

TEZĂ DE DOCTORAT

Cercetări clinice și de laborator în afecțiunile cutanate umane produse de ciuperci keratinofile filamentate la pacienții imunocompromiși

Rezumat

Doctorand: **Marius, Irimie**

Conducător de doctorat: **Alexandru, Tătaru**

Cluj-Napoca
2012



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	9
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	11
1. Epidemiologia infecțiilor dermatofitice.....	13
2. Agenții etiologici dermatofitici.....	16
3. Patogeneza infecției dermatofitice	22
4. Rolul sistemului imunitar în infecțiile dermatofitice	25
5. Forme clinice ale infecțiilor dermatofitice	27
6. Diagnosticul de laborator în infecțiile dermatofitice.....	31
8. Tratamentul infecțiilor dermatofitice	38
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....	43
1. Obiectivele generale ale studiului.....	45
2. Metodologia generală.....	46
3. STUDIUL 1. EVALUAREA TEHNICII MULTIPLEX PCR REAL-TIME ÎN DIAGNOSTICUL INFECȚIILOR CUTANATE CU CIUPERCI KERATINOFILE FILAMENTATE.....	49
3.1. Introducere.....	51
3.2. Obiective	53
3.3. Material și metodă.....	53
3.4. Rezultate.....	59
3.5. Discuții.....	65
3.6. Concluzii.....	73
4. STUDIUL 2. INFECȚIILE CUTANATE CU CIUPERCI KERATINOFILE FILAMENTATE LA PACIENȚII IMUNOCOMPROMIȘI.....	75
4.1. Introducere.....	77
4.2. Obiective	78
4.3. Material și metodă.....	78
4.4. Rezultate	81
4.5. Discuții.....	100
4.6. Concluzii.....	117
5. STUDIUL 3. EVALUAREA SENSIBILITĂȚII <i>IN VITRO</i> A DERMATOFIȚILOR LA CINCI AGENȚI ANTIFUNGICI UTILIZÂND METODA MICRODILUȚIILOR SUCCESIVE.....	119
5.1. Introducere.....	121
5.2. Obiective	122
5.3. Material și metodă.....	122
5.4. Rezultate	125
5.5. Discuții.....	133
5.6. Concluzii.....	142
Referințe	143

Cuvinte cheie: ciuperci filamentate keratinofile, dermatofiți, polymerase chain reaction, imunodepresie, antifungigrama, antifungice

INTRODUCERE

Dermatofitozele sunt definite ca infecții fungice superficiale ale pielii produse de ciuperci filamentate keratinofile (dermatofiți) grupate în trei genuri: *Trichophyton*, *Microsporum* și *Epidermophyton*. Dermatofiții sunt organisme ubicvitare putând fi întâlniți în orice regiune geografică și în orice grup populațional. Dermatofitozele sunt afecțiuni cutanate frecvente care reprezintă adevărate probleme de sănătate publică prin prevalența lor și prin morbiditățile asociate. Incidența lor este apreciată la aproximativ 20-25% din populația generală, și este într-o continuă creștere¹. În ultimul secol au fost înregistrate schimbări considerabile în ceea ce privește spectrul etiologic al infecțiilor dermatofitice. Factori favorizanți precum migrarea populației, industrializarea, îmbătrânirea populației sau creșterea incidenței unor afecțiuni precum diabetul zaharat, neoplaziile, infecția HIV, tulburările circulatorii, sau terapiile antibiotice și imunosupresoare au influențat profilul epidemiologic al infecțiilor dermatofitice. Cunoașterea tendințelor epidemiologice ale dermatofitozelor și a agenților lor cauzali poate permite punerea în aplicare a unor măsuri de sănătate publică care să oprească trendul crescător al acestor infecții.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Spectrul dermatofiților izolați din leziunile cutanate s-a schimbat mult în ultimii 100 de ani reflectând modificările socio-economice, ale stilului de viață și posibilitățile de migrație ale populației. Îmbunătățirea condițiilor de viață au fost asociate cu un declin al speciilor zoofile și o creștere a infecțiilor cu dermatofiți antropofili. *T. rubrum* este cel mai frecvent agent cauzal al tinea pedis, onicomicozei, tinea cruris și tinea corporis în întreaga lume. În Europa, îndeosebi în țările mediteraneene, incidența infecției cu *M. canis* a crescut puternic în ultimele decade, devenind o problemă epidemiologică importantă. Cunoașterea a speciilor dermatofitice predominante oferă o înțelegere mai clară a factorilor de risc pentru infecții fungice superficiale și a tendințelor epidemiologice viitoare.

Infecțiile dermatofitice sunt în general superficiale, dar la indivizii imunocompromiși pot cauza infecții diseminate severe². Manifestările infecției sunt întotdeauna rezultatul interacțiunii dintre fungul patogen și mecanismele de apărare ale gazdei³. În timpul infecției dermatofitice responsabilă pentru modularea bolii dermatofitice se consideră că este imunitatea mediată celular⁴ iar antigenele dermatofitice activează limfocitele T supresoare și T helper⁵. Mulți agenți patogeni care în mod normal produc infecții cutanate localizate,

autolimitante, pot avea o morbiditate și o mortalitate ridicată la indivizii imunocompromiși^{6, 7}.

În prezent testele de laborator de rutină ale dermatofitozelor includ evidențierea structurilor fungice prin examenul microscopic direct al mostrelor clinice și identificarea macroscopică și microscopică a speciilor dermatofitice din culturile *in vitro* crescute pe mediul Sabouraud. Examinarea microscopică directă deși este o metodă rapidă și ieftină are dezavantajul unei rate de rezultate fals negative de 15-30%^{8,9} și nu are o specificitate de specie. Culturile *in vitro* permit o identificare specifică a speciilor dermatofitice în aproximativ 10-15 zile dar, pentru anumite specii atipice sau cu creștere lentă, timpul de identificare poate crește la 3-4 săptămâni¹⁰. Sensibilitatea culturii este destul de redusă, de aproximativ 70%, în special în cazul infecțiilor părului și unghiilor¹¹ iar rata rezultatelor fals pozitive și fals negative este destul de ridicată. În acest context devine evidentă necesitatea unei metode simple și rapide de diagnostic a infecțiilor cutanate cu dermatofiți bazată pe tehnici de biologie moleculară.

Profilaxia antifungică și tratamentele empirice au condus la apariția unor modificări epidemiologice importante precum dezvoltarea unor tulpini dermatofitice cu rezistență secundară la antifungice și înlocuirea unor specii dermatofitice sensibile cu altele cu rezistență intrinsecă¹². Creșterea frecvenței infecțiilor dermatofitice și faptul că unii pacienți nu au un răspuns favorabil la terapia antimicotică sistemică au impus testarea unor noi strategii terapeutice^{13, 14}. Reușita tratamentului depinde de capacitatea de a alege antimicoticul potrivit pentru eradicarea infecției dermatofitice. Pentru a anticipa această capacitate, îndeosebi la pacienții imunodeprimați, testarea sensibilității *in vitro* devine absolut necesară ajutând clinicianul în alegerea tratamentului corect.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Obiectivele studiului

În acest studiu ne-am propus atingerea următoarelor obiective:

1. Evaluarea frecvenței formelor clinice de infecții dermatofitice la pacienții studiați;
2. Evaluarea incidenței infecției cu ciuperci filamentate keratinofile și identificarea speciilor dermatofitice responsabile la pacienții imunocompromiși;
3. Evaluarea acurateței *multiplex polymerase chain reaction real-time* în diagnosticul infecțiilor cutanate cu ciuperci keratinofile filamentate;

4. Identificarea frecvenței diferitelor specii de ciuperci keratinofile filamentate implicate în declanșarea infecțiilor dermatofitice în județul Brașov;
5. Determinarea sensibilității ciupercilor keratinofile filamentate la substanțele antimicotice utilizate în tratamentul sistemic al dermatofitiilor.

