

PCR - multiplexe pour la détection d'ADN aspergillaire et des mutations du gène *Cyp51*

Marie-Elisabeth Bournoux

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Service de
Microbiologie. Hôpital Necker-Enfants Malades

Unité Biologie et Pathogénicité Fongiques

Institut Pasteur, Paris

bournoux@pasteur.fr



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

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

Contexte

- L'émergence de la résistance des *Aspergillus* aux antifongiques azolés complique le traitement des AI
- Certains pensent que le traitement empirique des Aspergilloses devrait dépendre du taux local de résistance
- Est-ce que la disponibilité de kits permettant de détecter ADN et résistance peut améliorer la prise en charge thérapeutique des AI ?

Résistance de *Aspergillus fulmigatus* aux ATF azolés

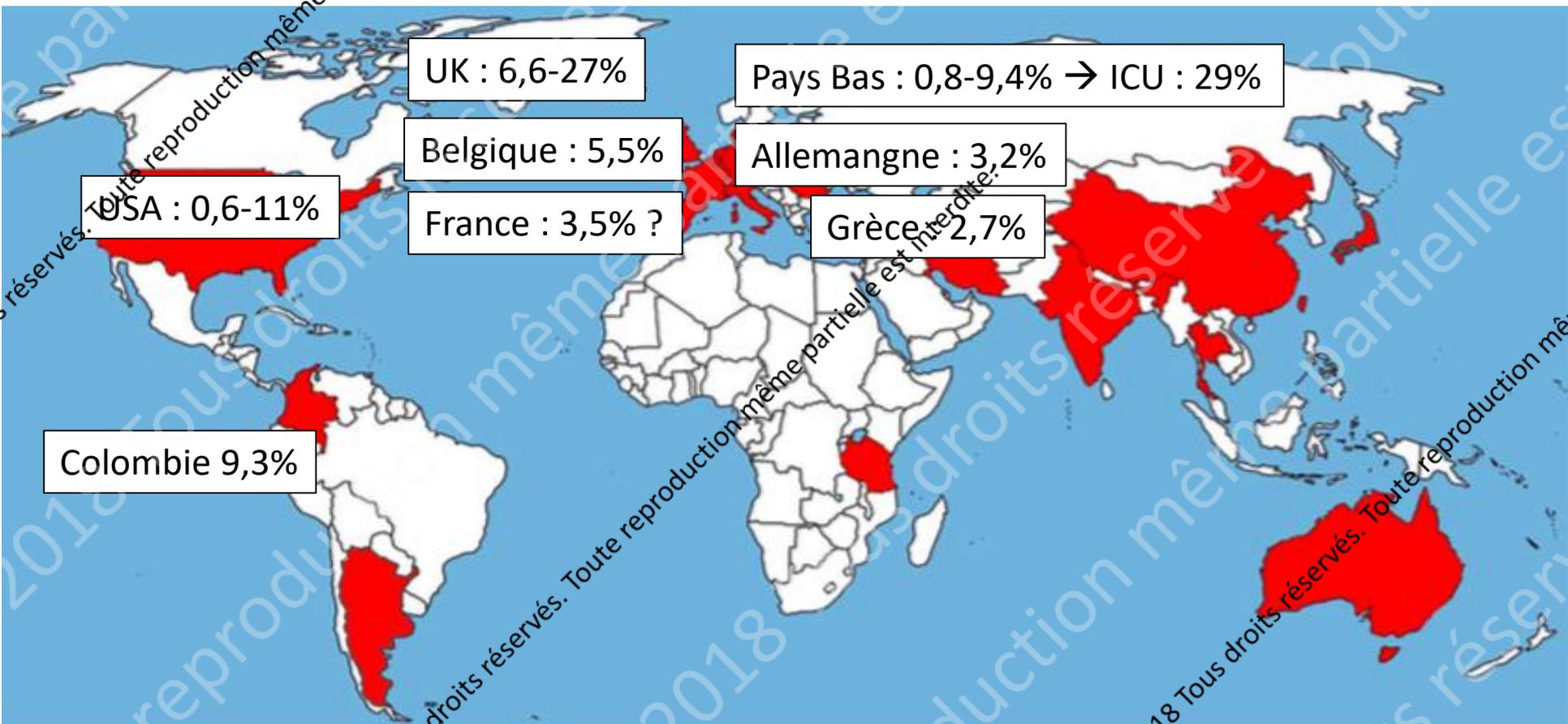
Estimation actuelle de la prévalence : 0,6 – 27%



Verweij P et coll., CID 2016 ; Van der Linden et coll., Emerg Infect Dis. 2019, Resendiz Sharps A et coll., Med Mycology 2018

Résistance de *Aspergillus fulmigatus* aux ATF azolés

Estimation actuelle de la prévalence : 0,6 – 27%



Verweij P et coll., CID 2016 ; Van der Linden et coll., Emerg Infect Dis. 2019, Resendiz Sharps A et coll., Med Mycology 2018

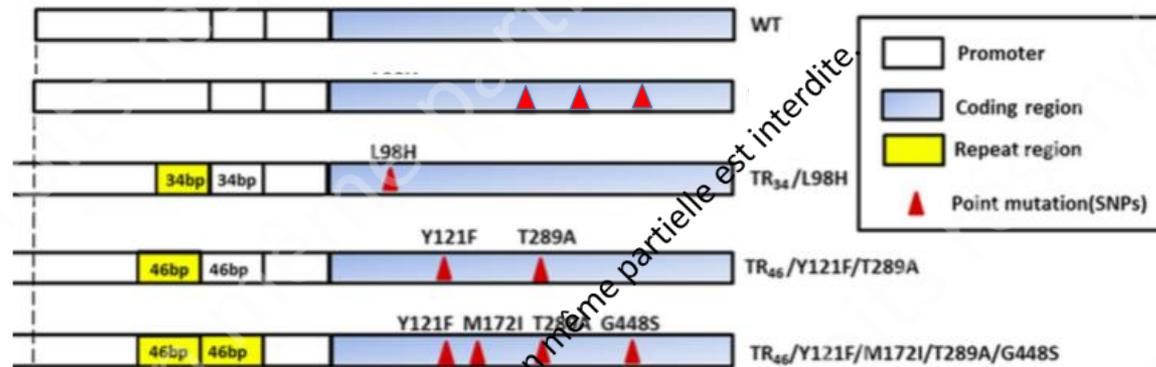
Contexte

- L'émergence de la résistance des *Aspergillus* aux antifongiques azolés complique le traitement des AI
- Certains pensent que le traitement empirique des Aspergilloses devrait dépendre du taux local de résistance
- Est-ce que la disponibilité de kits permettant de détecter ADN et résistance peut améliorer la prise en charge thérapeutique des AI ?

