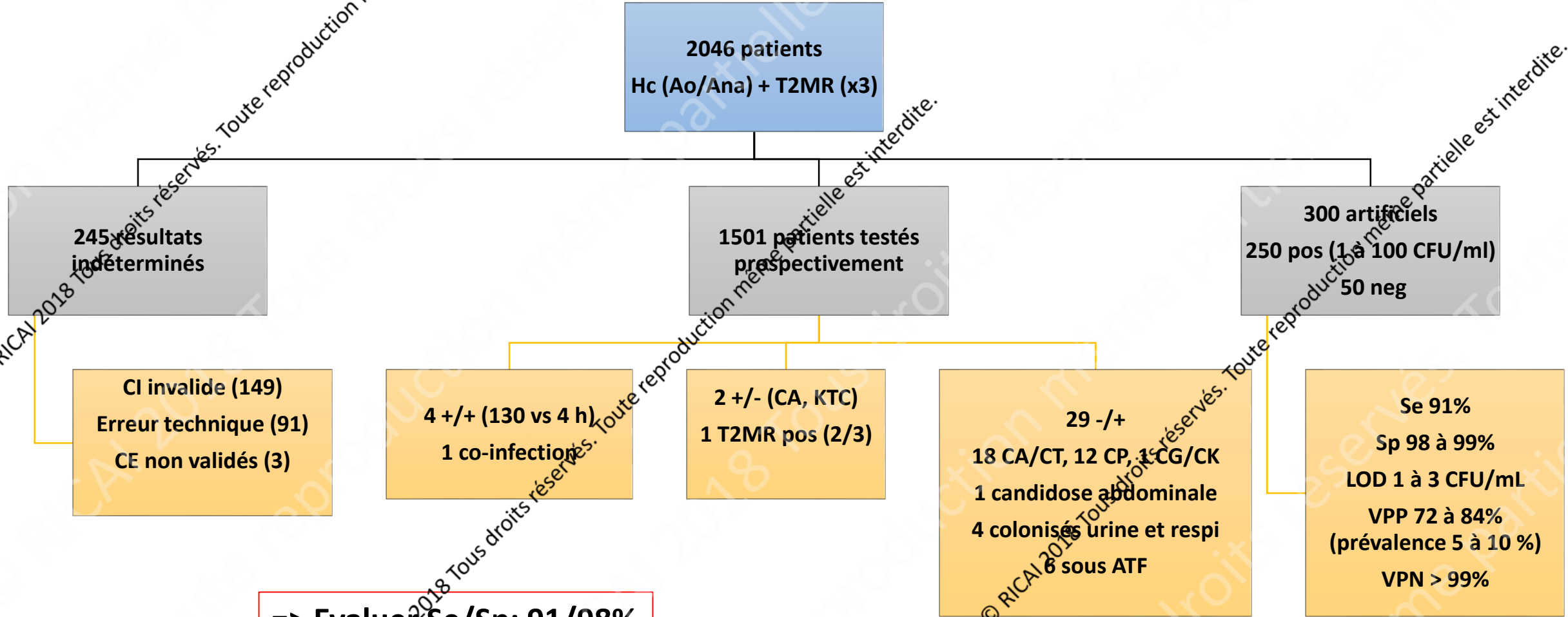


TABLE 3 Cost-effectiveness results

Treatment	Mortality (%)	No. of survivors at discharge (95% CI)	Avg cost per patient tested (95% CI) (\$)
BCDT	31.6	205 (201-209)	1,448 (1,405-1,475)
T2DT	17.2	249 (244-254)	1,384 (1,352-1,407)
FET	10.8	250 (245-255)	1,138 (1,106-1,170)
EET	15.2	254 (249-259)	1,450 (1,412-1,475)