2. Metodologia generală

Studiul s-a adresat pacienților cu suspiciunea de infecții cutanate dermatofitice care au fost consultați în ambulatoriul de dermatologie Brașov sau internați în Spitalul Clinic Județean de Urgență din Brașov (secțiile de dermatologie, oncologie, nefrologie, diabet-boli de nutriție, boli infecțioase) în perioada 01.05.2009-30.04.2011. Studiul a fost unul prospectiv, longitudinal, de tip observațional, efectuat cu consimțământul informat al pacienților. De la fiecare pacient inclus în studiu s-a recoltat material patologic de la nivelul leziunilor cutanate: scuame, fragment unghial sau fire de păr. Au fost recoltate astfel 681 de mostre clinice (351 probe de raclaj subunghial, 307 probe scuame și 23 de păr) de la 638 de pacienți. Fiecare mostră a fost divizată în trei părți egale: una pentru efectuarea examenului microscopic direct, una pentru efectuarea culturii pe mediul Sabouraud și una pentru analizarea prin tehnica PCR RT, cea din urmă fiind păstrată la -20°C până la efectuarea procedurii PCR.

3. Studiul 1. Evaluarea tehnicii multiplex PCR RT în diagnosticul infecțiilor cutanate umane cu ciuperci filamentate keratinofile

Material și metodă

În primul studiu al lucrării pentru determinarea specificității și sensibilității tehnicii multiplex PCR real-time (PCR RT) au fost examinate 681 de mostre clinice: 351 probe de raclaj subunghial, 307 probe scuame și 23 de păr. Fiecărei probe prelevate i s-a efectuat atât testul diagnostic de referință (examenul microscopic direct și cultura pe mediul Sabouraud) cât și cel de cercetat (PCR RT). Extragerea ADN din probele clinice a fost efectuată utilizând kitul de extracție QiaAmp DNA (Germania) după o prealabilă predigestie enzimatică cu proteinaza K. Ținta reacției PCR RT a fost regiunea ITS1 localizată între genele care codifică regiunile 18S și 5.8S a rARN-ului. Primerii specifici dermatofitiilor și sondele pentru hibridizare (fiecare constând dintr-o sondă ancoră și o sondă senzor) au fost alese utilizând serverele *Center for Biotechnology Information* și *Multalin*. Sondele au fost marcate cu fluorocromi: la capătul 3' cu fluoresceină (FL-520), iar la capătul 5' cu LC Red 610, LC Red 640, LC Red 670 sau LC Red 705. Sondele ancoră au fost desemnate să fie

complementare secvențelor ITS1 ale două sau trei specii dermatofitice, în timp ce sondele sensor să fie complementare doar unei anumite specii dermatofitice, tehnica permițând astfel detectarea și identificarea a până la 3 specii diferite din aceeași probă pe baza curbelor de topire diferite. Programul de polimerizare a fost efectuat pe platforma LightCycler 2.0 (Roche®). Prezența curbelor de amplificare în canalele 610, 640, 670 și 705 nm ale LightCycler, în conjuncție cu o curbă de topire cu o anumită temperatură de topire și o amplitudine a vârfului temperaturii de topire $\geq 0,01$ au fost considerate ca rezultate pozitive pentru o anumită specie dermatofitică. Specificitatea tehnicii PCR RT a fost analizată utilizând 10 tulpini dermatofitice de referință obținute de la CBS Fungal Biodiversity Centre (Olanda). Pentru a determina sensibilitatea PCR RT a fost preparată o soluție master de acizi nucleici izolați de la șase tulpini dermatofitice de referință care au fost selectate pentru a fi testate în toate canalele de fluorescență.

Rezultate

Prezența dermatofiților în probele examinate prin metodele tradiționale de examen micologic (examen microscopic și cultură) a fost decelată în 28,48% dintre probele testate. Per total s-a dovedit că examenul microscopic direct a avut o sensibilitate mai ridicată decât cultura, identificându-se filamente miceliene sau spori la 27,6% dintre probe, în timp ce cultura a fost diagnostică în doar 23,6% dintre probe. Valoarea predictivă pozitivă a examenului microscopic direct a fost de 87,44% iar a culturii de 98,7%. Valoarea predictivă negativă a testelor clasice a fost de 96,78% pentru examenul microscopic direct și de 91,89% pentru cultură. La cultura pe mediul Sabouraud au fost identificați 137 de dermatofiți aparținând genului *Trichophyton* (*T. rubrum* în 117 probe, *T. interdigitale* în 17 probe, *T. asteroides* într-un caz, *T. quinckeanum* în 2 cazuri), 20 din genul *Microsporum* (*M. canis* în 19 probe și *M. audouinii* într-o probă) și 4 din genul *Epidermophyton* (*E. floccosum* în 4 probe). La cultura pe mediul Sabouraud au putut fi identificate 6 cazuri de asociere a infecției dermatofitice cu cea levrucă, în 41 cazuri a existat o infecție izolată cu *Candida albicans*, iar în 3 probe au fost izolate mucegaiuri non-dermatofitice.

Sensibilitatea tehnicii PCR RT a fost de 97,5% mai ridicată decât a metodelor clasice de diagnostic micologic. PCR RT a avut o specificitate de 100%, o valoare predictivă pozitivă de 100% și o valoare predictivă negativă de 98,96%. PCR RT a realizat o creștere semnificativă (22,9%) a ratei de identificare a dermatofiților în mostrele clinice comparativ cu cultura ($p < 0.0001$). Tehnica PCR real-time a avut valoare diagnostică în 198 de probe fiind identificate 170 specii ale genului *Trichophyton* (*T. rubrum* în 146 probe, *T. interdigitale* în 21 probe), 23 ale genului *Microsporum* (*M. canis* în 22 probe și *M. audouinii* într-o probă) și 5 ale genului *Epidermophyton* (*E. floccosum* în 5

probe). *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. verrucosum* și *M. ferugineum* care au fost incluși în această tehnică de detectare PCR nu au fost identificați în nici o probă.

Concordanța la nivel de gen între rezultatele culturii și cele ale PCR RT a fost de 100%, iar la nivel de specie a fost de 95,65%. Deși prin cultură nu a fost identificată nici o infecție dermatofitică mixtă prin tehnica PCR RT au fost detectate două cazuri de asociere a infecțiilor lamei unghiale cu *T. rubrum* și *T. interdigitale*. În 18,6% dintre probe la care pe cultură au crescut non-dermatofiți, prin PCR RT s-a putut detecta și un dermatofit.

Per total 23,9% din probele cu prelevat subunghial, 34,52% dintre probele de scuame și 34,78% dintre probele de păr au fost pozitive pentru dermatofiți utilizând tehnica PCR RT comparativ cu 18,8% din probele de unghie, 28,66% din probele de piele și 30,4% dintre mostrele de păr utilizând cultura pe mediul Sabouraud.

