

Centre de référence mycoses

Centre hospitalier universitaire de Liège

Rapport d'activité 2016

Marie-Pierre Hayette

Rosalie Sacheli

Mars 2017

Sommaire

1. Introduction
2. Missions spécifiques du CNR mycoses
3. Résumé des activités de 2016
 - Activités du CNR/Liège
 - Démarche qualité
 - Accréditation Belac ISO15189
 - Contrôles de qualité externe supranationaux
 - Collection
4. Bilan de 2016 pour les champignons isolés par le CNR
 - Bilan Global
 - Bilan selon l'origine du prélèvement de phanères
 - Cheveux
 - Peau
 - Ongles
 - Bilan selon l'âge des patients
5. Comparaison années 2012-2016
6. Enquêtes épidémiologiques
7. Travaux de recherche et collaborations
8. Conclusions
9. Références

1. Introduction

Le CNR mycoses a pour mission l'expertise et la surveillance épidémiologique et microbiologique des mycoses superficielles et profondes. L'importance grandissante tenue par les mycoses au niveau médical est sans nul doute liée à l'incidence croissante des infections fatales causées par celles-ci chez des patients immunodéprimés durant les deux dernières décennies (1). Cette augmentation est attribuée à un accroissement du nombre de patients soumis à un traitement immunodépresseur (patients cancéreux, greffés de moelle ou d'organe), à l'intensification de ce type de traitement mais aussi à l'accroissement du nombre de patients infectés par le VIH.

Un diagnostic rapide et précis est nécessaire chez ces patients vulnérables. Dans ces cas, il est important de connaître les aspects culturels, macroscopiques et microscopiques des agents fongiques de façon à orienter rapidement le clinicien vers une thérapeutique adaptée.

A côté des mycoses invasives, les mycoses superficielles et particulièrement les onychomycoses ont une prévalence élevée dans la population générale comme l'atteste une étude portant sur 16 pays européens qui montre une prévalence de 59% (2). De plus, les agents responsables de teignes microsporiques (touchant le cuir chevelu), peuvent se révéler contagieux et nécessiter une éviction scolaire d'où l'importance d'un diagnostic rapide et précis (3).

Le centre national de référence (CNR) a pour mission principale l'identification des champignons qui lui sont adressés de façon à confirmer un diagnostic jusqu'au niveau de l'espèce. Une confirmation ou détermination de la sensibilité *in vitro* des champignons vis-à-vis des antifongiques adaptés peut également être réalisée si nécessaire. D'autre part dans le cadre d'épidémies, les laboratoires de référence offrent une aide dans la caractérisation phénotypique et génotypique des souches impliquées.

2. Missions spécifiques du CNR Mycoses

Les missions du CNR mycoses sont les suivantes :

- « Identification des champignons filamenteux et de levures adressés par les laboratoires belges. Réalisation d'antifongogramme dans le cas d'infection profonde ou d'infection récidivante »
- Constitution et entretien de la collection de souches de dermatophytes (CNR Mycoses Liège) et de souches d'intérêt particulier
- Mise au point et développement de nouvelles méthodes de diagnostic, d'identification et de typage moléculaire des champignons, telles que les méthodes d'amplification génique et de séquençage moléculaire
- Alerte des autorités sanitaires à l'exemple de l'émergence de nouvelles résistances aux antifongiques ou de l'apparition d'une souche épidémique dans une population particulière
- Activité de conseil auprès des autorités sanitaires, des médecins et des biologistes
- Participation à des groupes d'experts à travers l'Europe
- Valorisation des travaux par des publications, articles scientifiques, guide de prescription, formation continue
- Activités de recherches et d'études en collaboration avec d'autres équipes scientifiques
- Participation à des contrôles de qualité externe

3. Résumé des activités de 2016

- **Activités du CNR/Liège**

Au cours de l'année 2016, tous les aspects des missions attribuées au CNR ont été couverts, comme l'identification d'isolats de levures et champignons filamenteux, l'aide au diagnostic de mycoses rares, la détermination de la sensibilité aux antifongiques et l'amélioration de techniques de typage et d'identification moléculaire. Le CNR de Liège se focalise principalement sur l'identification des mycoses superficielles isolées de phanères.

Parmi les techniques d'identification des levures, l'identification par spectrométrie de masse (Maldi-tof) est l'outil n°1 qui est utilisé. Les résultats sont confirmés par séquençage moléculaire si nécessaire.

En 2016, une attention particulière a été accordée à l'identification des dermatophytes par spectrométrie de masse Maldi-Tof. Une base de donnée « home made » a été créée et un total de 134 nouveaux spectres ont été ajoutés par le traitement de souches de dermatophytes dont l'identification avait été préalablement validée par séquençage moléculaire de la région ITS et par microscopie.

Parmi les outils moléculaires, une approche polyphasique est utilisée. La région ciblée en premier lieu dans le cas de l'identification d'une espèce est tout ou partie de la région ITS1-5,8S-ITS2 de l'ARN ribosomique (ARNr). Deux cibles complémentaires sont disponibles à savoir la région D1-D2 de la partie LSU (28S) de l'ARNr et la bêta-tubuline. Ces autres cibles sont utilisées en cas de confirmation de l'identification d'une espèce rare ou en cas de réponse non satisfaisante après une première amplification de la région ITS.

En 2016, Le CNR a implémenté dans son laboratoire l'identification des dermatophytes directement à partir de prélèvements primaires (ongles, peau, cheveux) à l'aide du kit DermaGenius commercialisé par PathoNostics. A ce jour, les examens directs et la mise en culture sont toujours réalisés mais cette méthode d'identification est réalisée dans des cas précis comme par exemple lorsque

l'examen direct est positif mais que la culture est négative, lorsque la culture est contaminée ou lorsque l'identification microscopique est difficile.

Le CNR Mycose avait acquis l'automate Diversilab (BioMérieux). Cet appareil permet une caractérisation précise du génome des champignons filamenteux (y compris les dermatophytes) et des levures. Il a déjà été utilisé pour la caractérisation de souches issues d'une étude nationale (4). Il pourrait aussi être utilisé en cas d'épidémies notamment afin de caractériser rapidement le génome de la souche circulante.

- **Démarche de qualité**

- Accréditation Belac ISO 15189

Le laboratoire de Microbiologie clinique du CHU de Liège a mis en place une démarche d'accréditation du laboratoire depuis quelques années. La mise en place du système qualité du CNR mycoses de Liège a été initiée en 2012 et l'audit d'accréditation a eu lieu en mai 2013. La démarche retenue pour mettre en conformité le CNR avec la norme ISO 15189 est fondée sur la rédaction de procédures pour chaque analyse proposée par le CNR, la création d'un dossier de validation complet pour chacune de ces techniques et un état des lieux des procédures et protocoles existants. La démarche consiste également en la mise en conformité des locaux et appareillages dédiés aux activités du CNR. La gestion du matériel permet en outre de garantir l'utilisation d'équipements fiables, appropriés aux besoins et surveillés en temps réel. La gestion des réactifs et consommables (sélection et évaluation des fournisseurs, distribution et évaluation des produits) est assurée également. L'accréditation ISO 15189 a été octroyée au CNR mycoses à la suite de l'audit BELAC de mai 2013. En 2014, toutes les procédures du CNR mycoses ont été révisées et réactualisées. Un audit de surveillance a eu lieu en juin 2016 et une seule remarque de type B concernant le CNR a été enregistrée. Cette remarque de type B a été solutionnée la semaine suivant l'audit.

- Contrôles de qualité externes supranationaux

Le CNR Mycoses participe à un contrôle de qualité externe tri-annuel, concernant la détermination de la sensibilité de souches de levures à différents antifongiques et l'identification de cultures de levures/champignons filamenteux issus d'échantillons cliniques. Ces contrôles sont proposés par l'UK NEQAS.

Parallèlement à cela, le CNR mycose organise et /ou participe annuellement à des « ring tests » inter-laboratoires afin de valider les analyses pour lesquelles il n'existe pas de contrôle proposé par un organisme externe.

- **Collection**

Tous les isolats cliniques de levures et de dermatophytes adressée au CNR sont systématiquement conservés et congelés à -80°C excepté les isolats de champignons contaminants, sauf intérêt particulier. La pureté des souches est préalablement vérifiée et des techniques d'identification (y compris séquençage moléculaire) et de détermination de la sensibilité aux antifongiques (selon la demande) sont réalisées préalablement à la congélation. Les souches sont référencées, étiquetées et stockées au sein de la « champithèque » (souchothèque) du CNR.

