



**HAL**  
open science

# Impact de la consommation d'antifongiques sur *Candida* sp. : étude dans un service de réanimation médicale de 2004 à 2009 au CHU de Grenoble

Pierre Fournier

## ► To cite this version:

Pierre Fournier. Impact de la consommation d'antifongiques sur *Candida* sp. : étude dans un service de réanimation médicale de 2004 à 2009 au CHU de Grenoble. Sciences pharmaceutiques. 2011. dumas-00633500

**HAL Id: dumas-00633500**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00633500v1>**

Submitted on 18 Oct 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci – La Tronche

Année : 2011

N°

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE  
BIOLOGIE MEDICALE**

*Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de*

**THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
DIPLOME D'ETAT**

**Impact de la consommation d'antifongiques sur *Candida sp.*  
Etude dans un service de réanimation médicale de 2004 à 2009  
au CHU de Grenoble**

**Pierre FOURNIER**

Né le 21 juillet 1981 à Echirolles

**THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

**Le 23 septembre 2011**

**DEVANT LE JURY COMPOSE DE :**

- Dr Danièle MAUBON : Directeur de thèse
- Pr Muriel CORNET : Président de jury
- Pr Hervé PELLOUX
- Pr Jean-François TIMSIT
- Dr Luc FORONI

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.



UFR  
de PHARMACIE  
de GRENOBLE



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : M. Christophe **RIBUOT**  
Vice –Doyen et directeur des études : Mme Delphine **ALDEBERT**

Année 2010-2011  
Mise à jour : 07 avril 2011

### PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n=18)

<b>BAKRI</b>	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC IMAG)
<b>BOUMENDEL</b>	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M)
<b>BURMEISTER</b>	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
<b>CALOP</b>	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC, IMAG, PU PH)
<b>CORNET</b>	Muriel	Parasitologie-Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
<b>DANEL</b>	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU, PU-PH)
<b>DECOUT</b>	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M)
<b>DROUET</b>	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
<b>DROUET</b>	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I)
<b>FAURE</b>	Patrice	Biochimie (HP2, PU-PH)
<b>GODIN-RIBUOT</b>	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
<b>LENORMAND</b>	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
<b>MOSSUZ</b>	Pascal	Hématologie (PU-PH)
<b>PEYRIN</b>	Eric	Chimie analytique (D.P.M)
<b>SEVE</b>	Michel	Biochimie-Biotechnologie (IAB, PU-PH)
<b>RIBUOT</b>	Christophe	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
<b>ROUSSEL</b>	Anne –Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
<b>WOUESSIDJEW</b>	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M)

### ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

<b>BUSSER</b>	Benoît	Biochimie (IAB, AHU-Biochimie)
<b>MONNERET</b>	Denis	Biochimie (HP2, AHU-Biochimie)



UFR  
de PHARMACIE  
de GRENOBLE



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE  
Doyen de la Faculté : M. Christophe **RIBUOT**  
Vice –Doyen et directeur des études : Mme Delphine **ALDEBERT**  
Année 2010-2011

### MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n=34)

<b>ALDEBERT</b>	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
<b>ALLENET</b>	Benoît	Pharmacie clinique (ThEMAS TIMC-IMAG, MCU-PH)
<b>BATANDIER</b>	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
<b>BRETON</b>	Jean	Biologie Moléculaire, Biochimie (L.C.I.B-LAN)
<b>BRIANCON –MARJOLLET</b>	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
<b>BUDAYOVA SPANO</b>	Monika	Biophysique (I.B.S)
<b>CAVAILLES</b>	Pierre	Biologie Cellulaire et Génétique (L.A.P.M)
<b>CHOISNARD</b>	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
<b>DELETRAZ-DELPORTE</b>	Martine	Droit Pharmaceutique
<b>DEMEILLIERS</b>	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
<b>DURMORT-MEUNIER</b>	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
<b>GEZE</b>	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
<b>GERMI</b>	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I, MCU-PH)
<b>GILLY</b>	Catherine	Chimie thérapeutique (D.P.M)
<b>GROSSET</b>	Catherine	Chimie analytique (D.P.M)
<b>GUIEU</b>	Valérie	Chimie analytique (D.P.M)
<b>HININGER-FAVIER</b>	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
<b>JOYEUX –FAURE</b>	Marie	Physiologie Pharmacologie (HP2)
<b>KHALEF</b>	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC, IMAG)
<b>KRIVOBOK</b>	Serge	Biologie végétale et Botanique (L.C.B.M)
<b>MOUHAMADOU</b>	Bello	Cryptogamie, Mycologie Médicale (L.E.C.A)
<b>MORAND</b>	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
<b>MELO DE LIMA</b>	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
<b>NICOLLE</b>	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
<b>PERES</b>	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
<b>PEUCHMAUR</b>	Marine	Chimie Organique (D.P.M)
<b>PINEL</b>	Claudine	Parasitologie-Mycologie Médicale (GIN, MCU-PH)
<b>RACHIDI</b>	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
<b>RAVEL</b>	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
<b>RAVELET</b>	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
<b>SOUARD</b>	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
<b>TARBOURIECH</b>	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I)
<b>VANHAVERBEKE</b>	Cécile	Chimie Organique (D.P.M)
<b>VILLET</b>	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M)



UFR  
de PHARMACIE  
de GRENOBLE



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : M. Christophe **RIBUOT**  
Vice –Doyen et directeur des études : Mme Delphine **ALDEBERT**

Année 2010-2011

#### ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

<b>COLLE</b>	Pierre Emmanuel	Maitre de conférence
<b>FITE</b>	Andrée	Professeur Certifié
<b>GOUBIER</b>	Laurence	Professeur Certifié

#### ATER (n=5)

<b>DEFENDI</b>	Frédérica	ATER	Immunologie Médicale (GREPI-TIMC)
<b>GRATIA</b>	Séverine	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (LBFA)
<b>REGENT</b>	Myriam	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (IAB)
<b>ROSSI</b>	Caroline	ATER	Anglais Master ISM (JR)
<b>RUFFIN</b>	Emilie	ATER	Pharmacie Galénique (Therex/TIMC)
<b>SAPIN</b>	Emilie	ATER	Physiologie-Pharmacologie

#### MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=7)

<b>BOUCHET</b>	Audrey (01-10-2009 au 30-09-2012)	Biotechnologie (GIN, ESRF)
<b>DUCAROUGE</b>	Benjamin (01-10-2008 au 30-09-2011)	Laboratoire HP2 (JR)
<b>FAVIER</b>	Mathieu (01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)
<b>GRAS</b>	Emmanuelle (01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
<b>HAUDECOEUR</b>	Romain (01-10-2009 au 30-09-2011)	Chimie Thérapeutique (DPM)
<b>LESART</b>	Anne Cécile (01-10-2009 au 30-09-2013)	Informatique C2i
<b>POULAIN</b>	Laureline (01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)

#### PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=3)

<b>BELLET</b>	Béatrice	Pharmacie Clinique
<b>RIEU</b>	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché –CHU)
<b>TROUILLER</b>	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier-CHU)



UFR  
de PHARMACIE  
de GRENOBLE



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : M. Christophe **RIBUOT**  
Vice –Doyen et directeur des études : Mme Delphine **ALDEBERT**

Année 2010-2011  
Mise à jour : 07 avril 2011

**ATER** : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches  
**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire  
**CIB** : Centre d'Innovation en Biologie  
**DPM** : Département de Pharmacochimie Moléculaire  
**HP2** : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire  
**IAB** : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogénèse et Ontogénèse »  
**IBS** : Institut de Biologie Structurale  
**JR** : Jean Roget  
**LAPM** : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes  
**LBFA** : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée  
**LCBM** : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux  
**LCIB** : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie  
**LECA** : Laboratoire d'Ecologie Alpine  
**LR** : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
**PAST** : Professeur Associé à Temps Partiel  
**PRAG** : Professeur Agrégé  
**TIMC-IMAG** : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition  
**UVHCI**: Unit of Virus Host Cell Interactions

## REMERCIEMENTS

Cette thèse représente l'aboutissement de longues années d'études, et donc le début d'une nouvelle période de vie. Nombreuses sont les personnes qui ont compté pour moi et qui ont fait de moi ce que je suis maintenant. D'innombrables pages seraient nécessaires afin de tous les remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury :

**A Madame le Docteur Danièle Maubon**, pour avoir accepté de diriger ce travail de thèse. Tes compétences et ton savoir, associés à ton humour et à ta bonne humeur ont permis à nos nombreux travaux de se dérouler dans des conditions idéales.

**A Madame le Professeur Muriel Cornet**, pour m'avoir fait l'honneur de présider et de juger cette thèse. Je voudrais exprimer ma sincère reconnaissance pour votre soutien, notamment pour l'aide à la présentation orale des résultats de cette étude.

**A Monsieur le Professeur Jean-François Timsit**, pour votre vision de cette spécialité médicale, vos conseils, mais surtout pour la mise à disposition de moyens humains conséquents qui ont permis de mener à bien cette aventure.

**A Monsieur Aurélien Vésin**, pour avoir effectué ce travail titanesque de statistiques. Un grand merci pour ta disponibilité, tes compétences mais surtout ta réactivité à toute épreuve.

**A Monsieur le Professeur Hervé Pelloux**, pour m'avoir accueilli de nombreux semestres dans votre laboratoire de parasitologie-mycologie, dans une atmosphère de travail rigoureuse mais clairement détendue. Un grand merci pour avoir contribué à ma formation de biologiste.

**A Monsieur le Docteur Luc Foroni**, pour avoir accepté d'être un membre de mon jury et pour votre aide lors du recueil de données.

A Madame le Docteur Bernadette Lebeau, pour avoir été l'instigateur de ce projet.

A Sandra Meignen, pour ta sympathie et pour ta participation à cette thèse. Merci au laboratoire Gilead.

A mes parents, qui ont su croire en moi et me soutenir durant ces longues années d'études.  
Je vous dois tout. Vous rendre fiers aujourd'hui est ma plus grande satisfaction.

A ma famille, pour tous les bons moments passés à leurs côtés. Particulièrement aux  
grands-parents qui nous ont laissé il y a quelques temps ou plus récemment. Leur mémoire  
ainsi que leurs valeurs humaines resteront ancrés au fond de moi-même.

A mes innombrables et fidèles amis, toujours présents, qui m'ont suivi tout au long de  
mon parcours et qui ont su me soutenir, mais surtout me divertir !

Aux co-internes avec qui j'ai partagé de bons moments, et à tous les autres qui ont dû me  
supporter durant l'internat.

A tous les techniciens de laboratoires, qui égayent l'atmosphère d'un laboratoire. Ils se  
reconnaîtront...

A toutes les personnes que j'ai pu rencontrer de près ou de loin durant mon internat :  
médecins, internes, externes, infirmières, aides-soignantes....



**Impact de la consommation d'antifongiques sur *Candida sp*  
Etude dans un service de réanimation médicale de 2004 à 2009 au  
CHU de Grenoble**

## SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	9
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	10
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
INTRODUCTION.....	11
PREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	13
I. L'agent pathogène.....	14
1. Description.....	14
2. Les caractéristiques des principales espèces de <i>Candida</i> .....	15
II. Les candidémies et les candidoses.....	18
1. Les différentes infections cliniques.....	18
2. Physiopathologie.....	19
3. Facteurs de risques d'infection candidosique.....	20
4. Symptomatologie.....	21
5. Critères de diagnostic de l'EORTC.....	22
III. Diagnostic biologique.....	25
1. Examen direct.....	25
2. Culture.....	27
3. Techniques d'identifications.....	28
4. Sérologie et antigénémie.....	30
IV. Les antifongiques.....	32
1. Généralités.....	32
2. Détermination de la sensibilité aux antifongiques.....	38
3. Mécanismes de résistances.....	41
V. Les traitements et les référentiels.....	43
1. Les différents types de traitement.....	43
2. Les référentiels.....	44
VI. L'épidémiologie des <i>Candida sp.</i> et sensibilité aux antifongiques.....	45
1. Epidémiologie globale des candidémies et des candidoses invasives.....	45
2. Evolution de l'épidémiologie des infections à <i>Candida sp.</i> .....	46
3. Facteurs de modifications de l'épidémiologie mondiale et de la sensibilité aux antifongiques.....	47
4. Epidémiologie en service de réanimation.....	48
VII. Conclusion.....	49

DEUXIEME PARTIE : IMPACT DE L'UTILISATION DES ANTIFONGIQUES SUR LA DISTRIBUTION ET LA SENSIBILITE DE CANDIDA SP.....	51
Problématique .....	52
Article « Antifungal Use Influences <i>Candida</i> Species Distribution and Susceptibility in the Intensive Care Unit ».....	54
I. Résultats complémentaires.....	66
1. Population étudiée.....	66
2. Détermination de la consommation d'antifongiques.....	66
3. Données supplémentaires sur les espèces isolées .....	67
4. Distribution des espèces.....	67
5. Corrélations avec les consommations d'antifongiques.....	69
II. Discussion.....	70
1. Patients.....	70
2. La consommation des antifongiques .....	71
3. Epidémiologie et corrélation avec la consommation d'antifongiques.....	72
4. Sensibilité aux antifongiques et corrélation avec la consommation d'antifongiques..	73
CONCLUSION.....	76
BIBLIOGRAPHIE.....	78
ANNEXES.....	84

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### LISTE DES FIGURES

Fig 1 : Les différents constituants de la paroi fongique.....	14
Fig 2 : Physiopathologie des candidémies.....	20
Fig 3 : Lésions cutanées dues à la dissémination hématogène de <i>Candida</i> sp.....	22
Fig 4 : Candidose hépato-splénique, aspect radiologique (TDM).....	22
Fig 5 : Levures et pseudofilaments de levures observés à la coloration de Musto.....	26
Fig 6 : Levures et pseudofilaments de levures observés au bleu de méthylène.....	26
Fig 7 : Aspect macroscopique des colonies de <i>Candida</i> sp. sur milieu Sabouraud.....	27
Fig 8 : Réaction positive du test Glabrata RTT.....	29
Fig 9 : Réaction positive du test Bichro-latex albicans.....	29
Fig 10 : Kit Krusei color avec exemple d'une réaction positive.....	30
Fig 11: Galerie API-ID32C .....	30
Fig 12: Structure chimique de l'amphotéricine B.....	34
Fig 13 : Cascade métabolique de la synthèse de l'ergostérol à partir de l'acétylCoa, et lieu d'action des allylamines, des azolés et des morpholines.....	35
Fig 14 : Structure chimique de l'itraconazole, du fluconazole, du posaconazole et du voriconazole .....	36
Fig 15 : Structure chimique de la caspofungine.....	37
Fig 16 : Structure chimique de la flucytosine.....	37
Fig 17 : Cible des différents antifongiques.....	38
Fig 18 : Méthode E-Test. Détermination de la CMI à l'itraconazole pour <i>C. albicans</i> .....	40
Fig 19 : Cas décrits d'échecs de traitement par échinocandines.....	43
Fig 20 : Tendance temporelle des candidémies sur les séries entre 1980 et 2000.....	46

## LISTE DES TABLEAUX

Tab I : Facteurs de risque des candidémies à <i>Candida non albicans</i> .....	18
Tab II : Descriptif des infections causées par <i>Candida</i> sp.....	19
Tab III : Critères pour une infection fongique invasive prouvée, d’après les critères EORTC/MSG.....	23
Tab. IV : Critères d’hôtes d’infection fongique probable.....	23
Tab V : Critères de classification des infections fongiques.....	24
Tab VI : Critères microbiologiques d’infection fongique probable.....	24
Tab VII : Sensibilité, spécificité, avantages et inconvénients des principales techniques de diagnostic.....	32
Tab VIII : Sensibilité à l’amphotéricine B, au 5 fluoro-cytosine, aux azolés et aux échinocandines des principales espèces appartenant au genre <i>Candida</i> .....	33
Tab IX: Concentrations critiques (“breakpoints”) du fluconazole, de l’amphotéricine B, du voriconazole, de la caspofungine et de l’itraconazole (en mg/l) et interprétation des CMI pour les levures.....	40
Tab X : Nombre de patients et de prélèvements sur la période 2004 – 2009.....	66
Tab XI : Distribution des espèces fongiques isolées de 2004 à 2009.....	68
Tab XII : Coefficient de corrélation de Spearman (Rhô et p value entre la consommation de caspofungine, de fluconazole, d’amphotéricine B et de voriconazole et l’incidence de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , et <i>C. parapsilosis</i> ) .....	69

## LISTE DES ABREVIATIONS

AMB : Amphotéricine B
ABPA : Aspergillose Broncho-pulmonaire Allergique
CAS : Caspofungine
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
DDD: Defined Daily Dose
DDD/1000HD: Defined Daily Doses per 1000 Hospitalisation Days
ECIL: European Conference on Infections in Leukemia
EORTC: European Organization of Research and Treatment of Cancer
EUCAST: EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FCZ: Fluconazole
IDSA: Infectious Diseases Society of America
ITZ: Itraconazole
LAMB : Liposomal amphotéricine B
MGG : May Grunwald Giemsa
MSG: Mycoses Study Group
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards
RTT: Rapid Trehalose Test
SDD : Sensibilité Dose Dépendante
UFC : Unités Formant Colonies
VCZ: Voriconazole
WHO: World Health Organisation

# INTRODUCTION

En pathologie humaine, les levures du genre *Candida* sont les agents étiologiques les plus fréquents d'infections fongiques invasives (IFI). Agent commensal de la peau ou des muqueuses humaines, elles sont habituellement peu pathogènes chez l'individu sain, mais peuvent provoquer des infections fongiques gravissimes selon le terrain du patient, en association avec certains facteurs de risques.

Depuis le début des années 1980, on observe une augmentation de l'incidence de ces mycoses profondes, principalement chez les patients immunodéprimés et les patients en service de réanimation. *Candida albicans* est de loin l'espèce la plus fréquemment retrouvée, mais l'incidence des *Candida* non *albicans* comme *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* est croissante dans les prélèvements cliniques.

Les modifications récentes de l'épidémiologie sont multifactorielles : changement de profil des patients à risque, utilisation grandissante d'antibiotiques, etc. Le rôle des antifongiques sur ces modifications épidémiologiques n'est pas clairement établi, même si l'émergence de certaines espèces a déjà été corrélée à l'utilisation de certains antifongiques. Les molécules récentes comme les échinocandines ou les nouveaux triazolés enrichissent l'arsenal thérapeutique, mais leur impact sur les levures reste peu étudié.

Face à cette problématique, une collaboration entre le service de réanimation médicale adulte et le laboratoire de parasitologie-mycologie a été établie afin d'étudier l'épidémiologie fongique ainsi que les répercussions des modifications d'habitudes de prescriptions d'antifongiques.

À travers une étude rétrospective de 6 ans, de 2004 à 2009, nous avons observé la répartition et l'évolution des différentes espèces de *Candida*, la sensibilité aux antifongiques de 2007 à 2009 ainsi que la consommation des antifongiques sur la période entière. Secondairement, nous

avons recherché les corrélations éventuelles entre la consommation d'antifongiques et l'épidémiologie et les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).

Cette étude nous a permis de préciser les modifications en termes de répartition et de sensibilité des *Candida* sp. mais surtout d'évaluer l'impact de la consommation d'antifongiques sur ces deux variables au sein de notre Centre Hospitalo-Universitaire (CHU).

Dans une première partie, nous aborderons certaines généralités concernant notre problématique, afin de donner les éléments nécessaires à la compréhension de l'étude.

Les résultats de cette étude ont été acceptés le 26 août 2011 et seront donc publiés dans le *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Ils seront présentés sous forme d'article dans une seconde partie, la partie « matériels et méthodes » sera uniquement consultable en l'état.

Dans une dernière partie les principaux résultats seront rappelés et discutés. Une conclusion générale achèvera ce travail de thèse.

# Première Partie

## Rappels Bibliographiques

## I. L'agent pathogène

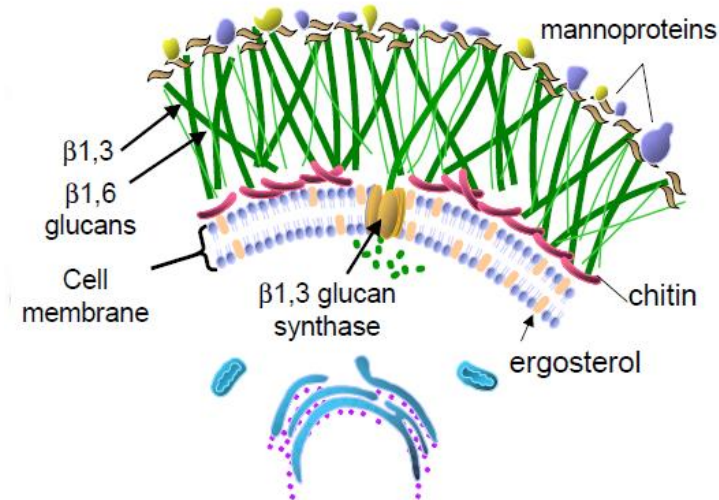
### 1. Description

Les champignons microscopiques appartiennent au règne fongique et forment un groupe de plus de 1 200 000 espèces connues dont une centaine d'espèces sont responsables de pathologies humaines.

Les levures sont des organismes eucaryotes unicellulaires sans chlorophylle, pigment assimilateur retrouvé chez les plantes. Elles sont médicalement représentées par les genres *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Saccharomyces*, *Geotrichum* et *Trichosporon*.

D'un point de vue cellulaire, elles possèdent un noyau entouré d'une membrane nucléaire, un réticulum endoplasmique et des mitochondries.

La membrane fongique est riche en lipides dont l'ergostérol, et la paroi est composée de protéines, de phospholipide, de chitine, et de sucres dont les principaux sont les mannanes et les glucanes. (Fig.1)



**Fig 1 : Les différents constituants de la paroi fongique**  
(Source: Diamond R., *Atlas of fungal Infections*, Ed.1999)

Ces levures sont hétérotrophes, c'est-à-dire qu'elles nécessitent une source de carbone provenant de matières organiques en décomposition ou du parasitisme pour se développer et survivre. La nutrition des levures par absorption est assurée par un réseau de filaments (thalle ou mycélium). La morphologie de ce thalle reproducteur est à l'origine de la classification des champignons microscopiques. En effet, la formation de spores sexuées

caractérise le genre des champignons parfaits (zygomycètes, basidiomycètes, ascomycètes et chytridiomycètes) tandis que les champignons imparfaits (deutéromycètes) sont définis par la formation de spores asexuées.

Chez les levures, le thalle est constitué d'éléments unicellulaires appelés blastopores, de 4 à 10µm, qui se reproduisent par bourgeonnement et crée des pseudofilaments.

Concernant le genre *Candida* : Les levures du genre *Candida* apparaissent macroscopiquement sous forme de colonies blanches à crémeuses de 1 à 3 mm. Suivant l'espèce en question, leur texture peut être pâteuse, lisse, brillante, sèche, ridée ou terne.

Les caractères microscopiques diffèrent grandement selon l'espèce. Toutes produisent des blastoconidies, rondes ou allongées, et la plupart des pseudo-hyphes qui peuvent être longs, incurvés ou ramifiés. Certaines espèces présentent des formes de résistances appelées chlamydospores.

## **2. Les caractéristiques des principales espèces de *Candida***

Le genre *Candida* est ubiquitaire : on le retrouve comme agent commensal de la peau, du tractus digestif et urinaire. Il comporte plus de 200 espèces, seules 10% sont connues pour être responsables d'infections chez l'Homme.<sup>1</sup> Il regroupe des levures non pigmentées, non capsulées, à bourgeonnement multilatéral, productrices ou non de filaments.

*Candida albicans* est de loin la plus fréquente, et les autres espèces les plus représentées sont regroupées sous les termes de *Candida non-albicans* : *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* et *C. krusei*.

### *Candida albicans*

C'est l'espèce la plus fréquemment incriminée dans les infections et les colonisations à *Candida sp.*<sup>2, 3</sup> Elle est commensale du tube digestif et des muqueuses humaines. Sa présence sur la peau est systématiquement pathogène. Cette espèce est responsable d'atteintes cutanéomuqueuses, d'infections profondes (pyélonéphrite, péritonite) et d'infections hématogènes (candidémie, candidose hépatosplénique et méningite)

La neutropénie et la pré-exposition au fluconazole apparaissent comme des facteurs de risques de candidémies à *C. non albicans* plutôt que *C. albicans*. Concernant les cancers,



les patients présentant des tumeurs solides sont plus à risque que ceux souffrant de pathologies onco-hématologiques dans la survenue de candidémie à cette espèce prédominante.<sup>4</sup>

### *Candida glabrata*

En deuxième position en Europe et aux Etats-Unis en terme de fréquence après *C. albicans*, on retrouve cette espèce au niveau du tube digestif et des muqueuses humaines. Elle est responsable de candidémies, d'infections du tractus urinaire et de candidoses profondes.

L'âge avancé, la transplantation d'organes solides ainsi que la prophylaxie par fluconazole sont des facteurs de prédisposition pour les candidémies à *C. glabrata*.<sup>5, 6</sup> Elles sont d'ailleurs très rares chez les enfants.

Sa principale caractéristique est d'être de « sensibilité dose-dépendante » au fluconazole, lui conférant donc une résistance relative à cet antifongique. D'un point de vue biologique, on note une absence de filamentation pour cette espèce.