Résistance *Aspergillus* aux Azolés

Aspergillus fumigatus

- **90% : hot spot gène *Cyp51A***

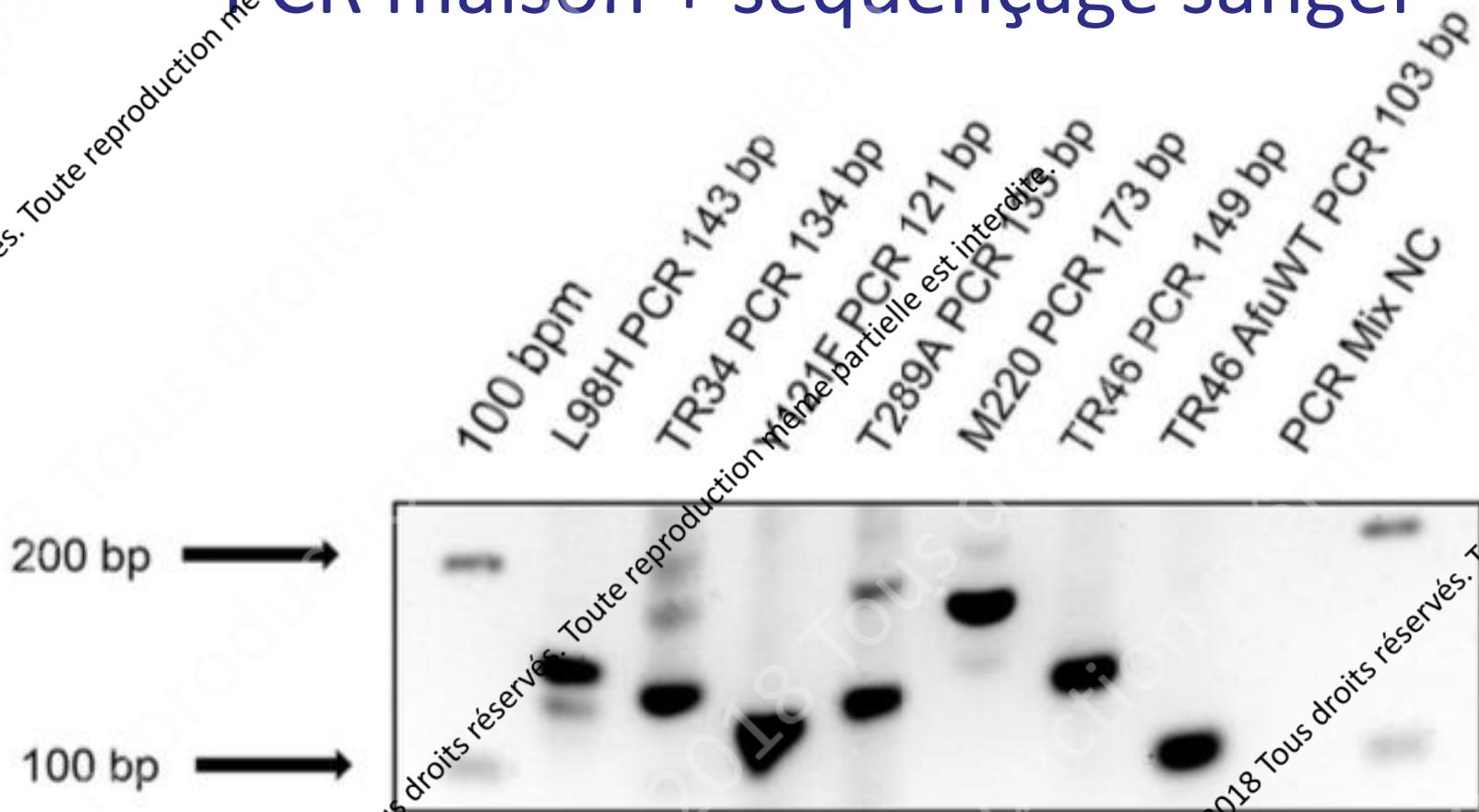


2 types d'altération :

- Région codante mutations ponctuelles : “traitement antifongique au long cours” G54, M220, P216, G138, G448,
 - Régions promoteur et codante : “environnementale” (distribuées mondialement) : TR₃₄/L98H et TR₄₆/Y121F/T289A
- **10% : pompes à efflux- gène *HapE*- autres mécanismes**

Comment détecter les mutations du gène *Cyp51A* ?

PCR maison + séquençage sanger



Postina P et coll, *Frontiers in Microbiol* 2018
Spiess B et coll, *AAC* 2012 et *Plos One* 2014

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction mé

Rendement “médiocre” PCR dans les prélèvements → LBA

Gène *Cyp51* : copie unique

	PCR+	Successful sequencing
TR34	82% (18/22)	73% (16/22)
L98H	91% (20/22)	77% (17/22)
TR46	77% (17/22)	73% (16/22)
Y121F	68% (15/22)	59% (13/22)
→ T289A	59% (13/22)	50% (11/22)
M220	68% (15/22)	68% (15/22)
Total	74% (98/132)	67% (88/132)

Kits PCR en temps réel détection ADN *Aspergillus* dans les prélèvements

	Cible multicopie	<i>Cyp51A</i>	Fournisseur
AsperGenius®	28S	Oui	PathoNostics
MycAssay <i>Aspergillus</i> ®	18S		Myconostica
MycoReal <i>Aspergillus</i> ®	ITS		Ingenetics
RenDX Fungiplex®	18S		Renishaw Diagnostics
MycoGenie®	28S	OUI	ADEMTEC
LightCycler SeptiFast®			Roche
GeneProof <i>Aspergillus</i> PCR®	ITS2/28S rDNA		Brno
<i>Aspergillus</i> spp. Alert Kit®	18S		ELITech
<i>Aspergillus</i> Real time PCR Panel®	?		Viracor Eurofins
<i>A. Fumigatus</i> Bio-Evolution®	?		Bio-Evolution
Fungiplex <i>Aspergillus</i> ®	?		Bruker