4. Bilan de 2016 pour les champignons isolés par le CNR

- **Bilan global**

En 2016, un total de 2526 isolats fongiques ont été envoyés aux deux CNR « Mycoses » (regroupement des cas isolés de phanères isolés à la KU Leuven et au CHU de Liège) dont 2241 provenaient de phanères et 88 d'autres sites (sang, LCR, urine, frottis d'oreille, de plaie, de vagin, expectoration, lavage broncho-alvéolaire, œil...). Parmi les échantillons, 1399 (55,5%) ont été identifiés comme étant des dermatophytes, dont 162 provenant de la KUL et 1237 provenant du CHU de Liège. Parmi eux, 1248 (89,3%) isolats ont été identifiés comme faisant partie du genre *Trichophyton*, 151 (10,8%) comme faisant partie du genre *Microsporum* et 2 (0,14%) comme faisant partie du genre *Epidermophyton*. Un total de 393 isolats de levures ont également été répertoriés (tous prélèvements confondus), soit 15,5% de tous

les prélèvements, dont 277 *Candida sp.* Le reste des isolats (735 souches 29,1% de tous les prélèvements) correspond à d'autres champignons filamenteux.

Récemment, une reclassification des dermatophytes a été réalisée (De Hoog et al, 2016). Alors que *Trichophyton interdigitale* et *Arthroderma benhamiae* étaient auparavant regroupés dans le complexe *T. mentagrophytes*, ces deux espèces font désormais partie de deux « séries » différentes respectivement la série *T. mentagrophytes* et la série *T. benhamiae*. *Arthroderma benhamiae* a été de plus renommé en *Trichophyton benhamiae*. Dans la suite de ce rapport (hormis pour la comparaison 2012-2016, point 5), contrairement aux précédentes années, ces deux espèces seront donc considérées comme deux espèces bien distinctes. Parmi les dermatophytes, l'isolat le plus fréquemment retrouvé (tous prélèvements confondus) est *T. rubrum* (963 isolats, 69% des dermatophytes), suivi de *T. interdigitale* 160 isolats, 11,5%), *M. audouinii* (119 isolats, 8,5%), *T. benhamiae* (55 isolats, 3,87%), *M. canis* (29 isolats, 2,07%), *T. tonsurans* (27 isolats, 1,93%), *T. soudanense* (25 isolats, 1,78%), *T. violaceum* (11 isolats, 0,8%), *T. verrucosum* (2 isolats, 0,14%), *E. floccosum* (2 isolats, 0,14%), *T. megnini* (2 isolats, 0,14%). *M. gypseum* (1 isolat, 0,07%), *T. terrestre* (1 isolat, 0,07%) et *Trichophyton sp.* (1 isolat 0,07%). La **figure 2** représente la répartition des cas de dermatophytoses en 2016. Parmi les autres isolats envoyés au CNR, on retrouve des levures réparties en 15 espèces de *Candida sp.* (277 isolats, 70,9% des levures isolées), *Rhodotorula sp.* (79 isolats, 19,8% des levures isolées), *Trichosporon sp.* (36 isolats, 9,1%), *Geotrichum sp.* (7 isolats, 1,78 % des levures isolées) et *Saccharomyces sp* (1 isolat, 0,4% des levures isolées). La **figure 3** décrit en détail la répartition des levures isolées par le CNR mycoses.

Parmi les autres souches reçues par le CNR, on retrouve, entre autres, des *Penicillium sp.* (200 isolats, 7,91% de tous les prélèvements), *Aspergillus sp.* (105 isolats, 4,1%), *Scopulariopsis sp.* (72 isolats, 2,85%), *Fusarium sp.* (52 isolats, 2,06%), *Acremonium sp.* (29 isolats, 1,14%), *Alternaria sp.* (47 isolats, 1,86%) *Cladosporium sp.* (13 isolats, 0,5%).

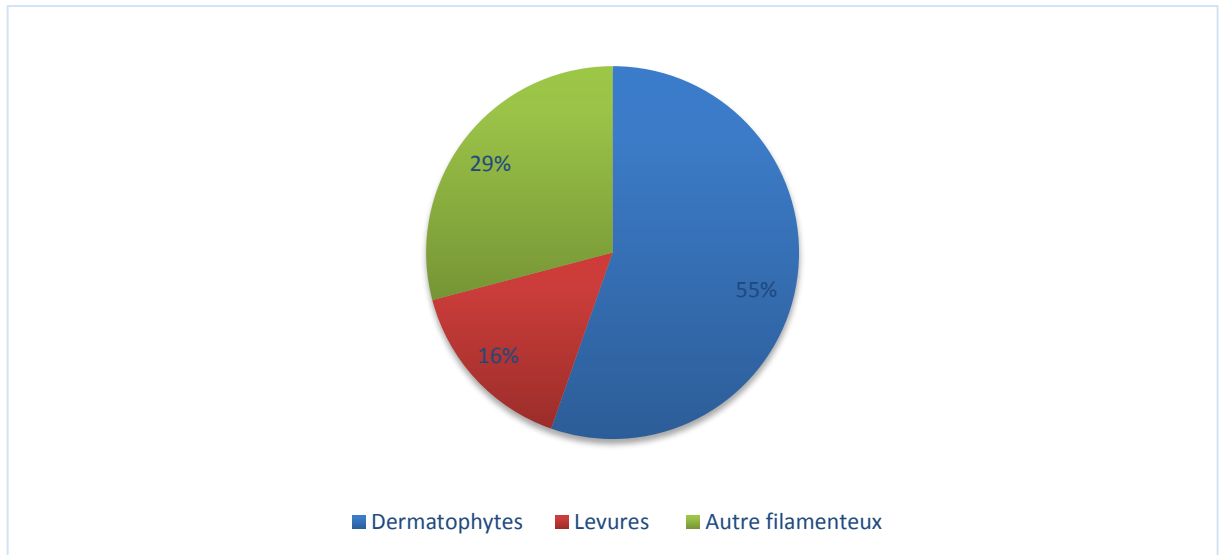


Figure 1 : Répartition des prélèvements reçus en 2016 par le CNR mycoses.