T2Candida: 1^{ère} étude clinique multicentrique



=> Evaluer Se/Sp: 91/98%

T2Candida: Etude DIRECT2

- Etude multicentrique prospective
- Objectif: évaluer la Se du T2MR chez des patients candidémiques
- Hc diagnostique: détection 47 h, identification 5,5 j
- Hc diagnostique suivi par T2 vs. Hc (T2;Hc Ao;Hc Ana)

Patient group (n)	Test results, n (%)							
	T2+	T2-	cBC+	cBC-	T2+/cBC+	T2+/cBC-	T2-/cBC+	T2-/cBC-
All (152)	69 (45%)	83 (55%)	36 (24%)	116 (76%)	32 (21%)	37 (24%)	4 (3%)	79 (52%)
74% Prior AF (112)	55 (49%)	57 (51%)	23 (20%)	89 (80%)	20 (18%)	35 (31%)	3 (3%)	54 (48%)
No AF (40)	14 (35%)	26 (65%)	13 (32%)	27 (68%)	12 (30%)	2 (5%)	1 (2%)	25 (62%)

89% des Hc+ étaient T2MR+ (32/36)

Parmi les 4 T2-/Hc+,
2 échantillons étaient coagulés

T2 plus facilement positif
si Hc diagnostique pousse plus vite

Impact ATF sur la positivité de l'Hc et le délai

Rattrapage par T2MR (31%)

T2Candida: 1^{ère} étude en pédiatrie

- 15 candidémiques vs. 9 négatifs
- T2MR sur sang prélevé dans les 48h suivant l'Hc, patients non traités
- 2 mL (fabricant > 3 mL)



Agreement Between T2Candida and Blood Culture Results for 24 Pediatric Samples Pipetted Directly Into a T2Candida cartridge

Blood Culture Result	T2Candida Result, No.			
	<i>Candida albicans/ Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida krusei/ Candida glabrata</i>	Negative
<i>C parapsilosis</i>	0	7	0	0
<i>C albicans</i>	4	0	0	0
<i>C glabrata</i>	0	0	3	0
<i>C tropicalis</i>	1	0	0	0
Negative	0	0	0	9

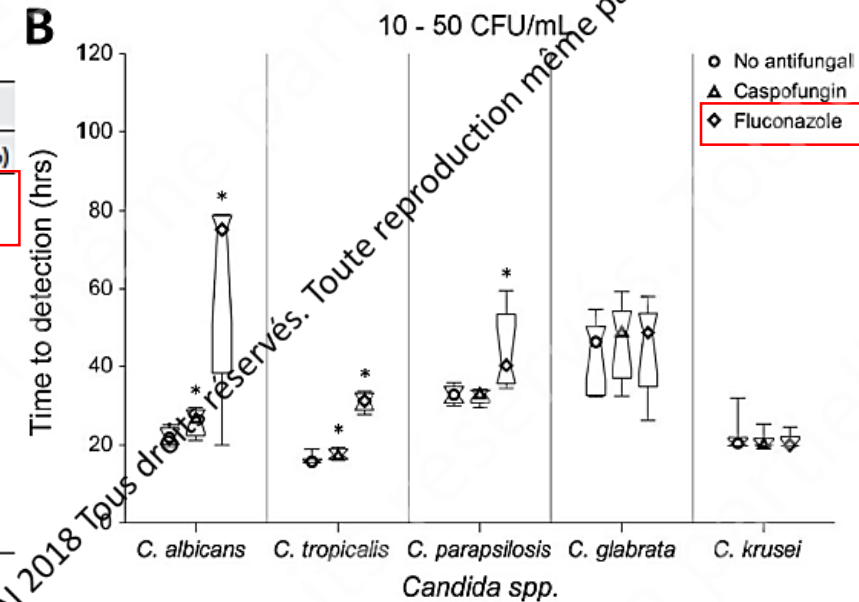
T2Candida: Influence du traitement ATF?