Concluzii

Conform rezultatelor studiului de evaluare a acurateții de diagnostic a infecțiilor dermatofitice prin tehnica multiplex PCR real-time putem susține următoarele concluzii: metoda multiplex PCR real-time a avut o sensibilitate (97,5%) și o specificitate (100%) superioară tehnicilor convenționale de diagnostic al infecțiilor dermatofitice realizând și o creștere semnificativă a ratei de detecție a dermatofiților direct din mostrele clinice comparativ cu cultura ($p < 0.0001$), având o valoare predictivă pozitivă de 100% și o valoare predictivă negativă de 98,96%. Deși PCR real-time pare a fi mai scumpă decât cultura pe mediul Sabouraud, diferența de cost nu este foarte mare, PCR putând înlocui ambele metode clasice de diagnostic micologic, și este justificată utilizarea tehnicii PCR real-time de rutină și în laboratoarele clinice.

4. Studiul 2. Infecțiile cutanate cu ciuperci filamentate keratinofile la pacienții imunocompromiși

În acest studiu ne-am propus să evaluăm incidența infecțiilor cu ciuperci filamentate keratinofile, speciile cauzatoare și formele clinice ale acestora la pacienții imunocompromiși.

Material și metodă

Studiul s-a adresat pacienților cu diverse afecțiuni care asociază o scădere a răspunsului imun (neoplazii, infecție HIV, diabet zaharat, insuficiență renală cronică, hepatită cronică, ciroză hepatică, malnutriție, alcoolism cronic, tuberculoză, transplant de organ, tratamente imunosupresoare), consultați pentru infecții cutanate cu ciuperci keratinofile filamentate (dermatofiți) în ambulatoriul de dermatologie sau internați în Spitalul Clinic Județean de Urgență Brașov. De asemenea a fost creat un lot martor format din pacienți

imunocompetenți care prezentau semne ale unei infecții dermatofitice. Au fost astfel incluși în studiu 351 de pacienți (152 bărbați și 199 femei) diagnosticați cu diverse afecțiuni imunodeprimante, cu vârsta cuprinsă între 8 și 87 ani (vârsta medie 55,18 ani), și un lot martor de control cuprinzând 287 pacienți imunocompetenți (125 bărbați și 162 femei) cu vârsta cuprinsă între 5 și 91 de ani (vârsta medie 54,59 ani).

Rezultate

Prevalența infecțiilor dermatofitice a fost de 33,9% în lotul pacienților imunocompromiși și respectiv de 29,27% în lotul martor ($p=0.2111$; OR 1.24). Tinea unguium a fost forma clinică cea mai frecventă a dermatofitiilor atât în lotul pacienților imunocompromiși cât și în cel al subiecților imunocompetenți, cu o prevalență de 15,95% și respectiv 12,54% din totalul subiecților investigați. Următoarele forme clinice în ordinea frecvenței au fost: tinea pedis (8,26% și respectiv 9,06%), tinea cruris (3,13% și respectiv 2,78%), tinea corporis (3,98% și respectiv 2,44%), tinea manum (0,85% și respectiv 0,7%), tinea feței (0,57% și respectiv 1,04%), tinea capitis (0,57% și respectiv 0,7%) și tinea barbae (0,57% și respectiv 0%). Procentele formelor clinice ale dermatofitiilor în cele două loturi de subiecți imunocompromiși și imunocompetenți au fost relativ egale, cu excepția tinea unguium ($p=0.22$; OR=1.32) și tinea corporis ($p=0.27$; OR=1.66) care au fost mai frecvente la subiecții imunocompromiși.

T. rubrum a fost principalul agent cauzator al infecțiilor dermatofitice în toate subgrupurile populaționale studiate cu un procent total de 72,9%, fiind urmat de *T. interdigitale* cu 11,8%, *M. canis* cu 10,8%, *E. floccosum* cu 2,46%, *T. quinckeanum* cu 0,98%, *M. audouinii* cu 0,48% și *T. asteroides* cu 0,48%. Procentele infecțiilor cu o anumită specie dermatofitică au fost asemănătoare în cele două loturi, o ușoară diferență observându-se doar pentru *T. rubrum* (mai mare în lotul de studiu; 74,79% față de 70,23%) și a *T. interdigitale* (mai mare în lotul martor; 14,28% față de 10,08%), diferența nefiind semnificativă statistic ($p>0.05$).

În rândul pacienților diabetici a fost găsită o asocieră semnificativă statistic între vârsta de peste 50 de ani și rata infecțiilor dermatofitice ($p=0.0016$; OR=3.83; RR=2.7). Durata DZ nu pare să fie un factor predispozant al infecțiilor dermatofitice nici la subiecții cu DZ tip 1 ($p=1$, OR=1, RR=1) și nici la cei cu DZ tip 2 ($p=0.72$, OR=1.14, RR=1.09). Valoarea Hb A1c s-a corelat cu prezența infecției dermatofitice doar la subiecții cu DZ de tip 2 ($p=0.59$, OR=1.22, RR=1.069). Studiul complicațiilor metabolice și degenerative asociate DZ a evidențiat o asocieră semnificativă statistic între boala arterială periferică a membrelor inferioare ($p=0.0422$; RR=1.57; OR=2.03), și prezența dermatofitiilor la acest nivel, și între neuropatia periferică și infecțiile

dermatofitice ($p=0.0255$; $RR=1.67$; $OR=2.11$). Tinea unguium și tinea pedis au reprezentat cele mai frecvente forme de manifestare a infecției dermatofitice la pacienții diabetici cu o prevalență de 46,55% și respectiv 27,58%. *T. rubrum* a fost agentul etiologic dermatofitic cel mai frecvent al tinea unguium (88,8%), tinea pedis (87,5%), tinea manum (100%) și tinea cruris (66,67%), iar *M. canis* a fost izolat în majoritatea cazurilor de tinea corporis (80%) diagnosticate la pacienții cu DZ.

Rata infecțiilor dermatofitice la pacienții cu neoplazii a fost de 30,4% observându-se o frecvență mult mai ridicată a infecțiilor dermatofitice la pacienții cu neoplazii hematologice (55,5%) comparativ cu cei cu cancere solide (24,3%) ($OR=3.88$; $p=0.1$). Aspectul clinic al dermatofitiilor la pacienții cu neoplazii a îmbrăcat forma tinea unguium în 50% din cazuri, a tinea pedis la 28,5% dintre pacienți, a tinea corporis, tinea capitis și tinea cruris la câte 7,14% din cazuri. *T. rubrum* a fost dermatofitul cel mai frecvent izolat în 78,5% din cazuri fiind urmat de *T. interdigitale*, *M. canis* și *E. floccosum* fiecare în 7% din cazuri.