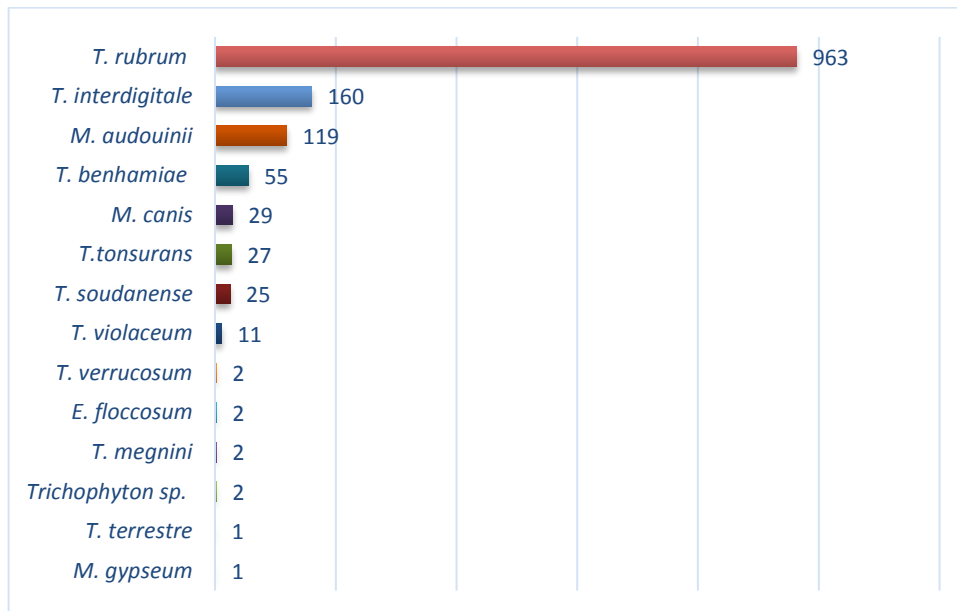


Figure 2 : Répartition des 1399 dermatophytes isolés en 2016 par les 2 CNR

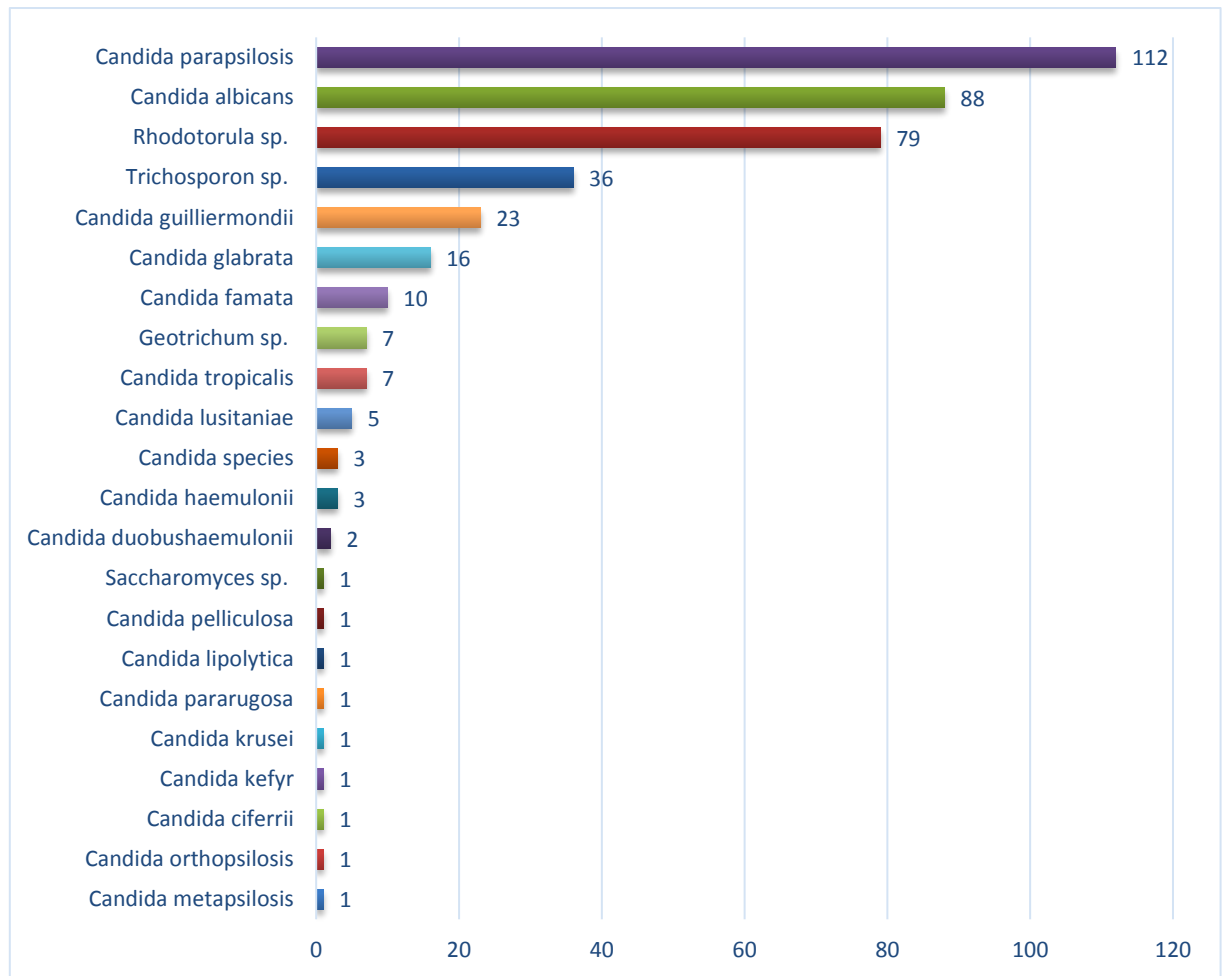


Figure 3 : Représentation graphique de la répartition des espèces de levures retrouvées dans les prélèvements reçus par le CNR en 2016.

○ Bilan selon l'origine du prélèvement

Parmi les isolats envoyés au CNR de Liège (et avec en sus les prélèvements de phanères du CNR de la KUL), 1738 (68,9%), provenaient d'ongles, 518 (20,53%) provenaient de squames ou biopsies de peau, 177 (7,04%) provenaient de cheveux (inclus cuir chevelu) et 88 (3,4%) provenaient d'autres sources (œil, oreille, sang, vagin, urine, expectoration)(Voir **figure 4**).

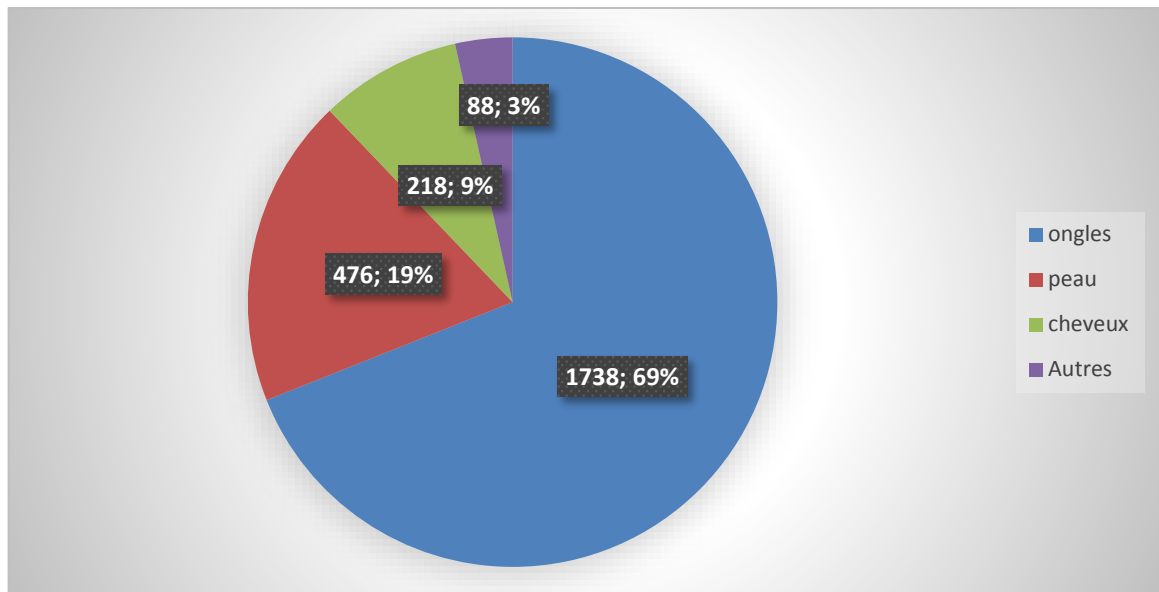


Figure 4: Répartition de l'origine des prélèvements envoyés au CNR Mycoses en 2016.

- Cheveux

Au total, 218 isolats reçus par le CNR provenaient de cheveux parmi lesquels, 173 ont été identifiés comme étant des dermatophytes se répartissant en 10 espèces. *M. audouinii* est le pathogène fongique le plus fréquent pour ce type de prélèvement et est responsable de 66,6% des cas de teignes du cuir chevelu (n=115). Les autres dermatophytes identifiés sont *Trichophyton soudanense* (n=22, 12,7%), *Trichophyton tonsurans* (n=14, 8,9%), *Microsporum canis* (n=9, 5,26%), *Trichophyton violaceum* (n=4, 2,35%), *Trichophyton rubrum* (n=3, 1,75%), *Trichophyton megnini* (n=2, 1,45%), *Trichophyton mentagrophytes complex* (n=2, 1,16%), *Trichophyton verrucosum* (n=1, 0,58%) et *Trichophyton benhamiae* (n=1, 0,58%)(Voir **figure 5**). Les autres espèces cultivées étaient des champignons filamenteux non dermatophytes, présents dans les échantillons comme contaminants. Notre analyse révèle l'importance de l'espèce *M. audouinii* comme agent causal de la teigne. En 2016, cette espèce gagne encore du terrain comme responsable de

teignes du cuir chevelu puisqu'elle passe de 30% en 2014 à 66,6% en 2016 (Voir **Fig 12**).

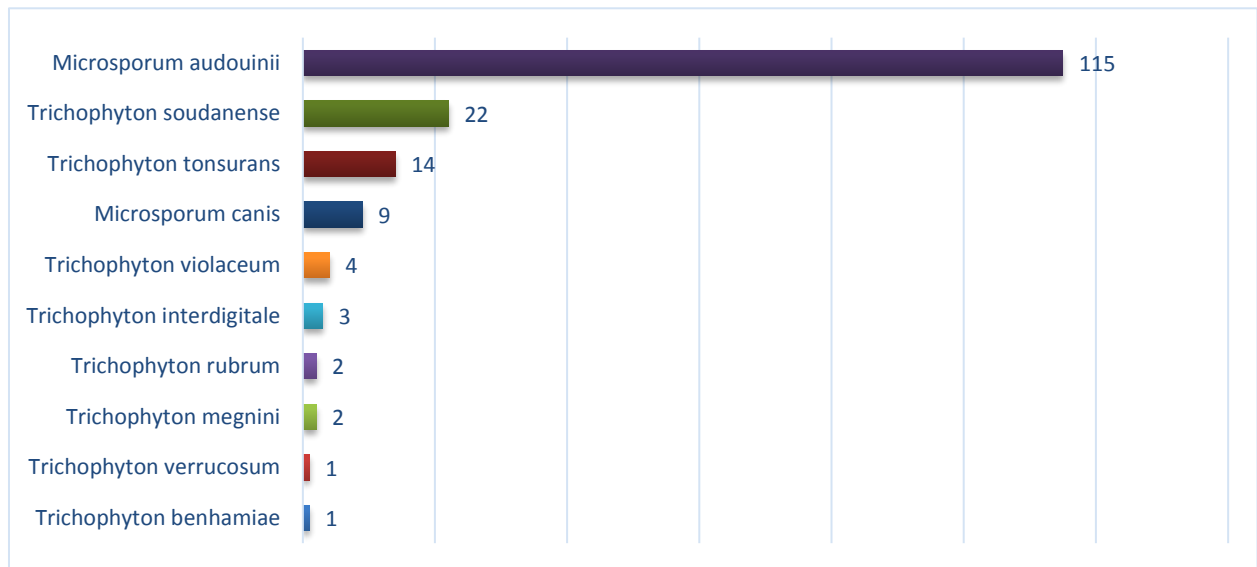


Figure 5 : Répartition des espèces de dermatophytes causant des infections du cuir chevelu en 2016

- Peau

Au total, 476 isolats cultivés à partir de squames ont été reçus. Les isolats sont répartis comme suit: dermatophytes (253 isolats, 53,2% de tous les isolats), levures (95 isolats, 20% de tous les isolats). Le reste des souches est réparti en différentes espèces de champignons filamenteux non dermatophytiques.