- 240 échantillons artificiels
 - 4 souches de chaque espèce (S;R)
 - T2MR = 2 résultats invalides

TABLE 2 Impact of caspofungin or fluconazole on the sensitivity and performance of BacT/Alerta FA blood culture bottles and the T2Candida assay in the detection of *Candida* spp. at low and high inoculum levels^a

<i>Candida</i> species	Instrument	Inoculum of ~1-5 cells/ml			Inoculum of ~10-50 cells/ml				
		No. of cells/ml	ND (%)	CAS (%)	FLU (%)	No. of cells/ml	ND (%)	CAS (%)	FLU (%)
All species	BacT/Alert	1.7-5.7	97.5	97.5	85	17-57	100	100	92.5
	T2CA		95	95	95		100	100	100
<i>C. albicans</i>	BacT/Alert	1.7-4.7	100	100	50	10-47	100	100	87.5
	T2CA		100	100	100		100	100	100
<i>C. tropicalis</i>	BacT/Alert	2.7-4.2	100	87.5	87.5	27-42	100	100	100
	T2CA		100	100	100		100	100	100
<i>C. glabrata</i>	BacT/Alert	2-5.7	100	100	100	20-57	100	100	100
	T2CA		87.5	87.5	87.5		100	100	100
<i>C. krusei</i>	BacT/Alert	2.4-4.3	100	100	87.5	24-43	100	100	75
	T2CA		87.5	87.5	87.5		100	100	100
<i>C. parapsilosis</i>	BacT/Alert	3.2-4.9	87.5	100	100	32-49	100	100	100
	T2CA		100	100	87.5		100	100	100

^aLow inoculum, 1 to 5 cells/ml; high inoculum, 10 to 50 cells/ml; ND, no drug; CAS, caspofungin; FLU, fluconazole; T2CA, T2Candida assay.

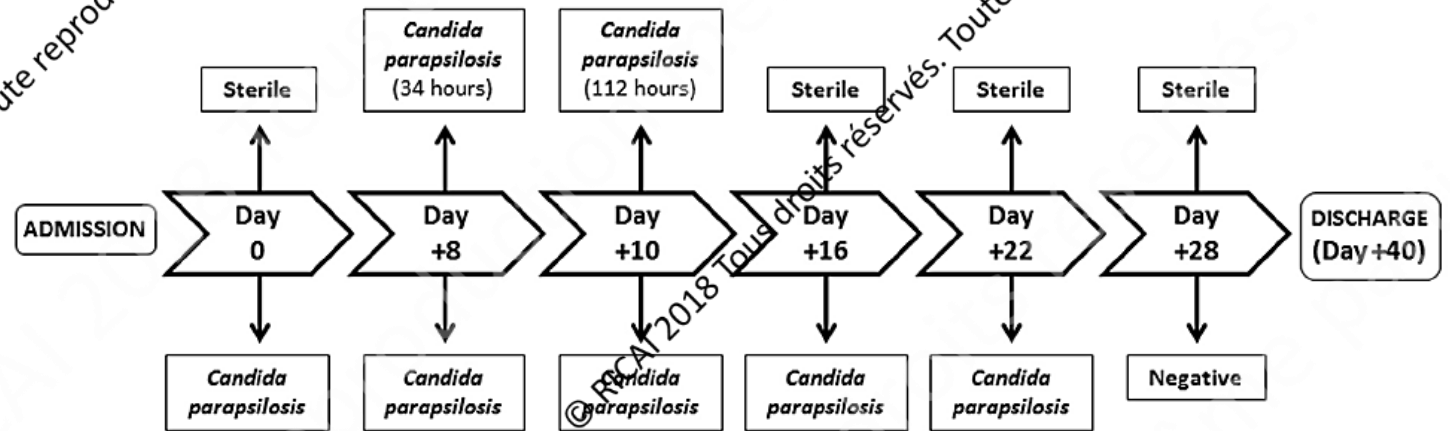


T2Candida: Cas cliniques

- Fièvre, ↑GB, hémodialyse, KTC, ATB large spectre, IS, ATCD candidémie
- Choc septique, réa
- T2Candida positif chez un patient en choc septique
- T2Candida positif et critères de prediction clinique de candidémie en réa
- Examen ophtalmo en faveur d'une chorioretinite à Candida