Dintre cei 29 pacienți hemodializați, în urma investigațiilor micologice, au rezultat probe pozitive pentru dermatofiți la 41,38% dintre aceștia. Incidența infecțiilor dermatofitice nu s-a corelat cu durata de evoluție a IRC și nici cu durata de efectuare a hemodializei ($OR=1$; $RR=1$; $p=ND$), în schimb prezența DZ ca și cauză a IRC a constituit un factor de risc independent pentru apariția infecțiilor dermatofitice ($OR=2$; $RR=1.5$; $p=0.3622$). Au fost diagnosticate infecții dermatofitice la 31,25% dintre pacienții infectați cu HIV. Incidența infecțiilor dermatofitice s-a corelat atât cu durata de evoluție a infecției HIV ($OR=1,8$; $RR=1,5$), cât și cu scăderea numărului de limfocite CD₄ ($OR=1,8$; $RR=1,5$), în schimb nivelul viremiei nu a constituit un factor de risc independent pentru apariția infecțiilor dermatofitice ($OR=0,52$; $RR=0,67$; $p=ND$). 36,36% dintre pacienții cu terapii imunosupresoare prezentau infecții dermatofitice ($OR=1.24$; $p=0.61$). Incidența infecțiilor dermatofitice s-a corelat cu durata terapiei imunosupresoare ($OR=1,48$; $RR=1,28$ $p=0.5323$). O asociere semnificativă statistic între tipul medicației imunosupresoare și apariția infecțiilor dermatofitice a fost găsită doar în cazul tratamentului cu metotrexat ($OR=1.68$; $p=0.22$). De asemenea a fost calculată frecvența infecțiilor dermatofitice în rândul pacienților cu boli hepatice cronice (27,77%), cu malnutriție (33,33%), cu tuberculoză (50%) și cu sindrom Down (66,7%) dar numărul pacienților a fost prea redus pentru a avea semnificație statistică.

Concluzii

Prevalența infecțiilor dermatofitice în lotul pacienților imunocompromiși a fost de 33,9% comparativ cu 29,27% în lotul martor

(OR=1.24; p=0.21), iar tinea unguium a fost forma clinică cea mai frecventă a dermatofitiilor în lotul pacienților imunocompromiși cu o prevalență de 15,95% din totalul subiecților investigați, fiind urmată de tinea pedis cu 8,26%. *T. rubrum* a fost principalul agent cauzator al infecțiilor dermatofitice în toate subgrupurile populaționale studiate cu un procent total de 72,9%, fiind urmat de *T. interdigitale* cu 11,8%, *M. canis* cu 10,8%, *E. floccosum* cu 2,46%, *T. quinckeanum* cu 0,98%, *M. audouinii* cu 0,48% și *T. asteroides* cu 0,48%.

5. Studiul 3. Evaluarea sensibilității in vitro a dermatofitelor la cinci agenți antifungici utilizând metoda microdiluțiilor succesive

Creșterea frecvenței infecțiilor dermatofitice și faptul că unii pacienți nu au un răspuns favorabil la terapia antimicotică sistemică au impus testarea unor noi strategii terapeutice. Scopul principal al acestui studiu a fost evaluarea sensibilității dermatofitelor la substanțele antimicotice utilizate uzual în tratamentul sistemic al dermatofitiilor (ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, terbinafină).

Material și metodă

Testarea sensibilității antidermatofitice a fost efectuată utilizând o metoda microdiluțiilor succesive în mediu de cultură lichid. Au fost analizate 163 probe clinice provenite de la pacienții care au fost consultați cu suspiciunea de a avea infecții dermatofitice ale pielii, unghiilor sau firelor de păr (117 au fost reprezentate de *T. rubrum*, 20 de *T. interdigitale*, 19 de *M. canis*, 4 de *E. floccosum*, 2 de *T. quinckeanum* și 1 de *T. asteroides*). Pentru testarea *in vitro* a sensibilității dermatofitelor au fost folosite 5 substanțe antimicotice: ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol și terbinafină. Mediul utilizat pentru efectuarea testului de sensibilitate în microdiluții a fost RPMI 1640. Pentru fiecare substanță antimicotică au fost efectuate 10 diluții succesive (1:2). Plăcile de microdiluție cu 96 godeuri cu fundul plat au fost incubate la 30°C timp de 7 zile. Rata creșterii în fiecare godeu a fost evaluată vizual zilnic pe baza comparației cu creșterea în godeurile conținând doar substanța antimicotică și cele fără medicament. Pentru fiecare asociere specie dermatofitică-medicament a fost calculată media geometrică a CMI pentru a facilita compararea cu CMI₅₀ (CMI care inhibă creșterea a 50% dintre probe) și CMI₉₀ (CMI la care 90% dintre probe sunt inhibate).

Rezultate

Luând în considerare toate speciile dermatofitice cărora li s-a determinat sensibilitatea la antifungice, CMI medie pentru cele cinci antifungice a fost: 0,334±0,39 μg/ml pentru ketoconazol, 0,132±0,12 μg/ml pentru itraconazol,

8,9±5,2 μg/ml pentru fluconazol, 0,163±0,06 μg/ml pentru voriconazol și 0,013±0,007 μg/ml pentru terbinafină. Terbinafina a avut cea mai bună activitate antifungică fiind urmată de itraconazol și voriconazol ($p < 0.05$). De asemenea CMI₅₀ și CMI₉₀ ale terbinafinei au avut cele mai mici valori dintre cele cinci antifungice pentru toți dermatofii testați: 0,012±0,004 μg/ml și respectiv 0,025±0,0188 μg/ml. În schimb, activitatea antidermatofitică a fluconazolului a fost cea mai redusă cu o CMI medie de 8,946±5,2 μg/ml. Nu au fost observate diferențe semnificative statistic ($p > 0.05$) între valorile medii ale CMI medii pentru ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol și terbinafină, între cele două grupuri de pacienți imunocompromiși și respectiv imunocompetenți. Activitatea antifungică împotriva dermatofitelor identificați în ambele grupuri de pacienți poate fi rezumată astfel: terbinafina > itraconazol > voriconazol > ketoconazol > fluconazol. Au fost înregistrate 4 cazuri de rezistență a dermatofitelor față de fluconazol (2 tulpini de *T. interdigitale* și 2 de *M. canis*) și unul față de ketoconazol (1 tulpină *T. interdigitale*). Trei dintre cei patru pacienți (2 cu DZ, 1 cu neoplazie, 1 cu infecție HIV) de la care s-au izolat tulpinile rezistente la fluconazol au mai urmat anterior tratamente cu fluconazol pentru infecții candidozice.

Analizând sensibilitatea dermatofitelor izolați de la pacienții cu DZ, cu neoplazii, cu IRC, cu infecție HIV, cu terapii imunosupresoare, cu boli hepatice cronice, malnutriți, cu tuberculoză, s-a observat că CMI medii ale tuturor celor cinci antifungice au valori egale sau mai mari decât cele determinate la dermatofii selectați de la subiecții grupului martor diferența nefiind semnificativă statistic ($p > 0.05$). Variațiile profilului de activitate ale fiecărei specii dermatofitice în parte la substanțele antifungice este mai mare la subiecții imunocompromiși.

Concluzii

Pentru toate speciile dermatofitice testate terbinafina a avut cea mai bună activitate antidermatofitică, iar fluconazolul a avut activitatea antidermatofitică cea mai redusă. Clasificarea globală pentru toate speciile dermatofitice a activității antifungice a celor cinci antimicotice studiate a fost terbinafină > itraconazol > voriconazol > ketoconazol > fluconazol. Au fost înregistrate și patru cazuri de rezistență a dermatofitelor față de fluconazol (2 tulpini de *T. interdigitale* și 2 de *M. canis*) și unul față de ketoconazol (1 tulpină *T. interdigitale*); 4 au fost în lotul pacienților imunocompromiși (2 cu DZ, 1 cu neoplazie, 1 cu infecție HIV) și unul în lotul martor. Luând în considerare toate speciile dermatofitice izolate, nu au fost observate diferențe semnificative statistic ($p > 0.05$) între sensibilitatea tulpinilor dermatofitice izolate de la pacienții imunocompromiși și cea obținută de la pacienții lotului martor.