Parmi les dermatophytes, 156 isolats de *T. rubrum* ont été identifiés soit 61,7% des cas. Cet agent est l'agent le plus fréquemment rencontré dans ce type de prélèvements. Au total, *T. interdigitale* a été isolé de 29 prélèvements (11,5%) alors que *T. benhamiae* a été isolé de 23 prélèvements de peau (9,1%). *M. canis* a été retrouvé à raison de 20 souches durant l'année 2016 (7,9%). Les autres dermatophytes retrouvés moins fréquemment sont les suivants : 13 *T. tonsurans* (5,15), 5 *T. violaceum* (2 %), 2 *T. soudanense* (0,42%), 2 *Microsporum audouinii* (0,42%), 2 *Trichophyton sp.* (0,42%) et 2 *E. floccosum* (0,42%). (Voir **figure 6** pour la distribution).

Le groupe des non-dermatophytes contient des genres différents tels que des *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis*,

Penicillium. Parmi ceux-ci, certains peuvent être à l'origine d'infection chez les patients dont l'immunité est diminuée ou en cas de blessure non correctement prise en charge. Il est important de considérer chaque agent fongique en fonction du patient (patient à risque de développer une infection superficielle ou invasive en fonction de son degré d'immunodépression ou de facteurs locaux). C'est pour cela que le remplissage du formulaire mis à disposition par le CNR est essentiel dans la prise en charge de l'échantillon.

Par ailleurs, la présence de contaminants de l'environnement au moment du prélèvement ou de l'ensemencement conduit à la culture de champignons non significatifs pouvant empêcher la culture du véritable pathogène. Il est important de rappeler que la prise de squames doit être précédée par la désinfection de la peau avec de l'alcool à 70% pour réduire au maximum le risque de contamination.

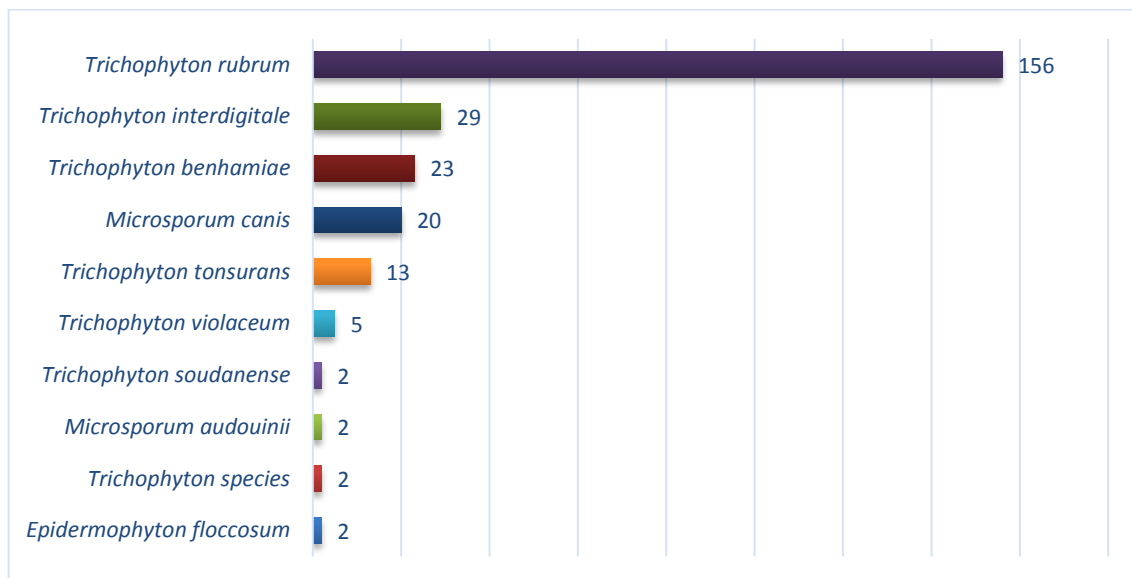


Figure 6 : Répartition des espèces de dermatophytes causant des infections de la peau en 2016.

- Ongles

La majorité des souches reçues par le CNR provenaient d'ongles (1738 isolats). Ceci a conduit à l'identification de 957 dermatophytes (55,2%), 250 levures (174 *Candida* répartis en 12 espèces, 76 appartenant à d'autres genres) et des champignons non-dermatophytes, considérés souvent comme contaminants où l'on retrouve des genres tels que les *Alternaria*, *Scopulariopsis*, *Acremonium*, *Penicillium*,

Aspergillus ou encore *Fusarium*. Il est important de mettre l'accent sur le fait que la présence de champignons non-dermatophytes qui sont potentiellement pathogènes, tels que *Fusarium spp* ou *Scopulariopsis spp*, doit être confirmée sur base de la positivité de l'examen direct et également d'un second échantillon positif pour le même agent, avant de le juger responsable de la symptomatologie. En effet, la présence d'un dermatophyte peut être gênée par la croissance de tels contaminants.

Le groupe des dermatophytes comprend principalement 802 *T. rubrum* (84,03%), 121 *T. interdigitale* (12,6%) et 31 *Trichophyton benhamiae* (3,2%). Tout comme pour les prélèvements de peaux, cette dernière espèce anciennement incluse dans le complexe *T. mentagrophytes* est en augmentation dans les prélèvements d'ongles. D'autres espèces de dermatophytes ont été identifiées minoritairement à partir de prélèvements d'ongles à savoir : 1 *T. soudanense* (0,01%), 1 *T. verrucosum* (0,1%) et 1 *T. terrestre* (0,1%), (Voir **figure 7**).

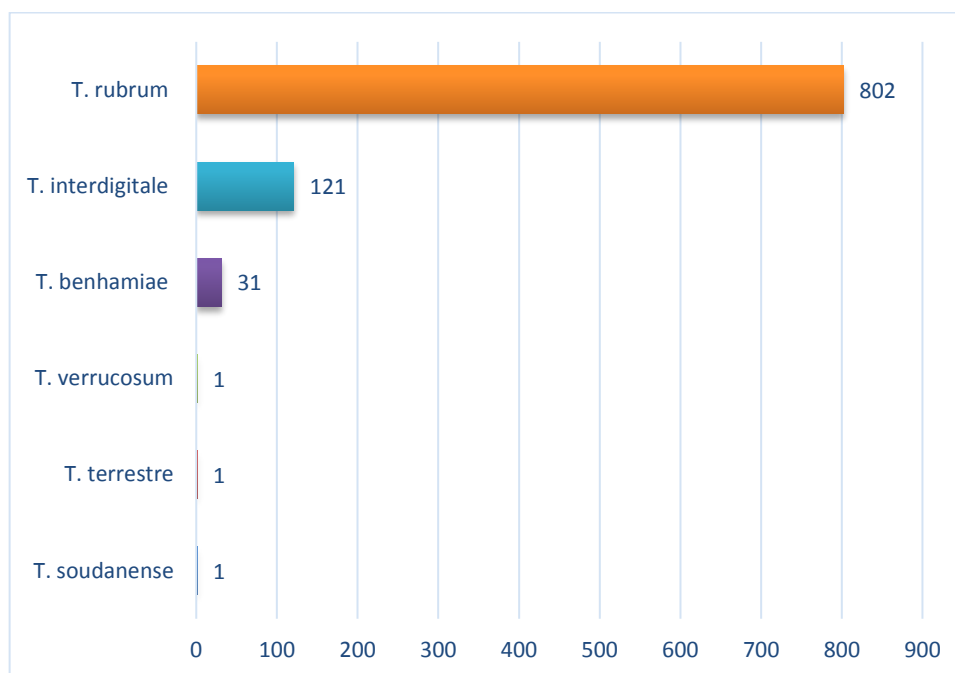


Figure 7: Répartition des espèces de dermatophytes responsables d'onychomycoses en 2016.