### *Candida parapsilosis*

*C. parapsilosis* est préférentiellement retrouvé sur la peau. Il est responsable d'infections cutanées, mais aussi d'infections profondes qui peuvent être d'origine endogène ou exogène. Le portage manuel du personnel soignant est fréquent, la transmission horizontale est donc aisée et certaines épidémies en milieu hospitalier ont déjà été décrites.<sup>6-8</sup>

Cette espèce est connue pour son habilité à former des biofilms sur les dispositifs implantables. De plus, elle peut se développer dans les poches de solutés contenant du glucose. De par ces caractères, *C. parapsilosis* cause des infections principalement d'origine iatrogène, en particulier chez les prématurés, les nouveau-nés et les enfants.<sup>9</sup>

D'autres facteurs intrinsèques ou extrinsèques sont impliqués dans le développement d'infections à cet agent pathogène, notamment la chirurgie récente.<sup>5</sup>

De plus, cette espèce est souvent moins sensible aux échinocandines, de par l'existence d'un polymorphisme sur le gène *FKSI*, codant pour une des deux sous-unités de la  $\beta$  (1-3) glucane synthase, cible de cette classe antifongique.<sup>10</sup>

Néanmoins, parmi toutes les espèces de *Candida*, les candidémies à *C. parapsilosis* affichent le taux de mortalité le plus faible, de l'ordre de 30%.<sup>11</sup>

*C. parapsilosis* appartient au complexe *C. parapsilosis*, qui contient 3 espèces différentes, avec en terme de fréquence : *C. parapsilosis* (91,3%) ; *C. orthopsilosis* (6,1%) et *C. metapsilosis* (1,8%). Ces espèces ont pu être définies sur la base d'études moléculaires<sup>12, 13</sup> ou par des techniques de migration électrophorétique capillaire.<sup>14</sup>

Des différences de sensibilités aux antifongiques existent parmi ces nouvelles espèces : d'après l'étude de Lockhart en 2008,<sup>13</sup> les souches de *C. orthopsilosis* et de *C. metapsilosis* étaient toutes sensibles au fluconazole et aux échinocandines. A l'intérieur de ce complexe, c'est *C. parapsilosis stricto sensu* qui présente les CMI aux échinocandines (caspofungine et anidulafungine) les plus élevées. *C. metapsilosis* a quant à lui la sensibilité la plus faible au fluconazole.<sup>7</sup>

### *Candida tropicalis*

La neutropénie étant un facteur prédisposant de candidémie à *C. tropicalis*, on retrouve cette levure principalement chez les populations de patients ayant des tumeurs solides, des pathologies onco-hématologiques ou chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques.<sup>6</sup> De plus, *C. tropicalis* présente une virulence importante.<sup>4</sup>

Cette espèce est très sensible au fluconazole et l'utilisation prophylactique du fluconazole entraîne une diminution des candidémies à *C. tropicalis*, de 23% en 1988-1992 à 9,6% en 1993-2003, depuis la démocratisation du fluconazole en prophylaxie.<sup>5</sup>

### *Candida krusei*

Les candidémies à *C. krusei* sont redoutables, avec une mortalité très élevée (mortalité brute de 80% et mortalité attribuable de 40%).<sup>15</sup>

Les facteurs prédisposants sont : l'utilisation prophylactique par fluconazole, la neutropénie, les pathologies onco-hématologiques et la greffe de cellules souches hématopoïétiques.<sup>6</sup> La caractérisation de cette espèce est très importante car *C. krusei* est naturellement résistant au fluconazole, mais peut montrer des résistances à d'autres antifongiques tels que l'amphotéricine B.<sup>16</sup>

Les différentes caractéristiques des espèces non-*albicans* prédisposent certains terrains à développer des candidémies. Le tableau 1 résume les différents facteurs de risques prédisposant à des candidémies à *Candida non albicans*.

Espèce	Facteurs de risques de candidémies
<i>C. glabrata</i>	Age avancé Transplantation d'organes solides Prophylaxie par fluconazole
<i>C. parapsilosis</i>	Nouveau-nés et prématurés Présence de dispositifs implantables Poche de solutés Chirurgie récente
<i>C. tropicalis</i>	Neutropénie Pathologies onco-hématologiques Greffe de cellules souches hématopoïétiques
<i>C. krusei</i>	Préexposition au fluconazole Neutropénie Pathologies onco-hématologiques Greffe de cellules souches hématopoïétiques

**Tab I : Facteurs de risques des candidémies à *Candida non albicans***  
(Source : Pfaller. Crit Rev Microbiol, 2010)

## **II. Les candidémies et les candidoses**

### **1. Les différentes infections cliniques**

Le spectre des infections causées par les espèces du genre *Candida* est large et peut se diviser en 2 catégories : les pathologies superficielles (cutanéomuqueuses) ou les pathologies systémiques (candidémies et candidoses invasives). Ne seront traités dans ce travail de thèse que les pathologies systémiques.

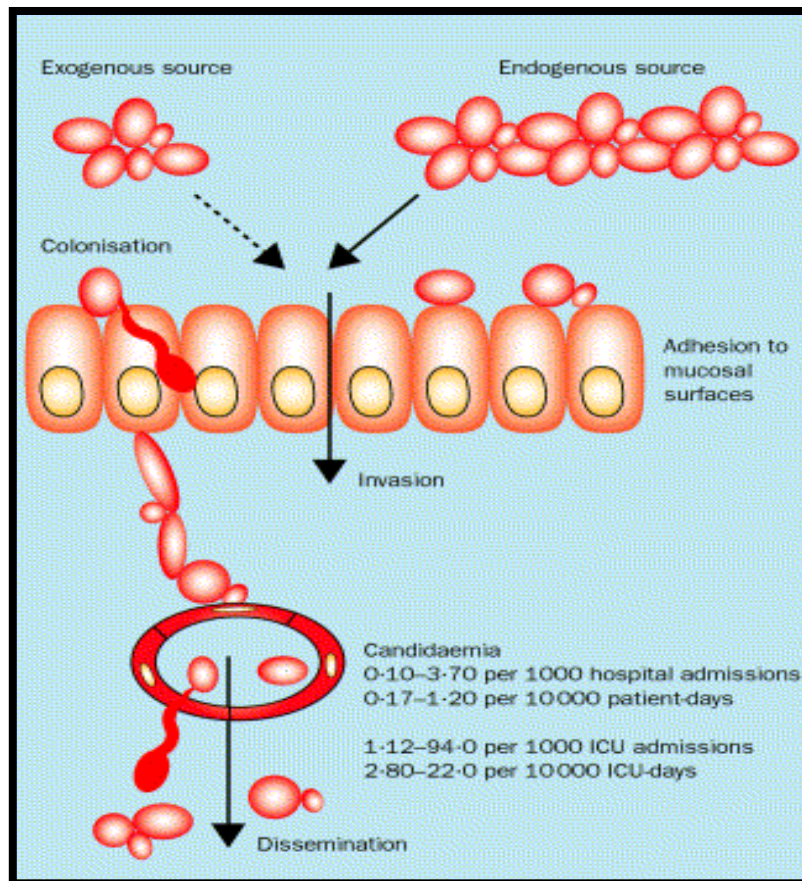
Le tableau II résume les infections profondes et superficielles causées par *Candida* sp.

Infections profondes		Infections superficielles
Candidémie	Endophtalmie	Candidose cutanée
Infection sur dispositif implantable	Ostéomyélite	Candidose oropharyngée
Thrombophlébite suppurée	Spondylodiscite	Candidose oesophagienne
Arthrite	Méningite	Vaginite
Candidose pulmonaire/hépatosplénique	Cystite/pyélonéphrite	
Trachéite/bronchite		

**Tab. II. Descriptif des infections causées par *Candida* sp.**  
(Source: Eggimann, Lancet. 2003)

## 2. Physiopathologie

Les levures appartiennent à la flore normale endogène des muqueuses du tractus gastro-intestinal et génital, en portage transitoire ou permanent chez 40 à 50% des Hommes. <sup>1</sup> Ce portage devient colonisation si certains facteurs de risques sont présents (principalement antibiothérapie et immunodépression). L'origine des candidémies ou des candidoses invasives peut être exogène (transmission à partir du milieu extérieur, principalement par une effraction cutanée) ou endogène (à partir d'un foyer profond principalement digestif, puis dissémination hématogène) (fig.2). Dans l'immense majorité des cas, la souche colonisante devient la souche infectante.



**Figure 2 : Physiopathologie des candidémies**  
 (Source: Eggimann. Lancet. 2003)

### 3. Facteurs de risques d'infection candidosique

Il existe de nombreux facteurs de risques pour le développement des candidoses et des candidémies. Ils sont regroupés en 2 catégories : intrinsèques et extrinsèques.<sup>1,17</sup>

#### Intrinsèques :

- Colonisation : c'est le facteur de risque principal.<sup>18</sup> L'antibiothérapie large spectre est un facteur favorisant cette colonisation.<sup>19</sup> Certains auteurs ont mis en place des scores clinique de colonisation,<sup>20-22</sup> prédictifs d'atteinte candidosique invasive. Le principal et le plus historique est l'index de colonisation de Pittet.<sup>18</sup> Ces différents scores de colonisation sont intéressants de par leur bonne valeur prédictive négative.<sup>23</sup>
- Neutropénie/immunodépression
- Hémopathie maligne/cancer
- Insuffisance rénale
- Age extrême
- Faible poids à la naissance

#### Extrinsèques :

- Chirurgie (digestive principalement)
- Iatrogènes : antibiotiques, prophylaxie par antifongiques, corticostéroïdes, chimiothérapie
- Epuration extra-rénale
- Dispositifs implantables ou matériels
- Ventilation mécanique
- Nutrition parentérale
- Durée d'hospitalisation <sup>24</sup>

La majorité des patients de réanimation présentent ces facteurs de risque et sont donc à risque d'infection fongique invasive.

#### **4. Symptomatologie**

Chez les patients aux lourds antécédents médicaux et/ou chirurgicaux, et présentant des facteurs de risques, toute fièvre résistante à une antibiothérapie large spectre de plus de 48h avec frissons et obnubilations, associée à une splénomégalie et des pétéchies, doit faire orienter vers l'origine fongique du sepsis. Après dissémination sanguine, les signes cliniques sont variés : lésions cutanées, lésions oculaires à type de chorio-rétinites, foyers hépatospléniques principalement, mais pouvant toucher d'autres organes profonds. Cependant, pour une majorité de patients, notamment les immunodéprimés, ces signes cliniques sont rarement tous présents. Le diagnostic de candidémie repose donc sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques.

La figure 3 montre les lésions cutanées retrouvées lors de la dissémination sanguine de *Candida* sp. et la figure 4 montre l'aspect radiologique d'une candidose hépato-splénique.



probables ou possibles. Ces définitions ont été révisées en 2008. Les 3 catégories sont les suivantes : critères d'hôtes, critères cliniques et critères biologiques. <sup>25</sup>

Néanmoins, ces critères ont été établis pour une population immunodéprimée (cancer ou greffe de cellules souches hématopoïétiques), et pas uniquement pour des patients de réanimation. Les critères d'infections décrits ci-dessous permettent de classer les IFI en général et ne se limitent donc pas aux infections à *Candida* sp.

- Une infection fongique invasive prouvée à levures et champignons filamenteux se définit par au minimum 1 critère exposé dans le tableau III

- Une infection fongique invasive probable se définit par au moins 1 critère d'hôte et 1 critère microbiologique, et 1 critère clinique majeur (ou 2 critères mineurs) pour le site anormal suggérant une infection. Le tableau IV résume ces critères d'hôtes.

- Une infection fongique possible se définit par la présence d'au moins 1 critère d'hôte et 1 signe clinique d'IFI, mais en absence de critères microbiologiques.

	<b>Champignons filamenteux</b>	<b>Levures</b>
Analyse du prélèvement	Examen direct, ou histologique ou cytologique mettant en évidence des pseudofilaments prélevés par cytoponction ou prélèvement biopsique mettant en évidence des lésions tissulaires associées	Examen direct, ou histologique ou cytologique mettant en évidence des levures ou des pseudofilaments prélevés par cytoponction ou prélèvement biopsique mettant en évidence des lésions tissulaires associées
Culture	- Résultat de culture positif pour un échantillon prélevé selon une procédure stérile sur un site normalement stérile et cliniquement ou radiologiquement anormal suggérant une infection (sauf prélèvements des urines, des sinus et LBA)  -Hémoculture positive à champignon filamenteux (sauf <i>Aspergillus</i> sp.)	- Résultat de culture positif pour un échantillon prélevé selon une procédure stérile sur un site normalement stérile et cliniquement ou radiologiquement anormal suggérant une infection  -Hémoculture positive à levure
Antigénémie du LCR	Non applicable	Antigène cryptocoque positif

**Tab.III : Critères pour une infection fongique invasive prouvée, d'après les critères EORTC/MSG.**



<b>Critères d'hôtes</b>
Episode récent de neutropénie (< 500 neutrophiles/mm <sup>3</sup> pendant > 10 jours)
Greffe de cellules souches hématopoïétiques
Usage prolongé de corticoïdes (Hors patients présentant une ABPA) à une dose moyenne de 0.3 mg/kg/j de prednisone à une durée supérieure à 3 semaines.
Traitement immunosuppresseur (ciclosporine, inhibiteurs du TNF $\alpha$ , anticorps monoclonaux ou analogues nucléosidiques)
Immunodépression sévère innée (Granulomatose septique par exemple)

**Tab. IV : Critères d'hôtes d'infections fongiques probables**

<b>Critères cliniques</b>
<p>Infections respiratoires basses</p> <p>Présence d'au moins 1 des 3 signes suivants au TDM</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lésions circonscrite avec ou sans signe du halo</li> <li>- Signe du croissant gazeux</li> <li>- Cavité au sein d'une condensation alvéolaire</li> </ul>
<p>Infections naso-sinusiennes</p> <p>Signes radiologiques évocateurs d'une infection sinusienne associés à au moins 1 des 3 signes suivants.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Douleur aigue localisée</li> <li>- Ulcération nasale ou escarre de la muqueuse nasale</li> <li>- Extension de la sinusite vers la barrière osseuse.</li> </ul>
<p>Trachéobronchite</p> <p>Lésions trachéobronchiques à la bronchoscopie</p>
<p>Système nerveux central</p> <p>Au moins 1 des 2 signes suivants à l'imagerie</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lésions focales</li> <li>- Syndrome d'engagement</li> </ul>
<p>Infection candidosique disséminée</p> <p>Au moins 1 des 2 entités survenant au maximum 2 semaines avant l'épisode candidémique</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Abscès hépatiques ou spléniques visibles sur le TDM ou l'IRM</li> <li>- Exsudats rétinien</li> </ul>

**Tab.V : Critères de classification des infections fongiques**

<b>Critères microbiologiques</b>
Diagnostic direct (examen direct, culture ou cytologie) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Présence d'éléments fongiques dans une expectoration, une BA, un LBA, un prélèvement de sinus et dans un liquide normalement stérile</li> <li>- Culture positive</li> </ul>
Diagnostic indirect (détection d'antigènes ou de constituants de la paroi fongique) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Antigène galactomannane positif dans le plasma, le sérum, le LBA ou le LCR (en cas d'aspergillose)</li> <li>- Détection de <math>\beta</math> (1-3) glucane dans le sérum (IFI autre que cryptococcose et zygomycose)</li> </ul>

**Tab.VI. Critères microbiologiques d'infections fongiques probables d'après les critères EORTC/MSG.**  
 (Source : De Pauw et al, *Clin Infect Dis*, 2008)

NB : la détection de l'ADN fongique ne fait pas partie des critères actuels.

### **III. Diagnostic biologique**

Le diagnostic biologique des infections candidosiques est difficile et manque souvent de sensibilité. La stratégie diagnostique s'appuie d'une part sur la recherche directe d'éléments fongiques (examen direct, culture, antigénémie et PCR) et d'autre part sur la recherche indirecte (recherche d'anticorps).

Néanmoins, la faible sensibilité des hémocultures, la faible spécificité de la sérologie, et la manque de standardisation de la Polymerase Chain Reaction (PCR) représentent de nombreuses contraintes qui font toute la complexité de ce diagnostic biologique.

De plus, la distinction entre colonisation et infection est difficile sur le plan purement biologique. Le caractère commensal de ces levures rend la confrontation aux symptômes cliniques nécessaire.

#### **1. Examen direct**

L'examen direct est le test de première ligne. Il permet une orientation diagnostique rapide de genre. Il est peu couteux, spécifique mais reste peu sensible. Il donne donc une appréciation rapide du prélèvement, d'un point de vue qualitatif (présence ou non d'éléments levuriformes, de pseudofilaments mycéliens), mais surtout quantitatif, argument décisif d'interprétation biologique.

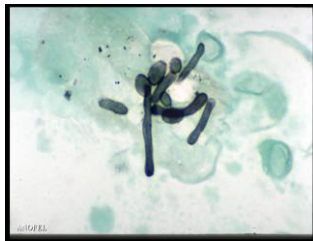
Les levures apparaissent sous forme d'éléments ovalaires ou arrondies, de 6 à 8 $\mu$ m, éventuellement bourgeonnantes.

En pratique, différentes techniques et colorations spécifiques peuvent être mise en œuvre, rendant alors l'observation plus aisée. Le lame/lamelle est utilisé pour les biopsies œsophagiennes, gastriques, coliques et rectales ainsi que pour les prélèvements de la sphère génitale et urinaire.

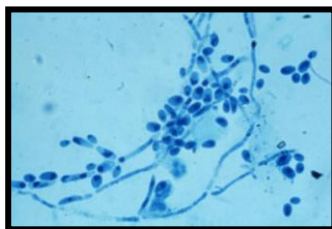
Les colorations non-spécifiques sont les suivantes :

- Le noir chlorazole qui colore la paroi des éléments mycéliens en vert,
- Le bleu de méthylène : colorant les éléments mycéliens en bleu.
- Le May-Grunwald-Giemsa (MGG) : coloration principalement utilisée en hématologie
- La coloration de Gram : coloration utilisé en bactériologie, les éléments mycéliens prennent une coloration bleu foncé.
- Il existe aussi des colorations fluorescentes, non détaillées ici.

La coloration de Musto (coloration de Gomori-Grocott modifiée) est une coloration spécifique, elle permet l'imprégnation argentique de chitine (composant de la paroi fongique). Ceux-ci sont ensuite identifiés par une coloration gris noir sur un fond vert clair.



**Fig 5 : Levures et pseudo-filaments de levures observés à la coloration de Musto.**  
(Source: Anofel. Ed Masson.)



**Fig 6: Levures et pseudo-filaments de levures observés au bleu de méthylène.**  
(Source : Anofel. Ed Masson.)

NB : Les colorations d'anatomopathologie utilisées pour les biopsies ne seront pas détaillées ici.

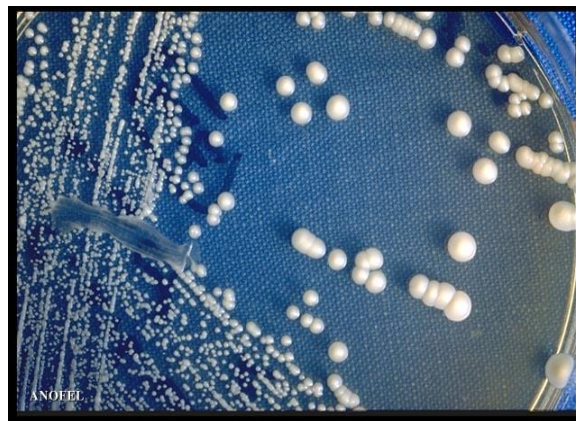
## 2. Culture

La croissance peut se faire sur différents milieux de culture, commerciaux ou non, avec comme milieu de référence le milieu de Sabouraud (Cf annexe 1). Les levures poussent en 24 à 48h, formant des colonies blanc-crème, lisses et crémeuses.

Certains milieux commerciaux sont dits « chromogènes », car les colonies peuvent présenter une coloration particulière suivant une espèce donnée (Cf annexe 1). L'identification de l'espèce est donc rapide et permet donc de s'abstenir des galeries d'assimilation biochimique. La figure 7 montre l'aspect des colonies de *Candida* sp. sur le milieu de Sabouraud.

Considérée comme le « gold standard », la culture a pour avantage un ensemencement possible de tous les types de localisation de prélèvements. Sa sensibilité est néanmoins faible (50%) contre une spécificité exemplaire de 100%,<sup>26</sup> avec comme principal point faible une durée d'incubation longue.

C'est néanmoins le seul examen biologique qui permet à l'heure actuelle une détermination ultérieure de la sensibilité aux antifongiques.



**Fig 7. Aspect macrosopique des colonies de *Candida* sp. sur milieu Sabouraud**  
(Source : Anofel. Ed Masson.)

### Hémoculture fongique

C'est l'examen de choix pour le diagnostic de candidémie.

Contrairement à certains champignons filamenteux dont l'isolement est très rare, les levures poussent aisément sur les milieux IC/F (Becton Dickinson®, Sparks, MD, USA). Ce milieu contient des antibiotiques (chloramphénicol et tobramycine), des facteurs de croissance ainsi que des cytolytiques, le rendant sélectif et particulièrement adapté à la croissance des champignons. Néanmoins les flacons d'hémocultures utilisés en bactériologie détectent eux aussi la pousse fongique. Pour une utilisation optimale, un volume de remplissage correct de 8 à 10 ml doit être respecté. Cependant, uniquement 50% des candidémies entraînent une positivité des hémocultures, mais 1 seule hémoculture positive suffit au diagnostic de candidémie.

Le protocole de prélèvement d'hémocultures est mal défini, et doit se faire en fonction du terrain du patient mais surtout de la clinique.

### **3. Techniques d'identifications**

Dès l'apparition des Unités Formant Colonies (UFC) sur le milieu de culture, l'identification au rang d'espèce peut se faire par des techniques d'agglutinations, par la mise en évidence de ses caractères biochimiques (de loin la technique la plus utilisée) ou par PCR.

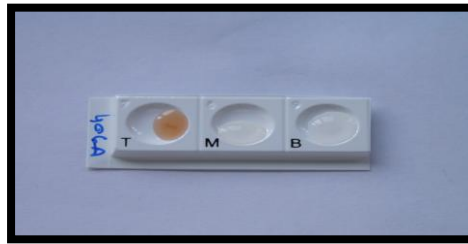
Les recherches directes par PCR ne sont pas encore assez fiables et standardisées. Ces techniques ne seront pas détaillées ici.

Il existe plusieurs tests rapides d'agglutinations, concernant les espèces les plus fréquemment isolées.

- Glabrata RTT (Fumouze diagnostics ®) : Le « Rapid Trehalose Test » (RTT) est un test d'identification rapide (20 min) de *C. glabrata*. Il repose sur la détection de la tréhalase, enzyme hydrolysant le tréhalose en glucose. Après incubation de la colonie à tester dans une cupule contenant du tréhalose, on révèle par une solution contenant un mélange de glucose oxydase, de peroxydase et de substrat chromogène. En présence de glucose, le chromogène alors oxydé devient brun-orangé.

Néanmoins d'autres espèces de *Candida* possèdent une tréhalase mais hydrolysent également le maltose, contrairement à *C. glabrata*, d'où la nécessité d'un témoin maltose.

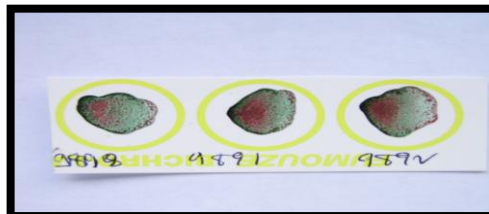
D'après le fabricant, la sensibilité du test RTT est de 93,8 à 97,9% et sa spécificité de 97,6 à 98,8% selon le milieu d'isolement utilisé.



**Fig.8 : Réaction positive du test Glabrata RTT**  
(Source : O. Faure, laboratoire de parasitologie-mycologie. CHU de Grenoble)

- Bichro-latex albicans (Fumouze diagnostics ®): C'est un test de coagglutination, permettant une identification rapide (5 min) de *C. albicans* / *C. dubliniensis* directement à partir de colonies. Il est réalisé à partir de 2 réactifs. Le 1<sup>er</sup> est un réactif dissociant permettant de démasquer l'antigène pariétal. Le second de couleur rouge est constitué de particules de latex sensibilisées avec un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement l'antigène pariétal de *C. albicans* / *C. dubliniensis* préalablement démasqué. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'agglutinats rouges sur fond vert.

Sa sensibilité et sa spécificité sont supérieures à 99%.



**Fig 9 : Réaction positive du test Bichro-latex albicans**  
(Source : O. Faure, laboratoire de parasitologie-mycologie. CHU de Grenoble)

- Krusei color (Fumouze diagnostics ®) : C'est un test de coagglutination, permettant une identification rapide (5 min) de *C. krusei* directement à partir de colonies. Le réactif utilisé est constitué de particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal permettant de détecter spécifiquement un antigène de surface de *C. krusei*. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'agglutinats rouges.

Sa sensibilité est de 100% et sa spécificité de 98,8% selon le fabricant.



**Fig 10 : Kit Krusei color avec exemple d'une réaction positive.**  
 (Source : O. Faure, laboratoire de parasitologie-mycologie. CHU de Grenoble)

Pour les espèces ne pouvant être identifiées par ces tests rapides, on utilise au CHU de Grenoble la galerie API-ID32C (bioMérieux®, Lyon, France) L'identification par les caractères biochimiques repose sur l'assimilation de différents substrats. (Cf annexe 2)

La lecture est faite à 48h par l'automate Mini API (bioMérieux®, Lyon, France)



**Fig 11. Galerie API-ID32C**  
 (Source : konimex.com/apilab/img/strip/ID\_32\_C\_NEG.jpg)

#### **4. Sérologie et antigénémie**

Ces techniques peuvent aider au diagnostic mais leur utilisation est parfois délicate du fait d'une faible sensibilité et spécificité. En pratique, c'est l'observation d'une cinétique croissante qui est retenue, et la combinaison de la détection simultanée des deux marqueurs est fortement préconisée.

Sérologie : La détection des anticorps anti-*Candida* a un rôle limité. Bien que la production d'anticorps soit plutôt le reflet d'une colonisation que d'une invasion, ils constituent, tout comme les scores prédictif de colonisation, un élément dans la décision de prise en charge thérapeutique.

Au laboratoire de parasitologie-mycologie de Grenoble, on utilise une technique d'immunofluorescence détectant des anticorps dirigés contre des antigènes « maison ». Si ce test est positif, il sera confirmé par une technique d'immuno-électrophorèse (IEP).

Antigénémie : Il existe de nombreux antigènes pariétaux détectables, les plus utilisés sont les mannanes (Pastorex Candida®). Certains kits commerciaux détectent un antigène inconnu mixte : Cand-tec ® (mannoprotéine). Au CHU de Grenoble, la détection des antigènes sériques est effectuée avec le kit Serion Elisa *antigen* Candida ®, technique immuno-enzymatique ELISA sur plaque.

