



RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Etude du complexe *Candida glabrata* au centre de Maternité de Monastir

Manel Zribi

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

Introduction



RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

- La candidose vulvovaginale touche jusqu'à 75% des femmes en âge de procréer

- Agent : *Candida albicans*

-  la prévalence *C. glabrata*

- *C. nivariensis*, *C. braccaricensis* : pathogènes émergents

indiscernables de *C. glabrata*

Objectif



RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Identifier les deux sous-espèces *Candida nivariensis* et *Candida bracarensis* à partir de l'espèce complexe *Candida glabrata*



RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Matériel et méthodes

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

- Étude rétrospective

56 souches de *Candida glabrata*

→ 43 prélèvements vaginaux (PV)

→ 5 placentaires

→ 3 urinaire

→ 1 stérilet

→ 1 sonde

- **Lieu** : Centre de Maternité et de Néonatalogie de Monastir (CMNMM)
- **Période** : 01/01/2015 jusqu'à 31/12/2016
- **L'âge médian** : 33 ans avec extrêmes d'âge entre 20 et 60 ans.

Identification phénotypique

- Test de blastèse
- Test de chlamydo-sporulation
- Identification biochimique
- Culture sur milieu CHROMagar®

Identification moléculaire

- Extraction de l'ADN
- Détermination de la concentration et évaluation de la pureté de l'ADN
- Amplification génique par PCR du **gène RPL31**

Méthodes



RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Extraction de l'ADN

- Kit GF-1 Blood / GF-1Tissue
- Phénol-chloroforme
- Chelex 100

Amplification du gène RPL31

Une paire d'amorces : RPL31cgF: 5'GCCGGTTTGAAGGACGTTGTTACT-3'
RPL31cgR: 5'GAACAATGGGTTCTTGGCGT-3'

Poids moléculaire de chaque espèce du complexe *C. glabrata*

Espèce	Poids moléculaire de la bande
<i>C. glabrata</i>	1 061 pb
<i>C. lusitana</i>	802 pb
<i>C. nivariensis</i>	665 pb



RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Résultats et discussion

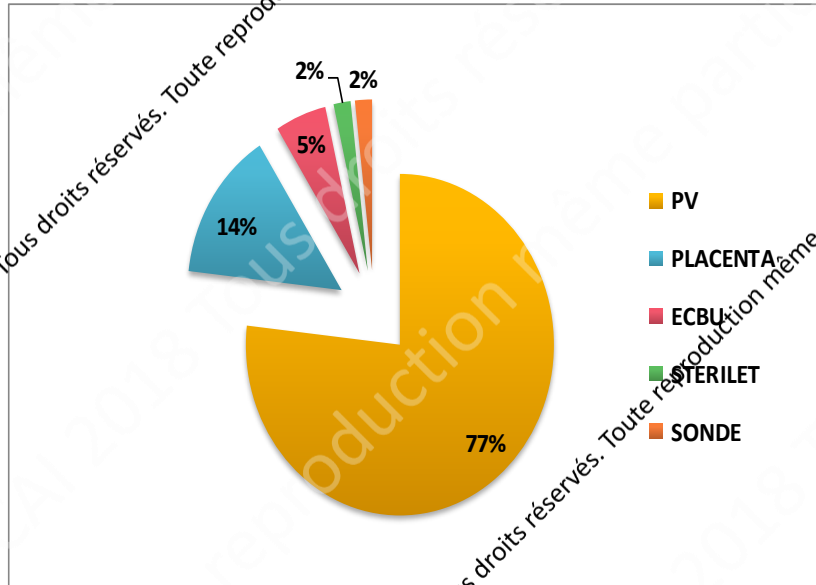
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Isolats cliniques



l'activité principale du CMNNM se consacre à la prise en charge des femmes en procréation ce qui explique la forte prévalence des candidoses vulvo-vaginales dans notre étude

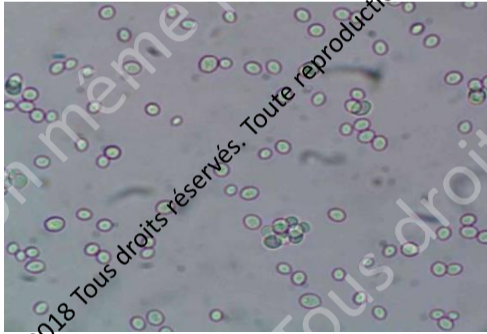
Répartition des souches selon le site du prélèvement



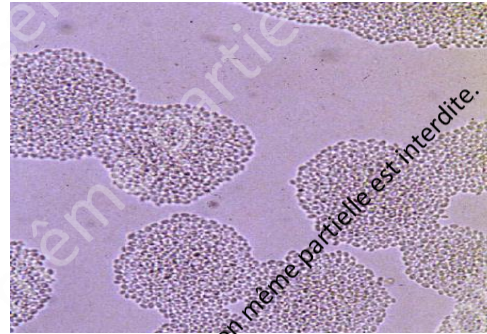
RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Etude phénotypique



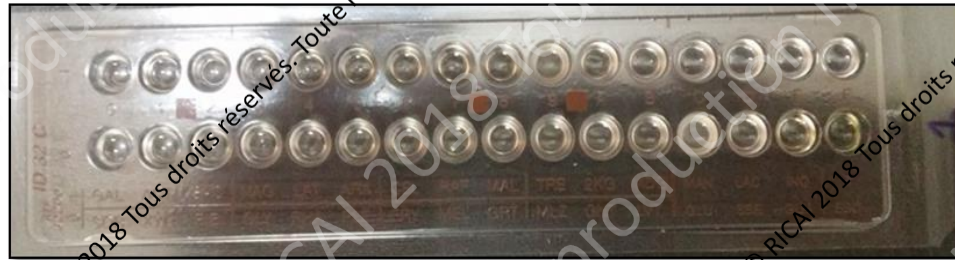
Test de blastèse



Test de Chamydosporulation



Culture sur milieu CHROMagar®



Identification de *C. glabrata* sur l'API ID 32C®



RICAI

RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Etude phénotypique

Culture sur milieu CHROMagar®

C. glabrata : Colonies de couleur rose

C. nivariensis, *C. bracarensis* : Colonies blanches

Morales-Lopez *et al*, Sharma *et al* :