○ Bilan selon l'âge des patients

Le groupe d'âge le plus affecté par les infections à dermatophytes est le groupe des 51-70 ans (Voir **figure 8**) suivi par le groupe des 31-50 ans. Dans la tranche d'âge <

de 10 ans, *M. audouinii* est l'agent responsable de 51,5% des infections (Voir répartition des espèces de dermatophytes touchant les < de 10 ans **figure 9**)(âge non renseigné dans 2% des cas de dermatophytose). A noter qu'au sein de l'espèce *M. audouinii*, 90% des prélèvements concernent les moins de 10 ans.

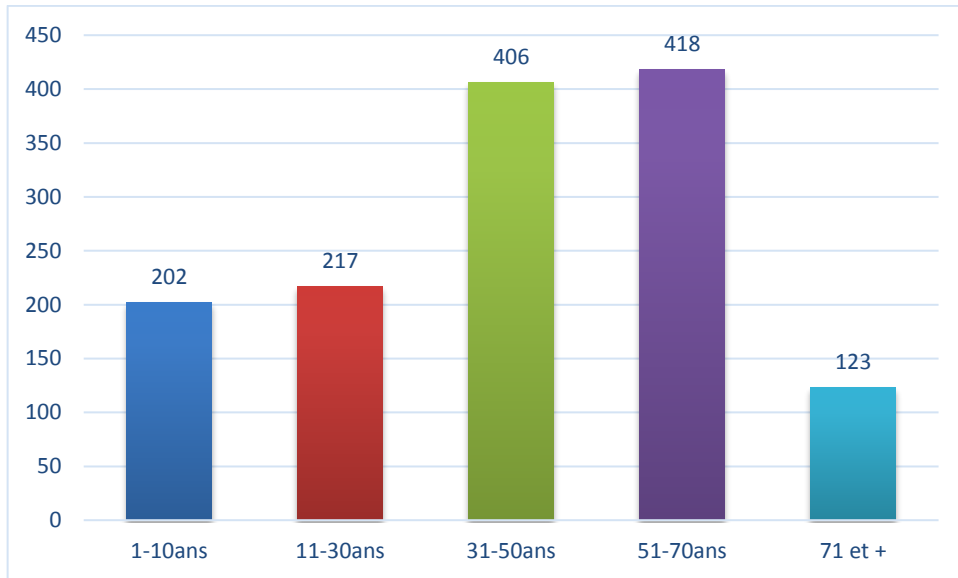


Figure 8 : Représentation graphique des groupes d'âges de patients concernés par les dermatophytoses en 2016.

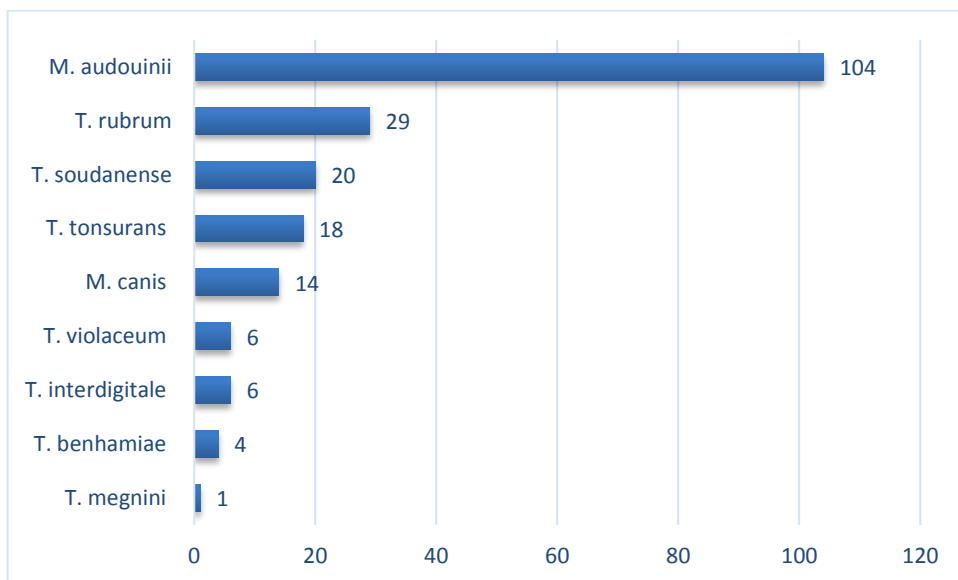


Figure 9 : Distribution des infections à dermatophytes dans la catégorie d'âge des < de 10 ans en 2016 (tous prélèvements confondus).

5. Comparaison années 2012-2016

En 2012, un total de 2733 prélèvements ont été traités par les CNR. En 2013, ce nombre était de 3185, il était de 3264 en 2014 et de 2563 en 2015. En 2016, le nombre de prélèvements traités par le CNR est de 2526, donc relativement stable par rapport à 2016. Parmi ces échantillons, 775 ont été identifiés comme étant des dermatophytes en 2012 contre 1529 en 2013, 1283 en 2014, 1262 en 2015 et 1399 en 2016. Comme le montre la **figure 10**, l'année 2013 a vu une recrudescence des dermatophytes isolés puisqu'ils représentent 48% des prélèvements en 2013 contre 28,4% en 2012 et 39,37% en 2014. En 2015, la proportion de dermatophytes isolés avait encore augmenté puisqu'ils représentaient 49,26% des échantillons. Cette croissance se confirme en 2016 puisque 55,5% des prélèvements concernaient des dermatophytes. Le taux de levures isolées est en légère baisse en 2016 puisqu'elles représentent 15,5% des isolats contre 18% en 2015. Ce nombre était de 15,6% en 2014, 15,06% en 2013 et 10,6% en 2012.

En ce qui concerne les dermatophytes *T. rubrum* reste le pathogène prédominant. Le taux de *T. rubrum* isolé en 2016 continue son ascension depuis 2012 puisqu'il représente 69% des isolats contre 67% en 2015, 65,72% en 2014, 53,2 % en 2013 et 45,6% en 2012. Depuis 2012, l'augmentation de l'isolation de cette espèce parmi les prélèvements envoyés au CNR est de l'ordre de 23,4%. Par contre une diminution progressive du complexe *T. mentagrophytes* a été observée depuis 2012. En 2014, ils représentaient 18,86% des prélèvements (19,6% en 2013, 31,1% en 2012). En 2015, ils ne représentent plus que 15,94% des prélèvements. En 2016, ce complexe a été scindé selon la nouvelle classification de De Hoog et al, 2016 en *T. interdigitale* et *T. benhamiae*. Ces deux espèces représentent respectivement 11,5% et 3,87% des prélèvements. Pour comparaison aux années antérieures, ces deux espèces regroupées représentent 15,37% des prélèvements en 2016. La décroissance lente de ces deux espèces de l'ancien complexe *T. mentagrophytes* se confirme donc.

Le nombre de *M. audouinii* isolés en 2013 avait augmenté à la suite de l'étude épidémiologique lancée début 2013, concernant les teignes anthropophiles à *M. audouinii* et *T. violaceum*, ils représentaient 11,9% des prélèvements en 2013. Ce nombre était revu à la baisse en 2014 puisqu'ils représentaient seulement 3,35% des prélèvements. En 2015, ils représentaient 6,73% des prélèvements et ce

pourcentage est encore à la hausse en 2016 puisqu'ils représentent 8,5% des prélèvements. Les infections à *M. canis* suivaient un accroissement lent mais constant entre 2012 et 2014 (1,16% en 2012, 3,07% en 2013, 4,96% en 2014). En 2015, le taux d'infection à *M. canis* était plutôt stationnaire avec un taux de 4,85%. En 2016, on note une diminution de cette espèce puisque seulement 2,07% des prélèvements sont concernés par cette espèce de dermatophyte. L'année 2013 a vu l'émergence de nouvelles espèces isolées telles que *T. verrucosum*, *T. terrestre complex*, *T. schoenleinii* et *M. gypseum*. En 2015, on observait l'apparition de *T. megnini*, *M. praecox* et *M. racemosum*. En 2016, il n'y a pas eu d'isolement d'une espèce rare de dermatophytes mais *T. terrestre complex*, *T. megnini*, *T. verrucosum* et *M. gypseum* ont été isolés à nouveau. (Voir **figure 11** et **Tableau 1** pour les détails).