Détection de résistance *A. fumigatus* :

2 Kits PCR en temps réel

	Cible multicopie	<i>Cyp51A</i>	Fournisseur
AsperGenius®	28S	Oui	PathoNostics
MycAssay <i>Aspergillus</i> ®	18S		Myconostica
MycoReal <i>Aspergillus</i> ®	ITS		Ingenetics
RenDX Fungiplex®	18S		Renishaw Diagnostics
MycoGenie®	28S	OUI	ADEMTEC
LightCycler SeptiFast®			Roche
GeneProof <i>Aspergillus</i> PCR®	ITS2/28S rDNA		Brno
<i>Aspergillus</i> spp. Alert Kit®	18S		ELITech
<i>Aspergillus</i> Real time PCR Panel®	?		Viracor Eurofins
<i>A. Fumigatus</i> Bio-Evolution®	?		Bio Evolution
Fungiplex <i>Aspergillus</i> ®	?		Bruker

PATHOMOSTICS



AsperGenius*: multiplex Real Time PCR assay for the detection of *Aspergillus fumigatus* and identification of azole resistance markers.

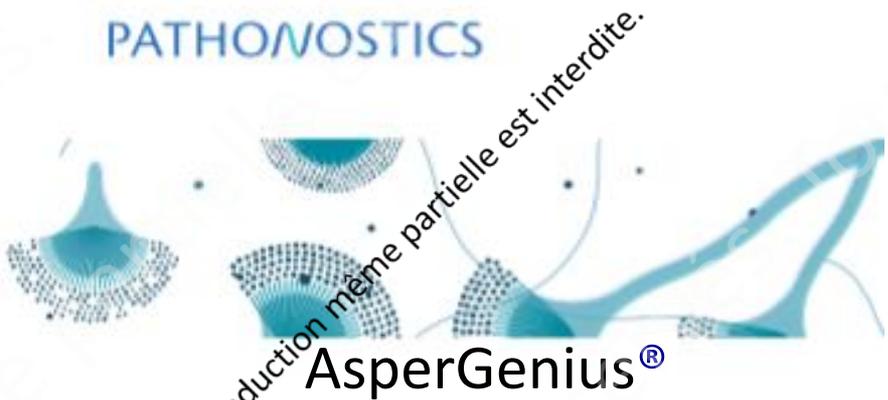


MycoGENIE® *Aspergillus fumigatus* and resistances TR34/L98H



Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

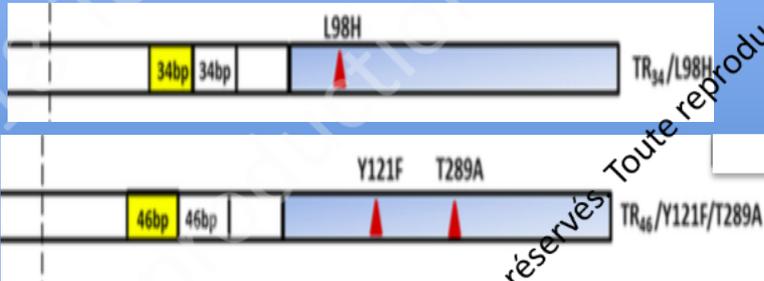


AsperGenius®

Appareils utilisables

- LightCycler 480 (Roche)
- Rotor-Gene 6000 (Corbett)
- Rotor-Gene Q (Qiagen).

Mutations détectées



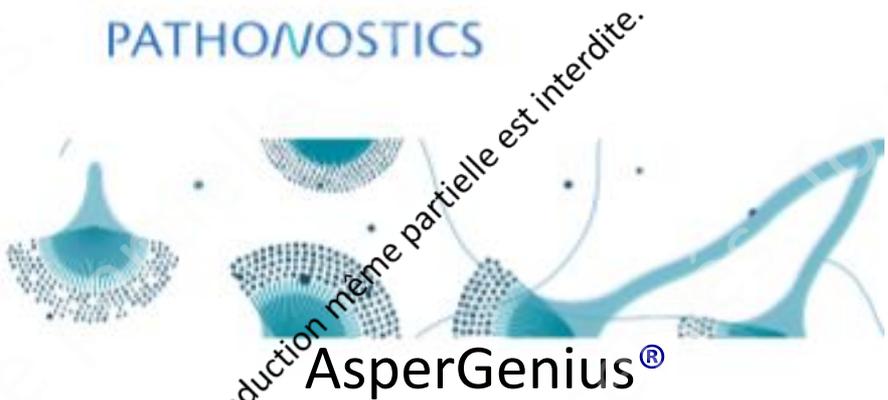
LOD 100% : 50 genomes/0,5 ml
LOD 20-75% : 10⁻⁴ 25 genomes/0,5ml

White et al, JCM 2017

MycoGENIE® *Aspergillus fumigatus* and resistances TR34/L98H



© RICAI 2018 Tous droits réservés

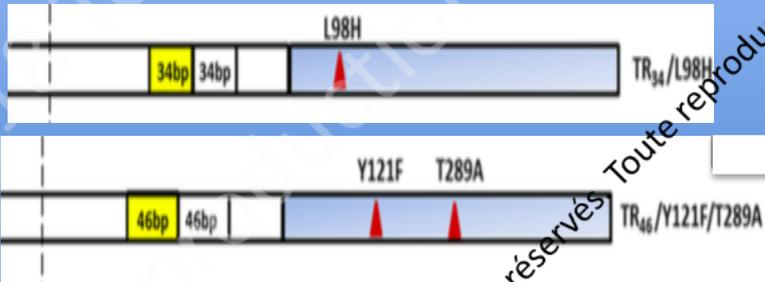


AsperGenius®

Appareils utilisables

- LightCycler 480 (Roche)
- Rotor-Gene 6000 (Corbett)
- Rotor-Gene Q (Qiagen).