Milieu CHROMagar® : méthode de criblage et screening

Aznar-Marin *et al* :

Pas de différenciation morphologique d'autres espèces apparentées comme *C. norvergensis*

et *C. inconspicua*

Morales-Lopez SE *et al*, Mycopathologia. 2016

Sharma C *et al*, Microbiol Infect Dis. 2013

Aznar-Marin P *et al*, Mycopathologia. 2016



RICAI

RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Etude moléculaire

Choix de la méthode d'extraction de l'ADN génomique

Comparaison des concentrations et de la pureté de l'ADN de deux isolats Ce23 et Ce28 effectués par trois méthodes d'extraction

Méthode d'extraction		Code l'isolat	Concentrations (ng/μl)	260/280	Amplifié de l'ADN
Kit	GF-1	Ce23	1,7	2,9	Absent
	Blood	Ce28	3,9	1,8	Présent
	GF-1	Ce23	44,8	1,95	Présent
	Tissue	Ce28	17,7	2,07	Présent
Phénol-chloroforme	Ce23	8	1,99	Absent	
	Ce28	3,7	1,96	Absent	
Chelex	Ce23	58,1	2,04	Présent	
	Ce28	48,5	1,98	Présent	

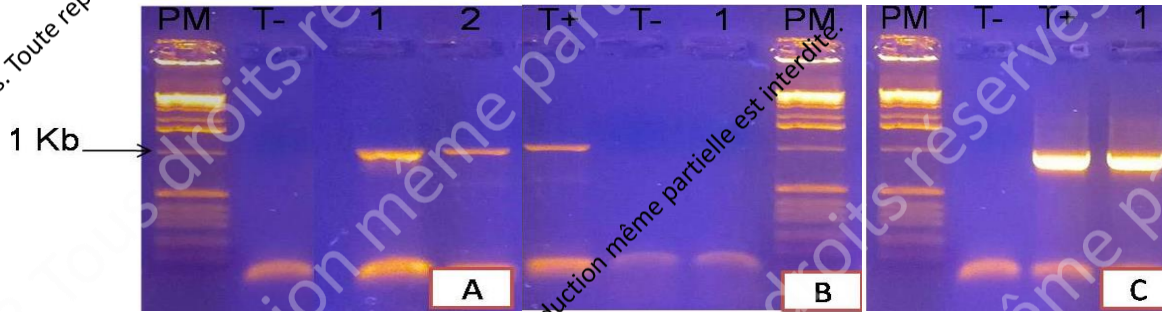


RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Etude moléculaire

Choix de la méthode d'extraction de l'ADN génomique



Résultat de l'amplification de l'ADN de l'espèce *C. glabrata* selon la méthode d'extraction

A : Extraction par kit : 1 : Echantillon extrait par GF-1 Tissue, 2 : Echantillon extrait par GF-1 Blood; **B: Extraction par phénol-chloroforme**: 1 : Echantillons extraits par le phénol-chloroforme, **C : Extraction par Chelex 100** : 1 : Echantillons extraits par Chelex 100; **T⁺** : Echantillon connu positif ; **T⁻** : Témoin négatif ; **PM** : Marqueur de poids moléculaire (1kb DNA Ladder, Promega®)



RICAI

RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Etude moléculaire

Choix de la méthode d'extraction de l'ADN génomique

- Kit GF-1 Blood / GF-1 Tissue
- Phénol-chloroforme :

Méthode de référence

Technique lourde, longue et toxique

- **Chelex 100**: Moins susceptible de contenir des éléments nuisibles ou désinhibiteurs de la réaction de PCR

Seul inconvénient ne permet pas une conservation à long terme de l'extrait

Nous avons choisi la technique d'extraction par Chelex 100

Meilleure qualité du produit obtenu + son rendement



RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Etude moléculaire

Amplification du gène RPL31



Profil de l'amplification de l'ADN du complexe *C. glabrata* par la PCR- RPL31



RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Etude moléculaire

Amplification du gène RPL31

- **Esposito et al.** : Absence de *C. nivariensis* et *C. bracarensis* parmi les 1000 isolats recueillis dans 14 régions italiennes
- **Mirkendi et al.** : identification de *C. glabrata* sensu stricto sur des isolats sanguins collectés sur une période de 7 ans
- *C. nivariensis* et *C. bracarensis* : causes rares de candidémie
- **Etude multicentrique** : *C. nivariensis* et de *C. bracarensis* ont été présents uniquement dans 0,2% des 1 598 isolats du complexe *C. glabrata*.

Esposito MC et al. Mycoses. 2013

Mirkendi H et al, Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011

Lockhart SR et al, J Clin Microbiol. 2009



RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Conclusion

- L'analyse phénotypique et moléculaire : absence polymorphisme d'espèces
- Nombre limité des échantillons de cette étude ne permet pas de conclure sur la présence ou non de sous espèce de *Candida glabrata*
- Une étude sur un nombre d'échantillons plus important à partir de différents types de prélèvements de candidose pourrait être intéressante pour valider ces conclusions



RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Merci pour votre attention

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