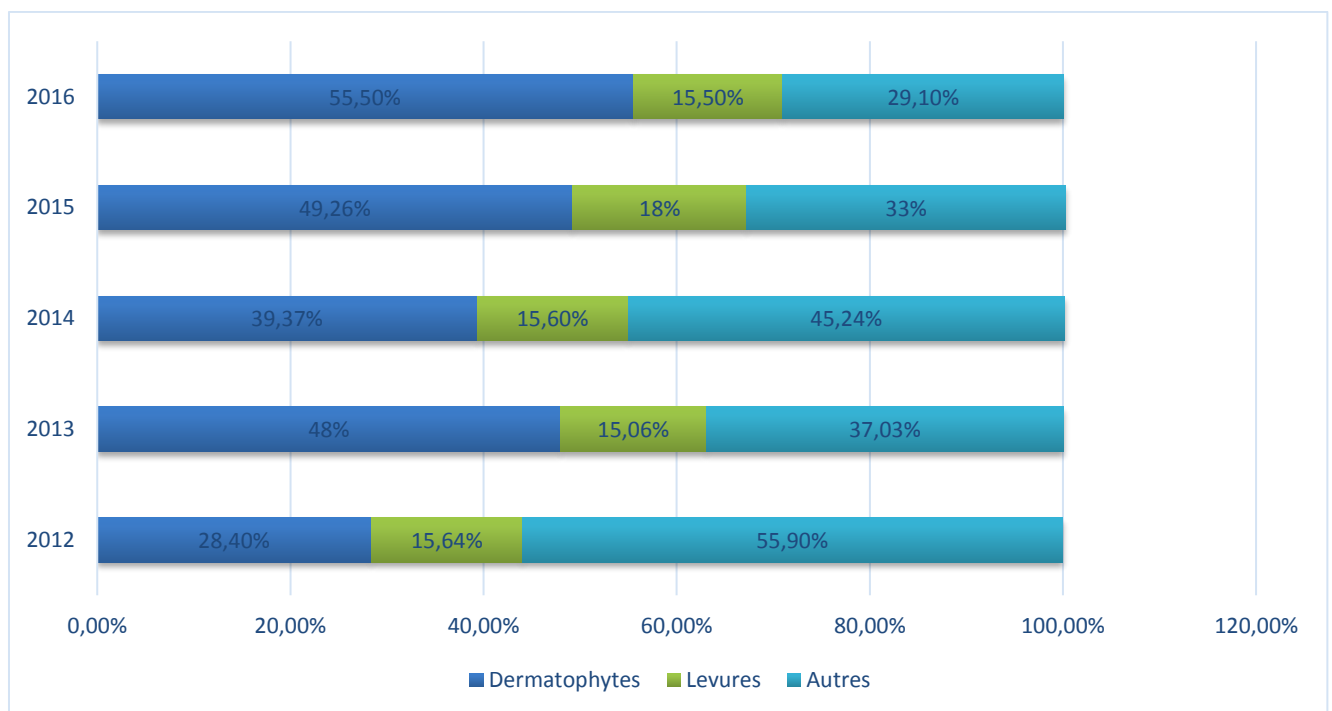


Figure 10 : Répartition des espèces les plus fréquemment identifiées reçus entre 2012 et 2016 aux CNR.

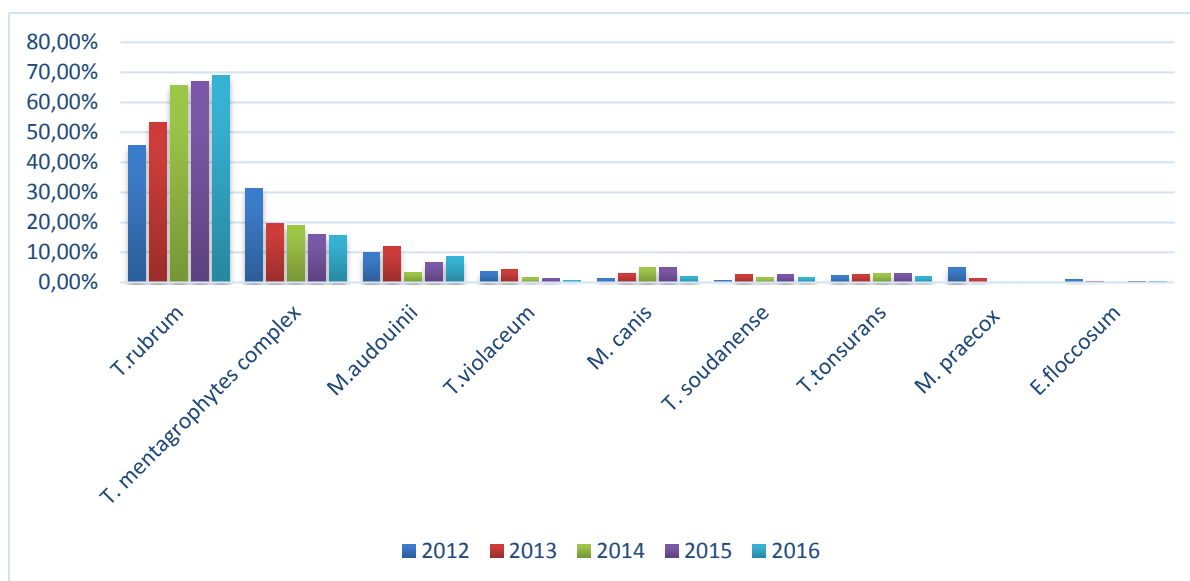


Figure 11 : Répartition des espèces de dermatophytes principalement isolées en 2012, 2013, 2014, 2015 et 2016 par les CNR.

Espèce	2012	2013	2014	2015	2016
<i>T.rubrum</i>	45,60%	53,20%	65,78%	67,11%	69%
<i>T. mentagrophytes complex</i>	31,15%	19,64%	18,86%	15,94%	15,50%
<i>M.audouinii</i>	9,94%	11,97%	3,35%	6,73%	8,50%
<i>T.violaceum</i>	3,56%	4,32%	1,48%	1,4%	0,80%
<i>M. canis</i>	1,16%	3,07%	4,9%	4,85%	2,07%
<i>T. soudanense</i>	0,64%	2,68%	1,55%	2,69%	1,78%
<i>T. tonsurans</i>	2,20%	2,61%	2,96%	2,96%	1,93%
<i>M. praecox</i>	4,90%	1,31%	0,07%	0,08%	0
<i>E.floccosum</i>	0,90%	0,39%	0,07%	0,23%	0,14%
<i>T. schoenleinii</i>	0	0,33%	0	0	0
<i>Trichophyton sp.</i>	0,25%	0,33%	0,07%	0	0,14%
<i>M. gypseum</i>	0	0,13%	0,21%	0	0,07%
<i>M. persicolor</i>	0,07%	0,06%	0,21%	0	0
<i>T. terrestre complex</i>	0	0,06%	0	0	0,07%
<i>T. verrucosum</i>	0	0,06%	0,14%	0,23%	0,14%
<i>M. ferrugineum</i>	0	0	0,14%	0	0
<i>M. racemosum</i>	0	0	0	0,08%	0
<i>T. megnini</i>	0	0	0	0,08%	0,14%

Tableau 1 : Comparaison des pourcentages des différentes espèces de dermatophytes observées en 2012, 2013, 2014, 2015 et 2016 par les CNR.

En ce qui concerne les prélèvements de cheveux, la proportion de *M. audouinii* isolés augmente fortement et dépasse largement le taux atteint en 2013 suite à l'étude nationale (il avait été demandé aux laboratoires participants d'envoyer toute souche de *M. audouinii* ou *T. violaceum* isolée au CNR). Le taux de *T. tonsurans* est en légère hausse par rapport à 2015 mais ne rejoint pas le taux atteint en 2014. Le taux de *T. soudanense* est quant à lui relativement stable alors que le taux de *T. violaceum* ainsi que le taux de *M. canis* et *T. mentagrophytes complex* est en baisse. (Voir **Figure 12**).

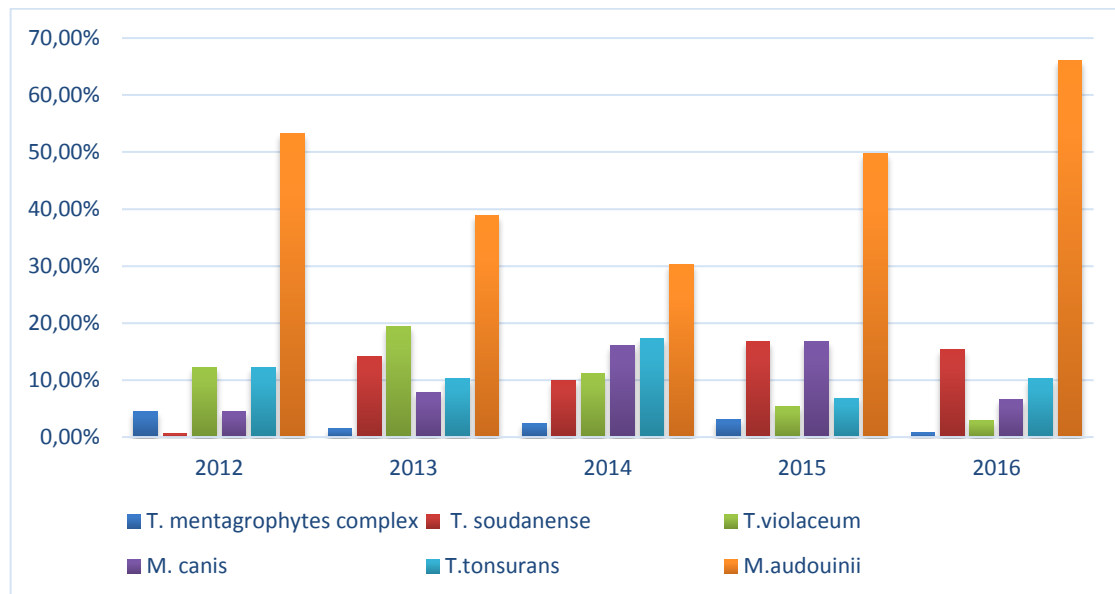


Figure 12 : Répartition des dermatophytes isolés de prélèvements de cheveux de 2012 à 2016

En ce qui concerne les prélèvements d'ongles, les infections à *T. rubrum* sont en constante augmentation toujours en 2016. Les infections à *T. mentagrophytes complex* connaissent une légère diminution par rapport à 2015 (Voir **Figure 13**).