D'autres antigènes pariétaux ont été évalués, le plus prometteur est le  $\beta$  (1-3) glucane, antigène polysaccharidique présent dans la majorité des champignons (exceptés les cryptocoques et les mucorales). Un kit est commercialisé sous le nom de Fungitell (BG assay; Fungitell; Associates of Cape Cod, Inc). Il présente une très bonne sensibilité de l'ordre du pg/ml, variant de 80 à 100% en fonction des études et des seuils adoptés<sup>27</sup> mais la spécificité globale reste faible (60 à 70%), dû aux faux-positifs (infections bactériennes et hémodialyse principalement).

Son intérêt réside dans une positivité plus précoce que les signes radiologiques et que les hémocultures.<sup>28, 29</sup> De plus, sa cinétique décroissante lors d'un traitement antifongique signe l'efficacité de la thérapeutique instaurée.<sup>30</sup> Au final, les études menées en hématologie s'accordent sur son excellente Valeur Prédictive Négative (VPN), qui devrait théoriquement permettre une abstention thérapeutique antifongique.

Pour conclure, le diagnostic biologique des candidoses et des candidémies dispose de nombreux tests, direct ou indirect, mais aucun n'est pleinement satisfaisant. C'est l'association de plusieurs d'entre eux mais surtout la confrontation avec les signes cliniques et l'imagerie qui permet le meilleur résultat. Le développement des techniques de PCR ainsi que l'arrivée de nouveaux marqueurs antigéniques ou de nouvelles techniques comme la spectrométrie de masse semble très prometteur, et est donc très attendu par les microbiologistes et les cliniciens.



Le tableau VII résume la sensibilité, la spécificité ainsi que les avantages et inconvénients des principales techniques de diagnostic biologique.

Technique	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Avantages	Inconvénients
Culture	50	100	- « Gold standard » - Utilisable sur tout type de prélèvement - Permet l'étude de la sensibilité aux antifongiques	- Faible sensibilité  - Nécessite un certain temps
Combinaison de la détection mannane et Ac anti-mannane	60 à 89	80 à 84	Bonne sensibilité et spécificité	Expérience limitée
Détection du $\beta$ (1-3) glucane	70 à 100	87 à 96	- Panfongique - Utilisable sur sérum et autre type de prélèvement - Bonne sensibilité et valeur prédictive négative	- Expérience limitée  - Nombreux faux positifs
Détection de l'ADN fongique (PCR)	90	100	Bonne sensibilité et spécificité	Absence de méthodes standardisées

**Tab. VII : Sensibilité, spécificité, avantages et inconvénients des principales techniques de diagnostic**  
(Source: Peman. Mycoses.2009)

## **IV. Les antifongiques**

### **1. Généralités**

Les principaux aspects sur l'utilisation des antifongiques dans les infections fongiques profondes seront détaillés dans ce chapitre, volontairement non exhaustif. Il reprend le mode d'action, le spectre d'activité, les principaux effets indésirables des antifongiques utilisés dans les infections fongiques invasives.

Le tableau VIII résume le spectre d'action de ces molécules et le tableau IX les différentes cibles cellulaires des antifongiques.

	Azolés						Echinocandines		
	AMB	5 FC	FCZ	ITZ	VCZ	POS	CAS	ANI	MIC
<i>C. albicans</i>	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. glabrata</i>	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	+	+	-	+/-	+	+	+	+	+
<i>C. lusitaniae</i>	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+/-

+ : actif ; - : inactif ; +/- : intermédiaire ; **fongicide** ; **fongistatique**.

**Tab VIII. Sensibilité à l'amphotéricine B, au 5 fluoro-cytosine, aux azolés et aux échinocandines des principales espèces appartenant au genre *Candida*.**

(Source : B. Lebeau, laboratoire de parasitologie-mycologie. CHU de Grenoble. D'après Sanglard. JIDIF, 2002)

### Polyènes (Sigma, St. Louis, MO)

Depuis son introduction dans les années 1950, l'amphotéricine B est considéré comme l'antifongique de référence par son activité sur un large spectre fongique et par son mécanisme d'action fongicide unique. Les polyènes sont des macrolides comportant un cycle lactone et une chaîne carbonée avec des doubles liaisons conjuguées. Ils agissent au niveau de la membrane fongique en s'intercalant dans la couche phospholipidique par interaction avec l'ergostérol, altérant la perméabilité cellulaire puis entraînant la mort de la cellule fongique.

Ses principaux effets indésirables sont immédiats, avec le choc anaphylactique, pouvant être prévenus par administration de corticoïdes ou d'antihistaminiques, mais surtout rénaux, avec une insuffisance rénale aigue. C'est cette toxicité rénale qui a motivé le développement ultérieur de formes galéniques moins toxiques, comme les bandelettes lipidiques (ABELCET®) ou les formes liposomales (AMBISOME®), formes qui possèdent, de plus, un volume de distribution plus important.

En pratique, la FUNGIZONE® (amphotéricine B) peut être utilisée comme antimycotique local et décontaminant digestif, car cette molécule n'est pas absorbée dans le tube digestif.

Son spectre d'action est très large, mais néanmoins certaines espèces n'y sont pas sensibles : *Trichosporon* sp, *Aspergillus terreus*, *Fusarium* sp., *Scedosporium* sp.

Concernant les levures appartenant au genre *Candida*, de rares cas de résistances cliniques ont été décrits pour *C. lusitaniae*<sup>31</sup>, *C. guilliermondii*<sup>32</sup> et *C. rugosa*.<sup>33</sup>

*C. krusei* et *C. glabrata* ont eux aussi plus tendance à développer des résistances à cet antifongique que les autres *Candida* sp.<sup>34, 35</sup>

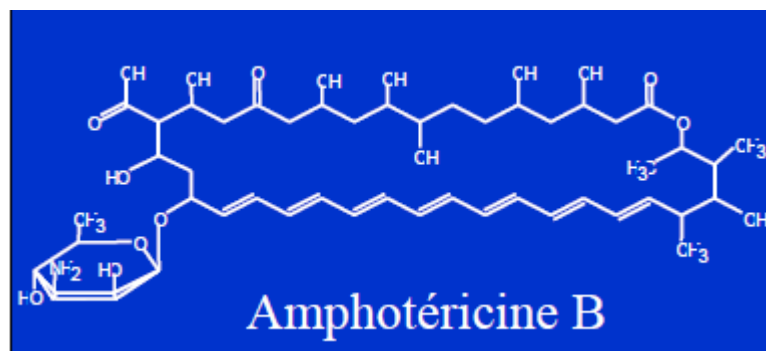
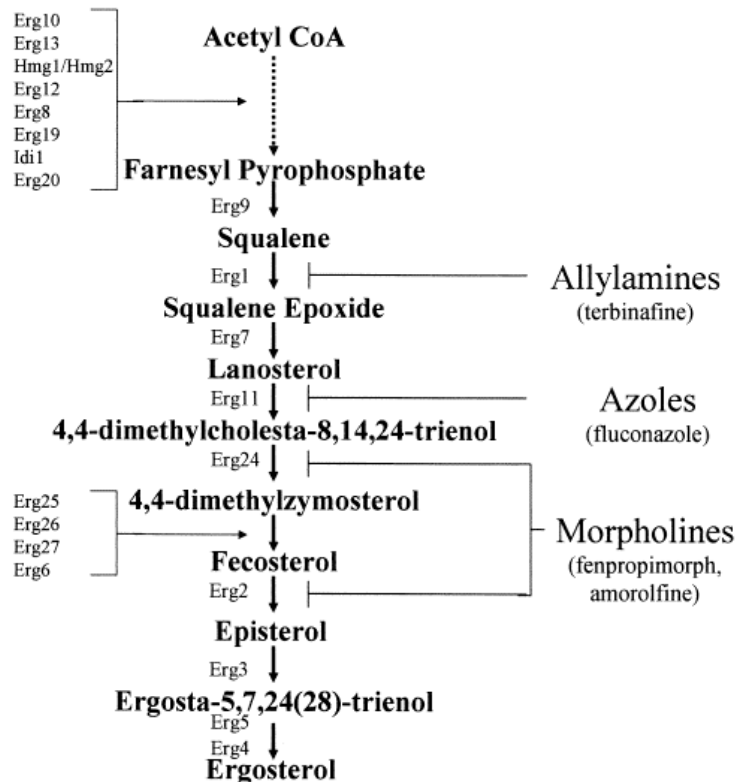


Fig 12 : Structure chimique de l'amphotéricine B

### Triazolés

Cette classe médicamenteuse fongistatique comprend le fluconazole (Pfizer, Sandwich, Kent, UK), l'itraconazole (Janseen, Beerse, Belgium), le voriconazole (Pfizer, Sandwich, Kent, UK), et le posaconazole (Schering Plough Research Institute, Kenilworth, NJ). Les triazolés dérivent de l'imidazole ou du triazole.

Ils agissent sur la synthèse de l'ergostérol, composant indispensable de la membrane fongique, par inhibition de la 14 $\alpha$  deméthylase, lors de l'étape lanostérol  $\rightarrow$  14-deméthyl lanostérol. L'action fongistatique résulte de la baisse de concentration en ergostérol mais aussi de l'accumulation de composés précurseurs en amont de la chaîne de synthèse. (fig 13)



**Fig 13 : Cascade métabolique de la synthèse de l'ergostérol à partir de l'acétylCoa, et lieu d'action des allylamines, des azolés et des morpholines.**

(Source : E. Dannaoui. Présentation orale. Centre National de Référence de la Mycologie et des Antifongiques, Institut Pasteur, Paris.)

Ces molécules présentent une toxicité hépatique.

Les triazolés le plus récents comme le voriconazole et le posaconazole ont un spectre plus étendu, avec une action sur *C. glabrata* et *C. krusei*. Le ravuconazole est la molécule la plus récente de cette classe mais reste encore peu utilisée.

*C. krusei* est naturellement résistant au fluconazole, tandis que certaines espèces comme *C. glabrata* sont considérées comme étant de sensibilité dose dépendante (SDD) aux triazolés, c'est-à-dire que l'antifongique pourrait être adéquat en utilisant des doses plus élevées lors du traitement. Le fluconazole est inactif sur les champignons filamenteux dont *Aspergillus* sp. Les autres triazolés sont actifs sur *Aspergillus* sp. Le posaconazole a quant à lui le plus large spectre, avec une activité sur les champignons filamenteux.

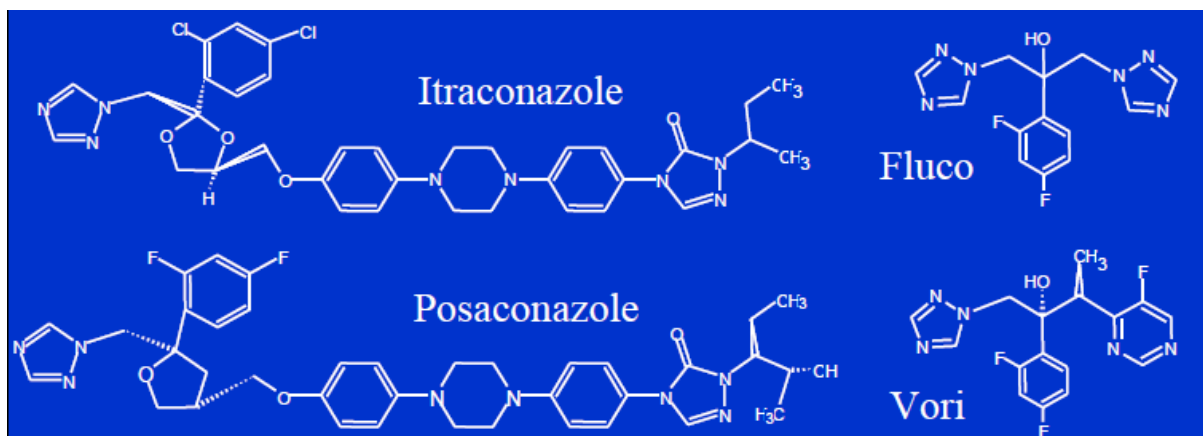


Fig 14 : Structure chimique de l'itraconazole, du fluconazole, du posaconazole et du voriconazole

### Echinocandines

Classe médicamenteuse la plus récente, les échinocandines inhibent de façon non compétitive la synthèse du  $\beta$  (1-3) D-glucane, composant structural essentiel de la paroi cellulaire. La caspofungine (MSD, whitehouse station, NJ, USA) est le chef de file, les autres molécules sont la micafungine (Astellas Pharma Inc, Osaka, Japan), et l'anidulafungine (Pfizer, Groton, CT, USA).

Les échinocandines ont une toxicité faible, principalement hépatique.

Le spectre de cette classe est très large, avec une action fongicide sur une grande majorité des espèces du genre *Candida* mais aussi fongistatique sur *Aspergillus sp.* Seuls *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* et *C. guilliermondii* présentent des CMI plus élevées à cet antifongique. Cette caractéristique sera détaillée dans le chapitre « mécanismes de résistance ».

*Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon sp.* et les mucorales sont résistants à la caspofungine.



Fig 15 : Structure chimique de la caspofungine

Le 5 fluoro-cytosine (Sigma, St. Louis, MO)

Agent fongistatique, la flucytosine (5-FC) est absorbée puis ensuite métabolisée en 5-fluorouracile (5-FU) par l'intermédiaire d'une cytosine déaminase spécifique présente dans la cellule fongique. Elle est utilisée uniquement en association avec les triazolés ou l'amphotéricine B afin d'éviter de sélectionner des mutants résistants. En pratique, on l'utilise principalement dans le traitement des cryptococcoses neuro-méningées et sa toxicité est principalement hématologique.

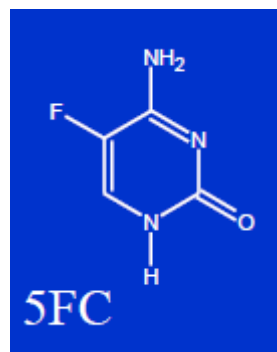
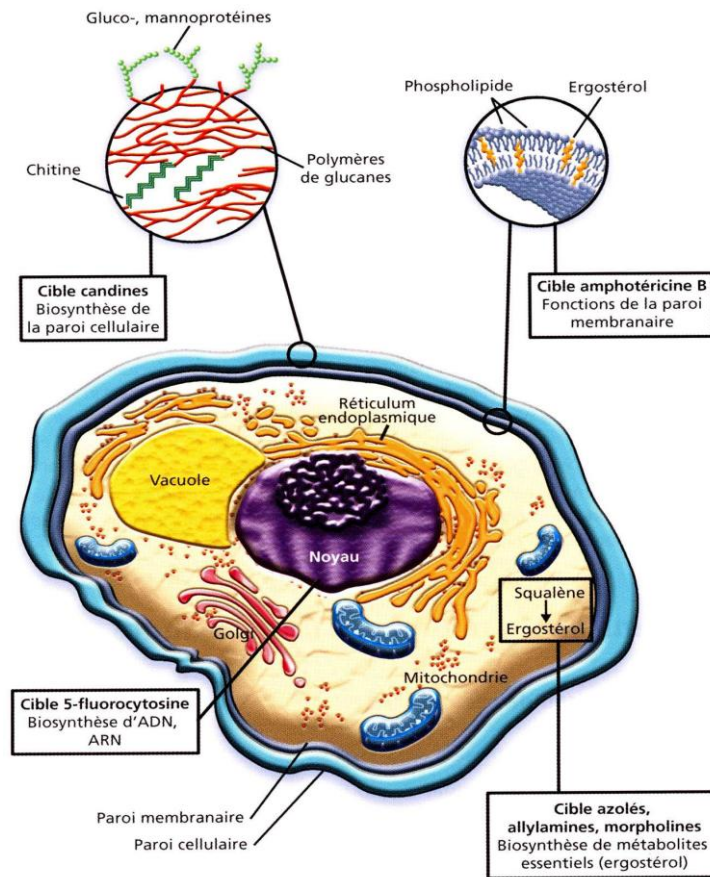


Fig 16 : Structure chimique de la flucytosine



**Fig 17 : Cibles des différents antifongiques.**

(Source : Sanglard D. « Infections fongiques : résistances et nouvelles modalités thérapeutiques » JIDIF)

## 2. Détermination de la sensibilité aux antifongiques

La détermination de la sensibilité aux antifongiques est difficile, car elle dépend de très nombreuses variables. Très rapidement, la notion de standardisation inter et intra-laboratoire a été abordée.

Les techniques de référence pour la détermination de la sensibilité aux antifongiques s'appuient sur la méthode de microdilution en milieu liquide.

Il existe actuellement deux techniques, une développée par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, anciennement NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards) qui a été validée pour les levures et les champignons filamenteux et une développée par l'EUCAST (EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) qui n'est validée actuellement que pour les levures. <sup>36</sup>

C'est la méthode M27A, publiée en 1997 par le NCCLS, qui sert en pratique de référence, et qui définit le milieu de culture, la taille de l'inoculum, le temps d'incubation et la méthode de mesure finale pour les levures.<sup>34</sup> Elle a été depuis réactualisée par le CLSI (méthode M27A3 et son supplément M27-S3).<sup>37,38</sup>

Ces deux techniques (CLSI et EUCAST) sont proches, mais présentent quelques différences. Dans la technique EUCAST, le milieu de culture utilisé (RPMI 1640) est additionné de 2% de glucose, et l'inoculum est 100 fois supérieur ce qui permet une lecture plus précoce après 24h d'incubation.

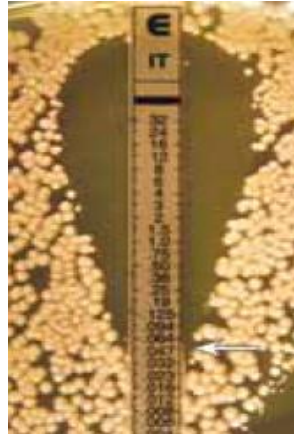
L'unité de référence est la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) : elle correspond à la plus faible concentration inhibant la pousse du pathogène, et est exprimée en mg/l.

Ces techniques de références sont relativement fastidieuses, donc peu applicables à une activité de routine. Les laboratoires utilisent donc des tests commerciaux de réalisation beaucoup plus simple. Les bandelettes E-Test (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) sont largement utilisées dans les laboratoires de mycologie et en particulier au sein de notre laboratoire du CHU de Grenoble. Ce sont de fines bandelettes présentant un gradient croissant d'antifongique, et permettant une lecture rapide de la CMI. Elles ont d'ailleurs montré une meilleure sensibilité pour détecter les espèces résistantes à l'amphotéricine B, en comparaison avec la technique de référence M27A.<sup>39</sup>

Après ensemencement d'une gélose RPMI par un inoculum de 0,5 McFarland de la souche à tester, on dispose la bandelette E-Test. Après 24 à 48 heures d'incubation, la CMI est déterminée par l'intersection des 2 ellipses d'inhibitions de la pousse fongique (fig.18). La lecture est faite à 100% d'inhibition pour l'amphotéricine B, et à 80% pour les triazolés et les échinocandines.

L'intégralité des différentes interprétations de ces bandelettes figure sur le site internet de bioMérieux. (<http://www.biomerieux.fr/upload/002FR99152A-ETEST-FR-final-antifongiques--1.pdf>)





**Fig 18 : Méthode E-Test. Détermination de la CMI à l'itraconazole pour *C. albicans*.**  
(Source : bioMérieux)

Ici, la CMI est de 0,047mg/l.

La corrélation entre les CMI *in vitro* et l'efficacité *in vivo* est difficile à établir en mycologie. Afin de tenter de corréler des deux, le concept de seuils (« breakpoints ») a été introduit en 1997.<sup>40</sup> Ces breakpoints sont différents en fonction de l'antifongique en question (Tab.IX). La règle des « 90-60 » est souvent utilisé pour comparer le degré de corrélation des valeurs de CMI à l'évolution clinique.<sup>41</sup> Pour les souches avec des CMI basses (S), environ 90% des infections devraient répondre à la thérapeutique contre 60% des souches avec des CMI élevées (R). Par exemple, Rex et al ont montré que la réponse positive au traitement par fluconazole a été vu chez 92% des 403 patients avec des isolats « sensibles », 82 % des 55 patients avec des isolats « sensibilité dose dépendant » et 56% des 61 patients avec des isolats « résistants ».<sup>40</sup> Les corrélations entre la sensibilité déterminée *in vitro* et la réponse clinique ne sont pas claires, les facteurs d'hôtes (statut immunitaire, terrain du patient) jouent donc un rôle crucial dans l'évolution clinique.

	Interprétation des CMI (mg/l)		
	Sensible	Sensible dose-dépendant	Résistant
Fluconazole	≤ 8	16-32	≥ 64
Amphotéricine B	≤ 1		≥ 4
Voriconazole	≤ 1	2	≥ 4
Caspofungine	≤ 1		≥ 2
Itraconazole	≤ 0.125	0.25-0.5	≥ 1

**Tab IX. Concentrations critiques (“breakpoints”) du fluconazole, de l'amphotéricine B, du voriconazole, de la caspofungine et de l'itraconazole (en mg/l) et interprétation des CMI pour les levures.**  
(Source : Rex. Clin Infect Dis. 1997)

Concernant la technique EUCAST, seuls les seuils de résistance au fluconazole et au voriconazole ont été déterminés pour le moment.<sup>42, 43</sup>

En pratique, les antifongogrammes ne sont pas effectués sur la totalité des souches isolées, mais uniquement sur celles provenant des prélèvements profonds, des sites supposés stériles, des candidémies ou sur demande expresse du clinicien, en fonction du contexte clinique du patient. Au CHU de Grenoble, le renouvellement de l'antifongogramme pour une même souche est effectué lors d'échecs cliniques de traitement ou de suspicion de résistances acquises. Il est effectué au minimum à une durée d'une semaine du précédent car l'émergence d'éventuelles résistances est relativement longue.

### **3. Mécanismes de résistances**

Tout comme chez les bactéries, il existe deux types de résistances chez les levures : les résistances naturelles et les résistances acquises. Ces résistances acquises surviennent rarement, mais principalement après l'exposition à un antifongique, et peuvent correspondre à un état d'adaptation transitoire ou définitif.<sup>34, 44</sup>

La résistance « mécanique » aux antifongiques par la synthèse de biofilms ne sera pas détaillée ici, même s'il apparaît maintenant clairement que la présence de biofilms est dans certaines situations un frein à la diffusion de l'antifongique.<sup>45</sup> Les modifications des voies de signalisations cellulaires ainsi que les interactions hôtes-pathogènes ne seront eux-aussi non détaillés.

#### Résistances aux azolés

Il existe quatre mécanismes de résistance à cette classe médicamenteuse, qui peuvent dans certains cas être intriqués.

- Mécanisme d'efflux : dû à la surexpression de « multidrug efflux transporter genes », majoritairement MDR1 mais aussi CDR1 et CDR2 chez *C. albicans*, CgCDR1 et PDH1 chez *C. glabrata*, CdCDR1 chez *C. dublinensis*. Les concentrations intracellulaires en antifongiques sont alors insuffisantes pour pouvoir exercer une activité fongistatique.
- Modification de la cible : la substitution d'acides aminés de la cible Erg11p entraîne une fixation moindre aux azolés. C'est d'ailleurs le mécanisme de résistance principal de *C. glabrata* aux azolés.

- Augmentation de la cible Erg11 : provenant de la dépression du gène *ERG11*, ce mécanisme semble moins impliqué que les autres.
- Altération de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (*ERG3* principalement)

### Résistances aux échinocandines

Depuis son introduction en clinique en 2001, il n'y a pas d'émergence de résistances décrites à cette classe médicamenteuse, mais uniquement des échecs de traitement par caspofungine à partir de 2005 (Fig.19)

Les différences de sensibilité aux échinocandines et/ou les échecs thérapeutiques peuvent relever de différents phénomènes :

- Polymorphisme dans le gène *FKS 1* ou *FKS 2* (gènes codant pour la  $\beta$  (1-3) D-glucane synthase) : *C. parapsilosis* et *C. guilliermondii* possèdent des mutations ponctuelles dans *FKS1*, d'où leur sensibilité moindre. Les 3 membres du complexe *parapsilosis* possèdent eux aussi une mutation ponctuelle en position 606 dans *FKS1* entraînant le remplacement d'une proline en alanine, et *C. guilliermondii* possède quant à lui a 3 mutations ponctuelles dans une région « hot-spot » de *FKS1* (région à l'intérieur d'un gène ou les mutations sont fréquentes). Concernant *C. glabrata*, les CMI plus élevées aux échinocandines sont la conséquence de mutations dans *FKS2*.<sup>46</sup> Ces différentes mutations entraînent une fixation diminuée des échinocandines à leur cible cellulaire : les  $\beta$  (1-3) D-glucane synthase.
- Augmentation de la synthèse des chitines : la paroi fongique est une structure dynamique, et l'inhibition de la synthèse d'un des composants ( $\beta$  (1-3) D-glucane) peut entraîner l'augmentation de la synthèse d'un autre composant, en particulier celle de la chitine. Une préexposition aux échinocandines peut induire ce phénomène de 'sauvetage'.<sup>10, 34</sup>
- Phénomène paradoxal d'Eagle : Effet observé *in vitro* dont la corrélation *in vivo* est controversée, il consiste en une absence de pousse à des concentrations faibles mais une pousse fongique à des concentrations plus élevées en échinocandines (8 à 32 mg/l). Ce phénomène observé est différent selon les espèces étudiées, et la méthode de détermination de la sensibilité aux antifongiques joue grandement dans la mise en évidence de cet effet (Méthode CLSI vs EUCAST).<sup>10</sup>

**Table 1**  
Selected cases of echinocandin therapy failure.

Clinical setting	Pathogen	Echinocandin therapy & duration	CAS MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	<i>FKS1</i> mutation	Reference
Oesophagitis (AIDS)	<i>C. albicans</i>	CAS (2 courses)	>64	ND	Hernandez et al. (2004)
Prosthetic aortic valve endocarditis	<i>C. parapsilosis</i>	CAS + FCZ for 6 weeks	>16	ND	Moudgal et al. (2005)
Disseminated (abdominal surgery)	<i>C. krusei</i>	CAS for 15 days	2	ND	Pelletier et al. (2005)
Disseminated	<i>C. albicans</i>	CAS	4	S645F	Park et al. (2005)
Candidaemia	<i>C. krusei</i>	CAS	32	R1361G	Park et al. (2005)
Candidaemia	<i>C. glabrata</i>	CAS, AMB, VRC	>8	S633P	Dodgson et al. (2005)
Azole refractory oesophagitis (AIDS)	<i>C. albicans</i>	CAS then MFG for total of 10 months	2	S645F, R1361H	Laverdiere et al. (2006)
Recurrent oesophagitis (AIDS)	<i>C. albicans</i>	CAS, 2 courses with dose escalation	8	S645P (homo)	Miller et al. (2006)
Candidaemia (Acute Myeloid Leukaemia)	<i>C. krusei</i>	CAS for 17 days	8	F655C (Het)	Hakki et al. (2006) and Kahn et al. (2007)
Candidaemia	<i>C. glabrata</i>	CAS (3 courses)	>16	ND	Daneman et al. (2006)
Candidaemia	<i>C. parapsilosis</i>	CAS (+phenytoin)	0.25	ND	Cheung et al. (2006)
Not reported	<i>C. glabrata</i>	Not reported	4	F659 V of Fks2	Katiyar et al. (2006)
Candidaemia	<i>C. glabrata</i>	VRC, CAS for 136 days	>8	ND	Krogh-Madsen et al. (2006)
Oesophagitis (AIDS)	<i>C. albicans</i>	CAS, 2 courses	2	F641S	Baixench et al. (2007)
Oesophagitis (AML)	<i>C. tropicalis</i>	CAS	4	ND	Pasquale et al. (2008)
Candidaemia	<i>C. glabrata</i>	CAS	>4	D632E	Cleary et al. (2008)
Candidaemia	<i>C. glabrata</i>	CAS for 61 days	8	F659 V of Fks2	Thompson III et al. (2008)
Candidaemia (HSCT)	<i>C. parapsilosis</i>	CAS for 41 days	1	ND	Kabbara et al. (2008)
Candidaemia (HSCT)	<i>C. parapsilosis</i>	CAS for 50 days	1	ND	Kabbara et al. (2008)
Candidaemia (HSCT)	<i>C. guilliermondii</i>	CAS for 26 days	0.5	ND	Kabbara et al. (2008)
Candidaemia (AML)	<i>C. tropicalis</i>	CAS for 16 days	4	S645P (Het)	Garcia-Effron et al. (2008b)
Candidaemia (HSCT)	<i>C. tropicalis</i>	CAS for 44 days	4	S645P (Het)	Garcia-Effron et al. (2008b)
Candidaemia (cancer)	<i>C. tropicalis</i>	CAS for 21 days	1	F641L (homo)	Garcia-Effron et al. (2008b)
Disseminated	<i>C. albicans</i>	CAS for 34 days	1 (>32 Etest)	S645P	Arendrup et al. (2009)
Not reported	<i>C. glabrata</i> <sup>a</sup>	CAS therapy or prophylaxis	>2	Fks1,2 <sup>a</sup>	Garcia-Effron et al. (2009a)

<sup>a</sup> Twelve different clinical isolates reported with various Fks1, Fks2 point mutations.