Referințe

- ¹ Vander Straten MR, Hossain MA, Ghannoum MA. Cutaneous infections dermatophytosis, onychomycosis, and tinea versicolor. *Infect Dis Clin North Am.* 2003 Mar;17(1):87-112.
- ² Rodwell GEJ, Bayles CL, Towersey L, Aly R. The prevalence of dermatophyte infection in patients infected with human immunodeficiency virus. *International Journal of Dermatology* 2008; 47(4):339-43.
- ³ Quatresooz P, Piérard-Franchimont C, Arrese JE, Piérard GE. Clinicopathologic presentations of dermatomycoses in cancer patients. *JEADV* 2008;22:907-917.
- ⁴ Almeida SR. Immunology of dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008;166(5-6):277-283.
- ⁵ Calderon RA. Immunoregulation of dermatophytosis. *Critical Reviews in Microbiology* 1989;16(5):339-69.
- ⁶ Odom RB. Common superficial fungal infections in immunosuppressed patients. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31: S56-S59.
- ⁷ Elewski EB, Sullivan J. Dermatophytes as opportunistic pathogens. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30(6): 1021-1022.
- ⁸ Machouart-Dubach M, Lacroix C, de Chauvin MF, Le Gall I, Giudicelli C, Lorenzo F, Derouin F. Rapid discrimination among dermatophytes, *Scytalidium spp.*, and other fungi with a PCR-restriction fragment length polymorphism method. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):685-90.
- ⁹ Liu HN, Lee DD, Wong CK. KONCPA: a new method for diagnosing tinea unguium. *Dermatology* 1993; 187: 166-8.
- ¹⁰ Rippon J.W. Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Philadelphia. (1988).
- ¹¹ Bergmans AM, Schouls LM, van der Ent M, Klaassen A, Bohm N, Wintermans RG. Validation of PCR-reverse line blot, a method for rapid detection and identification of nine dermatophyte species in nail, skin and hair samples. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 778-788.
- ¹² Roberts DT, Taylor WD, Boyle J. Guidelines for treatment of onychomycosis. *Br J Dermatol.* 2003; 148:402-10.
- ¹³ Odds, F., J. Ausma, F. Van Gerven, F. Woestenborghs, L. Meerpoel, J. Heeres, H. Vanden Bossche, and M. Borgers. In vitro and in vivo activities of the novel azole antifungal agent r126638. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:388-391.
- ¹⁴ Tatsumi, Y., M. Yokoo, H. Senda, and K. Kakehi. Therapeutic efficacy of topically applied KP-103 against experimental tinea unguium in guinea pigs in comparison with amorolfine and terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3797-3801.

PhD THESIS

Clinical and laboratory research in human skin diseases caused by keratinophilic filamentous fungi in immunocompromised patients

Summary

PhD Student: **Marius, Irimie**

PhD Supervisor: **Alexandru, Tătaru**

Cluj-Napoca
2012



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Contents

INTRODUCTION	9
CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE	11
1. Epidemiology	13
2. Etiologic agents	16
3. Pathogenesis of dermatophytic infection.....	22
4. The role of immune system in dermatophytic infections	25
5. Clinical forms of dermatophytic infections	27
6. Laboratory diagnosis of dermatophytic infections	31
7. Dermatophytic infections therapy	38
PERSONAL CONTRIBUTION	43
1. Objectives of the study.....	45
2. The general methodology.....	46
3. Study 1. Evaluation of multiplex PCR real-time assay in the diagnosis of human skin infections with keratinophilic filamentous fungi	49
3.1. Introduction	51
3.2. Objective	53
3.3. Materials and methods.....	53
3.4. Results	59
3.5. Discussion	65
3.6. Conclusions	73
4. Study 2. Keratinophilic filamentous fungal skin infections in immunocompromised patients	75
4.1. Introduction	77
4.2. Objective	78
4.3. Materials and methods.....	78
4.4. Results	81
4.5. Discussion	100
4.6. Conclusions.....	117
5. Study 3. Evaluation of <i>in vitro</i> susceptibility of dermatophytes to five antifungal agents using successive microdilution method	119
5.1. Introduction	121
5.2. Objective	122
5.3. Materials and methods.....	122
5.4. Results	125
5.5. Discussion	133
5.6. Conclusions	142
References	143

Key words: filamentous keratinophilic fungi, dermatophytes, polymerase chain reaction, immunodepression, antifungigram, antifungals

INTRODUCTION

Dermatophytosis are defined as superficial fungal infections of the skin caused by keratinophilic filamentous fungi (dermatophytes) grouped into three genera: *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton*. Dermatophytes are ubiquitous organisms can be found in any geographical region and in any population. Dermatophytosis are common skin conditions that represent a serious public health problem in their prevalence and associated morbidity. Their incidence is estimated to be about 20-25% of the general population, and there is a continuous increasing¹.

In the last century, there were considerable changes in the etiologic spectrum of dermatophytic infections. Predisposing factors such as population migration, industrialization, population aging and increased incidence of diseases such as diabetes, cancer, HIV infection, circulatory disorders, or antibiotics and immunosuppressive therapies have influenced the epidemiological profile of dermatophytic infection. Knowledge of epidemiological trends of dermatophytosis and their causative agents may allow the implementation of public health measures to stop the trend of these infections.

CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE

Spectrum of dermatophytes isolated from skin lesions has changed over the last 100 years reflecting the socio-economic and lifestyle changes and population migration possibilities. Improving life conditions have been associated with a decline zoophilic species and an increase in infections with antropophilic dermatophytes. *T. rubrum* is the most common causative agent of tinea pedis, onychomycosis, tinea cruris and tinea corporis worldwide. In Europe, especially in Mediterranean countries, the incidence of *M. canis* infection has risen sharply in recent decades, becoming an important epidemiological problem. Knowledge of predominant dermatophytic species provides a clearer understanding of risk factors for superficial fungal infections and future epidemiologic trends.

Dermatophytic infections are usually superficial, but in immunocompromised individuals can cause severe disseminated infections². Manifestations of infection are always the result of interaction between fungal pathogens and host defenses³. During dermatophytic infection responsible for modulation dermatophytic disease is considered to be cell-mediated immunity⁴ and dermatophytic antigens activate T suppressor and T helper cells⁵. Many

pathogens that normally cause localized self-limiting skin infections, may have a high morbidity and mortality in immunocompromised individuals^{6,7}.

Currently routine laboratory tests of dermatophytosis include fungal structures identification by direct microscopic examination of clinical samples and macroscopic and microscopic identification of dermatophytic species in vitro cultures grown on Sabouraud medium. Although direct microscopic examination is a fast and cheap method has the disadvantage of false negative rate of 15-30%^{8,9}, and is not species specific. *In vitro* cultures allow specific identification of dermatophytic species in about 10-15 days but in certain atypical or slow-growing species, identification time increased to 3-4 weeks¹⁰. Sensitivity of culture is quite low, about 70%, especially in hair and nail infections¹¹, and the rate of false positives and false negatives results is quite high. In this context, it becomes obvious need for a simple and rapid method for the diagnosis of cutaneous infections with dermatophytes based on molecular biology techniques.