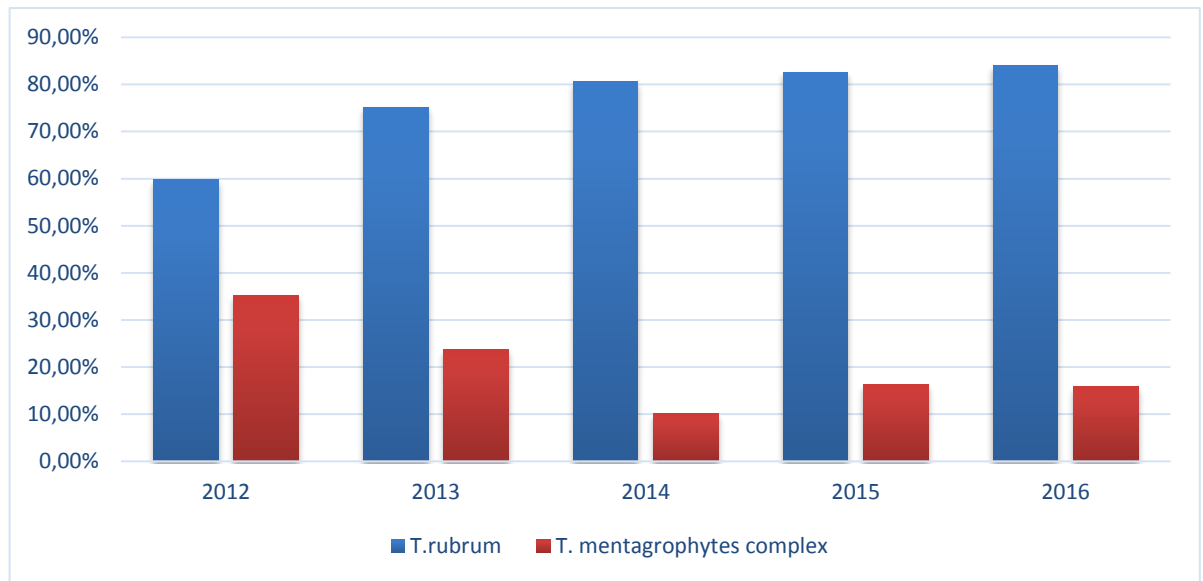


Figure 13 : Répartition des principaux dermatophytes isolés de prélèvements d'ongles de 2012 à 2016.

Pour les prélèvements de peau en 2016, les infections à *T. rubrum* sont en hausse (+2% par rapport à 2015) et *T. tonsurans* (+2,7% par rapport à 2015), alors que les taux d'isolements sont en baisse pour *T. mentagrophytes complex* (-1,8% par rapport à 2015), *M. audouinii* (-6,1%) et *M. canis* (-6,3% par rapport à 2015) (Voir **Figure 14**).

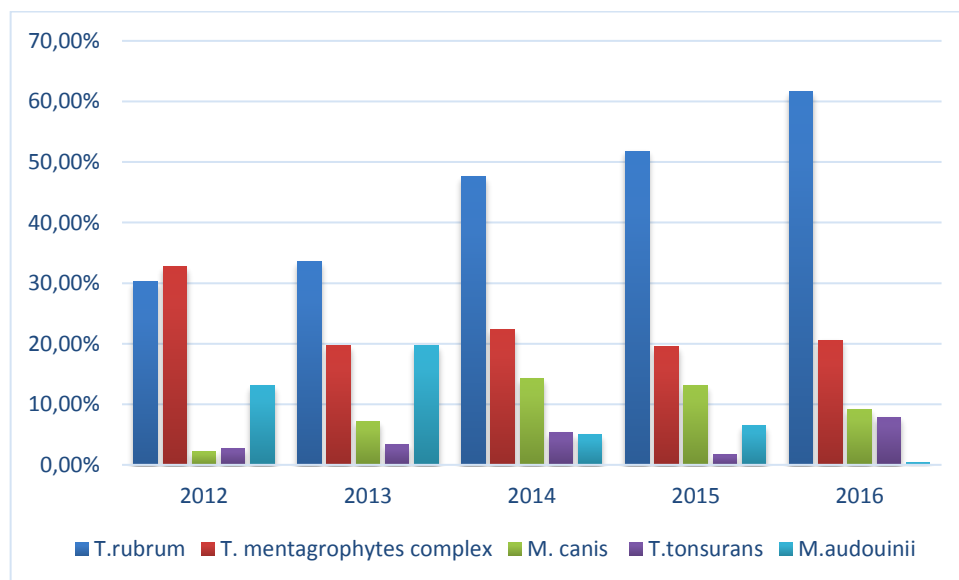


Figure 14 : Répartition des dermatophytes isolés de prélèvements de peau de 2012 à 2016

6. Enquêtes épidémiologiques

Durant l'année 2012, le CNR Mycoses a noté un nombre particulièrement élevé d'infections à *M. audouinii*. Les infections du cuir chevelu par *T. violaceum* étaient également élevées. C'est pourquoi le CNR mycose a entrepris une étude nationale pour le recueil des souches de *M. audouinii* et *T. violaceum* circulantes en 2013 et leur analyse génotypique, de façon à comprendre l'origine de cette croissance en Belgique. Cette étude avait pour finalité de déterminer s'il existait des différences génotypiques entre des souches d'une même espèce et si un lien pouvait être établi avec une éventuelle localisation géographique ou une origine ethnique particulière. Toutes les souches de *M. audouinii* et *T. violaceum* (n=139) reçues par le CNR dans le cadre de l'étude ont été analysées génotypiquement grâce au Diversilab® (bioMérieux). Les données épidémiologiques nécessaires à l'interprétation des résultats ont également été recueillies au cours de cette étude. Cependant, il nous a été très difficile d'obtenir ces données épidémiologiques et de nombreuses informations sont manquantes. Cette étude a fait l'objet d'un mémoire de Master 2 en Santé publique soutenu en juin 2014 par le Dr. Audace NKESHIMANA (5).

Sur le plan de l'analyse génotypique, une étude pilote a été effectuée sur une partie des souches de *M. audouinii* et *T. violaceum* 2012 et 2013 et les résultats ont été présentés au « 6th Trend in Medical Mycology » (TIMM) en octobre 2013 (6). Les résultats finaux de cette étude ont été présentés au 7th TIMM en octobre 2015 (7,8) ainsi qu'au « Sixth FEBS Advanced Lecture Course, Human Fungal Pathogens :Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and Virulence », Nice, France (9) et publiés dans « Clinical Microbiology and Infection » en janvier 2016 (4).

Le CNR Mycoses de Liège a également collaboré à l'étude nationale TANSIR, concernant les candidémies. Les résultats de cette étude sont publiés (10).

Fin 2015, le CNR a organisé une étude épidémiologique dans les institutions du CHU de Liège en vue de détecter la présence de dermatophytes dans les salles de kinésithérapie et revalidation. Cette étude a fait l'objet de deux mémoires, un en Santé publique par le Docteur Abdel-Sadick H. et un en Master en Sciences Pharmaceutiques de mademoiselle Tania Utri. Ces travaux ont été présentés en

2016 au cours du congrès de la Société française de mycologie médicale à Grenoble(11) et à l'ECCMID Amsterdam 2016 (12).

7. Travaux de recherche, collaborations et communications

Le CNR a participé à une étude visant le développement et la validation clinique d'un test PCR en temps réel pour la détection de plusieurs espèces de dermatophytes directement à partir d'échantillons d'ongles, de peau et de cheveux. Les résultats ont été présentés à l'ECCMID 2014 (13) et au TIMM en 2015 (14). Les résultats sont publiés (15). Le CNR a également validé la capacité de ce test à distinguer *T. violaceum* de *T. soudanense* (le séquençage ITS ne permet pas de séparer ces deux espèces).