**Fig 19 : Cas décrits d'échecs de traitement par échinocandines.**  
(Source: Walker, *fungus genet biol*, 2010)

## Résistance aux polyènes

Phénomène moins fréquent, il s'explique par des modifications structurelles du contenu en stérols de la paroi cellulaire ou la diminution de l'ergostérol membranaire. <sup>1</sup> Vandeputte *et al.* ont démontré sur un isolat de *C. glabrata* une sensibilité diminuée à l'amphotéricine B consécutive à une mutation dans CgERG6, gène codant pour la delta [24] stérol C-méthyltransférase, entraînant une baisse de l'ergostérol et une accumulation des précurseurs en amont de cette chaîne de biosynthèse. Cette mutation a d'ailleurs entraîné la croissance de pseudo-filaments chez une espèce normalement dépourvue. <sup>35, 47</sup>

## V. Les traitements et les référentiels

### 1. Les différents types de traitement

Différentes stratégies thérapeutiques peuvent être envisagées, en fonction de l'estimation du risque d'IFI et du degré de certitude diagnostique. <sup>1</sup>

- Traitement prophylactique : traitement instauré en prévention, chez un patient sans signe clinique d'infection fongique, qui présente ou qui présentera des facteurs de risques de développer une candidose invasive.
- Traitement préemptif : traitement instauré chez un patient colonisé à levure, et présentant des facteurs de risques.
- Traitement probabiliste (= empirique) : traitement instauré chez un patient suspect de présenter une candidose invasive, avant toute confirmation microbiologique, histologique ou sérologique.
- Traitement curatif : traitement instauré chez un patient dont l'étiologie fongique est prouvée ou probable sur des arguments cliniques, radiologiques, histologiques et/ou microbiologiques.

Il est à noter que pour certains <sup>48</sup>, le traitement préemptif doit être instauré chez les patients à risque et colonisés, mais présentant également un tableau septique. Cette prise en charge rapproche le traitement préemptif du traitement empirique.

## **2. Les référentiels**

Face aux difficultés diagnostiques et à la grande disparité dans les pratiques thérapeutiques, <sup>49</sup> des recommandations de prise en charge des infections fongiques invasives ont été émises par différentes sociétés savantes. En France, il existe les recommandations émanant de la Société Française d'Anesthésie Réanimation (SFAR), de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) et de la Société de Réanimation de Langue Française (SRFL) (Cf. annexe 3 et 4)

Néanmoins ces recommandations datent du 13 mai 2004, sont complexes et pas toujours respectées en pratique. L'étude Amarcand (Analyse et Management en Anesthésie-Réanimation des CANDIdoses invasives) publiée en 2008 a d'ailleurs montré moins de 50% de conformités entre la pratique et ces recommandations. <sup>50</sup>

Au niveau européen, des recommandations pour la prise en charge des infections fongiques chez les patients atteints de leucémie ou ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoiétiques, ainsi que chez les patients non leucémiques, ont été émises par l'ECIL (European Conference on Infections in Leukemia) en 2009. <sup>51</sup>

Aux Etats-Unis, il existe également des recommandations datant de 2009 de l'Infectious Diseases Society of America (IDSA).<sup>16</sup> Ces recommandations semblent actuellement mieux convenir aux différentes situations cliniques et intègrent les nouveaux antifongiques. Elles prennent en compte la gravité du patient ainsi que la neutropénie sous-jacente, et préconisent fortement le principe de désescalade vers le fluconazole. Les molécules privilégiées seront les échinocandines et le fluconazole plutôt que l'amphotéricine B et le voriconazole. (Cf annexe 5 à 9)

## **VI. L'épidémiologie des *Candida sp.* et sensibilité aux antifongiques**

### **1. Epidémiologie globale des candidémies et des candidoses invasives**

Les données épidémiologiques des infections à *Candida* sont très hétérogènes et dépendent de plusieurs facteurs :

- La zone géographique étudiée
- Le type de population étudiée : âge, pathologies sous-jacentes et facteurs de risques des patients en question

En effet, l'incidence des candidémies augmente avec l'âge.<sup>52</sup>

Actuellement *Candida sp.* est la 4<sup>ème</sup> cause de septicémie nosocomiale aux USA.<sup>53</sup> En Europe, celles-ci se situent entre la 6<sup>e</sup> à la 10<sup>e</sup> place.<sup>54</sup> En France, un rapport de l'INVS en 2006 basé sur 2337 établissements place *Candida sp.* à la 6<sup>e</sup> place des hémocultures positives, tout comme en Espagne.<sup>55</sup>

En France, le rapport du CNR mycologie de 2009 a estimé l'incidence des candidémies sur Paris *intra muros* à 10.6/100 000, ce qui correspond à 6000 à 7000 cas par an.

(<http://www.pasteur.fr/ip/resource/filecenter/document/01s-000047-00j/ip-rap2009-cnr-mycologie.pdf>)

### **Particularités géographiques**

Dans le monde, *C. albicans* est l'espèce la plus fréquemment isolée en clinique<sup>4</sup> et plus de 90% des levures isolées appartiennent à 4 espèces : *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, et *C. tropicalis*.<sup>56-58</sup>

*C. glabrata* est retrouvé en 2<sup>e</sup> position en Europe et aux Etats-Unis,<sup>59</sup> tandis que dans les régions comme le Brésil, l'Amérique Latine et l'Espagne, *C. parapsilosis* occupe cette 2<sup>e</sup> place.<sup>55, 60, 61</sup> L'étude de 2009 de Leroy *et al.* sur 180 services de réanimation français a

retrouvé le classement suivant : *C. albicans* (57.0%) *C. glabrata* (16.7%), *C. parapsilosis* (7.5%), *C. krusei* (5.2%), and *C. tropicalis* (4.9%).<sup>62</sup>

## 2. Evolution de l'épidémiologie des infections à *Candida* sp.

L'incidence des infections fongiques invasives et des candidémies est en hausse depuis les années 1980. Martin *et al.* ont montré que les candidémies ont augmenté de 207 % de 1979 à 2007 aux Etats-Unis.<sup>63</sup> D'autres études américaines décrivent une hausse de plus de 50% de l'incidence des candidémies entre 2000 et 2005.<sup>52</sup> Lors d'une revue de l'évolution des tendances de candidémies, Eggiman *et al.* ont observé une augmentation globale du pourcentage des candidémies entre le début et la fin de la période étudiée.<sup>1</sup> La figure 20 expose la tendance temporelle de l'incidence de ces candidémies.

Year of publication	Period of observation	Type of population, country	Rate/10 000 beginning of study period	Rate/10 000 end of study period	Ratio of change (% increase)
1988	1983-1985	University hospital, USA	5.1*	10.3*	202
1991	1980-1989	Large teaching hospitals, USA	1.6*	6.1*	381
1991	1983-1987	Cancer hospital, France	10.0*	32.0*	320
1994	1986-1988	University hospital, USA	2.0*	13.0*	650
1994	1989-1991	University hospital, USA	13.0*	8.0*	-62
1995	1983-1992	University hospitals, USA	0.15†	1.75†	1167
1996	1987-1992	University hospital, Switzerland	1.2*	6.7*	558
1996	1987-1995	University hospitals, Holland	0.37†	0.72†	195
1996	1978-82 to 1983-87	Autopsy series, Germany	220.0*	320.0*	145
1996	1983-87 to 1988-92	Autopsy series, Germany	320.0*	510.0*	159
1996	1983-86 to 1991-94	Cancer hospital, Italy	34.0*‡	63.0*‡	185
1996	1983-86 to 1991-94	Cancer hospital, Italy	7.5*§	74.0*§	987
1996	1980-1994	University hospital, Taiwan	0.9*	25.3*	2811
1997	1987-1994	Intensive care, Holland	4.7†	7.4†	157
1998	1989-1993	Paediatric university hospital, USA	0.12†	0.28†	233
1998	1991-1996	All hospitals, Norway	0.29†	0.27†	-9
1999	1981-85 to 1987-90	Neonatology, USA	25.0*	46.0*	184
1999	1987-90 to 1990-95	Neonatology, USA	46.0*	285.0*	620
2000	1992-1997	University hospital, Italy	1.01†	1.14†	113
2002	1989-2000	University hospital, Switzerland	0.32†	0.24†	-75
2002	1992-2002	University hospitals, Canada	4.5*	7.6*	169
2002	1996-2000	University hospital, Hungary	2.0-4.1*	2.0-4.1*	0-205
2003	1991-2000	University and referral hospitals	0.37†	0.48†	130

**Fig 20 : Tendance temporelle des candidémies sur les séries entre 1980 et 2000.**  
(Source : Eggimann. *Lancet*. 2003)

*C. albicans* est de loin l'espèce prédominante, elle représente maintenant la moitié des espèces isolées en clinique, mais l'augmentation des espèces non-*albicans* est réelle.<sup>1</sup> De très

nombreuses études décrivent ce changement épidémiologique, avec en particulier l'émergence d'espèces de sensibilité diminuée aux antifongiques.<sup>64, 65</sup>

Cette tendance est à surveiller attentivement car la mortalité des candidémies à espèces *non-albicans* est plus élevée.<sup>66</sup>

### **3. Facteurs de modifications de l'épidémiologie mondiale et de la sensibilité aux antifongiques.**

#### *- L'utilisation des antifongiques*

La prophylaxie par fluconazole fut instaurée dans les années 1980 lors des neutropénies chimio-induites ou lors du conditionnement pré-greffe de moelle osseuse. Cette prophylaxie antifongique permet une réduction de l'utilisation du traitement curatif, une baisse des infections fongiques superficielles et profondes ainsi qu'une baisse de la mortalité relative à l'infection fongique.<sup>67</sup> Cependant certains auteurs notent une absence d'amélioration de la survie totale.<sup>68, 69</sup>

Globalement, l'utilisation prophylactique du fluconazole entraîne une baisse des infections à *C. albicans* et *C. tropicalis* au dépend d'espèces de sensibilité réduite au fluconazole comme *C. glabrata* et *C. krusei*.<sup>57, 70-75</sup> D'autres études montrent plus particulièrement une augmentation des candidémies à *C. glabrata* ou *C. parapsilosis* après traitement antérieur par fluconazole. Concernant l'impact sur la sensibilité aux antifongiques, les levures isolées présentaient des CMI plus élevées aux molécules utilisées au préalable.<sup>65</sup> Certains auteurs ont démontré que l'augmentation des CMI de *C. glabrata* au fluconazole était liée à la consommation de fluconazole.<sup>60</sup> Bassetti *et al.* montrent même en 2009 que l'arrêt de la prophylaxie par fluconazole entraîne une chute des candidémies à *Candida non-albicans* un an plus tard.<sup>75</sup>

Néanmoins, cette affirmation reste controversée et d'autres études ne retrouvent pas ces résultats.<sup>76</sup> Certaines sont biaisées de par la méthodologie utilisée dans leur étude (monocentrique, non focalisation sur les services « à risque » etc...) et d'autres ont été faites dans des zones géographiques où la prévalence des ces espèces étaient moindres.<sup>57, 58, 77-79</sup>

Une étude française récente portant sur les candidémies a montré que l'exposition antérieure au fluconazole (administré 30 jours avant l'épisode fongémique) était associée avec une augmentation du risque d'infection à *C. glabrata* et *C. krusei*, espèces de sensibilité diminuée au fluconazole. De même, la préexposition à la caspofungine entraîne un risque supérieur d'être infecté à *C. parapsilosis*, *C. glabrata* et *C. krusei*. On observe une diminution du risque



d'infection à *C. albicans* avec l'utilisation de chacune des deux molécules dans les 30 jours antérieurs, par rapport aux sujets non exposés.<sup>80</sup>

Concernant les échinocandines seules, l'utilisation de cette classe médicamenteuse en traitement curatif a entraîné une augmentation de l'incidence de certaines espèces qui sont de sensibilité diminuée à cet antifongique : *C. parapsilosis* et *C. guilliermondii*.<sup>81-83</sup>

Kabbara *et al.* a décrit des candidémies à *C. parapsilosis* après traitement prolongé par caspofungine<sup>84</sup>, tandis que Forrest *et al.* ont montré une corrélation entre l'utilisation augmentée de la caspofungine et l'augmentation de 400% des cas de candidémies à *C. parapsilosis*.<sup>85</sup>

Le fluconazole et les échinocandines semblent alors modifier l'équilibre entre les espèces mais aussi leur sensibilité aux antifongiques.

#### - *La durée d'hospitalisation*

L'augmentation de la durée d'hospitalisation entraîne une augmentation de la colonisation à levure.<sup>17</sup> Mais plus récemment a été démontré qu'une durée d'hospitalisation supérieure à 30 jours augmentait également le risque d'infection à espèces non sensibles au fluconazole.<sup>24</sup>

#### - *L'augmentation du nombre de patients à risque et des facteurs de risques*

Le vieillissement de la population, l'augmentation du nombre de cancers et les changements dans les pratiques de transplantations (schémas de conditionnement, thérapies immunosuppressives, nouvelles chimiothérapies) sont les principaux facteurs modifiant la distribution des espèces vers les non-*albicans*.<sup>1, 70, 86-88</sup>

### **4. Epidémiologie en service de réanimation**

Les candidémies comptent pour 10 à 20% des infections à *Candida sp.*<sup>1</sup>

L'incidence des candidémies est très différente suivant le type de population étudiée, variant de 1.7 à 10/100 000 admissions dans la population générale<sup>17</sup> à 94 00/100 000 dans une population de réanimation chirurgicale.<sup>89</sup> En réanimation les patients présentent un risque 5 à 10 fois plus élevé de candidémies par rapport à la population normale.<sup>58</sup>

Les services de réanimation ainsi que les services d'oncologie présentent les chiffres d'incidence d'infection à *Candida* sp. les plus élevés, avec par exemple 33 à 55% des candidémies survenant en service de réanimation.<sup>17</sup>

Les candidémies apparaissent plus fréquemment dans ces services à risque, principalement à cause du terrain de ces patients, de leurs nombreux facteurs de risques, de l'augmentation de la durée d'hospitalisation et donc de la colonisation.<sup>55, 90</sup>

Les patients candidémiques en service de réanimation présentent une mortalité brute entre 40 à 60%.<sup>72, 91</sup> et elle est largement conditionnée par la précocité du traitement antifongique.<sup>20</sup>

## **VII. Conclusion**

Les infections fongiques invasives connaissent depuis une trentaine d'années un développement sans précédent. D'un point de vue qualitatif, avec l'émergence progressive de champignons filamenteux, mais principalement d'un point de vue quantitatif, avec un accroissement majeur de l'incidence de ces pathologies. Les causes de ce phénomène sont multiples, mais ce sont surtout les progrès médicaux en matière de réanimation et de thérapies immunosuppressives qui génèrent une population fortement à risque.

Les agents étiologiques de ces infections sont principalement les levures appartenant au genre *Candida*. Chez les patients fragilisés de réanimation, qui présentent souvent un lourd passé médical, ces infections fongiques sont redoutables. La mortalité élevée nécessite une prise en charge thérapeutique rapide, en dépit d'une difficulté de diagnostic clinique, ainsi qu'un délai encore difficilement compressible dans le diagnostic biologique actuel.

Les facteurs de risque de ces infections sont partiellement connus et peuvent orienter avant confirmation biologique vers une espèce particulière. Ainsi des recommandations de prise en charge thérapeutique ont été émises et préconisent l'utilisation de molécules antifongiques large spectre en première intention dans des situations cliniques précises. Néanmoins les conséquences de l'usage de ces molécules récentes sur les espèces et sur leur sensibilité aux antifongiques restent peu étudiées, et les recommandations de bon usage des antifongiques pourraient se voir modifier si l'émergence d'espèces à sensibilité diminuée se généralise.

Face à ces questions essentielles, mais aussi face à l'observation quotidienne de modifications dans le suivi mycologique des patients du service de réanimation, nous avons voulu objectiver cette impression par une étude monocentrique, afin d'évaluer réellement au sein de notre institution les modifications de l'épidémiologie et de la sensibilité aux antifongiques des levures en réanimation. Ces données ont été confrontées aux modifications

de la consommation des antifongiques dans ce même service, afin de mieux cerner l'impact des prescriptions sur la flore à *Candida* de ces patients.

## **Deuxième partie**

### **Impact de la consommation des antifongiques sur la distribution et la sensibilité de *Candida* sp.**

## **Problématique**

L'objectif principal de cette étude était donc le suivant :

Sur la période 2004-2009, recueillir les données mycologiques (espèce isolée et sensibilité aux antifongiques) de l'ensemble des prélèvements issus d'un service de réanimation, puis comparer ces données brutes au volume d'utilisation des principaux antifongiques utilisés dans ce même service. Finalement, observer l'impact de la consommation des antifongiques sur les modifications de l'épidémiologie et de la sensibilité des espèces appartenant au genre *Candida*.

De plus, cette étude présente une originalité : les variations de sensibilité des souches testées ont pu être plus précocement détectées en créant des sous-catégories de CMI à l'intérieur même de la catégorie « sensible » pour chaque antifongique. Puis, ces CMI ont été corrélées à la dispensation temporelle des antifongiques. Ce type d'analyse statistique a donc permis d'observer les conséquences à court terme de l'usage des antifongiques sur les levures appartenant au genre *Candida* sp.

Ce travail a objectivé l'écologie locale et évolutive de l'environnement fongique d'un service de réanimation (particulièrement adapté pour une étude mycologique) mais aussi les réactions d'adaptations fongiques à une pression iatrogène antifongique.

Cette étude est présentée sous forme d'article, tel qu'il a été accepté le 26 août 2011 par le *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*

Les résultats principaux de nos travaux sur la période 2004-2009 ont permis d'objectiver une incidence croissante de *C. parapsilosis*. La consommation de caspofungine est elle-aussi en constante augmentation, qui a pour conséquence une diminution de la sensibilité pour *C. parapsilosis* mais aussi pour *C. glabrata* à cet antifongique. L'utilisation du fluconazole est à la baisse, et entraîne une augmentation de la sensibilité pour *C. albicans* au fluconazole. Concernant l'amphotéricine B, l'augmentation de son utilisation pendant la période étudiée corrèle avec l'augmentation des CMI à l'amphotéricine B pour *C. albicans* et *C. glabrata*.

Les modifications d'utilisation des antifongiques ont donc un impact sur les espèces du genre *Candida*.

Des résultats complémentaires non détaillés dans l'article seront exposés à la suite de ce dernier. Enfin, une discussion et une conclusion générale clôtureront ce manuscrit.



## Antifungal use influences *Candida* species distribution and susceptibility in the intensive care unit

Pierre Fournier<sup>1\*</sup>, Carole Schwebel<sup>2</sup>, Danièle Maubon<sup>1</sup>, Aurélien Vesin<sup>3</sup>, Bernadette Lebeau<sup>1</sup>, Luc Foroni<sup>4</sup>, Rebecca Hamidfar-Roy<sup>2</sup>, Muriel Cornet<sup>1</sup>, Jean-François Timsit<sup>2,3</sup> and Hervé Pelloux<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Parasitology-Myecology Laboratory, Infectious Agent Department, Albert Michallon University Hospital and Joseph Fourier University, Grenoble cedex 9, France; <sup>2</sup>Medical ICU, Albert Michallon University Hospital, Grenoble cedex 9, France; <sup>3</sup>Inserm U823 (Outcome of cancer and critically ill patients), Albert Bonniot Institute, University Grenoble 1, Grenoble cedex 9, France; <sup>4</sup>Pharmacy Department, Albert Michallon University Hospital and Joseph Fourier University, Grenoble cedex 9, France

\*Corresponding author. Tel: +33-476-765-490; Fax: +33-476-765-228; E-mail: pfournier@chu-grenoble.fr

Received 22 April 2011; returned 22 May 2011; revised 29 July 2011; accepted 26 August 2011

**Objectives:** Antifungal prescription practices have changed over the last decade, and the impact of these changes is unclear. Our objective here was to evaluate the effect of antifungal drug use on the distribution and drug susceptibility of *Candida* spp. in a French intensive care unit (ICU).

**Methods:** Antifungal drug use was measured as the number of defined daily doses per 1000 hospital days (DDDs/1000HD). The distribution of *Candida* spp. over a 6 year period (2004–09) and the MICs of antifungal drugs over 2007–09 were determined. Statistical analyses were performed to assess relationships between antifungal drug use, *Candida* spp. distribution and MIC changes over time.

**Results:** Of 26450 samples from 3391 patients, 1511 were positive for *Candida* spp. *Candida albicans* predominated (52.5%), followed by *Candida glabrata* (16.6%) and *Candida parapsilosis* (7.5%). *C. parapsilosis* increased significantly, from 5.7% in 2004 to 12.5% in 2009 ( $P=0.0005$ ). Caspofungin use increased significantly between 2004 (17.9 DDDs/1000HD) and 2009 (69.9 DDDs/1000HD) ( $P<0.0001$ ). Between 2007 and 2009, the increase in caspofungin use correlated significantly with the increase in caspofungin MICs displayed by *C. parapsilosis* ( $P<0.0001$ ) and *C. glabrata* ( $P=0.03$ ). Amphotericin B consumption changed over time and correlated with an increase in amphotericin B MICs for *C. albicans* ( $P=0.0002$ ) and *C. glabrata* ( $P=0.0005$ ). Significant declines occurred in both fluconazole use ( $P<0.0001$ ) and fluconazole MICs of *C. albicans* ( $P<0.001$ ).

**Conclusions:** Antifungal drug use in the ICU is associated with major changes in the distribution and drug susceptibility of *Candida* spp.

**Keywords:** antifungal agents, drug utilization, fungal susceptibility tests

### Introduction

*Candida* spp. are the most common cause of fungal infections in humans.<sup>1</sup> The incidence of *Candida* infections has risen over the last two decades,<sup>1</sup> in parallel with the increasing use of immunosuppressive treatments and transplantation procedures. Critically ill patients are at high risk of opportunistic invasive fungal infections (IFIs),<sup>2</sup> which are associated with high attributable mortality rates (10%–49%).<sup>3</sup> These high mortality rates can be ascribed in part to the difficulty of diagnosing IFI at an early stage. Because the diagnosis is difficult, antifungal drugs are widely used as empirical or pre-emptive treatments in patients with suspected IFI.<sup>4</sup>

Since 2003, several new antifungal agents have been introduced. Among these, the echinocandins and new azoles are

active against a broader spectrum of fungi, including *Candida glabrata* and *Candida krusei*. The echinocandin caspofungin and the new azole voriconazole are now used as first-line antifungal agents in many clinical situations.<sup>5</sup>

Several studies on changes in *Candida* spp. epidemiology identified prophylactic fluconazole therapy as a contributing factor.<sup>6,7</sup> The emergence of non-*albicans* *Candida* species correlated with fluconazole use in some studies,<sup>8,9</sup> although this finding was not replicated in other studies.<sup>10–12</sup> The potential impact of extensive use of the new antifungal drugs on the epidemiology and susceptibility of *Candida* spp. is not systematically monitored. In two studies, increasing caspofungin use was associated with an increased incidence of *Candida parapsilosis* candidaemia.<sup>13,14</sup> Antibiotic use has been proven to influence

the epidemiology and drug susceptibility of bacteria responsible for human disease.<sup>15,16</sup> The influence of antifungal drug use on species distribution or drug susceptibility has been assessed in studies focusing on candidaemia.<sup>6,8,13</sup> Here, we hypothesized that antifungal drug use impacts the overall species distribution and drug susceptibility of *Candida* spp. Identifying effects of the use of a specific antifungal agent on *Candida* spp. distribution and susceptibility might inform treatment decisions. We evaluated antifungal drug use, and we determined the distribution and susceptibility of *Candida* spp. over a 6-year period in our intensive care unit (ICU). Correlations between observed changes were assessed.