Antifungal prophylaxis and empirical treatment have led to important epidemiological changes and development of dermatophytic strains with secondary resistance to antifungal and replacement of sensitive dermatophytic species with others with intrinsic resistance¹². Increased dermatophytic infections and that some patients do not have a favorable response to systemic antimycotic therapy imposed testing new therapeutic strategies^{13,14}. The success of treatment depends on the ability to choose the antimycotics according to eradicate dermatophytic infection. To anticipate this capability, especially in immunocompromised patients, in vitro susceptibility testing is absolutely necessary to help clinicians in choosing the right treatment.

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Objectives of the study

In this study, we aimed to achieve the following objectives:

1. Assessment the frequency of clinical forms of dermatophytic infections in patients studied;
2. Assessment of incidence of keratinophilic filamentous fungi infection and identification of responsible dermatophytic species in immunocompromised patients;
3. Assessment the accuracy of multiplex real-time polymerase chain reaction in the diagnosis of fungal skin infections with keratinophilic filamentous fungi;
4. Identification of frequency of various species of keratinophilic filamentous fungi involved in triggering dermatophytic infections in Braşov area;

5. Determination of keratinophilic filamentous fungi sensitivity to antifungal substances used to treat dermatophytosis.

2. The general methodology

The study addressed patients with suspected dermatophytic skin infections that were consulted in dermatology ambulatory from Braşov or hospitalized in County Emergency Hospital of Braşov (departments of dermatology, oncology, nephrology, diabetes and nutrition diseases, infectious diseases) from 01.05.2009 to 30.04.2011. The study was a prospective, longitudinal, observational type conducted with informed consent of patients. From each patient included in the study was collected pathological material from skin lesions: scales, nail or hair pieces. Such were collected 681 clinical samples (351 samples subungual curettage, 307 scales and 23 hair samples) from 638 patients. Each sample was divided into three equal parts: one for direct microscopic examination, one for culture on Sabouraud medium and one for analysis by PCR real-time, the latter being kept at -20° C to performing the PCR.

3. Study 1. Evaluation of multiplex PCR real-time assay in the diagnosis of human skin infections with keratinophilic filamentous fungi

Materials and methods

In the first study of this paper to determine the specificity and sensitivity of real-time multiplex PCR technique were examined 681 clinical samples: 351 subungual curettage samples, 307 scales samples and 23 hair samples. To each sample was performed both diagnostic tests: reference tests (direct microscopic examination and culture on Sabouraud medium) and the investigated test (RT PCR). DNA extraction from clinical samples was performed using QiaAmp DNA extraction kit (Germany) after prior enzymatic predigestion with proteinase K. RT PCR target was ITS1 region located between genes encoding 18S and 5.8S regions of rARN. Specific primers and probes for hybridization (each consisting of an anchor probe and a sensor probe) were selected using servers Center for Biotechnology Information and Multalin. Probes were labeled with fluorochromes: at the 3' end with fluorescein (FL-520), and at the 5' end with LC Red 610, Red LC 640, LC Red 670 or LC Red 705. Anchor probes were designed to be complementary to ITS1 sequences of two or three species of dermatophytes, while sensor probes complementary to only a certain dermatophytic species, thus technique allowing detection and identification up to 3 different species of the same sample on different melting curves. The polymerization was carried out on the platform LightCycler 2.0

(Roche®). The presence of amplification curves in channels 610, 640, 670 and 705 nm of the LightCycler, in conjunction with a specific melting curve with certain melting temperature and a melting temperature peak amplitude ≥ 0.01 were considered as positive for certain dermatophytic species. RT PCR specificity was analyzed using 10 reference strains obtained from dermatophytic CBS Fungal Biodiversity Centre (Netherlands). To determine the sensitivity of RT PCR a master solution nucleic acids isolated from six reference dermatophytic strains was prepared and were selected for testing in all fluorescence channels.

Results

The presence of dermatophytes in samples examined by traditional mycological examination (microscopy and culture) was detected in 28.48% of samples tested. Overall, it appeared that direct microscopic examination had a higher sensitivity than culture, identifying filaments mycelia or spores in 27.6% of samples, while culture was diagnostic in only 23.6% of the samples. Positive predictive value of direct microscopic examination was 87.44% and the culture was 98.7%. Negative predictive values of classic tests were 96.78% for directly microscopic examination and 91.89% for culture. To culture on Sabouraud medium were identified 137 dermatophytes belonging to the genus *Trichophyton* (*T. rubrum* in 117 samples, *T. interdigitale* in 17 samples, *T. asteroides* in one case *T. quinckeanum* in 2 cases), 20 of the genus *Microsporum* (*M. canis* in 19 samples and *M. audouinii* in a sample) and 4 of the genus *Epidermophyton* (*E. floccosum* in 4 samples). To culture on Sabouraud medium were identified six cases of association of dermatophytic infection with the yeast infection, in 41 cases there was an isolated infection with *Candida albicans*, and three samples were isolated non-dermatophytic molds.

RT PCR sensitivity was 97.5%, higher than the classical methods of mycological diagnosis. RT PCR had a specificity of 100%, a positive predictive value of 100% and a negative predictive value of 98.96%. RT PCR achieved a significant increase in rate (22.9%) of identifying dermatophytes in clinical specimens compared with culture ($p < 0.0001$). Real-time PCR was diagnostic value in 198 samples being identified 170 species of the genus *Trichophyton* (*T. rubrum* in 146 samples, *T. interdigitale* in 21 samples), 23 of the genus *Microsporum* (*M. canis* in 22 samples and *M. audouinii* in a sample) and 5 of the genus *Epidermophyton* (*E. floccosum* in 5 samples). *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. verrucosum* and *M. ferugineum* that were included in the PCR detection assay were not identified in any sample.

Concordance at genus level between the results of culture and RT PCR was 100% and at the species level was 95.65%. Although by culture was not been identified any mixed dermatophytic infection, by RT PCR were detected

two cases of association of nail plate infection with *T. rubrum* and *T. interdigitale*. In 18.6% of samples in which non-dermatophytes were grown on culture, by RT PCR could also detect a dermatophyte.

Overall, 23.9% of unguis samples, 34.52% of scales samples and 34.78% of the hair samples were positive for dermatophytes using RT PCR compared with 18.8% of nail samples, 28.66% of skin samples and 30.4% of the hair samples using Sabouraud culture medium.

Conclusions

According to the results of the evaluation of diagnostic accuracy of dermatophytic infections by real-time multiplex PCR assay, we can support the following conclusions: multiplex real-time PCR method had a sensitivity (97.5%) and specificity (100%) superior to conventional techniques for diagnosis of dermatophytic infections achieving a significant increase in detection of dermatophytes directly from clinical samples than culture ($p < 0.0001$), with a positive predictive value of 100% and a negative predictive value of 98.96%. Although real-time PCR appears to be more expensive than culture on Sabouraud medium, the cost difference is not very large, PCR can replace both classical methods of mycological diagnosis, and justifies using real-time PCR in routine clinical laboratories.