En 2016, une étude comparant diverses méthodes pour l'identification de *T. benhamiae* a été initiée. La spectrométrie de masse Maldi Tof a été comparée à trois méthodes de biologie moléculaire ; le Diversilab permettant un typage génotypique de cette espèce, la PCR ITS/séquençage et la PCR en temps réel Dermagenius. Les résultats de cette étude feront l'objet d'un résumé soumis pour publication au « 8th Trend in Medical Mycology », (TIMM 2017).

Un autre projet initié en 2016 par le CNR, consiste en le développement d'une méthode permettant de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de divers antifongiques vis-à-vis des dermatophytes, comme la terbinafine, l'itraconazole et le fluconazole. Diverses approches ont été tentées. La première étant basée sur la méthode de microdilution en milieu liquide décrite dans la procédure CLSI-M38, la seconde approche était fondée sur une méthode de dilution en agar, calquée sur le principe du test commercialisé pour les *Aspergillus* « VIP-Check ». Les études ne sont pas concluantes pour le moment et seront poursuivies.

De même, le CNR a participé à une autre étude portant sur la mise au point d'un test de PCR pour la détection d'*Aspergillus* et des mutations génétiques sur le gène CYP51A conférant des résistances aux triazolés, ce qui a abouti à la publication d'un article (14).

Un doctorat en sciences biomédicales et pharmaceutiques et en collaboration avec le CNR Mycoses, a débuté en 2016 et a pour but de caractériser diverses métalloprotéases et subtilisines au sein de l'espèce *M. audouinii* et définir un éventuel rôle pathogène de ces protéases au sein de cette espèce. En effet, ces mêmes protéases ont déjà été démontrées être impliquées dans la pathogenèse d'autres espèces de dermatophytes comme *T. mentagrophytes* zoophile ou *M. canis*. A ce jour, la présence des métalloprotéases 1 à 5 a été démontrée par PCR au sein du génome de 100 souches de *M. audouinii*. Les résultats préliminaires de ce doctorat ont fait l'objet d'un résumé soumis pour publication au « 8th Trend in Medical Mycology », (TIMM 2017).

Par ailleurs des collaborations ont été établies avec le Centre d'ingénierie des protéines de Liège (CIP) portant sur l'activité antifongique de certaines espèces de *Streptomyces* (16).

Une revue concernant les nouvelles espèces de dermatophytes ou rarement identifiés, a été écrite et publiée sur invitation dans le journal Mycopathologia (17).

Une présentation orale a été réalisée sur sélection de résumés lors du Workshop dermatophytes organisé par l'ISHAM à Utrecht, traitant de la rep-PCR comme outil potentiel de typage pour les dermatophytes (18).

8. Conclusions

Les activités du CNR Mycoses ont permis de mettre en évidence que *T. rubrum*, reste dans nos régions le premier agent responsable de mycoses superficielles, tous prélèvements confondus, cet agent étant le plus souvent associé aux onychomycoses. Le complexe *T. mentagrophytes* est quant à lui fréquemment responsable de mycoses superficielles de la peau et de l'ongle. Depuis 2016, ce complexe est scindé en *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes* et *T. benhamiae* selon la nouvelle taxonomie proposée par de Hoog et al en 2016. Concernant les infections du cuir chevelu, *M. audouinii* reste le premier responsable de ce type d'infection, ce qui était également le cas en 2012, 2013, 2014 et 2015.

9. Références

1. Pagano L, Lumb J. Future microbial. 2011;6(9): 985-989. Update on fungal infections.
2. Burzykowski T, Molenberghs G, Abeck D, Haneke E, Hay R, Katsambas A, Roseeuw D, van de Kerkhof P, van Aelst R, Marynissen G: High prevalence of foot diseases in Europe: results of the Achilles Project. *Mycoses* 2003, 46(11-12):496-505.
3. Kelly BP. Superficial fungal infections. *Pediatr Rev*. 2012 Apr 33(4):e22-37.
4. Sacheli R, Adjetey C, Darfouf R, Harag S, Huynen P, Meex C, Descy J, Melin P, Arrese J, Hayette MP. A one-year survey of *Microsporum audouinii* infections in Belgium: epidemiological and genotypic characterization. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2016, 22(3):285 e289-217.
5. Nkeshimana A. Epidémiologie des teignes anthropophiles. Agents fongiques incriminés, facteurs de transmission, gestion en milieu scolaire. Mémoire de Master 2 en Santé publique (option épidémiologie et économie de la santé), Ulg, 2014 .
6. Sacheli R., Dimo L., Graide H., Meex C., Descy J., Huynen P. , Melin P. , André J., Arrese J., Hayette M.P. Poster communication TIMM 2013 "DNA fingerprinting using DiversiLab system for genotypic characterization of *Microsporum audouinii* and *Trichophyton violaceum* isolates in the Belgian population: preliminary study"
7. Sacheli R., Dekkers C., Géron B., Graide H., Darfouf R., Adjetey C., Meex C., Descy J., Huynen P. , Melin P. , André J., Arrese J., Hayette M.P. Poster communication TIMM 2015 Lisbon "Epidemiological aspects and genotypic characterization of *T.violaceum* strains collected during a Belgian National survey on anthropophilic tinea"
8. Sacheli R, Darfouf R, Graide H, Adjetey C, Pateet S, Lagrou K, Hayette M-P. Poster communication TIMM 2015 Lisbon "A 3-year survey of dermatophytosis in Belgium.
9. Sacheli, R., Dekkers, C., Darfouf, R., Adjetey Bahun, A., Graide, H., Meex, C., Descy, J., Huynen, P., Melin, P., Arrese Estrada, J., & Hayette, M.-P. (2015, May). *Epidemiological aspects and genotypic characterization of strains of Microsporum audouinii isolated in the context of a Belgian National survey on anthropophilic tinea*. Poster session presented at Sixth FEBS Advanced Lecture Course, Human Fungal Pathogens :Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and Virulence, Nice, France.
10. Trouvé C, Blot S, **Hayette MP**, Jonckheere S, Patteet S, Rodriguez-Villalobos H, Symoens F, Van Wijngaerden E, Lagrou K. Epidemiology and reporting of candidaemia in Belgium: a multi-centre study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016 Nov 17.
11. Sacheli, R., Utri, T., Abdel-Sadick, H. A., Alfageme Gonzalez, J., Adjetey Bahun, A., & Hayette, M.-P. (2016, March 23). *Etude de dermatophytes isolés dans les services de révalidation et physiothérapie d'une structure hospitalière en région Liégeoise (Belgique)*. Poster session presented at Congrès 2016 de la société française de mycologie médicale Grenoble.
12. Sacheli, R., Utri, T., Adjetey Bahun, A., Darfouf, R., & Hayette, M.-P. (2016, April 09). *Genotypic characterization of T. mentagrophytes complex strains circulating in Belgium with the Diversilab® system*. Poster session presented at 26th ECCMID, Amsterdam, Netherlands.
13. Dingemans G., van den Bosch M., Hayette M.P., Goethel S., Rusu V., Sacheli R., Meis J, Gajetaan G., Simons G. Development of a new commercial qPCR assay to detect and differentiate dermatophyte infections of the skin, nails and hair. ECCMID, Barcelone, Mai 2014.

14. Hayette MP, Hélène Graide, Caroline Adjetey, Jorge Arrese, Giel Gaajetaan, Dennis van Tegelen, Tim Kampermann, Guus Simons, Gijs Dingemans. Validation of the DermaGenius *plus* multiplex assay, a new commercial PCR assay developed for the detection and identification of dermatophytes and *Candida* in nails. TIMM, Lisbon, 2015.
15. Hayette MP^{1,2}, Seidel L³, Adjetey C¹, Darfouf R^{1,2}, Wéry M¹, Boreux R¹, Sacheli R^{1,2}, Melin P¹, Arrese J⁴. Clinical evaluation of the DermaGenius® Nail real-time PCR assay for the detection of dermatophytes and *Candida albicans* in nails. Med Mycol. 2018 May 11. doi: 10.1093/mmy/myy020. [Epub ahead of print]
16. Arias A., Lambert S., Martinet L., Adam D., Tenconi E., Hayette M.P., Ongena M., Rigali S. Growth of desferrioxamine-deficient *Streptomyces* mutants through siderophore piracy of airborne fungal contaminations. FEMS, 91, 2015, fiv080. doi: 10.1093/femsec/fiv080
17. Hayette, M.-P., & Sacheli, R. (2016, September). Unusual Species of Dermatophytes: Rarely Identified or New? *Mycopathologia*.
18. Sacheli, R., Adjetey Bahun, A., Darfouf, R., & Hayette, M.-P. (2016, October 29). *Application of rep-PCR as molecular typing method for dermatophytes*. Paper presented at ISHAM Workshop Dermatophytes, Utrecht, The Netherlands.