## Methods

The study was carried out in the adult ICU of the Michallon University Hospital in Grenoble, France, between 1 January 2004 and 31 December 2009. The ICU has 18 beds and serves medical and surgical patients, including transplant recipients and patients with haematological and solid malignancies.

### Antifungal drug use

Data on antifungal drug use were extracted from the electronic database of the hospital pharmacy. In our study, we selected the most commonly used antifungal drugs: polyenes (including amphotericin B and liposomal amphotericin B), caspofungin, voriconazole and fluconazole. For itraconazole, posaconazole, 5-fluorocytosine, and the other echinocandins (micafungin and anidulafungin), the levels of use in our ICU was considered too low during the study period to exert major effects.

We converted antifungal drug doses from milligrams to defined daily doses per 1000 hospital days (DDDs/1000HD), in accordance with the Guidelines for ATC classification and DDD assignment (WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology; www.whocc.no). The DDDs were 70 mg for amphotericin B, 210 mg for liposomal amphotericin B, 50 mg for caspofungin, 400 mg for voriconazole and 400 mg for fluconazole. In a second step, we pooled the data for amphotericin B and liposomal amphotericin B to reflect overall polyene use.

### Sampling and *Candida* spp. identification

All *Candida*-positive specimens from all sampling sources were considered, except those from superficial skin samples. When multiple isolates were obtained from the same patient, all species were included in the study but only the first isolate of a given species was considered in the analysis.

Specimens were inoculated onto CAN2 chromogenic isolation plates and/or Sabouraud chloramphenicol tubes (bioMérieux, Lyon, France) and incubated for 3–6 days at 35°C or 27°C depending on the sampling source. The following rapid tests were used for identification: rapid assimilation or agglutination tests (Glabrata RTT, Bichro-Latex Albicans and Krusei-Color; Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret, France) and api-ID32C (bioMérieux, Lyon, France). Blood samples were cultured on Mycosis IC/F and Bactec 9240 media (Becton Dickinson Inc., Sparks, MD, USA) to optimize sensitivity and decrease time to detection.<sup>17</sup>

### Antifungal drug susceptibility

Yeast isolated from blood cultures, deep sites and normally sterile sites were tested routinely. For non-sterile sites (e.g. the lower respiratory tract), the decision to perform antifungal drug susceptibility testing was based on the underlying disease or at the physician's request. The Etest® method (AB bioMérieux, Solna, Sweden) was used, and spanned the period from the beginning of 2007 to the end of 2009. Fluconazole,

amphotericin B, caspofungin and voriconazole Etest strips were placed on RPMI 1640 agar (AES, Reuz, France) and incubated at 35°C for 24 h, as recommended by the manufacturer.

Antifungal breakpoints and MIC interpretation were in accordance with the CLSI.<sup>18</sup> Many studies have shown good correlations between broth microdilution and Etest methods.<sup>19–23</sup> To ensure reliable detection of MIC fluctuations, we created subcategories within the clinical categories defining susceptibility and resistance, for the three main species (*C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*), as follows: fluconazole, 0–0.5 mg/L, 0.5–2 mg/L and  $\geq 2$  mg/L; amphotericin B, 0–0.5 mg/L, 0.5–1 mg/L and  $\geq 1$  to 4 mg/L; voriconazole, 0–1 mg/L and  $\geq 1$  to 32 mg/L; and caspofungin, 0–0.25 mg/L and  $\geq 0.25$  to 1 mg/L.

### Statistical analysis

For the six most commonly isolated *Candida* spp., the monthly incidences and their changes over time were assessed using linear regression with correction for autocorrelation (AUTOREG procedure, SAS Inc., Cary, NC, USA). The Durbin–Watson statistic was used to identify significant autocorrelation terms. The same method was used to test for linear trends in antifungal drug use over time. Fisher's test was performed to evaluate relationships between MIC categories and time periods; the  $\chi^2$  test for trend was used when only two MIC categories were available.

The relationship between monthly antifungal drug consumption and monthly median MIC of the same drug for a specific *Candida* spp. was assessed using a dynamic regression model.<sup>24</sup> In our study, this method consisted of modelling MIC using the ARIMA model<sup>25</sup> and adding drug consumption as an explanatory variable through a specific function (called 'transfer function'). ARIMA was designed to model a quantitative series over time by identifying the correlation with the past values of the same variable (AR stands for autoregressive) and abrupt changes in the recent past (MA stand for moving average). This method allowed us to determine the most plausible time to occurrence of the potential effect of antifungal drug use on the MIC for each particular drug. The model-building process for each antifungal drug–*Candida* pair involved three steps: (i) an ARIMA model was fitted to the MIC series and to the drug-use series; (ii) the cross-correlations of the series were estimated to identify any significant and relevant delayed association over time; and (iii) the drug-use series was entered in the MIC ARIMA model using the transfer function in ARIMA (0,0,0) according to the lag found in step 2.

Series stationarity was tested (Dickey and Fuller test) and ensured by data differencing or transformation. The model yielding the lowest Akaike Information Criterion (AIC) value was chosen as the best model. Goodness-of-fit was assessed throughout model fitting using a white noise test of residuals and cross-correlation check of residuals.

Statistical analyses were performed using SAS 9.13 (SAS Inc.) including ETS solution (Proc ARIMA).

## Results

### Patient population

During the 6-year period, we included 3391 patients, among whom 1061 had at least one positive specimen. The mean number of ICU admissions per year was 951 (SD 117; median 954), and the mean number of ICU hospitalization days per year was 5488 (SD 397; median 5530).

### Antifungal drug use

Table 1 reports the overall antifungal drug use during the study period. In 2009 caspofungin was the most heavily used



**Table 1.** Overall antifungal drug use in mean defined daily doses per 1000 hospital days: DDDs/1000HD (standard deviation) from 2004 to 2009

Drug	Drug use [DDDs/1000HD (SD)]						P value <sup>a</sup>
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	
Amphotericin B <sup>b</sup>	45.9 (47.1)	35.2 (26.3)	23.8 (22.4)	30.4 (28.4)	53.4 (50.5)	45.3 (33.0)	0.5
Fluconazole	34.0 (23.5)	33.5 (30.2)	25.5 (14.7)	24.2 (18.1)	13.1 (11.9)	17.9 (15.9)	<0.0001
Caspofungin	17.9 (19.3)	35.7 (35.7)	46.7 (31.4)	22.9 (25.7)	56.2 (25.5)	69.9 (40.1)	<0.0001
Voriconazole	14.8 (34.8)	20.9 (17.9)	26.2 (37.7)	14.1 (22.5)	10.2 (19.6)	37.5 (21.2)	0.22

<sup>a</sup>P value of the autocorrelated error model.

<sup>b</sup>Includes liposomal amphotericin B.

**Table 2.** Number and sources of specimens, and frequency of isolation of *Candida* spp. in a French ICU, 2004–09

Sample	Negative, n (%)	Positive, n (%)	Total
Blood cultures	13534 (99)	138 (1)	13672
Respiratory tract	1627 (52)	1470 (48)	3097
Oropharyngeal	920 (42)	1301 (58)	2221
Urine	1702 (80)	410 (20)	2112
Stool	964 (50)	968 (50)	1932
Surgical sites	1326 (84)	257 (16)	1583
Drains	890 (83)	178 (17)	1068
Others	601 (79)	164 (21)	765
Total	21564 (81)	4886 (19)	26450

antifungal drug (69.9 DDDs/1000HD), followed by amphotericin B (45.3 DDDs/1000HD), voriconazole (37.5 DDDs/1000HD) and fluconazole (17.9 DDDs/1000HD). Caspofungin use increased steadily and significantly ( $P<0.0001$ ) during the study period. Fluconazole use showed a significant decrease ( $P<0.0001$ ). The use of voriconazole and amphotericin B remained unchanged over the study period ( $P=0.22$  and  $P=0.5$ , respectively).

### Distribution of *Candida* spp.

Table 2 reports the sources of the samples and the *Candida* culture results. Of the 26450 samples collected during the study period, 4886 (18.5%) were positive. Each strain was counted only once per patient, which yielded a total of 1511 *Candida* spp. isolates. Table 3 shows the distribution of *Candida* spp. *C. albicans* predominated (52.5%), followed by *C. glabrata* (16.6%), *C. parapsilosis* (7.5%), *C. tropicalis* (7.3%), *Candida kefyr* (5.4%), *C. krusei* (4.6%) and other *Candida* spp. (6.1%). The proportion of *C. parapsilosis* strains increased significantly, from 5.7% (10/174) in 2004 to 12.5% (32/256) in 2009 ( $P<0.001$ ). No changes occurred over time for the other *Candida* spp., most notably *C. glabrata*.

### Antifungal susceptibility profiles

Table 4 reports the antifungal susceptibility data. The statistical analysis of drug susceptibility data for 2007–09 was confined to the three most common species, namely, *C. albicans* ( $n=177$ ), *C. glabrata* ( $n=51$ ) and *C. parapsilosis* ( $n=34$ ), resulting

in 262 Etest determinations. The proportion of *C. albicans* strains with fluconazole MICs between 0 and 0.5 mg/L increased significantly, from 52% in 2007 to 90% in 2009 ( $P<0.0001$ ). All *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* strains had caspofungin MICs within the susceptible range. However, we found an increase in the proportion of *C. parapsilosis* strains displaying caspofungin MICs between 0.25 and 1 mg/L, from 71% in 2007 to 82% in 2009 ( $P=0.86$ ). All *Candida* spp. displayed stable and low voriconazole MICs over time. *C. glabrata* susceptibility against amphotericin B declined non-significantly from 2007 to 2009 ( $P=0.59$ ).

### Correlations with antifungal drug use

Increased caspofungin use correlated significantly with increased caspofungin MIC values of *C. parapsilosis* strains ( $P<0.0001$ ) 3 months later, and with increased caspofungin MIC values of *C. glabrata* strains ( $P=0.03$ ) 2 months later (Table 5). As an example, Figure 1 shows the influence of high caspofungin use in period 61 on predicted and actual caspofungin MICs of *C. parapsilosis* in period 64 (3 months later). Greater amphotericin B use correlated with increased amphotericin B MICs for *C. albicans* ( $P=0.0002$ ) and *C. glabrata* ( $P=0.0005$ ) 3–4 months later.

No other significant correlations were found; in particular, fluconazole use at any given point in time did not correlate significantly with the fluconazole MIC decrease.

### Discussion

The number of critically ill patients at high risk of IFIs is growing, and consequently antifungal drugs are used on an everyday basis in the ICU. The pharmacoeconomic impact of these drugs was assessed recently.<sup>26</sup> Here, we assessed the impact of antifungal drug use on the epidemiology and susceptibility of *Candida* spp. in ICU patients.

The emergence of *Candida* strains with increased virulence and/or decreased drug susceptibility is of considerable concern, not only in the ICU but also in oncology and surgical wards. Close monitoring is needed, and if the results show an adverse impact of antifungal drug use, then new prescription strategies would need to be considered. Whereas many earlier studies focused on candidaemia,<sup>12–14,27</sup> we investigated the impact of antifungal drug use on the distribution and susceptibility of *Candida* spp. in the ICU. Over a 6-year period, antifungal drug use significantly affected both of our study parameters.

**Table 3.** Global *Candida* spp. distribution from 2004 to 2009

Organism	Number of isolates (%)						Total	P value <sup>a</sup>
	2004	2005	2006	2007	2008	2009		
<i>C. albicans</i>	100 (57.5)	147 (54.0)	144 (50.9)	136 (49.5)	126 (50.2)	141 (55.1)	794 (52.5)	0.57
<i>C. glabrata</i>	26 (14.9)	57 (20.9)	56 (19.8)	42 (15.3)	35 (13.9)	35 (13.7)	251 (16.6)	0.16
<i>C. parapsilosis</i>	10 (5.7)	10 (3.7)	16 (5.6)	24 (8.7)	22 (8.8)	32 (12.5)	114 (7.5)	0.0005
<i>C. tropicalis</i>	13 (7.8)	16 (5.9)	23 (8.1)	22 (8)	15 (6.0)	22 (8.6)	111 (7.3)	0.41
<i>C. kefyr</i>	10 (5.7)	14 (5.1)	15 (5.3)	14 (5.1)	20 (8.0)	9 (3.5)	82 (5.4)	0.16
<i>C. krusei</i>	6 (3.4)	13 (4.8)	14 (4.9)	13 (4.7)	19 (7.7)	5 (1.9)	70 (4.6)	0.98
Other <i>Candida</i> spp.	9 (5)	15 (5.6)	15 (5.4)	24 (8.7)	14 (5.4)	12 (4.7)	89 (6.1)	
All <i>Candida</i> spp.	174 (100)	272 (100)	283 (100)	275 (100)	251 (100)	256 (100)	1511 (100)	

<sup>a</sup>P value of the autocorrelated error model.

**Table 4.** MICs of fluconazole, amphotericin B, caspofungin and voriconazole for *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* from 2007 to 2009

Drug and MIC range (mg/L)	Number of isolates in the MIC range (%)								
	<i>C. albicans</i> (n=177)			<i>C. glabrata</i> (n=51)			<i>C. parapsilosis</i> (n=34)		
	2007 (n=58)	2008 (n=54)	2009 (n=65)	2007 (n=18)	2008 (n=15)	2009 (n=18)	2007 (n=7)	2008 (n=10)	2009 (n=17)
<b>Fluconazole</b>									
0–0.5	30 (52)	43 (80)	59 (90)	1 (6)	0 (0)	0 (0)	3 (43)	4 (40)	5 (30)
0.5–2	21 (36)	10 (18)	5 (8)	1 (6)	1 (7)	5 (28)	1 (14)	5 (50)	8 (47)
>2	7 (12)	1 (2)	1 (2)	16 (88)	14 (93)	13 (72)	3 (43)	1 (10)	4 (23)
<b>Amphotericin B</b>									
0–0.5	56 (97)	53 (98)	65 (100)	13 (73)	9 (60)	10 (56)	7 (100)	10 (100)	16 (94)
0.5–1	2 (3)	1 (2)	0 (0)	5 (27)	6 (40)	8 (44)	0 (0)	0 (0)	1 (6)
1–4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Voriconazole</b>									
0–1	58 (100)	53 (98)	65 (100)	18 (100)	14 (93)	18 (100)	7 (100)	10 (100)	17 (100)
1–32	0 (0)	1 (2)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Caspofungin</b>									
0–0.25	56 (97)	54 (100)	63 (97)	18 (100)	15 (100)	18 (100)	2 (29)	2 (20)	3 (18)
0.25–1	2 (3)	0 (0)	2 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (71)	8 (80)	14 (82)

Of all the *Candida* spp., the rise in *C. parapsilosis* incidence from 5.7% to 12.5% is one of the main findings of our study. Recent epidemiological studies have shown an increase in the incidence of *C. parapsilosis* infections; in some regions *C. parapsilosis* is now the second most frequently isolated *Candida* sp. from blood culture and from normally sterile body-sites of hospitalized patients.<sup>28</sup> This rise has been attributed to a variety of risk factors, such as the high ability of *C. parapsilosis* to colonize intravascular material and prosthetic devices. Patients requiring prolonged use of a central venous catheter, such as ICU patients, are at increased risk of infection with *C. parapsilosis*. Colonization of the skin or gastrointestinal tract is frequently the first step in the pathogenesis of invasive candidiasis. In our study, we did not assess possible links between the rise in *C. parapsilosis* and other well-known risk factors, such as the extensive use of intravascular catheters, broad-spectrum antibiotics and surgical

procedures.<sup>29</sup> Nevertheless, during the study period, we noted a 4-fold increase in caspofungin use, which directly and significantly affected *C. parapsilosis* MIC values. Breakthrough *C. parapsilosis* bloodstream infections have been reported after prolonged caspofungin therapy.<sup>27,30,31</sup> However, there are only limited data linking the increasing incidence of *C. parapsilosis* candidaemia to the growing use of caspofungin.<sup>13,14</sup>

According to the 2009 Infectious Diseases Society of America (IDSA) update of the clinical guidelines for managing candidiasis, echinocandins are now the recommended first-line drugs in many clinical situations, most notably for patients previously exposed to fluconazole and in those with *C. glabrata* infections.<sup>5</sup> The potential effect of this practice on *Candida* spp. epidemiology and susceptibility is unclear. Here, using subcategories within those recommended by the CLSI, we documented significant changes in MICs over time. According to the 2 mg/L CLSI

**Table 5.** Relationship between monthly antifungal consumption and *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* MICs in subsequent months, based on ARIMA models with transfer function

Drug	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<b>Caspofungin</b>			
$\beta$ (SE) <sup>a</sup>	NSCC	0.0007 (0.0003)	0.003 (0.0003)
time lag		2 months	3 months
P value		0.03	<0.0001
<b>Fluconazole</b>			
$\beta$ (SE) <sup>a</sup>	0.01 (0.008)	NSCC	NSCC
time lag	6 months		
P value	0.21		
<b>Amphotericin B</b>			
$\beta$ (SE) <sup>a</sup>	0.0017 (0.0004)	0.0066 (0.0017)	NSCC
time lag	3 months	4 months	
P value	0.0002	0.0005	
<b>Voriconazole</b>			
$\beta$ (SE) <sup>a</sup>	NSCC	NSCC	NSCC
time lag			
P value			

NSCC, no significant cross-correlation.

<sup>a</sup> $\beta$  (SE) is the estimate of the effect of antifungal use in previous months (time lag) on *Candida* MICs for an antifungal, after inclusion in an ARIMA model designed to predict the MIC time series.

breakpoint, all *Candida* spp. tested in this study remained susceptible *in vitro* to caspofungin, as reported previously.<sup>32</sup> However, recent results indicate that the CLSI breakpoints lack sensitivity for detecting echinocandin resistance.<sup>33,34</sup> The MIC subcategories used in our study allowed a more accurate analysis of MIC changes. We found not only a trend toward increasing caspofungin MIC values for *C. parapsilosis*, but also a significant correlation between these increasing MICs and increased caspofungin use at our institution. We documented a surprisingly rapid increase in the incidence of *C. parapsilosis* isolates having caspofungin MICs between 0.25 and 1 mg/L. A recent 7-year study of patients with candidaemia in France showed that previous caspofungin exposure was associated with increased proportions of *Candida* spp. having high caspofungin MICs, including *C. parapsilosis* and *C. glabrata*.<sup>35</sup> Similarly, we have demonstrated that a high level of caspofungin use in the ICU was associated with an increase in *C. parapsilosis* and *C. glabrata* strains exhibiting high caspofungin MICs after a few months. Our study confirms the presence of a selective pressure exerted by echinocandins on *Candida* spp. The high *in vitro* echinocandin MICs usually found for *C. parapsilosis* are generally attributed to the natural polymorphism in the *fkp1* gene sequence of this organism.<sup>36,37</sup> For *C. glabrata*, hot-spot mutations in *fkp2* contribute significantly to the decreased susceptibility to echinocandins.<sup>38</sup> Our study not only confirms the relationship between *C. parapsilosis* and caspofungin, but also corroborates recent data about the impact of caspofungin on *C. glabrata*.<sup>35</sup>

Although the antifungal activity of amphotericin B was excellent, increased use of amphotericin B was followed by increased

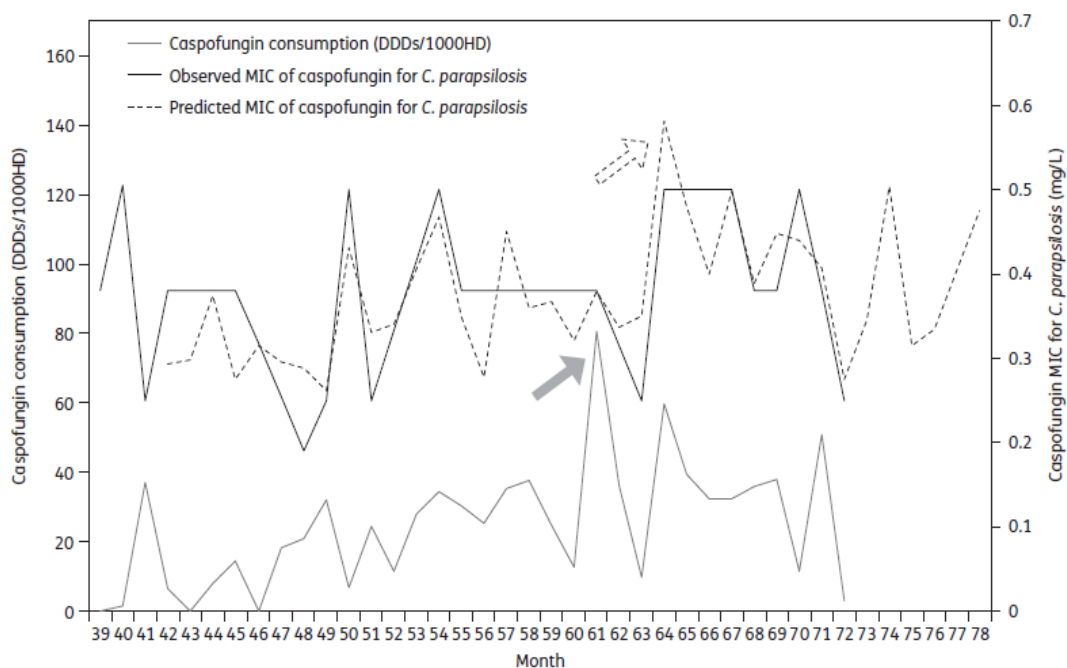
amphotericin B MICs for *C. albicans* and *C. glabrata*. These new results are unsurprising, as the recommendation to use echinocandins and amphotericin B as first- or second-line antifungals in *C. glabrata* infections<sup>5</sup> may lead to the selection of resistant strains.

*C. glabrata* and *C. krusei* occasionally show decreased susceptibility to amphotericin B, but resistance to amphotericin B during treatment is common with species such as *Candida guilliermondii* and *Candida lusitanae*.<sup>1,39</sup> For *C. glabrata* strains resistant to amphotericin B, mutations in the *erg6* gene and modifications in the ergosterol composition of the plasma membrane have been described,<sup>40</sup> suggesting adaptation or selection of these strains in response to amphotericin B exposure. For *C. albicans*, this phenomenon is less often reported,<sup>41</sup> and further studies would be of interest. Overall, the use of caspofungin and amphotericin B seems to impact the antifungal susceptibility of *Candida*, an effect that requires close monitoring.<sup>42</sup>

*C. albicans* fluconazole MICs diminished significantly over time in our study. There was no significant correlation with the decrease in fluconazole use, but improved fluconazole dosages and durations in patients with suspected or proven IFI may have contributed to these changes. In contrast to the *C. glabrata* increase reported in ICUs in the United States,<sup>1</sup> this species did not appear as an emerging pathogen in our unit. Voriconazole use affected neither *Candida* spp. distribution nor antifungal drug susceptibility.

Alternative explanations for our findings include changes in the endogenous flora of patients with long hospital stays, and transmission among patients of a modified *Candida* population in the ICU. Previous data suggest an impact of both factors on the colonizing of *Candida* flora in ICU patients.<sup>10</sup> In our study we took into account only the first available MIC value for a given strain, to avoid bias due to autocorrelation among MIC values of multiple isolates of the same strain. We were unable to determine whether this first isolate was endogenous or exogenous in origin. Antifungal drugs have a direct impact on the flora of patients receiving these drugs. Our results suggest that they may also have an indirect impact on patients who are not receiving antifungal drugs but who are exposed to these more-resistant strains. *C. parapsilosis* is a common skin commensal, and can therefore be readily transmitted. Clearly, the impact of antifungal drug use must be monitored closely, particularly for species that are easily spread via the hands of healthcare workers.

In conclusion, in our ICU the epidemiology and drug susceptibility of *Candida* spp. changed over a 6-year period. Increased caspofungin use was associated with increases in the incidence and caspofungin MICs of *C. parapsilosis* and *C. glabrata*, while amphotericin B consumption affected *C. glabrata* and *C. albicans*. On the other hand, decreased fluconazole use was accompanied by increased overall susceptibility of *C. albicans* to fluconazole. Significant MIC changes occurred during our brief study period, suggesting a rapid adaptation mechanism. Given the rapid increase in antifungal drug use, close monitoring is recommended. Strict rules for antifungal drug use should be devised to minimize the emergence of strains characterized by decreased susceptibility, especially in the ICU, where factors such as the cumulative length of hospital stays enhance antifungal resistance.<sup>43</sup> Furthermore, MIC thresholds should be assessed



**Figure 1.** Monthly caspofungin consumption and observed and predicted MICs of caspofungin for *C. parapsilosis*. The predicted MICs of caspofungin for *C. parapsilosis* were obtained from an ARIMA (2,0,6) model for caspofungin consumption with a 3-month lag as an input variable (see statistical methods for details). The numbers on the x-axis are months (from the middle until the end of the study period). The grey arrow underlines a period of high caspofungin consumption, and the dotted-line arrow underlines its impact on predicted *C. parapsilosis* caspofungin MIC.

as tools for improving the detection of changes in susceptibility to antifungal drugs.

### Acknowledgements

We thank Patricia Pavese for helpful discussion and Adrien Francois for his statistical work.

### Funding

The study data were generated as part of our routine work.

### Transparency declarations

J. F. T. has received research grants from Astellas, Pfizer, MSD, and Gilead, and has received consultant fees from MSD. The remaining authors have none to declare.

### References

- 1 Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 2010; **36**: 1–53.
- 2 Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 2003; **3**: 685–702.
- 3 Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20**: 133–63.
- 4 Rieger CT, Ostermann H. Empiric vs. preemptive antifungal treatment: an appraisal of treatment strategies in haematological patients. *Mycoses* 2008; **51** Suppl 1: 31–4.
- 5 Pappas PG, Kauffman CA, Andes D et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 503–35.
- 6 Bassetti M, Righi E, Costa A et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis* 2006; **6**: 21.
- 7 Sendid B, Cotteau A, François N et al. Candidaemia and antifungal therapy in a French University Hospital: rough trends over a decade and possible links. *BMC Infect Dis* 2006; **6**: 80.
- 8 Colombo AL, Nucci M, Park BJ et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 2816–23.
- 9 Bassetti M, Ansaldi F, Nicolini L et al. Incidence of candidaemia and relationship with fluconazole use in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 625–9.
- 10 Garbino J, Kolarova L, Rohner P et al. Secular trends of candidemia over 12 years in adult patients at a tertiary care hospital. *Medicine (Baltimore)* 2002; **81**: 425–33.
- 11 Blot S, Janssens R, Claeys G et al. Effect of fluconazole consumption on long-term trends in candidal ecology. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**: 474–7.