Probabilité de faire une candidémie
~1%
~3%
~67%
~80%
~100%

- Cas pédiatrique (SOT)
- Péritonite sur perforation intestinale
- Micafungine empirique
- Switch amphotericin B liposomale (T2MR)
- Fluconazole (ATFg)
- Durée de traitement basée sur le premier T2MR négatif

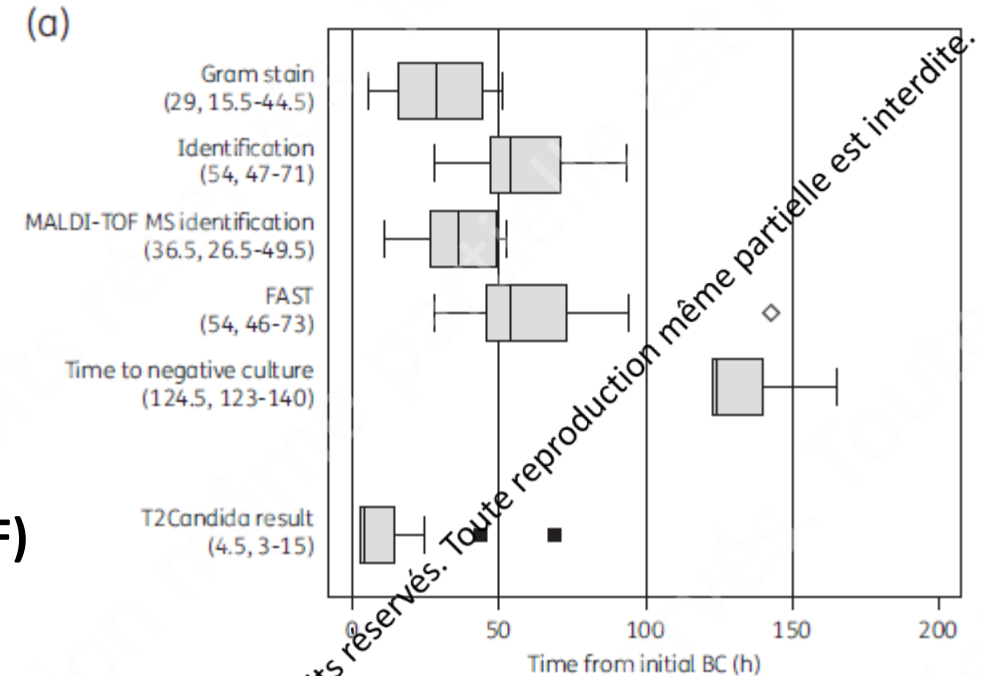


Clancy. DMMID. 2018

Falces Romero. Med Mycol Case Rep. 2018

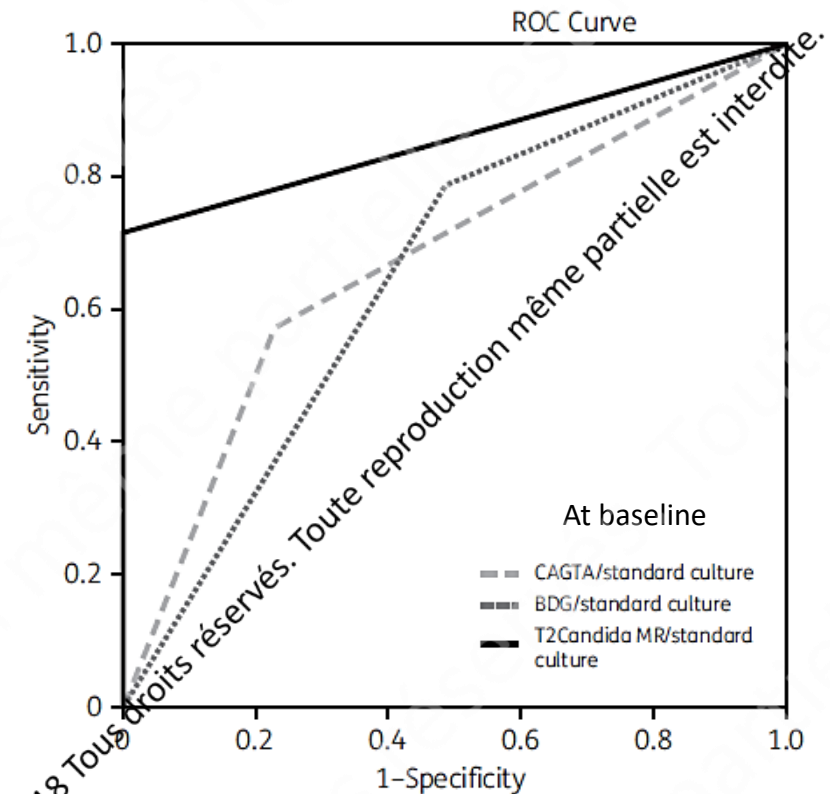
T2Candida: Précision diagnostique et délai

- Etude monocentrique: 46 patients
- Sous traitement empirique (échinocandine 7 j)
- 1 patient candidémique (prévalence 2,2%)
- T2MR:
 - 37 patients neg
 - 5 invalides (3/5 retestés invalides) (11%)
 - 4 pos- 1CA/CT, 3CP (1 Hc pos vs. 2 sous prophylaxie ATF)
- Se 100%, Sp 91.8%, VPP 25%, VPN 100%



T2Candida: Pronostic

- Etude prospective multicentrique observationnelle (4 hopitaux Madrid)
- Patients sous traitement empirique: \geq sepsis sévère, KTC, chir GI à risque \uparrow
- But: Prédiction IC ou mortalité dans les 7 j après instauration du traitement ATF
- T2MR, BDG, CAGTA (\pm associés) à baseline, J2, J4 vs. Culture
- 54 patients: 3 T2MR invalide (6%), 1 candidose abdominale à *C. kefyr*, 1 sans consentement
- 49 patients: 7 décès et 7 IC (1 candidémie, 6 abdominales), seul T2MR+ associé à cette évolution, T2MR neg dans les évolutions favorables
- 2 patients avec une bonne évolution ont positive T2MR à J2 (colonisés et choc septique)
- Prédiction T2MR de l'évolution défavorable ($P= 0,01$) :
 - Sp 100%, VPP 100%, VPN 80%, Se 36%
- Le plus discriminant: association T2MR + culture premier jour
- ATF auraient pu être arrêtés précocement chez 67,3% des patients
- Précocité ? 1 patient = T2MR 8 j avant Hc