4. Study 2. Keratinophilic filamentous fungal skin infections in immunocompromised patients

In this study, we aimed to evaluate the incidence of infections with keratinophilic filamentous fungi, causing species and their clinical forms in immunocompromised patients.

Materials and methods

The study addressed to patients with different diseases that associate a decrease in immune response (cancer, HIV infection, diabetes mellitus, chronic renal failure, chronic hepatitis, cirrhosis, malnutrition, chronic alcoholism, tuberculosis, organ transplant immunosuppressants), consulted for cutaneous infections with keratinophilic filamentous fungi (dermatophytes) in dermatology ambulatory Braşov or hospitalized in the Clinical County Emergency Hospital of Braşov. In addition, we created a control group consisting of immunocompetent patients who had signs of dermatophytic infections. Thus we enrolled 351 patients (152 men and 199 women) diagnosed with various immunocompromised diseases, aged between 8 and 87 years (mean age 55.18 years), and a control group comprising 287 patients immunocompetent control (125 men and 162 women) aged between 5 and 91

years (mean age 54.59 years) who had skin lesions suspected to be caused by a dermatophytic infection.

Results

Prevalence of dermatophytic infection was 33.9% in immunocompromised patients group and 29.27% in the control group respectively ($p = 0.2111$, OR 1.24). Tinea unguium was the most common clinical form of dermatophytosis in both immunocompromised patient group and that of immunocompetent subjects, with a prevalence of 15.95% and 12.54% respectively. The following clinical forms in order of frequency in the two groups were: tinea pedis (8.26% and 9.06%, respectively), tinea cruris (3.13% and 2.78%, respectively), tinea corporis (3.98% and 2.44%, respectively), tinea manum (0.85% and 0.7%, respectively), tinea face (0.57% and 1.04%, respectively), tinea capitis (0.57% and 0.7%, respectively) and tinea barbae (0.57% and 0%, respectively). Percentages of clinical forms of dermatophytosis in both immunocompromised and immunocompetent groups of subjects were relatively equal, except tinea unguium ($p = 0.22$, OR = 1.32) and tinea corporis ($p = 0.27$, OR = 1.66) that were more common in immunocompromised subjects.

T. rubrum was the main causative agent of dermatophytic infections in all populational subgroups studied with a total percentage of 72.9%, followed by *T. interdigitale* with 11.8%, by *M. canis* with 10.8%, by *E. floccosum* with 2.46%, by *T. quinckeanum* with 0.98%, by *M. audouinii* with 0.48% and by *T. asteroides* with 0.48%. Percentages of dermatophytic infections with a certain species were similar in the two groups, a slight difference can be noticed only for *T. rubrum* (higher in the study group, 74.79% compared to 70.23%) and for *T. interdigitale* (higher in the control group, 14.28% compared to 10.08%), the difference was not statistically significant ($p > 0.05$).

Among diabetic patients we found a statistically significant association between age over 50 years and dermatophytic infection rate ($p = 0.0016$, OR=3.83, RR=2.7). Diabetes length not seem to be a predisposing factor to dermatophytic infections nor in subjects with type 1 diabetes ($p = 1$, OR=1, RR=1), nor in patients with type 2 diabetes ($p = 0.72$, OR=1.14, RR=1.09). Hb A1c values were correlated with the presence of dermatophytic infection only in subjects with type 2 diabetes ($p = 0.59$, OR=1.22, RR=1.069).

Study of metabolic and degenerative complications associated with diabetes mellitus showed a statistically significant association between the peripheral arterial disease of the lower limbs ($p = 0.0422$, RR=1.57, OR=2.03), and presence of dermatophytosis at this level, between peripheral neuropathy and dermatophytic infections ($p = 0.0255$; RR=1.67; OR=2.11). Tinea unguium and tinea pedis were the most common manifestations of dermatophytic

infection in diabetic patients with a prevalence of 46.55% and 27.58% respectively. *T. rubrum* was the most common dermatophytic etiologic agent of tinea unguium (88.8%), tinea pedis (87.5%), tinea manum (100%) and tinea cruris (66.67%), and *M. canis* was isolated in most cases of tinea corporis (80%) diagnosed in patients with diabetes.

Dermatophytic infection rate in patients with malignancies was 30.4% observing the much higher frequency of dermatophytic infection in patients with haematological malignancies (55.5%) compared to those with solid cancers (24.3%) (OR=3.88, p=0.1). Clinical appearance of dermatophytosis in patients with neoplasia took the form of tinea unguium in 50% of cases, of tinea pedis in 28.5% of patients, tinea corporis, tinea capitis and tinea cruris each in 7.14% of cases. *T. rubrum* was the most frequently isolated dermatophytes in 78.5% of cases followed by *T. interdigitale*, *M. canis* and *E. floccosum* each in 7% of cases. Among the 29 patients on hemodialysis after mycological investigations, samples resulted positive for dermatophytes in 41.38% of them. The incidence of dermatophytic infections did not correlate nor with duration of evolution of CKD nor with time-to hemodialysis (OR=1, RR=1, p=NS), but presence of diabetes mellitus as a cause of CKD was an independent risk factor for dermatophytic infections (OR= 2, RR=1.5, p=0.3622). Dermatophytic infections were diagnosed in 31.25% of patients infected with HIV. The incidence of dermatophytic infections correlated with both the duration of evolution of HIV (OR=1.8, RR=1.5) and with decreasing CD4 cell counts (OR=1.8, RR=1.5), in contrast viremia level was not an independent risk factor for dermatophytic infections (OR=0.52, RR=0.67, p=NS). 36.36% of patients with immunosuppressive therapy had dermatophytic infections (OR = 1.24, p = 0.61). Dermatophytic infection rate was correlated with the duration of immunosuppressive therapy (OR=1,48; RR=1,28 p=0.5323). A statistically significant association between type of immunosuppressive medication and dermatophytic infections were found only in the treatment with methotrexate (OR=1.68; p=0.22). We also calculated the frequency dermatophytic infections among patients with chronic liver disease (27.77%) with malnutrition (33.33%), tuberculosis (50%) and Down syndrome (66.7%) but the number of patients was too small in order to have statistical significance.

Conclusions

The prevalence of dermatophytic infections in immunocompromised patients group was 33.9% compared with 29.27% in the control group (OR=1.24, p=0.21) and tinea unguium was the most common clinical form of dermatophytosis in immunocompromised patients group with a prevalence of 15.95% of the subjects investigated, followed by tinea pedis with 8.26%. *T.*

rubrum was the main causative agent of dermatophytic infections in all populational subgroups studied with a total percentage of 72.9%, followed by *T. interdigitale* with 11.8%, *M. canis* with 10.8%, *E. floccosum* with 2.46%, *T. quinckeanum* with 0.98%, *M. audouinii* with 0.48% and *T. asteroides* with 0.48%.

5. Study 3. Evaluation of *in vitro* susceptibility of dermatophytes to five antifungal agents using successive microdilution method

An increased frequency of dermatophytic infections and that some patients do not have a favorable response to systemic antimycotic therapy required the testing of new therapeutic strategies. The main purpose of this study was to evaluate the sensitivity of dermatophytes against antifungal substances commonly used in systemic treatment of dermatophytosis (ketoconazole, itraconazole, fluconazole, voriconazole, terbinafine).