- 12 Marchetti O, Bille J, Fluckiger U et al. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991–2000. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 311–20.
- 13 Forrest GN, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J Infect* 2008; **56**: 126–9.
- 14 Paugam A, Baixenx MT, Taieb F et al. [Emergence of *Candida parapsilosis* candidemia at Cochin hospital. Characterization of isolates and search for risk factors.]. *Pathol Biol (Paris)* 2011; **59**: 44–7.
- 15 Choi SH, Lee JE, Park SJ et al. Emergence of antibiotic resistance during therapy for infections caused by Enterobacteriaceae producing AmpC beta-lactamase: implications for antibiotic use. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 995–1000.
- 16 Muller A, Lopez-Lozano JM, Bertrand X et al. Relationship between ceftriaxone use and resistance to third-generation cephalosporins among clinical strains of *Enterobacter* doacae. *J Antimicrob Chemother* 2004; **54**: 173–7.
- 17 Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Pelloux H et al. Use of the BACTEC 9240 System with Mycosis-IC/F blood culture bottles for detection of fungemia. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 1855–6.
- 18 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts—Third Edition: Approved Standard M27-A3*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- 19 Canton E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; **7**: 107–19.
- 20 Silva Mdo R, Costa MR, Miranda AT et al. Evaluation of Etest and microdilution broth method for antifungal susceptibility testing of *Candida* sp strains isolated from oral cavities of AIDS patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002; **44**: 121–5.
- 21 Arkan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol* 2007; **45**: 569–87.
- 22 Matsumoto FE, Dias AL, Melhem MS et al. Antifungal susceptibility of bloodstream yeasts isolated at a public children's hospital in Brazil: comparison of the Etest and the AFST-EUCAST microdilution method. *Can J Microbiol* 2007; **53**: 1300–6.
- 23 Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ et al. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 1592–9.
- 24 Monnet DL, Lopez-Lozano JM, Campillos P et al. Making sense of antimicrobial use and resistance surveillance data: application of ARIMA and transfer function models. *Clin Microbiol Infect* 2001; **7** Suppl 5: 29–36.
- 25 Brocklebank J, Dickey D. *SAS for Forecasting Time Series*. Second Edition. Cary, NC, USA: SAS Publishing 2003.
- 26 Hennen CR. Pharmacoeconomic evaluations of antifungal therapies. *Curr Med Res Opin* 2009; **25**: 1751–8.
- 27 Kabbara N, Lacroix C, Peffault de Latour R et al. Breakthrough *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* blood stream infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving long-term caspofungin therapy. *Haematologica* 2008; **93**: 639–40.
- 28 Silva S, Negri M, Henriques M et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x.
- 29 Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 1695–703.
- 30 Cheung C, Guo Y, Gialanella P et al. Development of candidemia on caspofungin therapy: a case report. *Infection* 2006; **34**: 345–8.
- 31 Moudgal V, Little T, Boikov D et al. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 767–9.
- 32 Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ et al. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 150–6.
- 33 Pfaller M, Boyken L, Hollis R et al. Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Candida* species to anidulafungin, caspofungin, and micafungin. *J Clin Microbiol* 2010; **49**: 624–9.
- 34 Pfaller MA, Diekema DJ, Ostrosky-Zeichner L et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 2620–9.
- 35 Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K et al. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 532–8.
- 36 Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ et al. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 760–3.
- 37 Walker LA, Gow NA, Munro CA. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol* 2010; **47**: 117–26.
- 38 Zimbeck AJ, Iqbal N, Ahlquist AM et al. FKS mutations and elevated echinocandin MIC values among *Candida glabrata* isolates from U.S. population-based surveillance. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 5042–7.
- 39 Atkinson BJ, Lewis RE, Kontoyiannis DP. *Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. *Med Mycol* 2008; **46**: 541–6.
- 40 Vandeputte P, Tronchin G, Bergès T et al. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 982–90.
- 41 Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002; **2**: 73–85.
- 42 Pfaller MA, Messer SA, Bolmström A. Evaluation of Etest for determining in vitro susceptibility of yeast isolates to amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; **32**: 223–7.
- 43 Kourkoumpetis TK, Velmahos GC, Ziakas PD et al. The effect of cumulative length of hospital stay on the antifungal resistance of *Candida* strains isolated from critically ill surgical patients. *Mycopathologia* 2011; **171**: 85–91.

## SUPPLEMENTAL DATA

Please find here the supplemental document reporting the data not described in the manuscript.

### CASPOFUNGIN

#### *C. parapsilosis*

From March 2007 to December 2009 (n=33)

Term	Parameter (SE)	P value
<b>ARIMA model for <i>C. parapsilosis</i> MIC for caspofungin</b>		
Constant	0.376	<.0001
<b>ARIMA model for caspofungin consumption</b>		
AR (1)	-1.10 (0.18)	<.0001
AR (2)	-0.93 (0.20)	<.0001
AR (3)	-0.42 (0.19)	0.03
<b>Transfer function (R<sup>2</sup> = 0.59)</b>		
Constant	0.29 (0.009)	<.0001
MA(2)	0.70 (0.18)	0.0001
AR(6)	-0.58 (0.15)	0.0001
Caspo (LAG3)	0.003 (0.0003)	<.0001

C. glabrata

From May 2006 to August 2009 (n=41)

Term	Parameter (SE)	P value
<b>ARIMA model for <i>C.glabrata</i> MIC for caspofungin</b>		
Constant	0.12 (0.007)	<.0001
AR(1)	0.48 (0.14)	0.002
MA(6)	0.40 (0.17)	0.026
<b>ARIMA model for caspofungin consumption</b>		
Constant	22.68 (7.14)	0.003
AR (1)	0.94 (0.16)	<.0001
MA(1)	0.79 (0.24)	0.002
<b>Transfer function (R<sup>2</sup> = 0.51)</b>		
Constant	0.09 (0.01)	<.0001
AR(1)	0.30 (0.16)	0.07
MA(6)	0.18 (0.20)	0.4
Caspo (Lag 2)	0.0007 (0.0003)	0.03

C. albicans

From April 2006 to December 2009 (n=45)

Term	Parameter (SE)	P value
<b>ARIMA model for <i>C. albicans</i> MIC for caspofungin</b>		
Constant	0.047 (0.0009)	<.0001
AR(5)	-0.35 (0.15)	0.025
MA(8)	0.62 (0.13)	<.0001
MA(9)	0.28 (0.13)	0.029
<b>ARIMA model for caspofungin consumption</b>		
Constant	23.2 (5.33)	<.0001
AR(1)	0.91 (0.20)	<.0001
MA(1)	0.79 (0.28)	0.008
<b>Transfer function</b>		
No significant cross-correlation		

## FLUCONAZOLE

*C. parapsilosis*

From March 2007 to December 2009 (n=34)

Term	Parameter (SE)	P value
<b>ARIMA model for <i>C. parapsilosis</i> MIC for fluconazole</b>		
Constant	1.95 (0.62)	0.004
AR(1)	0.47 (0.16)	0.005
<b>ARIMA model for fluconazole consumption</b>		
Constant	8.46 (1.27)	<.0001
<b>Transfer function</b>		
No significant cross-correlation		

*C. glabrata*

From June 2006 to September 2009 (n=40)

Term	Parameter (SE)	P value
<b>ARIMA model for <i>C. glabrata</i> MIC for fluconazole</b>		
AR(1)	0.50 (0.14)	0.0002
<b>ARIMA model for fluconazole consumption</b>		
Constant	9.28 (1.17)	<.0001
<b>Transfer function</b>		
No significant cross-correlation		

*C. albicans*

From January 2006 to December 2009 (n=48)

Term	Parameter (SE)	P value
<b>ARIMA model for <i>C. albicans</i> MIC for fluconazole</b>		
Constant	0.50 (0.08)	<.0001
AR(2)	0.35 (0.14)	0.016
<b>ARIMA model for fluconazole consumption</b>		
Constant	9.45 (1.04)	<.0001
<b>Transfer function</b>		
Constant	0.44 (0.11)	0.001
AR(2)	0.36 (0.15)	0.023
DDD Fluco (Lag6)	0.01 (0.008)	0.21



## AMPHOTERICIN B

### *C. parapsilosis*

From March 2007 to December 2009 (n=34)

Term	Parameter (SE)	P value
<b>ARIMA model for <i>C. albicans</i> MIC for amphotericin B</b>		
Constant	0.28 (0.01)	<.0001
MA(3)	0.45 (0.16)	0.01
<b>ARIMA model for amphotericin B consumption</b>		
Constant	21.3 (3.2)	<.0001
<b>Transfer function</b>		
No significant cross -correlation		

### *C. glabrata*

From June 2006 to February 2009 (n=40)

Term	Parameter (SE)	P value
<b>ARIMA model for <i>C. glabrata</i> MIC for amphotericin B</b>		
Constant	0.47 (0.049)	<.0001
AR(1)	0.32 (0.15)	0.045
<b>ARIMA model for amphotericin B consumption</b>		
Constant	18.7 (2.8)	<.0001
<b>Transfer function (R<sup>2</sup>=0.45)</b>		
Constant	0.37 (0.049)	<.0001
AR(1)	0.19 (0.17)	0.27
DDD AMB (lag 4)	0.0066 (0.0017)	0.0005

### *C. albicans*

From June 2006 to December 2009 (n=51)

Term	Parameter (SE)	P value
<b>ARIMA model for <i>C. albicans</i> MIC for amphotericin B</b>		
Constant	0.18 (0.028)	<.0001
AR(1)	0.34 (0.14)	0.016
MA (4)	-0.40 (0.18)	0.02
MA (5)	-0.47 (0.17)	0.006
<b>ARIMA model for amphotericin B consumption</b>		
Constant	18.7 (2.8)	<.0001
<b>Transfer function (R<sup>2</sup>=0.46)</b>		
Constant	0.15 (0.025)	<.0001
AR(1)	0.30 (0.16)	0.07
MA (4)	-0.15 (0.18)	0.2
MA (5)	-0.69 (0.16)	<.0001
DDD AMB (Lag 3)	0.0017 (0.0004)	0.0002

## VORICONAZOLE

### *C. parapsilosis*

From June 2006 to February 2009 (n=33)

Term	Parameter (SE)	P value
<b>ARIMA model for <i>C. parapsilosis</i> MIC for voriconazole</b>		
Constant	0.053 (0.016)	0.0017
AR(1)	0.48 (0.16)	0.0045
<b>ARIMA for voriconazole consumption</b>		
AR(1)	-0.79 (0.15)	<.0001
MA(2)	0.64 (0.18)	0.001
<b>Transfer function</b>		
<b>No significant cross-correlation</b>		

### *C. glabrata*

From May 2006 to September 2009 (n=41)

Term	Parameter (SE)	P value
<b>ARIMA model for <i>C. glabrata</i> MIC for voriconazole</b>		
Constant	0.27 (0.097)	0.008
<b>ARIMA for voriconazole consumption</b>		
Constant	9.91 (2.23)	<.0001
MA(7)	-0.55 (0.19)	0.006
<b>Transfer function</b>		
<b>No significant cross-correlation</b>		

### *C. albicans*

From March 2006 to December 2009 (n=46)

Term	Parameter (SE)	P value
<b>ARIMA model for <i>C. albicans</i> MIC for voriconazole</b>		
AR(1)	-0.88 (0.08)	<.0001
MA(4)	0.46 (0.15)	0.004
<b>ARIMA for voriconazole consumption</b>		
Constant	10.92 (1.92)	<.0001
<b>Transfer function</b>		
<b>No significant cross-correlation</b>		

## **I. Résultats complémentaires**

### **1. Population étudiée**

Les patients inclus présentent différentes pathologies aiguës médicales, chirurgicales ou liées à une transplantation de moelle osseuse ou d'organes solides. Au cours de cette période de 6 ans, 3391 patients ont été inclus dans notre étude, parmi lesquels 1061 patients ont présenté au moins un prélèvement positif à champignon filamenteux ou à levure. Le nombre moyen d'admissions par an dans ce service de réanimation a été de 951 (SD, 117; médiane, 954) et le nombre moyen de jours d'hospitalisation par an de 5488 (SD, 397; médiane, 5530).

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	Total
Nombre de patients	544 (16.0%)	550 (16.2%)	683 (20.2%)	544 (16.0%)	496 (14.6%)	574 (17.0%)	3391 (100%)
Nombre de prélèvements	3142 (11.9%)	4285 (16.2%)	4492 (17.0%)	4836 (18.2%)	4019 (15.2%)	5676 (21.5%)	26450 (100%)

**Tab.X. Nombre de patients et de prélèvements sur la période 2004 – 2009.**

### **2. Détermination de la consommation d'antifongiques**

Les données extraites de l'informatique de la pharmacie du CHU de Grenoble ont permis de déterminer la consommation d'antifongiques de ce service de réanimation médicale. Le mode d'expression préconisé (WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology 2010. Oslo, 2009) est la Defined Daily Dose per 1000 Hospitalisations days (DDD/1000HD)

Nous avons donc recueilli, pour chaque molécule antifongique (fluconazole, amphotéricine B et amphotéricine B liposomale, itraconazole, voriconazole et caspofungine et pour chaque dosage disponible, le nombre d'unités dispensées mensuellement au service de réanimation médicale en question, sur la période de 2004 à 2009. Secondairement ces données sont converties en nombre de milligrammes total, puis divisé par la dose que recevrait quotidiennement un adulte de 70 kg (Defined Daily Dose : DDD).

Les DDD pour l'amphotéricine B, l'amphotéricine B liposomale, le fluconazole, l'itraconazole, le voriconazole et la caspofungine sont respectivement 70, 210, 400, 200, 400 et 50 mg. Puis ces DDD ont finalement été exprimé par 1000 jours d'hospitalisations afin d'obtenir des chiffres entiers.

NB : L'AMB et le LAMB correspondent à la même molécule antifongique mais sous une forme galénique différente : les DDD de ces 2 antifongiques ont donc ensuite été compilées.

### **3. Données supplémentaires sur les espèces isolées**

Tous les types de prélèvements à la recherche de *Candida* sp. et/ou de champignons filamenteux ont été pris en compte quelque soit la localisation. Les prélèvements superficiels cutanés ont été exclus de l'étude. En effet, le traitement des candidoses cutanéomuqueuses est local, et ne pouvaient donc pas être comparé à une consommation d'antifongiques administrés *per os* d'une part, et d'autre part, certaines espèces sont plus fréquemment retrouvés sur la peau, biaisant alors les chiffres d'incidence des différentes levures. Puis les prélèvements ont été regroupés en 8 catégories : hémocultures, tractus respiratoire, sphère oropharyngée, urines, selles, sites opératoires, drains et autre.

Les dermatophytes, cryptocoques, champignons filamenteux et champignons dimorphiques ont été exclus de l'étude afin de se focaliser uniquement sur *Candida* sp.

Afin de ne pas fausser l'analyse statistique, chaque souche n'a été comptée qu'une unique fois par patient, même si l'espèce est trouvée dans une autre localisation ou ré-isolée plus tardivement.

### **4. Distribution des espèces**

La totalité des espèces isolées dans le service de réanimation médicale entre 2004 et 2009, levures et champignons filamenteux, est compilée dans le tableau XI.

	Année						Total
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	
<i>Candida albicans</i>	100	147	144	136	126	141	794
<i>Candida glabrata</i>	26	57	56	42	35	35	251
<i>Candida parapsilosis</i>	10	10	16	24	22	32	114
<i>Candida tropicalis</i>	13	16	23	22	15	22	111
<i>Candida kefyr</i>	10	14	15	14	20	9	82
<i>Candida krusei</i>	6	13	14	13	19	5	70
<i>Aspergillus fumigatus</i>	14	22	8	8	6	11	69
<i>Candida inconspicua/norvegensis</i>	1	5	10	5	5	8	34
<i>Candida lusitanae</i>	5	6	3	6	4	2	26
<i>Saccharomyces cerevisiae / boulardii</i>	2	5	3	4	3	1	18
<i>Penicillium sp</i>	0	4	5	1	0	2	12
<i>Candida guilliermondii</i>	0	2	0	4	2	0	8
<i>Candida sp</i>	1	1	0	5	0	0	7
<i>Aspergillus niger</i>	1	3	1	1	0	0	6
<i>Aspergillus terreus</i>	0	0	3	0	1	2	6
<i>Candida utilis</i>	0	0	0	2	2	2	6
<i>Geotrichum sp</i>	0	0	1	0	5	0	6
<i>Aspergillus flavus</i>	0	2	1	2	0	0	5
<i>Aspergillus nidulans</i>	0	2	0	1	0	1	4
<i>Geotrichum candidum</i>	1	1	0	0	1	1	4
<i>Aspergillus sp</i>	2	0	0	1	0	0	3
<i>Candida pulcherrima</i>	1	0	1	0	1	0	3
<i>Fusarium sp</i>	0	1	0	0	0	1	2
<i>Geotrichum capitum</i>	0	0	1	0	0	1	2
<i>Paecilomyces sp</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>Absidia sp</i>	0	0	0	0	1	0	1
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Candida dubliniensis</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Candida holmi</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>Candida intermedia</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>Candida rugosa</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Candida valida</i>	0	0	1	0	0	0	1
<i>Hansenula saturans</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>Mucorale sp</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Rhizomucor sp</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Rhodotorula sp</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Scedosporium sp</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>Trichosporon sp</i>	0	0	0	1	0	0	1
Total	195	315	306	298	268	276	1658

Tab XI. Distribution des espèces fongiques isolées de 2004 à 2009

## 5. Corrélations avec les consommations d'antifongiques

### - Corrélations avec l'incidence

Aucune corrélation n'a pu être statistiquement démontrée entre l'utilisation des antifongiques et la modification de la distribution des espèces *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*.

(Tab. XII)

		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CAS	<i>Rh</i> ô	0.11	-0.09	0.30
	<i>p value</i>	0.62	0.66	0.17
FCZ	<i>Rh</i> ô	-0.11	0.17	-0.26
	<i>p value</i>	0.62	0.42	0.22
AMB	<i>Rh</i> ô	-0.07	-0.20	0.17
	<i>p value</i>	0.74	0.35	0.41
VCZ	<i>Rh</i> ô	0.10	-0.05	0.16
	<i>p value</i>	0.65	0.82	0.47

**Tab XII : Coefficient de corrélation de Spearman (*Rh*ô et *p value*) entre la consommation de caspofungine, de fluconazole, d'amphotéricine B et de voriconazole et l'incidence de *C. albicans*, *C. glabrata*, et *C. parapsilosis***

## **II. Discussion**

L'augmentation du nombre de patients à risque d'infections fongiques invasives entraîne une augmentation de l'utilisation de molécules antifongiques. Nous avons choisi d'évaluer les conséquences de l'utilisation des antifongiques sur l'épidémiologie ainsi que sur la sensibilité des *Candida* sp. dans le service de réanimation médicale du CHU de Grenoble. Si l'émergence de levures résistantes ou de sensibilité réduite aux antifongiques est avérée et rapide, de nouvelles stratégies de prescription pourraient être considérées et certaines molécules antifongiques pourraient donc être privilégiées.

De précédentes études ont tenté d'objectiver ces modifications, mais étaient majoritairement focalisées sur les candidémies<sup>58, 84, 85</sup> et sur l'utilisation du fluconazole en prophylaxie.<sup>69, 71, 75</sup> Notre étude explore la flore fongique globale, par l'analyse de prélèvements provenant de nombreuses localisations, reflétant au mieux la pression fongique subie par les patients fragiles de réanimation.

Sur cette période de 2004 à 2009, nous avons réussi à démontrer que l'utilisation des antifongiques modifiait l'épidémiologie et la sensibilité aux antifongiques des levures appartenant au genre *Candida*.

Cette étude soulève néanmoins de nombreux points de discussion.

### **1. Patients**

Les services de réanimation sont propices au développement d'infections fongiques, donc adéquat pour une étude mycologique. En effet, les infections fongiques se développent de façon opportuniste chez des patients présentant des facteurs de risques extrinsèques et/ou intrinsèques. La population étudiée possède très fréquemment de lourdes pathologies sous-jacentes, une immunodépression primaire ou iatrogène, associée avec une antibiothérapie large spectre et des multiples facteurs de risques fongiques, majorant la colonisation candidosique. Le caractère commensal ou de colonisation de ces espèces est objectivé par un pourcentage élevé de positivité de prélèvements oropharyngés, de selles ou de tractus respiratoire, témoignant d'un développement fongique facilité chez ces hôtes fragiles.

Nous observons d'ailleurs un nombre globalement croissant de prélèvements, qui mettent en évidence l'intérêt du clinicien à objectiver une colonisation fongique, 1<sup>er</sup> étape nécessaire et facteur de risque principal des candidémies<sup>18</sup>, même si certaines publications isolées contestent cette affirmation.<sup>109</sup>

## **2. La consommation des antifongiques**

La caspofungine est l'antifongique le plus utilisé sur la période étudiée. En 2009, sa consommation s'élève à 69.9 DDD/1000HD. Son usage a été constamment croissant et son augmentation est significative entre 2004 à 2009 ( $p < 0.0001$ ) D'autres centres hospitaliers français ont montré eux-aussi que cet antifongique récent est désormais le plus utilisé.<sup>81, 110</sup>

De nombreux facteurs peuvent expliquer ce phénomène. Depuis les dernières recommandations de l'Infectious Diseases Society of America (IDSA) en 2009, les échinocandines sont préconisés comme traitement de première intention dans certaines situations cliniques<sup>16</sup>, notamment en cas de traitement antérieur par fluconazole. De plus, sa toxicité moindre ainsi que son spectre d'action étendu ont favorisé son utilisation massive. D'autre part, le fluconazole a suivi une baisse constante et significative ( $p < 0.0001$ ). La consommation de cet antifongique en 2009 est la plus faible de tous les antifongiques (DDD=17.9DDD/1000HD). Les effets de la diminution de l'usage de cette molécule sont très probables, notamment sur la diminution des CMI au fluconazole pour *C. albicans* mais aussi sur la diminution de l'incidence de l'isolement de *C. glabrata*.

L'amphotéricine B reste un antifongique largement utilisé en réanimation, il affiche une consommation totale de 45.3 DDD/1000HD sur la période 2004-2009, et se classe donc en 2<sup>e</sup> position. Ce succès s'explique par une activité fongicide sur la plupart des espèces fongiques. Les formulations galéniques récentes comme les formulations liposomales permettent d'administrer ces molécules même chez les patients dont la fonction rénale n'est pas optimale, situation très fréquemment retrouvée en service de réanimation.

Le voriconazole a vu son utilisation stagner au cours de la période 2007-2009. Sa consommation est élevée en 2009, cela est expliqué entre autre par la dispensation élevée de voriconazole pour un unique patient présentant une infection fongique profonde à une espèce sensible à cet antifongique.



### **3. Epidémiologie et corrélation avec la consommation d'antifongiques**

Sur la période 2004 à 2009, nous avons observé la prédominance franche de *C. albicans* dans notre étude, qui représente à lui seul 52.5% des isolats. Ces résultats sont cohérents avec les études mondiales.<sup>3, 4</sup> Son épidémiologie est globalement stable ( $p = 0.57$ ) au cours des différentes années, entre 57.5% en 2004 jusqu'à 52.5% des isolats en 2009.

Concernant *C. glabrata*, les études décrivent une très grande disparité d'incidence d'un point de vue géographique mais aussi suivant le type de population suivie (âge et pathologies sous-jacentes). Mais l'émergence de cette espèce est réelle dans de nombreux centres hospitaliers<sup>4</sup> ainsi que dans certains services de réanimation médicale.<sup>64</sup> Sa potentielle résistance aux triazolés semble fortement impliquée dans ce phénomène. Malgré tout, cette espèce reste néanmoins en Europe et aux Etats-Unis en 2<sup>e</sup> position derrière *C. albicans*.<sup>6</sup> Dans notre étude, l'incidence de *C. glabrata* reste stable. Ce phénomène à contre-courant de la tendance mondiale est à rapprocher à la baisse significative de l'utilisation du fluconazole et à l'augmentation de l'usage de la caspofungine, même si ces deux items n'ont pas pu être reliés statistiquement.

Les résultats épidémiologiques les plus probants concernent *C. parapsilosis*.

Nous avons démontré une augmentation de son incidence : 5.7% des isolats appartenant au genre *Candida* en 2004 à 12.5% en 2009. Cette augmentation a été décrite dans plusieurs pays<sup>111, 112</sup> mais principalement en Amérique Latine.<sup>61</sup>

De nombreuses étiologies peuvent être à la source de ce phénomène. La cause la plus fréquemment incriminée est l'utilisation de la caspofungine. Des candidémies à *C. parapsilosis* après traitement prolongé par caspofungine ont été décrites,<sup>84</sup> tandis que certains auteurs montrent une corrélation significative entre l'utilisation de la caspofungine et l'augmentation des cas de candidémies à *C. parapsilosis*.<sup>85</sup>

Dans notre étude, une relation statistiquement significative n'a pu être montrée entre l'augmentation de l'incidence de *C. parapsilosis* et l'augmentation de la consommation de caspofungine, mais cependant cette dernière a été parallèlement multipliée par 4 entre 2004 et 2009 dans ce service de réanimation.

Cette incidence croissante de *C. parapsilosis* est donc très probablement multifactorielle : les autres étiologies possibles sont une augmentation de l'utilisation des dispositifs intra-vasculaires, ainsi qu'un nombre croissant de patients en post-opératoire, facteurs de risques

bien connus d'infections à *C. parapsilosis*.<sup>6</sup> Dans notre étude, les facteurs de risques n'ont pas fait l'objet d'une étude approfondie.