Mutations détectées



LOD 100% : 50 genomes/0,5 ml
LOD 20-75% : 10⁻²⁵ genomes/0,5ml

White et coll, JCM 2017

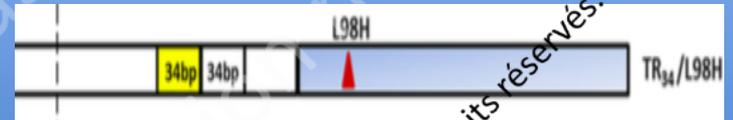
MycoGENIE® *Aspergillus fumigatus* and resistances TR34/L98H

MycoGenie®

Appareils utilisables

- LightCycler 480 (Roche)
- Rotor-Gene Q (Qiagen)
- CFX96 (BioRad)
- ABI 7500 (Applied Biosystem)
- SmartCycler

Mutations détectées



LOD 100% : 6 copies

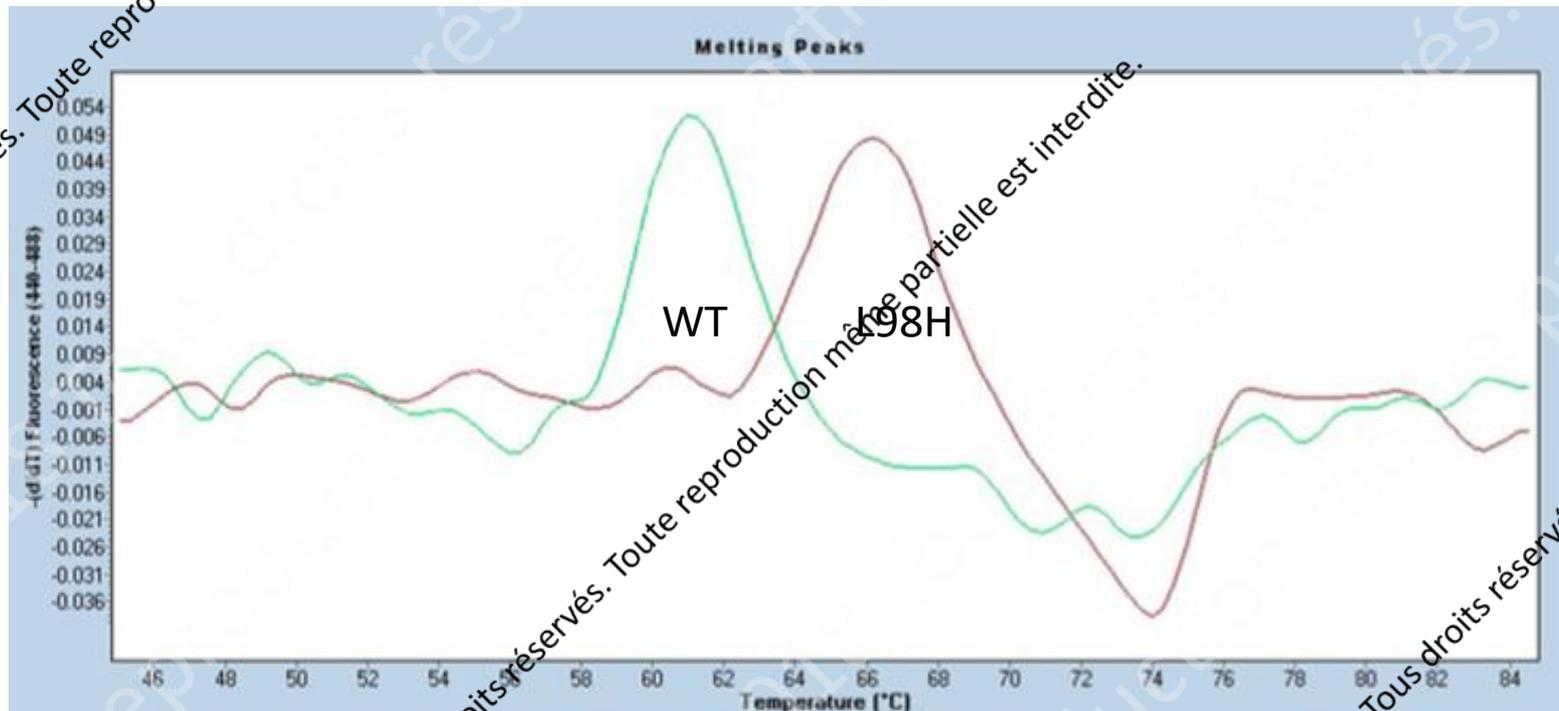
Dannaoui et coll, JCM 2017

Détection des mutations de résistance par le kit AsperGenius®

- qPCR Multiplexe : amplification de 4 régions (TR34/L198H/Y121F/T289A)
- Détection et Identification des mutations par l'analyse des courbes de fusion : SYBR green
- Avantage : vérification amplification des régions
- Inconvénient : plus compliqué/ routine expérimentateurs plus spécialisés

Détection des mutations par le kit AsperGenius®

Courbe de fusion
Analyse mutation L98H



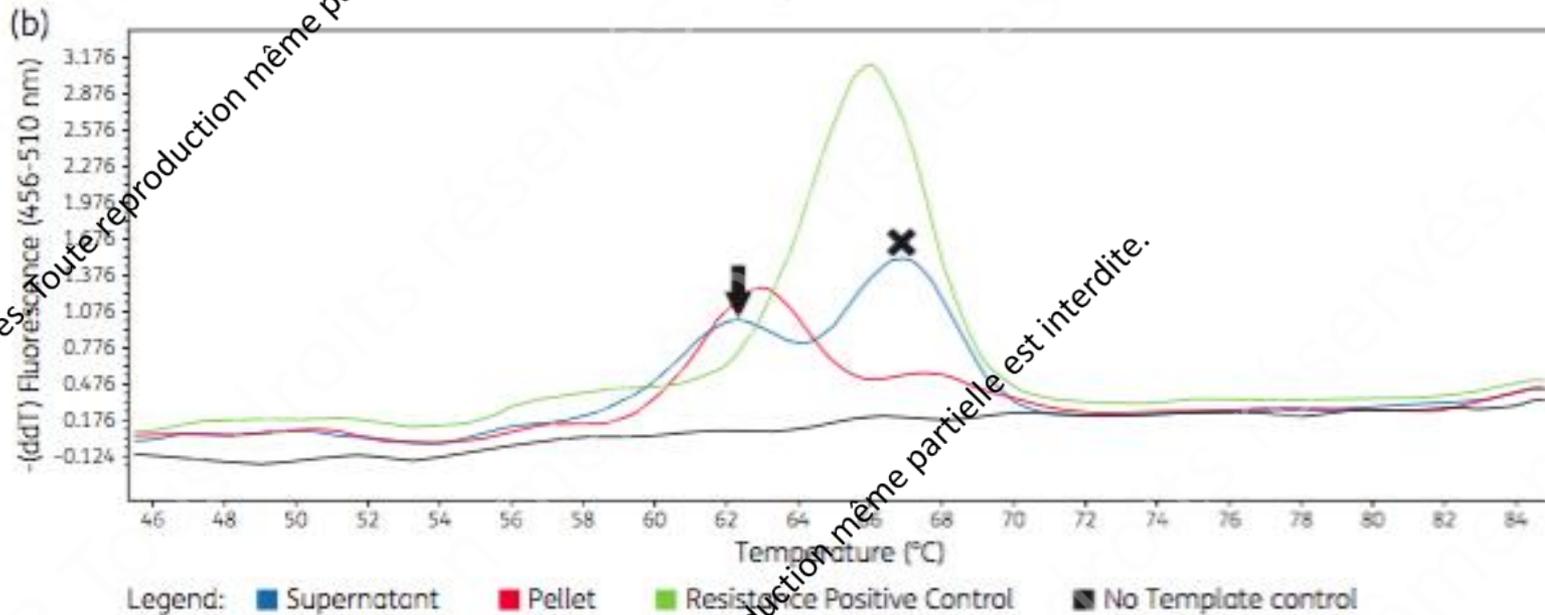
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