T2Candida: Candidémie compliquée

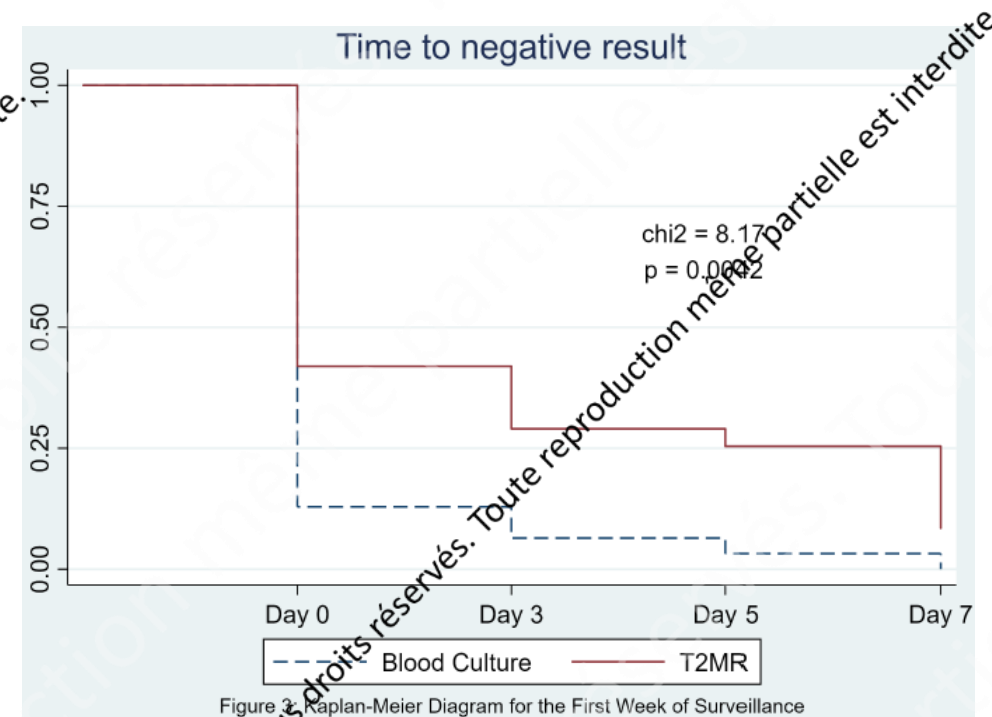
- Etude prospective multicentrique observationnelle (3)
- Prédire les complications des candidémies
- Suivi Hc, persistance T2MR et β DG (J0, J2, J4, J7, J14 après la 1^{ère} Hc pos)
- Complications: métastase septique et/ou mortalité imputable
- 30 patients, 9 complications
- T2MR pos dans les 5 premiers jours et risque de complications (OR = 36,5)

Table 3. Yield of the three studied tests for the prediction of complicated and uncomplicated candidaemia

Test	Uncomplicated (n = 21), n (%)	Complicated (n = 9), n (%)	P value ^a	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
Early samples (<5 days)							
positive BC	5 (23.8)	4 (44.4)	0.39	44.4 (15.3–77.3)	76.1 (52.4–90.8)	44.4 (15.3–77.3)	76.1 (52.4–90.8)
positive T2MR	5 (23.8)	9 (100)	<0.001	100 (62.8–100)	76.1 (52.4–90.8)	64.2 (35.6–86.0)	100 (75.9–100)
positive BDG	13 (61.9)	9 (100)	0.07	100 (62.8–100)	38.9 (18.9–61.3)	46.9 (21.5–63.3)	100 (59.7–100)
Late samples (>7 days)							
positive BC ^b	0/6	2/5 (40.0)	0.18	40.0 (7.2–82.9)	100 (51.6–100)	100 (19.7–100)	66.7 (30.9–90.9)
positive T2MR ^c	1/19 (5.3)	7 (85.7)	0.001	85.7 (42.0–99.2)	94.7 (71.9–99.7)	85.7 (42.0–99.2)	94.7 (71.9–99.7)
positive BDG ^d	12/18 (66.7)	7/7 (100)	0.14	100 (56.0–100)	33.3 (14.7–58.9)	36.8 (17.2–61.3)	100 (51.6–100)

T2Candida: Etude STAMP, suivi post-thérapeutique

- Etude prospective multicentrique
- 31 patients inclus/ 188 screenés
- T2MR: baseline, J3, J5, J7
- 18 suivis neg (T2MR+Hc), 13 positifs
- 7 Hc (4 patients) vs 23 T2MR (13 patients), 7 concordants
- 2 patients toujours détectés à J7 en T2MR
- 2 T2MR consécutifs négatifs ?