*C. parapsilosis* est une espèce retrouvée principalement sur la peau. Les prélèvements cutanés n'étant pas été pris en compte dans notre étude, l'augmentation de cette incidence n'est donc pas liée à l'augmentation du nombre des prélèvements superficiels.

De par cette caractéristique, le portage manuel de cette levure par le personnel soignant est possible. Certains auteurs ont déjà décrit des épidémies à l'intérieur même de service d'hospitalisation.<sup>8</sup> Le caractère épidémique des souches circulantes peut être objectivé par un génotypage des souches isolées. Cette technique n'ayant pas été utilisée, nous ne pouvons donc pas clairement statuer sur l'origine endogène ou exogène des espèces qui sont influencées par l'usage des antifongiques, reste néanmoins qu'elles sont présentes et qu'elles peuvent très probablement circuler en milieu hospitalier.

#### **4. Sensibilité aux antifongiques et corrélation avec la consommation d'antifongiques**

Pour rappel, la sensibilité aux antifongiques a été déterminée pour les 3 espèces les plus fréquemment isolées (n=262), c'est-à-dire *C. albicans* (n=177), *C. glabrata* (n=51) et *C. parapsilosis* (n=34). La période étudiée est 2007-2009. Durant cette période, l'antifongigramme a été effectué par E-test uniquement.

L'originalité de notre étude d'un point de vue méthodologique a été de créer des sous-classes à l'intérieur des zones considérées comme « sensible » pour chaque antifongique. Cela a permis d'objectiver des mouvements plus précis de modifications des CMI en permettant de détecter plus rapidement l'émergence de résistance vis-à-vis d'un agent antifongique. Des publications récentes ont aussi abordé cette problématique : les 'breakpoints' utilisés sont utiles pour relier les sensibilités déterminées *in vitro* à la réponse clinique au traitement mais manquent de sensibilité pour détecter l'apparition de résistances.<sup>106, 107</sup>

Caspofungine : Toutes les levures testées ont une CMI  $\leq 1$  mg/l et sont donc considérées comme sensible. Ces données sont en adéquation avec les données de la littérature actuelle.

<sup>105</sup> La caspofungine reste donc un antifongique très efficace sur les levures du genre *Candida*. Néanmoins nous avons montré une tendance à l'augmentation des CMI pour les souches de *C. parapsilosis* testées, mais le résultat le plus important est une corrélation statistiquement significative entre l'augmentation de l'usage de la caspofungine et l'augmentation des CMI à la caspofungine pour *C. parapsilosis*. Tout comme démontré par Lortholary *et al.* en 2011, la pré-exposition à la caspofungine entraîne une proportion augmentée de souches présentant des CMI élevées à cet antifongique, dont *C. parapsilosis* et *C. glabrata*.<sup>80</sup> Nous retrouvons également dans notre service de réanimation, avec une méthodologie différente, des souches de cette espèce présentant 3 mois après l'utilisation de caspofungine des CMI plus élevées. *C. parapsilosis* affiche des CMI élevées envers les échinocandines de façon naturelle, car il possède un polymorphisme sur le gène *FKS1*, gène codant pour une des sous-unités de la  $\beta$  (1-3) glucane synthase. Une des perspectives possibles de notre étude serait de comparer les CMI de *C. parapsilosis* à la caspofungine avant et après son utilisation en clinique.

Tout comme *C. parapsilosis*, *C. glabrata* présente des CMI à la caspofungine plus élevées avec l'utilisation croissante de cet antifongique. Les souches de *C. glabrata* possédant une sensibilité diminuée aux échinocandines présentent des mutations dans les régions *hot-spot 1* de *FKS1*, mais principalement de *FKS2*.<sup>46</sup>

Cette étude confirme donc la pression de sélection exercée par les échinocandines sur certaines espèces du genre *Candida*. Le mécanisme d'adaptation de cet organisme survient de surcroît de façon très rapide.

Fluconazole : Les CMI du fluconazole pour *C. albicans* diminuent significativement sur la période 2007-2009. Parallèlement, l'utilisation de cet antifongique décrit une baisse sur la période 2004-2009.

Cette augmentation du nombre de souches de *C. albicans* catégorisées « sensible » est aussi très certainement à relier avec une meilleure utilisation clinique de cette molécule, dans la durée du traitement ainsi que dans les doses administrées.

Voriconazole : Cette molécule présente une excellente activité antifongique sur les *Candida* sp. L'usage de cet antifongique n'a pas eu d'impact sur l'épidémiologie ni sur la sensibilité aux antifongiques sur la période étudiée.

Amphotéricine B: L'augmentation de l'utilisation de l'amphotéricine B à l'intérieur de la période étudiée entraîne une augmentation des CMI pour *C. glabrata* et pour *C. albicans* pour l'amphotéricine B. La résistance à cet antifongique, plus rare, est principalement décrite pour des espèces comme *C. guilliermondii* et *C. lusitaniae*, mais à déjà été rapporté pour *C. krusei* et *C. glabrata*.<sup>4, 31</sup> Des mutations dans le gène *ERG6* ou des modifications dans la composition de la membrane fongique au niveau de l'ergostérol sont responsables de la résistance impliqués chez *C. glabrata*.<sup>35, 47</sup> Les mécanismes d'adaptations de *C. albicans* vis-à-vis de l'amphotéricine B sont très peu décrits,<sup>34</sup> et nécessiteront donc des études supplémentaires.

**THESE SOUTENUE PAR : Pierre FOURNIER**

**TITRE :** Impact de la consommation d'antifongiques sur *Candida* sp.

Etude dans un service de réanimation médicale de 2004 à 2009 au CHU de Grenoble

## **CONCLUSION**

*Candida albicans* et les levures appartenant au genre *Candida* sont les étiologies les plus fréquentes d'infections fongiques invasives. L'émergence de *Candida* non *albicans*, dont certaines espèces présentent une sensibilité diminuée aux antifongiques, est observée depuis plusieurs décennies et les causes de ce phénomène tentent d'être identifiées. Parallèlement, l'augmentation du nombre de patients à risque entraîne une augmentation de l'usage prophylactique ou curatif des molécules antifongiques. A travers cette étude, nous voulons analyser l'impact de l'utilisation des principaux antifongiques sur l'épidémiologie de la période 2004-2009 et sur la sensibilité des *Candida* sp. aux antifongiques sur 2007 - 2009, afin de déterminer si les antifongiques sont directement impliqués dans la modifications de ces deux paramètres.

Cette étude, menée au sein d'un service de réanimation médicale sur tout type de prélèvement, nous a délivrés de nombreuses informations. Outre un descriptif épidémiologique local et temporel d'un inoculum fongique, nous avons objectivé une modification réelle de l'épidémiologie et de la sensibilité aux antifongiques. En parallèle à l'augmentation de l'incidence de *C. parapsilosis*, l'utilisation croissante de la caspofungine entraîne une diminution de la sensibilité à cet antifongique pour cette espèce mais aussi pour *C. glabrata*. D'autre part, la baisse de la consommation du fluconazole est accompagnée d'une sensibilité augmentée à cette molécule pour *C. albicans*. Concernant l'amphotéricine B, les augmentations de l'utilisation de cet antifongique à l'intérieur de la période étudiée sont corrélées à l'augmentation des CMI à l'amphotéricine B pour *C. glabrata*, phénomène peu fréquent mais déjà décrit, mais également pour *C. albicans*.

Ces modifications de sensibilité sont apparues de façon très rapide, suggérant un mécanisme de réaction de ces micro-organismes face à la pression antifongique. Ces résultats sont en accord avec certaines données de la littérature, démontrant le rôle central de l'usage des antifongiques dans le changement de la distribution des espèces. Malgré un spectre élargi et une toxicité moindre, l'utilisation des molécules les plus récentes n'est pas sans conséquences

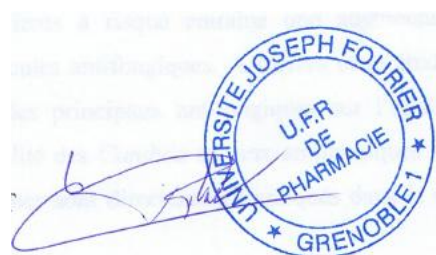
sur la flore fongique. Ces aspects essentiels pourraient être pris en considération pour l'établissement des recommandations à venir de bon usage des antifongiques.

D'autre part, la détection par le laboratoire de l'émergence de souches résistantes doit être maintenue, d'autant que l'utilisation des antifongiques dans un schéma prophylactique ou curatif est en constante augmentation, tout comme le nombre de patients à risque. Certaines concentrations critiques, à l'intérieur des classes délimitées par les 'breakpoints', pourraient être instaurées en fonction d'une molécule et d'une espèce donnée afin de détecter plus précocement l'apparition de souches de sensibilité diminuée.

Ces résultats restent à être corroborés par de plus grandes études nationales et multicentriques.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER  
Grenoble, le 28/08/2011

LE DOYEN : Dr Christophe RIBUOT



LE PRESIDENT DE LA THESE : Pr. Muriel CORNET



# BIBLIOGRAPHIE

1. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 2003; **3**: 685-702.
2. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL *et al.* Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 1366-77.
3. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2007; **48**: 1-12.
4. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 2010; **36**: 1-53.
5. Hachem R, Hanna H, Kontoyiannis D *et al.* The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer* 2008; **112**: 2493-9.
6. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ *et al.* Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 1695-703.
7. van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol* 2009; **35**: 283-309.
8. Almirante B, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M *et al.* Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 1681-5.
9. Zaoutis TE, Argon J, Chu J *et al.* The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis* 2005; **41**: 1232-9.
10. Walker LA, Gow NA, Munro CA. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol* 2010; **47**: 117-26.
11. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; **21**: 606-25.
12. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA *et al.* *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 284-92.
13. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA *et al.* Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 2659-64.
14. Horka M, Ruzicka F, Kubsova A *et al.* Separation of phenotypically indistinguishable *Candida* species, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. parapsilosis*, by capillary electromigration techniques. *J Chromatogr A* 2011; **25**:3900-7
15. Antoniadou A, Torres HA, Lewis RE *et al.* Candidemia in a tertiary care cancer center: in vitro susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy. *Medicine (Baltimore)* 2003; **82**: 309-21.
16. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 503-35.

17. Bouza E, Munoz P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* 2008; **32** Suppl 2: S87-91.
18. Pittet D, Monod M, Suter PM *et al.* Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 1994; **220**: 751-8.
19. Charles PE, Dalle F, Aube H *et al.* Candida spp. colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study. *Intensive Care Med* 2005; **31**: 393-400.
20. Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P *et al.* A bedside scoring system ("Candida score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with Candida colonization. *Crit Care Med* 2006; **34**: 730-7.
21. Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P *et al.* Usefulness of the "Candida score" for discriminating between Candida colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: a prospective multicenter study. *Crit Care Med* 2009; **37**: 1624-33.
22. Ostrosky-Zeichner L, Sable C, Sobel J *et al.* Multicenter retrospective development and validation of a clinical prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; **26**: 271-6.
23. Hermesen ED, Zapapas MK, Maiefski M *et al.* Validation and comparison of clinical prediction rules for invasive candidiasis in intensive care unit patients: a matched case-control study. *Crit Care* 2011; **15**: R198.
24. Kourkoumpetis TK, Velmahos GC, Ziakas PD *et al.* The effect of cumulative length of hospital stay on the antifungal resistance of Candida strains isolated from critically ill surgical patients. *Mycopathologia* 2011; **171**: 85-91.
25. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP *et al.* Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 1813-21.
26. Peman J, Zaragoza R. Current diagnostic approaches to invasive candidiasis in critical care settings. *Mycoses* 2010; **53**(5):424-33
27. Persat F, Ranque S, Derouin F *et al.* Contribution of the (1-->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 1009-13.
28. Ellis M, Al-Ramadi B, Finkelman M *et al.* Assessment of the clinical utility of serial beta-D-glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. *J Med Microbiol* 2008; **57**: 287-95.
29. Senn L, Robinson JO, Schmidt S *et al.* 1,3-Beta-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 878-85.
30. Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S *et al.* An evaluation of serodiagnostic tests in patients with candidemia: beta-glucan, mannan, candida antigen by Cand-Tec and D-arabinitol. *Microbiol Immunol* 1993; **37**: 207-12.
31. Atkinson BJ, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Candida lusitanae fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. *Med Mycol* 2008; **46**: 541-6.
32. Dick JD, Rosengard BR, Merz WG *et al.* Fatal disseminated candidiasis due to amphotericin-B-resistant Candida guilliermondii. *Ann Intern Med* 1985; **102**: 67-8.
33. Colombo AL, Melo AS, Crespo Rosas RF *et al.* Outbreak of Candida rugosa candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; **46**: 253-7.
34. Sanglard D, Odds FC. Resistance of Candida species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002; **2**: 73-85.
35. Vandeputte P, Tronchin G, Larcher G *et al.* A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of Candida glabrata. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 3701-9.



36. EUCAST. EUCAST Definitive Document EDef 7.1:Method for the determination of broth dilution MIC's of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**: 398-405.
37. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed., Approved standard M27-A3. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA*. 2008.
38. CLSI. Reference method for broth dilution. Antifungal susceptibility testing of yeasts. Informational supplement M27-S3. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA*. 2008.
39. Pfaller MA, Messer SA, Bolmstrom A. Evaluation of Etest for determining in vitro susceptibility of yeast isolates to amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; **32**: 223-7.
40. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN *et al*. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and candida infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Infect Dis* 1997; **24**: 235-47.
41. Rex JH, Pfaller MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis* 2002; **35**: 982-9.
42. EUCAST. Technical note on fluconazole. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**: 193-5.
43. EUCAST. Technical note on voriconazole. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**: 985-7.
44. Sanglard D, Ischer F, Monod M *et al*. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* 1997; **143** ( Pt 2): 405-16.
45. Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat* 2004; **7**: 301-9.
46. Zimbeck AJ, Iqbal N, Ahlquist AM *et al*. FKS mutations and elevated echinocandin MIC values among *Candida glabrata* isolates from U.S. population-based surveillance. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 5042-7.
47. Vandeputte P, Tronchin G, Berges T *et al*. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 982-90.
48. SFAR. Conference de consensus : Prise en charge des candidoses etaspergilloses invasives de l'adulte. 2004.
49. Gauzit R, Cohen Y, Dupont H *et al*. [Infections by *Candida* sp. in intensive care. Survey of French practices]. *Presse Med* 2003; **32**: 440-9.
50. Leroy O, Mira JP, Montravers P *et al*. [Invasive candidiasis in ICU: analysis of antifungal treatments in the French study AmarCand]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2008; **27**: 999-1007.
51. Maertens J, Marchetti O, Herbrecht R *et al*. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3--2009 update. *Bone Marrow Transplant* 2010; **46**: 709-18.
52. Zilberberg MD, Shorr AF, Kollef MH. Secular trends in candidemia-related hospitalization in the United States, 2000-2005. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; **29**: 978-80.
53. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM *et al*. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; **39**: 309-17.
54. Mean M, Marchetti O, Calandra T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care* 2008; **12**: 204.
55. Picazo JJ, Gonzalez-Romo F, Candel FJ. Candidemia in the critically ill patient. *Int J Antimicrob Agents* 2008; **32** Suppl 2: S83-5.

56. Sandven P, Bevanger L, Digranes A *et al.* Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 1977-81.
57. Blot S, Janssens R, Claeys G *et al.* Effect of fluconazole consumption on long-term trends in candidal ecology. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**: 474-7.
58. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U *et al.* Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 311-20.
59. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H *et al.* Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; **23**: 317-22.
60. Colombo AL, Nucci M, Park BJ *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 2816-23.
61. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20**: 133-63.
62. Leroy O, Gangneux JP, Montravers P *et al.* Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med* 2009; **37**: 1612-8.
63. Martin GS, Mannino DM, Eaton S *et al.* The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; **348**: 1546-54.
64. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR *et al.* Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* 2002; **35**: 627-30.
65. Nguyen MH, Peacock JE, Jr., Morris AJ *et al.* The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 1996; **100**: 617-23.
66. Dimopoulos G, Ntziora F, Rachiotis G *et al.* *Candida albicans* versus non-*albicans* intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome. *Anesth Analg* 2008; **106**: 523-9, table of contents.
67. Bow EJ, Laverdiere M, Lussier N *et al.* Antifungal prophylaxis for severely neutropenic chemotherapy recipients: a meta analysis of randomized-controlled clinical trials. *Cancer* 2002; **94**: 3230-46.
68. Winston DJ, Pakrasi A, Busuttill RW. Prophylactic fluconazole in liver transplant recipients. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1999; **131**: 729-37.
69. Shorr AF, Chung K, Jackson WL *et al.* Fluconazole prophylaxis in critically ill surgical patients: a meta-analysis. *Crit Care Med* 2005; **33**: 1928-35; quiz 36.
70. Sendid B, Cotteau A, Francois N *et al.* Candidaemia and antifungal therapy in a French University Hospital: rough trends over a decade and possible links. *BMC Infect Dis* 2006; **6**: 80.
71. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O *et al.* The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* 1997; **24**: 1122-8.
72. Playford EG, Webster AC, Sorrell TC *et al.* Antifungal agents for preventing fungal infections in non-neutropenic critically ill and surgical patients: systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 628-38.
73. Gleason TG, May AK, Caparelli D *et al.* Emerging evidence of selection of fluconazole-tolerant fungi in surgical intensive care units. *Arch Surg* 1997; **132**: 1197-201; discussion 202.
74. Presterl E, Daxbock F, Graninger W *et al.* Changing pattern of candidaemia 2001-2006 and use of antifungal therapy at the University Hospital of Vienna, Austria. *Clin Microbiol Infect* 2007; **13**: 1072-6.

75. Bassetti M, Ansaldi F, Nicolini L *et al.* Incidence of candidaemia and relationship with fluconazole use in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 625-9.
76. Lin MY, Carmeli Y, Zumsteg J *et al.* Prior antimicrobial therapy and risk for hospital-acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: a case-case-control study. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4555-60.
77. Garbino J, Kolarova L, Rohner P *et al.* Secular trends of candidemia over 12 years in adult patients at a tertiary care hospital. *Medicine (Baltimore)* 2002; **81**: 425-33.
78. Girao E, Levin AS, Basso M *et al.* Seven-year trend analysis of nosocomial candidemia and antifungal (fluconazole and caspofungin) use in Intensive Care Units at a Brazilian University Hospital. *Med Mycol* 2008; **46**: 581-8.
79. Magill SS, Swoboda SM, Shields CE *et al.* The epidemiology of *Candida* colonization and invasive candidiasis in a surgical intensive care unit where fluconazole prophylaxis is utilized: follow-up to a randomized clinical trial. *Ann Surg* 2009; **249**: 657-65.
80. Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K *et al.* Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 532-8.
81. Paugam A, Baixench MT, Taieb F *et al.* [Emergence of *Candida parapsilosis* candidemia at Cochin hospital. Characterization of isolates and search for risk factors.]. *Pathol Biol (Paris)* 2010; **55** (2): 532-8.
82. Cheung C, Guo Y, Gialanella P *et al.* Development of candidemia on caspofungin therapy: a case report. *Infection* 2006; **34**: 345-8.
83. Moudgal V, Little T, Boikov D *et al.* Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 767-9.
84. Kabbara N, Lacroix C, Peffault de Latour R *et al.* Breakthrough *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* blood stream infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving long-term caspofungin therapy. *Haematologica* 2008; **93**: 639-40.
85. Forrest GN, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J Infect* 2008; **56**: 126-9.
86. Bassetti M, Righi E, Costa A *et al.* Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis* 2006; **6**: 21.
87. Wingard JR. The changing face of invasive fungal infections in hematopoietic cell transplant recipients. *Curr Opin Oncol* 2005; **17**: 89-92.
88. Tortorano AM, Biraghi E, Astolfi A *et al.* European Confederation of Medical Mycology (ECMM) prospective survey of candidaemia: report from one Italian region. *J Hosp Infect* 2002; **51**: 297-304.
89. Hung CC, Chen YC, Chang SC *et al.* Nosocomial candidemia in a university hospital in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 1996; **95**: 19-28.
90. Dimopoulos G, Velegraki A, Falagas ME. A 10-year survey of antifungal susceptibility of candidemia isolates from intensive care unit patients in Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1242-4.
91. Ostrosky-Zeichner L. Prophylaxis or preemptive therapy of invasive candidiasis in the intensive care unit? *Crit Care Med* 2004; **32**: 2552-3.
92. Rieger CT, Ostermann H. Empiric vs. preemptive antifungal treatment: an appraisal of treatment strategies in haematological patients. *Mycoses* 2008; **51** Suppl 1: 31-4.
93. Choi SH, Lee JE, Park SJ *et al.* Emergence of antibiotic resistance during therapy for infections caused by Enterobacteriaceae producing AmpC beta-lactamase: implications for antibiotic use. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 995-1000.

94. Muller A, Lopez-Lozano JM, Bertrand X *et al.* Relationship between ceftriaxone use and resistance to third-generation cephalosporins among clinical strains of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* 2004; **54**: 173-7.
95. Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Pelloux H *et al.* Use of the BACTEC 9240 System with Mycosis-IC/F blood culture bottles for detection of fungemia. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 1855-6.
96. Canton E, Espinel-Ingroff A, Peman J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; **7**: 107-19.
97. Silva Mdo R, Costa MR, Miranda AT *et al.* Evaluation of Etest and macrodilution broth method for antifungal susceptibility testing of *Candida* sp strains isolated from oral cavities of AIDS patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002; **44**: 121-5.
98. Arikan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol* 2007; **45**: 569-87.
99. Matsumoto FE, Dias AL, Melhem MS *et al.* Antifungal susceptibility of bloodstream yeasts isolated at a public children's hospital in Brazil: comparison of the Etest and the AFST-EUCAST microdilution method. *Can J Microbiol* 2007; **53**: 1300-6.
100. Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ *et al.* Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 1592-9.
101. Monnet DL, Lopez-Lozano JM, Campillos P *et al.* Making sense of antimicrobial use and resistance surveillance data: application of ARIMA and transfer function models. *Clin Microbiol Infect* 2001; **7** Suppl 5: 29-36.
102. Brocklebank J, Dickey D. SAS for Forecasting Time Series. *SAS Publishing* 2003; Second Edition.
103. Hennen CR. Pharmacoeconomic evaluations of antifungal therapies. *Curr Med Res Opin* 2009; **25**: 1751-8.
104. Silva S, Negri M, Henriques M *et al.* *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011.
105. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ *et al.* In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 150-6.
106. Pfaller M, Boyken L, Hollis R *et al.* Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Candida* species to anidulafungin, caspofungin, and micafungin. *J Clin Microbiol* 2010; **49**: 624-9.
107. Pfaller MA, Diekema DJ, Ostrosky-Zeichner L *et al.* Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 2620-9.
108. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ *et al.* In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 760-3.
109. Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM *et al.* Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 177-86.
110. Pavese P, Ouachi Z, Vittoz JP *et al.* [Adequacy of new systemic antifungal agents prescriptions in a teaching hospital]. *Med Mal Infect* 2007; **37** Suppl 3: S223-8.
111. Playford EG, Nimmo GR, Tilse M *et al.* Increasing incidence of candidaemia: long-term epidemiological trends, Queensland, Australia, 1999-2008. *J Hosp Infect* 2010; **76**: 46-51.
112. Horasan ES, Ersoz G, Goksu M *et al.* Increase in *Candida parapsilosis* Fungemia in Critical Care Units: A 6-Years Study. *Mycopathologia* 2010; **170**: 263-8.

# ANNEXES

## Milieu chromogène CAN2 (Biomérieux®)

Ce milieu contient un mélange de substrats et de régulateurs enzymatiques. L'hydrolyse d'un substrat chromogène d'hexosaminidase en présence d'un inducteur de l'enzyme entraîne la coloration bleue des colonies de *C. albicans* et de *C. dubliniensis*. *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* et *C. kefir* poussent sous formes de colonies roses grâce à l'hydrolyse d'un second substrat.

Composition : Extrait de levure : 6g ; Extrait de malt : 4,5g ; Substrats et régulateurs enzymatiques : 1,71g ; Agar : 14g ; Mélange d'antibiotiques : 0,082g ; Eau purifiée : QSP 1000ml

Prix : 1,30 euros/boîte

## Milieu Sabouraud et chloramphénicol (Laboratoire AES®)

Ce milieu contient du chloramphénicol (antibiotique de la famille des phénicolés) qui inhibe la pousse bactérienne. Il permet un isolement des moisissures et des levures.