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

Détection des mutations de résistance par le kit AsperGenius®

- qPCR Multiplex : amplification de 4 régions
- (TR34/L198H/Y121F/T289A)
- Détection et Identification des mutations par l'analyse des courbes de fusion : SYBR green
- **Avantages :**
 - vérification amplification des régions +++
 - Infections mixtes : détection de double population dans un même échantillon : souche WT/souche mutée
- **Inconvénients :** plus compliquée/ routine expérimentateurs plus spécialisés

Détection de double population



qPCR AsperGenius : 91 LBA testés

→ qPCR + : 79% (72/91) 28S et 62% (45/72) multiplexe résistance

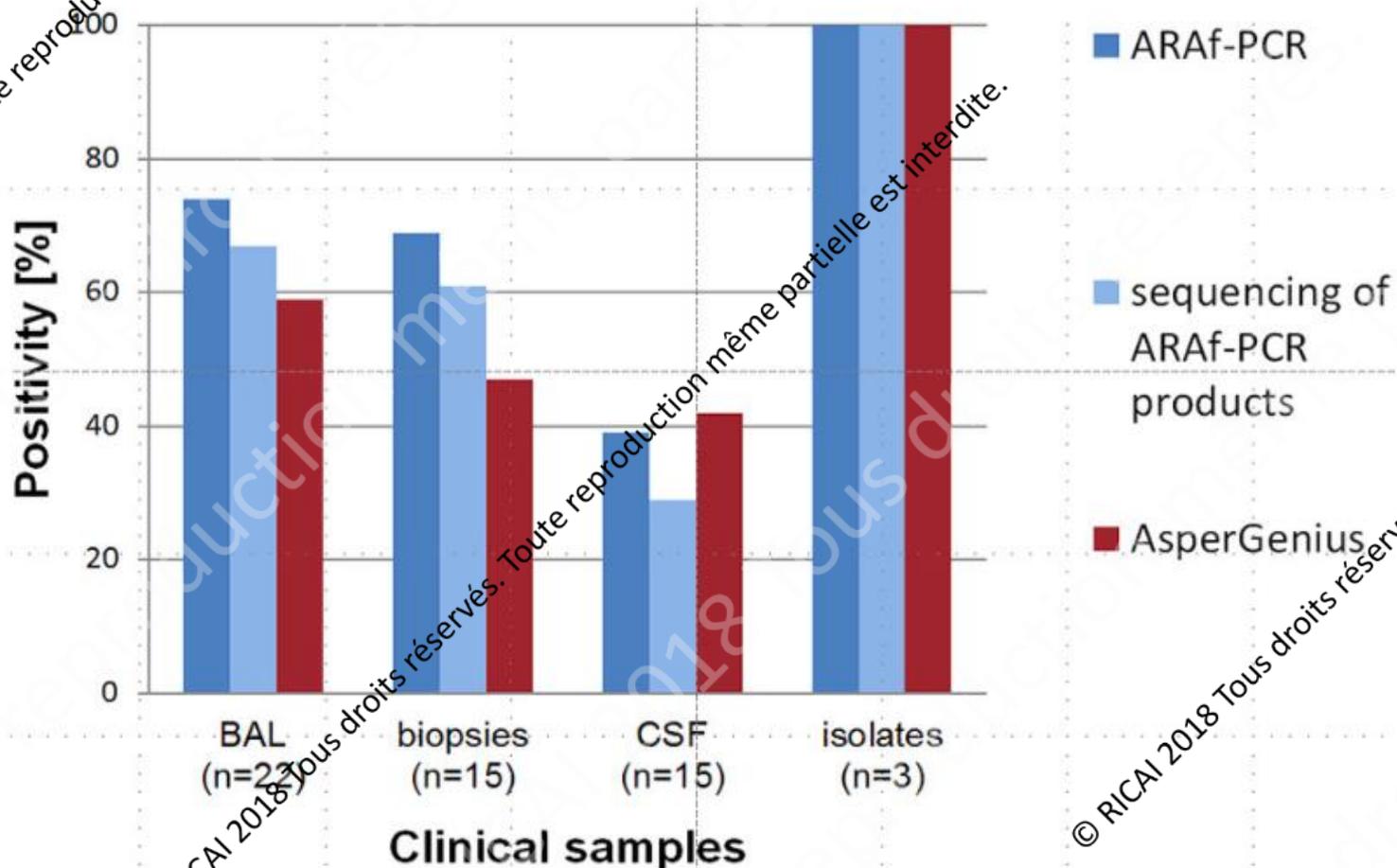
→ 8 mutations TR34/L98H / 3 mutations TR46/Y121F T289A

→ Et 3 infections mixtes WT + mutations TR34/L98H

Détection des mutations de résistance par le kit AsperGenius®

- qPCR Multiplex : amplification de 4 régions (TR34/L198H/Y121F/T289A)
- Détection et Identification des mutations par l'analyse des courbes de fusion : SYBR green
- **Avantages :**
 - vérification amplification des régions +++
 - Infections mixtes : détection de double population dans un même échantillon : souche WT/ souche mutée
- **Inconvénients :**
 - plus compliquée/ routine. Expérimentateurs plus spécialisés
 - Rendement de la « PCR résistance »