T2Candida: Etude avant/après T2MR

- Etude multicentrique (4)
- Objectif: délai d'instauration d'un traitement ATF avant et après installation de l'automate T2MR
- Candidémie prouvée ou probable (BDG \geq 200 pg/mL) = 161 patients
 - Pré-T2MR: paire d'Hc + BDG, puis paire d'Hc à 24 et 48 h = 87 patients; 57% identifiés, début de traitement approprié en 39 h
 - Post-T2MR: paire d'Hc + T2MR, puis paire d'Hc à 24 et 48 h = 74 patients; 93% identifiés, début de traitement approprié en 22 h
- Autant de traitement dans les 2 groupes, mortalité et durée d'hospitalisation équivalente, moins de candidose oculaire en post-T2MR

T2Candida: Etude avant/après T2MR

- Etude rétrospective en 2 phases (Phase 1 Culture vs. phase 2 T2MR)
- Objectifs:
 - 1/ Comparer (Phase 1 vs. Phase 2)
 - Délais d'initiation du traitement ATF
 - Durée d'hospitalisation
 - Mortalité à 30 j
 - 2/ 100 patients consécutifs traités par micafungine de façon empirique sans résultats positifs (Phase 1 vs. Phase 2)
 - Durée de traitement
 - Durée d'hospitalisation
 - Mortalité à 30 j
- Phase 1: 19 candidémies
- Phase 2: 418 patients avec T2MR (93 exclus) => 325 dont 20 positifs (8 IC, 4 colonisés)
 Délai d'initiation d'ATF approprié à l'espèce: 34 vs. 6h ($P= 0,001$)
 - 8j d'hospitalisation ($P= 0,2$)
- Durée de traitement: 6,7 j vs. 2,4 j (-280\$ d'ATF /patient testé)

T2Candida: *Candida auris*

- Levure multi-R
- Colonisation, survie dans l'environnement, transmission nosocomiale facilitée, épidémies, difficultés d'identification, culture ± lente
- Dépistage par T2MR sur écouvillons cutanés
- 89 échantillons artificiels => T2MR vs. Culture
 - dilution de levures dans 3 mL final de PBS-tween ou pool de flore cutanée dans un tube EDTA
- Reconnaît chacune des 4 clades connues, LOD 5 CFU/mL

• Se 89%/ Sp 98%

	Culture +	Culture -
T2MR +	41	1
T2MR -	5	42

En résumé

• Avantages

- T2MR > Hc sensibilité +++, LOD 1CFU/mL, délai de résultat
- T2MR > PCR en termes de temps techniques, de délai de résultat, de LOD, de VPP
- Détection des candidoses invasives au sens large (Plus d'études nécessaires)
- Suivi, pronostic (complications)
- Aspect médico-économique
 - Durée d'hospitalisation réduite
 - Utilisation d'antifongiques plus adaptés, moins de résistance et moins d'effets indésirables
 - Durée d'utilisation réduite de l'ATF
 - Baisse de la mortalité
 - Moins de traitement chez les non infectés, traitement plus précoce chez les infectés
- Se, Sp, VPN, (VPP fonction de la prévalence)

• Limites

- Ne remplace pas les hémocultures
 - => 5 espèces de Candida (majorité des espèces rencontrées) et absence d'antifongogramme
- Résultats discordants ? Gold standard= Hc?
- Coût!!!
 - Définir sa place en pratique => Sélection des patients avec la probabilité pré-test la plus élevée.
- Capacité ? 7 tiroirs
- Biomarqueur Bayésien ? (probabilité de faire une candidémie)
 - Chaque centre/service doit connaître l'épidémiologie, la prévalence des candidoses invasives

Remerciements

Comité d'organisation de la RICAI

Les services de réanimations

(Pr S. Nseir, Dr A. Rouzé, Dr O. Pouly, Pr J. Poissy)

Les techniciens: Nadine François, Rachid Aijjou

Dr Séverine Loridant

Pr Boualem Sendid

Eurobio