Composition: Extrait de levure : 5g; Peptone: 10 g; Glucose: 20g; Agar: 20g; Chloramphénicol: 0,5g; Eau distillée : QSP 1000ml

Prix : 1,15 euros/boîte

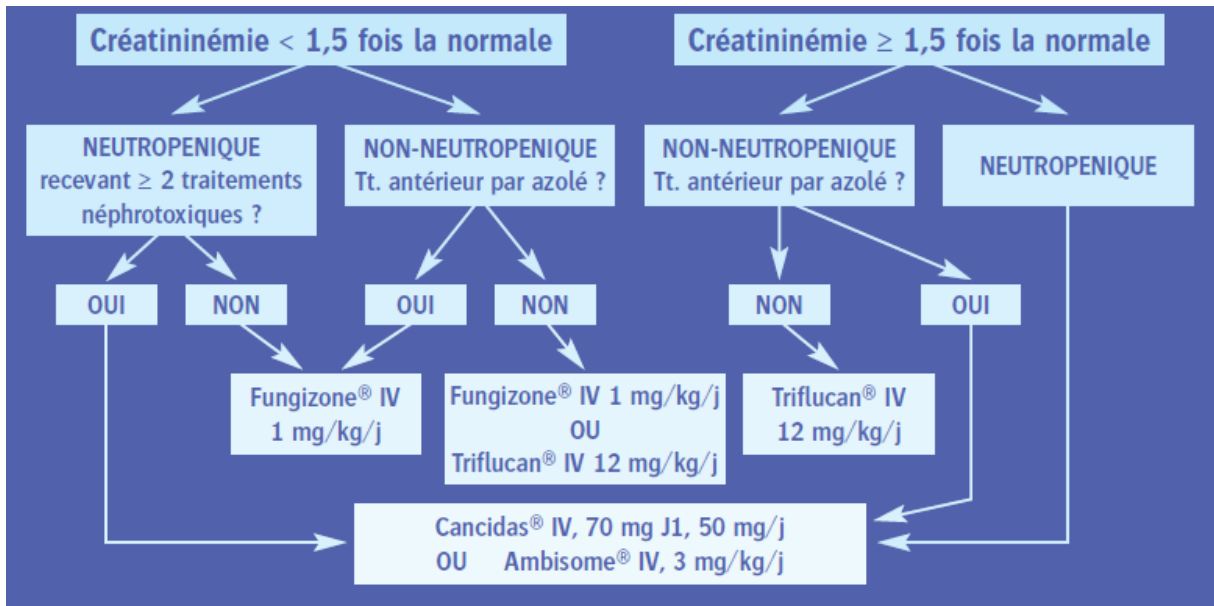
**Annexe 1 : composition des milieux de cultures CAN2 et Sabouraud/chloramphénicol.**

Caractères établis avec les galeries d'identification ID 32C bioMérieux

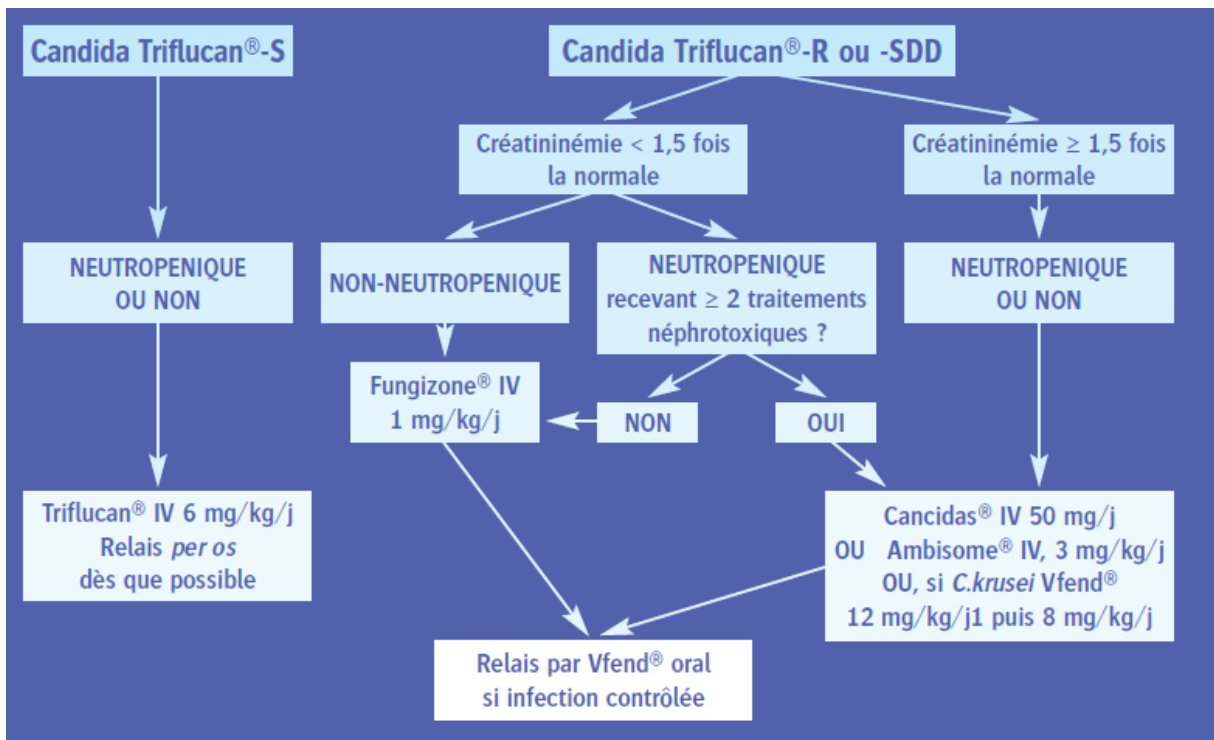
	Galactose	0,01% Cycloheximide	Sucrose	N-acetyl-glucosamine	DL-Lactate	L-Arabinose	Cellobiose	Raffinose	Maltose	Trehalose	2-keto-D-gluconate	α-Methyl-D-glucoside	Sorbitol	D-xylose	Ribose	Glycerol	Rhamnose	Palatnose	Erythritol	Melibiose	Glucuronate	Melezitose	Glucuronate	Levulinate	Mannitol	Lactose	Inositol	Glucose	Sorbose	Glucosamine	Esculine				
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
<i>C. famata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
<i>C. glabrata (T. glabrata)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>C. kefyr</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>C. krusei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>C. lusitanae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>C. utilis (P. Jadinii)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>M. pulcherrima</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Pichia anomala</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>C. albidus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>C. curvatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. humicola</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. laurentii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhodotorula glutinis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

-- : absence de pousse; + : croissance positive; ⊖ : croissance variable  
Lecture après 48h ou 72h de croissance à 28°C

Annexe 2. Caractères biochimiques établis par la galerie ID32C



Annexe 3. Recommandations de la Société Française d'Anesthésie Réanimation (SFAR), de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) et de la Société de Réanimation de Langue Française (SRFL) du 13 mai 2004, du traitement des candidémies avant identification de l'espèce.



Annexe 4. Recommandations de la Société Française d'Anesthésie Réanimation (SFAR), de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) et de la Société de Réanimation de Langue Française (SRFL) du 13 mai 2004, du traitement des candidémies après identification de l'espèce.

Candida Infections of the Cardiovascular System			
Condition	Primary	Alternative	Comments
Endocarditis	LFAmB 3-5 mg/kg +/- 5-FC 25 mg/kg qid or AmB-d 0.6-1 mg/kg daily +/- 5-FC 25 mg/kg qid or an echinocandin* (B-III)	Step-down therapy to fluconazole 400-800 mg (6-12 mg/kg) daily for susceptible organism in stable patient with negative blood cultures (B-III)	Valve replacement <b>strongly recommended</b> . If unable to remove valve, chronic suppression fluconazole 400-800 mg (6-12 mg/kg) daily. Life-long suppressive therapy for prosthetic valve endocarditis if valve cannot be replaced.
Pericarditis, myocarditis	LFAmB 3-5 mg/kg daily, or fluconazole 400-800 mg (6-12 mg/kg) daily, or an echinocandin* (B-III)	After stable, step-down to fluconazole 400-800 mg (6-12 mg/kg) daily (B-III)	Therapy for several months but little data. Pericardial window or pericardiectomy recommended.
Suppurative thrombo-phlebitis	LFAmB 3-5 mg/kg daily, or fluconazole 400-800 mg (6-12 mg/kg) daily, or an echinocandin* (B-III)	After stable, step-down to fluconazole 400-800 mg (6-12 mg/kg) daily (B-III)	Catheter removal essential. Surgical incision and drainage or resection of vein if feasible. Treat for at least 2 wk after candidemia has cleared.
Infected pacemakers, ICD, VAD	LFAmB 3-5 mg/kg +/- 5-FC 25 mg/kg qid or AmB-d 0.6-1 mg/kg daily +/- 5-FC 25 mg/kg qid or an echinocandin* (B-III)	Step-down therapy to fluconazole 400-800 mg (6-12 mg/kg) daily for susceptible organism in stable patient with negative blood cultures (B-III)	Removal of pacemakers and ICD. Treat for 4-6 weeks after device removed. For VAD that cannot be removed, chronic suppressive therapy with fluconazole is recommended.

\* For patients with endocarditis and other cardiovascular infections, higher daily doses of an echinocandin may be appropriate, eg caspofungin 50-150 mg/d, micafungin 100-150 mg/d, anidulafungin 100-200 mg/d

Candida Osteoarticular Infections			
Condition	Primary	Alternative	Comments
Osteomyelitis	Fluconazole 400 mg (6 mg/kg)/d for 6-12 mo or LFAmB 3-5 mg/kg daily for several wk, then fluconazole for 6-12 mo (B-III)	An echinocandin* or AmB-d 0.5-1 mg/kg daily for several wks, then fluconazole for 6-12 mo (B-III)	Duration of therapy usually is prolonged (6-12 months). Surgical debridement is frequently necessary.
Septic arthritis	Fluconazole 400 mg (6 mg/kg)/d for at least 6 wk or LFAmB 3-5 mg/kg daily for several wks, then fluconazole to completion (B-III)	An echinocandin** or AmB-d 0.5-1 mg/kg daily for several wks, then fluconazole to completion (B-III)	Duration of therapy usually for at least 6 wk, but few data are available. Surgical debridement recommended for all cases. Prosthetic joint removal recommended.

**Candida vulvovaginitis**

Topical agents (see table below) or fluconazole (Diflucan) 150 mg single dose for uncomplicated vaginitis (A-1)

Recurrent vulvovaginal candidiasis (VVC) is managed with fluconazole (Diflucan) 150 mg weekly for 6 months, following initial control of the recurrent episode

Intravaginal Agents	
<b>Gynazole-1</b> (butoconazole) 2% cream 5 g intravaginally x 1 or 3 days	
<b>Gynazole-1</b> (butoconazole) 2% cream 5 g (butoconazole-sustained release) single intravaginal application	
<b>Clotrimazole</b> 1% cream 5 g intravaginally for 7-14 days	
<b>Gyne-Lotrimin 7</b> (clotrimazole) 100 mg vaginal tablet for 7 days	
<b>Gyne-Lotrimin 3</b> (clotrimazole) 200 mg vaginal tablet for 3 days	
<b>Monistat</b> (miconazole) 2% cream 5 g intravaginally for 7 days	
<b>Miconazole</b> 100 mg vaginal suppository, one suppository for 7 days	
<b>Monistat 3</b> (miconazole) 200 mg vaginal suppository daily x 3 days	
<b>Monistat 1</b> (miconazole) 1,200 mg vaginal suppository for 1 day	
<b>Nystatin</b> 100,000-unit vaginal tablet, one tablet for 14 days	
<b>Vagistat-1</b> (tioconazole) 6.5% ointment 5 g intravaginally x 1	
<b>Terazol 7</b> (terconazole) 0.4% cream 5 g intravaginally for 7 days	
<b>Terazol 3</b> (terconazole) 0.8% cream 5 g intravaginally for 3 days	
<b>Terconazole</b> 80 mg vaginal suppository, one suppository for 3 days	

**Neonatal Candidiasis**

AmB-d 1 mg/kg daily (A-II) or fluconazole 12 mg/kg daily (B-II) for 3 wks	LFAmB 3-5 mg/kg daily (B-III)	A lumbar puncture and dilated retinal examination should be performed on all neonates with suspected invasive candidiasis. Intravascular catheter removal is <b>strongly recommended</b> . Duration of therapy is at least 3 wks. LFAmB used only if there is no renal involvement. Echinocandins should be used with caution and only when other agents cannot be used
---	-------------------------------	---

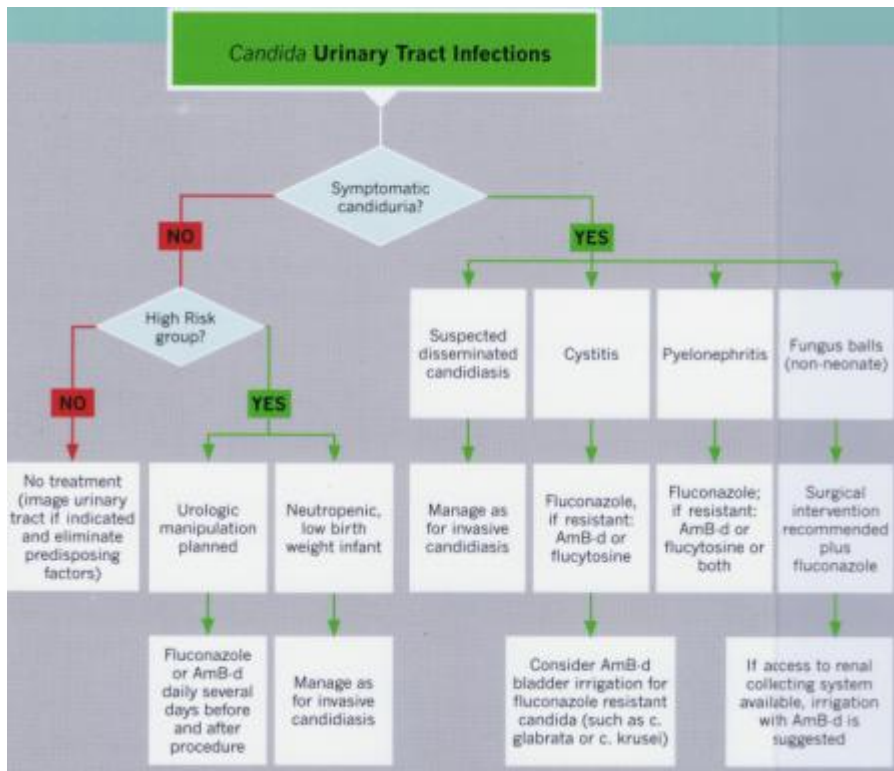
Esophageal Candidiasis		
	Primary	Alternative
Primary Treatment	Fluconazole 200-400 mg (3-6 mg/kg) daily (A-1)	
Unable to tolerate Oral Therapy	An echinocandin**; or AmB-d 0.3-0.7 mg/kg daily (B-II)	
Fluconazole-Refractory	Itraconazole oral solution 200 mg daily; or posaconazole suspension 400 mg bid; or voriconazole 200 mg IV or PO bid (A-III) x 14-21 d.	Micafungin 150 mg daily, caspofungin 50 mg daily, anidulafungin 200 mg daily or AmB-d 0.3-0.7 mg/kg daily.

**Annexe 5. Traitement des infections cardio-vasculaires, ostéoarticulaires, vulvo vaginales, néonatales et oesophagiennes à Candida sp. (Source : IDSA 2010)**

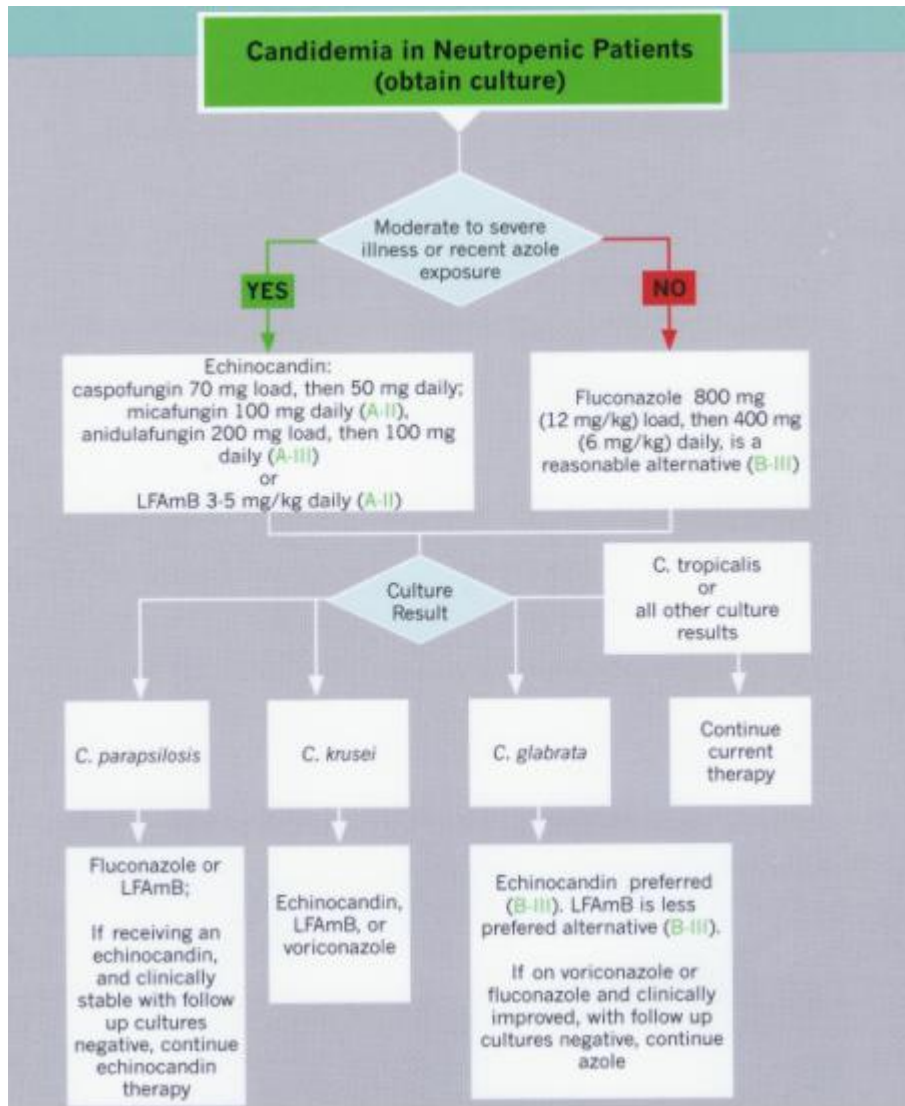


Central Nervous System Candidiasis		
Primary	Alternative	Comments
LFAmB 3-5 mg/kg +/- 5-FC 25 mg/kg <i>qid</i> for several wks, followed by fluconazole, 400-800 mg (6-12 mg/kg) daily (B-III)	Only when there is a specific contraindication to the use of LFAmB should fluconazole, 400-800 mg (6-12 mg/kg) daily, be considered for primary therapy.	Treat until all signs and symptoms, cerebrospinal fluid (CSF) abnormalities, and radiologic abnormalities have resolved. Removal of intraventricular devices is recommended.
Candida Endophthalmitis		
AmB-d 0.7-1 mg/kg +5-FC 25 mg/kg <i>qid</i> (A-III) or fluconazole 6-12 mg/kg daily (B-III) Surgical intervention for patients with severe endophthalmitis or vitreitis (B-III)	LFAmB 3-5 mg/kg daily; voriconazole 6 mg/kg <i>q12h</i> for two doses, then 3-4 mg/kg <i>q12h</i> ; or an echinocandin** (B-III)	Therapy x 4-6 wks as determined by repeated examinations to verify resolution. Diagnostic vitreal aspiration should be done if etiology unknown.
**Echinocandin dosing in adults is anidulafungin, 200 mg loading then 100 mg/d, caspofungin, 70 mg loading then 50 mg/d, and micafungin, 100 mg/d.		
Oropharyngeal Candidiasis		
Clotrimazole troches 10 mg 5 times daily; nystatin suspension or pastilles <i>qid</i> (B-II); or fluconazole 100-200 mg daily (A-I)	Itraconazole solution 200 mg daily; or posaconazole 400 mg daily (A-II); voriconazole 200 mg <i>bid</i> ; or AmB oral suspension (B-II); IV echinocandin** or AmB-d 0.3 mg/kg daily (B-II)	Fluconazole for moderate to severe disease; topical therapy with clotrimazole or nystatin for mild disease. Treat uncomplicated disease for 7-14 d. For refractory disease, itraconazole solution, voriconazole, posaconazole or AmB suspension, and rarely AmB-d or echinocandins is recommended.
**Echinocandin dosing in adults is anidulafungin, 200 mg loading then 100 mg/d, caspofungin, 70 mg loading then 50 mg/d, and micafungin, 100 mg/d.		
Chronic Disseminated Candidiasis		
Fluconazole 400 mg (6 mg/kg) daily for stable patients (A-III) LFAmB 3-5 mg/kg daily or AmB-d 0.5-0.7 mg/kg daily for severely ill patients (A-III) When stable, change to fluconazole (B-III)	An echinocandin for several wks followed by fluconazole (B-III)	Transition from LFAmB or AmB-d to fluconazole is favored after several wks in stable patients. Duration of therapy is until lesions resolve (usually months) and should continue through periods of immunosuppression (chemotherapy, transplantation).
Candida Isolated from Respiratory Secretions		
Therapy not recommended (A-III)		

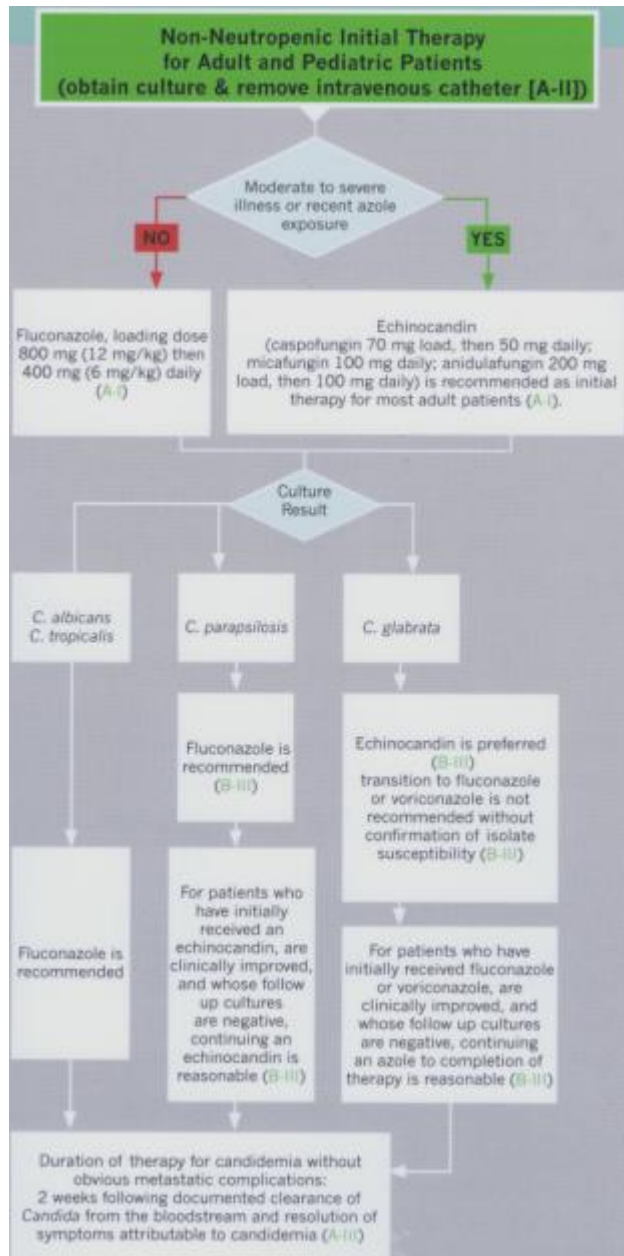
Annexe 6. Recommandations de traitement des candidoses du système nerveux central, des candidoses oropharyngées, des candidoses disséminées chroniques et des endophtalmies à *Candida* sp.  
(Source : IDSA 2010)



Annexe 7. Recommendations de traitement des infections du tractus urinaire à *Candida* sp.  
 (Source : IDSA, 2010)



**Annexe 8. Recommandations de traitement des candidémies chez les patients neutropéniques**  
 (Source : IDSA, 2010)



**Annexe 9. Recommandations de traitement des candidémies chez les patients non-neutropéniques.**  
(Source : IDSA, 2010)



# Serment

## des

### Apothicaire



**Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**

**FOURNIER Pierre**

**Impact de la consommation d'antifongiques sur *Candida* sp  
Etude dans un service de réanimation médicale de 2004 à 2009.**

## **RESUME**

Les levures appartenant au genre *Candida*, dont le chef de file est *Candida albicans*, sont les espèces les plus fréquemment incriminées dans les infections fongiques. Depuis les avancées médicales en matière de réanimation et de thérapeutiques immunosuppressives, l'incidence des infections fongiques invasives est en constante augmentation. De diagnostic clinique difficile, la mortalité élevée des candidoses profondes et des candidémies chez les patients fragilisés pousse les cliniciens à manier les antifongiques sans documentation immédiate. L'impact de ces antifongiques sur ces levures reste peu étudié.

Notre étude de 6 ans (2004-2009) dans un service de réanimation a pour but de déterminer l'impact de l'utilisation du fluconazole, de l'amphotéricine B, du voriconazole et de la caspofungine sur l'épidémiologie et sur la sensibilité aux antifongiques des *Candida* sp.

Sur la totalité des prélèvements (hors prélèvements cutanés), 1511 souches de *Candida* sp. ont été analysées provenant de 3391 patients. *C. albicans* représentait 52.5% des souches, *C. glabrata* 16.6%, *C. parapsilosis* 7.5%. La proportion de *C. parapsilosis* a augmenté significativement de 5.7% en 2004 à 12.5% en 2009 ( $p=0.0005$ ). La consommation de caspofungine a augmenté elle aussi significativement de 17.9 DDD/1000HD (Defined Daily Doses per 1000 Hospitalisation Days) en 2004 à 69.9 DDD/1000HD en 2009 ( $p<0.0001$ ). Toutes les souches testées restaient sensibles à la caspofungine avec toutefois une tendance à l'augmentation des souches de *C. parapsilosis* ayant des CMI entre 0.25 et 1 $\mu$ g/ml (de 63.6% en 2007 à 82.8% en 2009). Il existe une corrélation entre l'augmentation des CMI à la caspofungine de *C. parapsilosis* ( $p<0.0001$ ) et de *C. glabrata* ( $p=0.03$ ) avec l'augmentation de la consommation de caspofungine. La consommation de fluconazole est à la baisse sur la période étudiée ( $p<0.0001$ ) et nous avons mis en évidence une diminution des CMI des *C. albicans* entre 2007 et 2009 ( $p<0.001$ ). L'augmentation de la consommation d'amphotéricine B corrèle avec l'augmentation des CMI à l'amphotéricine B pour *C. albicans* ( $p=0.0002$ ) et *C. glabrata* ( $p=0.0005$ ).

Notre étude a donc objectivé une modification de l'épidémiologie au cours de cette période de 6 ans, ainsi qu'un impact de l'utilisation des molécules antifongiques sur la sensibilité aux antifongiques. Ces résultats devront être pris en considération dans l'établissement des recommandations à venir de bon usage des antifongiques. Le choix de la molécule utilisée en thérapeutique devra se faire suivant les recommandations émises, afin de limiter l'émergence des souches résistantes ou de sensibilité diminuée.

## **MOTS CLES**

Epidémiologie des *Candida* sp. , sensibilité aux antifongiques, consommation d'antifongiques, réanimation médicale.

## **JURY**

Dr. Danièle MAUBON  
Pr. Muriel CORNET  
Pr. Hervé PELLOUX  
Pr. Jean-François TIMSIT  
Dr. Luc FORONI

**DATE DE SOUTENANCE : Vendredi 23 septembre 2011**