Kit AsperGenius vs PCRs maison



		In-house ARAf PCR			AsperGenius®	
		PCR+	Successful sequencing	Mutation+	PCR+	Mutation+
BAL	TR34	82% (18/22)	73% (16/22)	1	64% (14/22)	1
	L98H	91% (20/22)	77% (17/22)	1	31% (7/22)	1
	TR46	77% (17/22)	73% (16/22)	0	-	-
	Y121F	68% (15/22)	59% (13/22)	0	72% (16/22)	0
	T289A	59% (13/22)	50% (11/22)		68% (15/22)	0
	M220	68% (15/22)	68% (15/22)	0	-	-
	Total	74% (98/132)	67% (88/132)	2	59% (52/88)	2
BIOPSY	TR34	53% (08/15)	53% (08/15)	1	33% (05/15)	0
	L98H	67% (10/15)	60% (09/15)	3	33% (05/15)	0
	TR46	60% (09/15)	53% (08/15)	1	-	-
	Y121F	80% (12/15)	67% (10/15)	1	60% (09/15)	1
	T289A	80% (12/15)	60% (09/15)	1	60% (09/15)	1
	M220	73% (11/15)	73% (11/15)	0	-	-
	Total	69% (62/90)	61% (55/90)	7	47% (28/60)	2

TABLE 3 | Results of AsperGenius multiplex real-time PCR assay on subset of patient materials.

Patient + No.	Origin	Ct <i>Aspergillus</i> species	Ct <i>A. fumigatus</i>	Ct <i>A. terreus</i>	<i>A. fumigatus</i> CYP51A PCR			
					WT/ TR ₃₄	WT/ L98H	WT/ Y121F	WT/ T289A
A3	Serum, GM 0.1	35.49	38.60	-	-	-	WT	WT
A4	Serum, GM 0.1	35.49	36.93	-	-	WT	WT	WT
A8	Biopsy lung	26.87	28.61	-	WT	WT	WT	WT
A10	Biopsy lung	30.80	32.55	-	WT	WT	WT	WT
A11	Biopsy lung	31.61	33.43	-	WT	WT	WT	WT
B10	Serum, GM 0.4	31.83	32.44	-	-	WT	WT	-
B16	Serum, GM 4.0	29.78	31.39	-	#	WT	WT	WT
B18	Serum, GM 5.6	32.41	33.93	-	WT	WT	WT	WT
B19	Biopsy lung	-	-	-	-	-	-	-
C3	Bronchial biopsy	32.55	34.36	-	WT	WT	-	-
C4	Serum	-	-	-	-	-	-	-
C9	Serum	-	-	-	-	-	-	-
C25	Serum	36.41	38.56	-	WT	WT	WT	WT
C28	Bronchial biopsy	26.76	28.78	-	WT	WT	WT	WT
D7	Serum, GM 0.2	-	-	-	-	-	-	-
D8	Biopsy lung	30.70	32.45	-	WT	WT	WT	WT
E2	Bronchial biopsy	30.77	32.62	-	WT	WT	WT	WT

-, Amplification not successful.

#Melting curve differ.

Détection des mutations de résistance par le kit MycoGenie®

- qPCR Multiplexe : amplification de 3 régions
28S/TR34/L198H

→ détection spécifique des TR34/L98H mutés

- **Avantage** : simple, la détection des mutations (simple copie) n'altère pas le rendement d'amplification du 28S (multicopies)
- Inconvénient : pas de contrôle de l'amplification TR34/L98 : pas de mutation ou non détectable par quantité insuffisante ??

TABLE 1 Detection of TR₃₄ L98H *cyp51A* mutations in *Aspergillus fumigatus* isolates by the MycoGENIE *A. fumigatus* qPCR assay

Isolate	Mutations (detected by CR/sequencing)	C _T by qPCR ^a		
		TR ₃₄	<i>A. fumigatus</i>	L98H
1			23.47	
2			20.72	
3	TR ₃₄ L98H	23.56	20.89	24.49
4	TR ₄₆ Y121F T289A		20.64	
5			20.57	
6	TR ₄₆ Y121F T289A		20.61	
7	TR ₃₄ L98H	22.93	20.39	24.06
8			21.41	
9	TR ₃₄ L98H	23.74	21.35	24.80
10	TR ₃₄ L98H	23.55	20.61	24.43
11	TR ₄₆ Y121F T289A		20.87	
12			21.22	
13			20.87	
14	TR ₃₄ L98H	23.06	20.46	24.21
15	TR ₃₄ L98H	23.02	20.59	24.15
16			21.74	
17			21.36	
18	TR ₃₄ L98H	23.77	21.18	24.92
19	TR ₄₆ Y121F T289A		20.97	
20			21.08	
21	TR ₃₄ L98H	23.35	20.37	24.13
22			20.15	
23	TR ₃₄ L98H	22.67	20.28	23.73
24	TR ₃₄ L98H	23.21	20.65	24.36
25	TR ₄₆ Y121F T289A		21.18	

^aC_T, threshold cycle.

TABLE 1 Detection of TR₃₄ L98H *cyp51A* mutations in *Aspergillus fumigatus* isolates by the MycoGENIE *A. fumigatus* qPCR assay

Isolate	Mutations (detected by CR/sequencing)	C _T by qPCR ^a		
		TR ₃₄	<i>A. fumigatus</i>	L98H
1			23.47	
2			20.72	
3	TR ₃₄ L98H	23.56	20.89	24.49
4	TR ₄₆ Y121F T289A		20.64	
5			20.57	
6	TR ₄₆ Y121F T289A		20.61	
7	TR ₃₄ L98H	22.93	20.39	24.06
8			21.41	
9	TR ₃₄ L98H	23.74	21.35	24.80
10	TR ₃₄ L98H	23.55	20.61	24.43
11	TR ₄₆ Y121F T289A		20.87	
12			21.22	
13			20.87	
14	TR ₃₄ L98H	23.06	20.46	24.21
15	TR ₃₄ L98H	23.02	20.59	24.15
16			21.74	
17			21.36	
18	TR ₃₄ L98H	23.77	21.18	24.92
19	TR ₄₆ Y121F T289A		20.97	
20			21.08	
21	TR ₃₄ L98H	23.35	20.37	24.13
22			20.15	
23	TR ₃₄ L98H	22.67	20.28	23.73
24	TR ₃₄ L98H	23.21	20.65	24.36
25	TR ₄₆ Y121F T289A		21.18	

^aC_T, threshold cycle.

TABLE 1 Detection of TR₃₄ L98H *cyp51A* mutations in *Aspergillus fumigatus* isolates by the MycoGENIE *A. fumigatus* qPCR assay

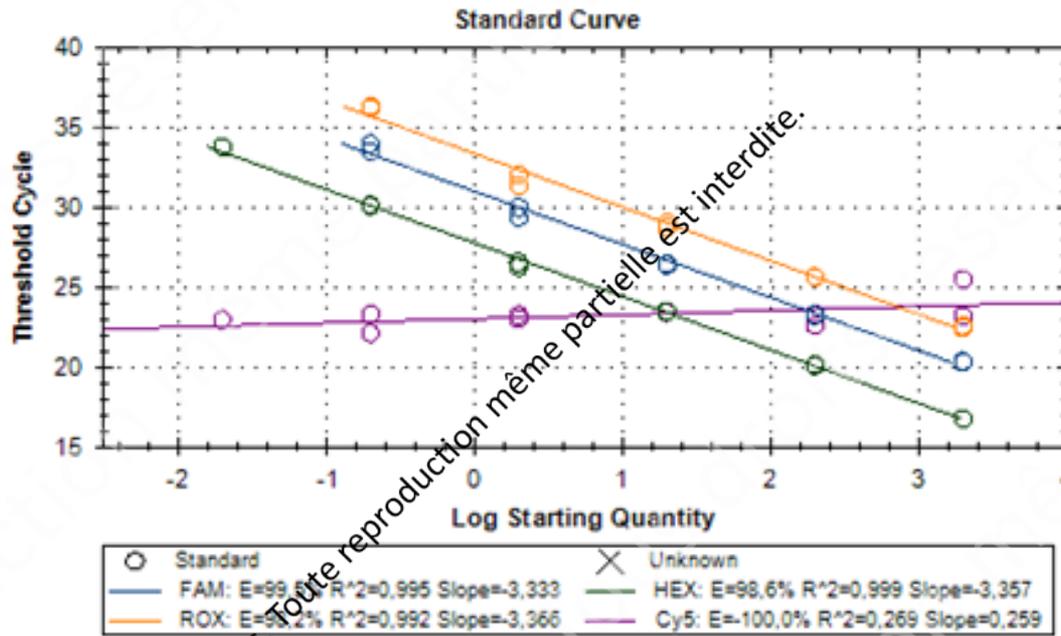
Isolate	Mutations (detected by CR/sequencing)	C _T by qPCR ^a		
		TR ₃₄	<i>A. fumigatus</i>	L98H
1			23.47	
2			20.72	
3	TR ₃₄ L98H	23.56	20.89	24.49
4	TR ₄₆ Y121F T289A		20.64	
5			20.57	
6	TR ₄₆ Y121F T289A		20.61	
7	TR ₃₄ L98H	22.93	20.39	24.06
8			21.41	
9	TR ₃₄ L98H	23.74	21.35	24.80
10	TR ₃₄ L98H	23.55	20.61	24.43
11	TR ₄₆ Y121F T289A		20.87	
12			21.22	
13			20.87	
14	TR ₃₄ L98H	23.06	20.46	24.21
15	TR ₃₄ L98H	23.02	20.59	24.15
16			21.74	
17			21.36	
18	TR ₃₄ L98H	23.77	21.18	24.92
19	TR ₄₆ Y121F T289A		20.97	
20			21.08	
21	TR ₃₄ L98H	23.35	20.37	24.13
22			20.15	
23	TR ₃₄ L98H	22.67	20.28	23.73
24	TR ₃₄ L98H	23.21	20.65	24.36
25	TR ₄₆ Y121F T289A		21.18	

^aC_T, threshold cycle.

Détection des mutations de résistance par le kit MycoGenie®

- qPCR Multiplex : amplification de 3 régions
- (28S/TR34/L198H)
- Amplification spécifique des TR34/L98H mutés
- **Avantage** : simple, la détection des mutations (simple copie) n'altère pas le rendement d'amplification du 28S (multicopies)
- Inconvénient : pas de contrôle de l'amplification TR34/L98 : pas de mutation ou non détectable par quantité insuffisante ??

Détection des mutations n'altère pas le rendement de l'amplification du 28S



Dannaoui E et coll, JCM 2017

© RICAI 2018

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction mé

Détection des mutations de résistance par le kit MycoGenie

- qPCR Multiplex : amplification de 3 régions
- (28S/TR34/L198H)
- Amplification spécifique des TR34/L98H mutés
- **Avantage** : simple, la détection des mutations (simples copies) n'altère pas le rendement d'amplification du 28S (multicopies)
- **Inconvénient** : pas de contrôle de l'amplification TR34/L98H : pas de mutation ou non détectable par quantité insuffisante ??

Evaluation kit MycoGenie ?

- LBA/ prélèvements respiratoires
- Sérums
- Biopsies

MycoGenie

Dannaoui et coll, JCM 2017

Morio et coll, Mycose 2018

Guegan H, J Infection 2017

Guegan H, Frontiers Microbiol 2018

Evaluation des 2 Kits sur des prélèvements ?

- **LBA/ prélèvements respiratoires → OUI**
- Sérums → NON
- Biopsies → NON

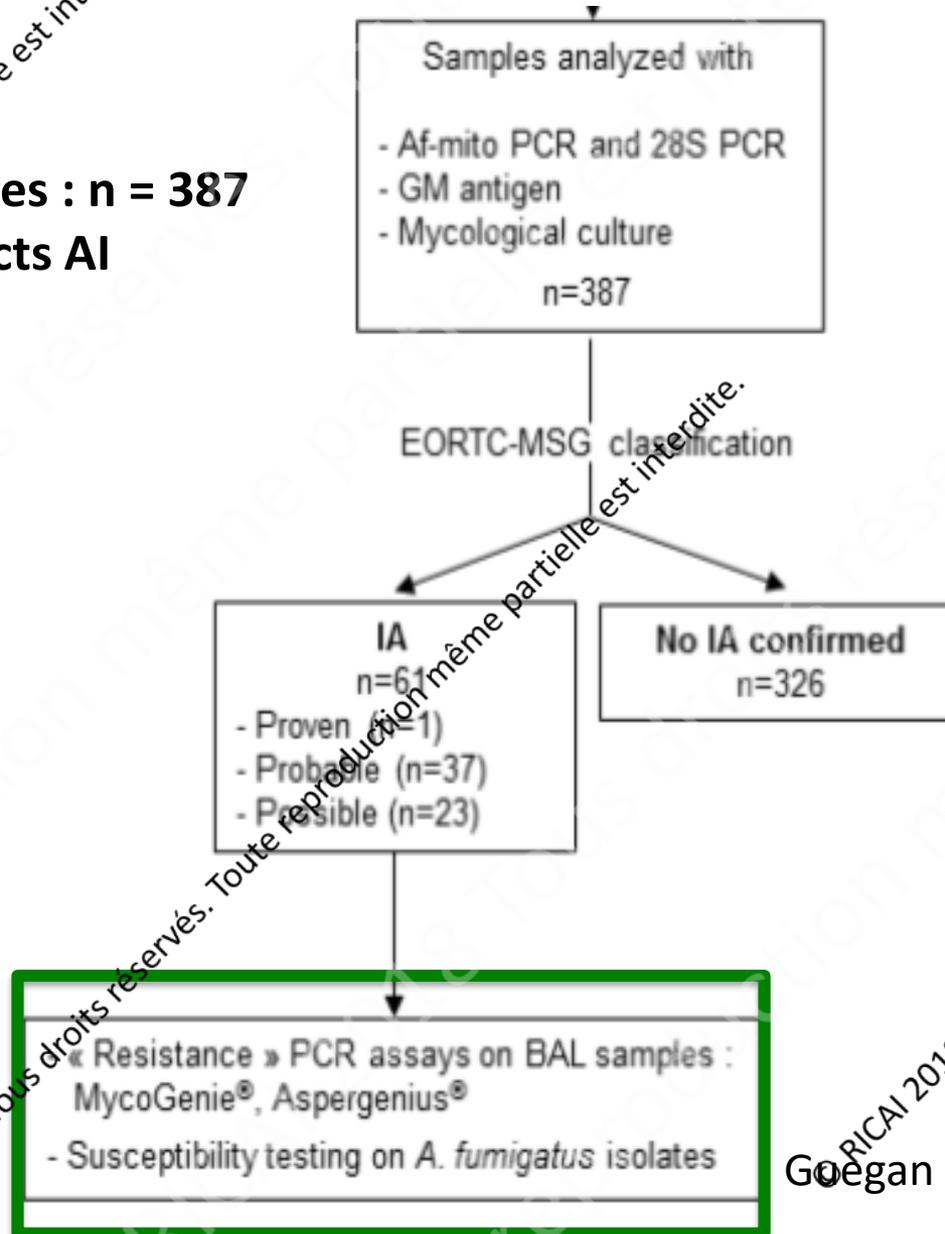
Dannaoui et coll, JCM 2017

Morio et coll, Mycose 2018

Guegan H, J Infection 2017

Guegan H, Frontiers Microbiol 2018

Prél respiratoires : n = 387
Patients suspects AI
AI : n=61



Détection des mutations *Cyp51A* avec les 2 kits dans les prélèvements respiratoires

PCR assay	28S	Résistance			
	<i>A. fumigatus</i> PCR	TR34	L98H	Y121F	T289A
Target amplification	29/61 (47.5)	18/29 (62.1)	18/29 (62.1)	19/29 (65.5)	18/29 (62.1)
Detection of mutated allele ^a	na	0/18	0/18	0/19	0/18
Detection of mutated allele	37/61 (60,6)	0/37	0/37	na	na

Surveillance ECBC patients atteints de Mucoviscidose

Faible sensibilité de détection des marqueurs de résistance !!

PCR assay		Number of positive samples (%) for				
		<i>A. fumigatus</i>	TR ₁	L98H	Y121F	T289A
AsperGenius®	Target amplification ^a	57 (47.9)	25/57 (43.9)	22/57 (38.6)	30/57 (52.6)	32/57 (56.1)
	Detection of mutated allele ^b	NA	0/25	0/21	0/30	0/32
Mycogenie®	Detection of mutated allele	64 (56.8)	0/64	0/64	NA	NA

Guegan H et coll, Frontiers Microbiol 2018

Conclusion (1)

- 2 Kits de détection de mutations de résistance chez *A. fumigatus*
 - Mutations les plus fréquentes « environnementales »
 - ne permettent pas d'éliminer une résistance
 - Intéressant sur les souches
 - enquêtes épidémiologiques (Seufert et coll JAC 2018 détection des résistances de type environnementale en Allemagne, Abdolrasouli et coll, I J Antimicrobial agents 2018)
- Prélèvements : concept est intéressant mais leur utilisation est limitée par le manque de sensibilité de la détection des résistances recherchées
- **En revanche** : couplés à des Kits standardisés de détection ADN *Aspergillus* dans les prélèvements : cible multicopie 28S

Performances des 2 kits pour la détection ADN *Aspergillus* : cible 28S

Kit	Prélèvement testé	Patients	N° Patients IA prouvée /probable	Se. %	Sp. %	référence
AsperGenius	LBA (n=201)	Hémato	52	84	80	Chong et al, 2016
	Plasma (n=210)	Hémato	20	80	77,8	White et al, 2017
	LBA (n=387)	Patients à risque	38	68,4	92	Guegan et al, 2018
MycoGenie	Respira (n=88)	Patients à risque	-	92,9	90,1	Dannaoui et al, 2017
	Sérum (n=69)	Hémato	16	100	84,6	Dannaoui et al, 2017
	LBA (n=387)	Patients à risque	38	71,1	92	Guegan et al, 2018

Conclusion (2)

- Ces Kits représentent actuellement une première approche intéressante pour vérifier systématiquement dans les prélèvements positifs en 28S (respiratoires et sanguins) l'existence ou non de résistance de type environnementale, en particulier lorsque les cultures sont négatives
- Manque d'essais cliniques pour valider ces kits pour une utilisation en routine chez les patients à risque
→ cf recommandations ESCIMD-ECMM 2018 :
Ullmann A et al, CMI 2018

Merci de votre attention.....

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

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

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