Materials and methods

Antidermatophytic susceptibility testing was performed using a broth microdilution method. Were analyzed 163 clinical samples from patients that were suspected of having consult with the dermatophytic infections of the skin, nails and hair (117 were represented by *T. rubrum*, 20 of *T. interdigitale*, 19 of *M. canis*, 4 of *E. floccosum*, 2 of *T. quinckeanum* and 1 for *T. asteroides*). For testing *in vitro* susceptibility of dermatophytes were used five antifungal substances: ketoconazole, itraconazole, fluconazole, voriconazole and terbinafine. Growth medium used for *in vitro* microdilution susceptibility testing was RPMI 1640. For each antimycotic substance were performed 10 successive dilutions (1:2). 96-well microdilution plates were incubated at 30⁰ C for 7 days. Rate of growth in each well was visually assessed daily based on comparison with growth in wells containing only antifungal and in those without antimycotic substance. For each dermatophytic species-drug association was calculated the geometric mean of MIC to facilitate comparison with MIC₅₀ (MIC that inhibited growth of 50% of samples) and MIC₉₀ (MIC in which 90% of the samples are inhibited).

Results

Considering all dermatophytic species for which we determined sensitivity to antifungal, the average MIC for the five antifungal was: 0,334±0,39 µg/ml for ketoconazole, 0,132±0,12 µg/ml for itraconazole, 8,9±5,2 µg/ml for fluconazole, 0,163±0,06 µg/ml for voriconazole and 0,013±0,007 µg/ml for terbinafine.

Terbinafine had the best antifungal activity followed by itraconazole and voriconazole ($p < 0.05$). Also MIC₅₀ and MIC₉₀ of terbinafine had the lowest values of the five antifungal for all dermatophytes tested: 0.012 ± 0.004 µg/ml and 0.025 ± 0.0188 µg/ml respectively. Instead, antidermatophytic activity of fluconazole was lowest with an average MIC of 8.946 ± 5.2 µg/ml. There were no statistically significant differences ($p > 0.05$) between the mean average of MIC of ketoconazole, itraconazole, fluconazole, voriconazole and terbinafine between the two groups of patients immunocompromised and immunocompetent respectively. Antifungal activity against dermatophytes identified in both groups of patients can be summarized as follows: terbinafine > itraconazole > voriconazole > ketoconazole > fluconazole.

Four cases of resistance of dermatophytes to fluconazole (2 strains of *T. interdigitale* and 2 of *M. canis*) and one to ketoconazole (1 strain of *T. interdigitale*) were recorded. Three of the four patients (2 with diabetes, 1 with malignancy, 1 with HIV infection) from the isolated strains were resistant to fluconazole have received previous treatment with fluconazole for candidal infections. Four patients were in immunocompromised patients group (2 with diabetes, 1 with malignancy, 1 with HIV infection) and one in control group.

Analyzing the sensitivity of dermatophytes isolated from patients with DM, malignancy, CKD, HIV infection, immunosuppressive therapies, chronic liver disease, malnutrition, tuberculosis was observed that average MIC values of all five antifungal are equal to or greater than those due to dermatophytes selected from the control group subjects, the difference was not statistically significant ($p > 0.05$). Variations in the activity profile of each dermatophytic species separately to antifungal substances were higher in immunocompromised subjects.

Conclusions

For all tested dermatophytic species, terbinafine had the best and fluconazole was lowest antidermatophytic activity. Overall classification for all dermatophytic species antifungal activity of the five studied antifungals was terbinafine > itraconazole > voriconazole > ketoconazole > fluconazole. Four cases of resistance to fluconazole and one to ketoconazole were recorded. Considering all dermatophytic species isolated, there were not obtained any statistically significant differences ($p > 0.05$) between sensitivity of dermatophytic strains isolated from immunocompromised patients and from the control group patients. Results emphasize the importance of conducting *in vitro* susceptibility testing noting that the same dermatophytic species may show different sensitivity to a clinical sample to another.

References

- ¹ Vander Straten MR, Hossain MA, Ghannoum MA. Cutaneous infections dermatophytosis, onychomycosis, and tinea versicolor. *Infect Dis Clin North Am.* 2003 Mar;17(1):87-112.
- ² Rodwell GEJ, Bayles CL, Towersey L, Aly R. The prevalence of dermatophyte infection in patients infected with human immunodeficiency virus. *International Journal of Dermatology* 2008; 47(4):339-43.
- ³ Quatresooz P, Piérard-Franchimont C, Arrese JE, Piérard GE. Clinicopathologic presentations of dermatomycoses in cancer patients. *JEADV* 2008;22:907–917.
- ⁴ Almeida SR. Immunology of dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008;166(5-6):277-283.
- ⁵ Calderon RA. Immunoregulation of dermatophytosis. *Critical Reviews in Microbiology* 1989;16(5):339-69.
- ⁶ Odom RB. Common superficial fungal infections in immunosuppressed patients. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31: S56–S59.
- ⁷ Elewski EB, Sullivan J. Dermatophytes as opportunistic pathogens. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30(6): 1021–1022.
- ⁸ Machouart-Dubach M, Lacroix C, de Chauvin MF, Le Gall I, Giudicelli C, Lorenzo F, Derouin F. Rapid discrimination among dermatophytes, *Scytalidium spp.*, and other fungi with a PCR-restriction fragment length polymorphism method. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):685-90.
- ⁹ Liu HN, Lee DD, Wong CK. KONCPA: a new method for diagnosing tinea unguium. *Dermatology* 1993; 187: 166-8.
- ¹⁰ Rippon J.W. Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Philadelphia. (1988).
- ¹¹ Bergmans AM, Schouls LM, van der Ent M, Klaassen A, Bohm N, Wintermans RG. Validation of PCR-reverse line blot, a method for rapid detection and identification of nine dermatophyte species in nail, skin and hair samples. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 778–788.
- ¹² Roberts DT, Taylor WD, Boyle J. Guidelines for treatment of onychomycosis. *Br J Dermatol.* 2003; 148:402–10.
- ¹³ Odds, F., J. Ausma, F. Van Gerven, F. Woestenborghs, L. Meerpoel, J. Heeres, H. Vanden Bossche, and M. Borgers. In vitro and in vivo activities of the novel azole antifungal agent r126638. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:388–391.
- ¹⁴ Tatsumi, Y., M. Yokoo, H. Senda, and K. Kakehi. Therapeutic efficacy of topically applied KP-103 against experimental tinea unguium in guinea pigs in comparison with amorolfine and terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3797–3801.

Universit te de Médicine et Pharmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca

THESE DE DOCTORAT

La recherche clinique et de laboratoire dans les maladies de peau humaine caus e par des champignons filamenteux kératinophiles dans patients immunodéprimés

Résumé

Doctorante: **Marius, Irimie**

Directeur de thèse: **Alexandru, T taru**

Cluj-Napoca
2012



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Table des matières

INTRODUCTION	9
L'ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES.....	11
1. Épidémiologie des infections dermatophytique	13
2. Agents étiologiques de la dermatophytose	16
3. Pathogenèse de l'infection dermatophytique.....	22
4. Le rôle du système immunitaire	25
5. Formes cliniques des infections dermatophytique	27
6. Le diagnostic de laboratoire	31
7. Traitement des infections dermatophytique	38
CONTRIBUTION PERSONNELLE.....	43
1. Les objectifs de l'étude.....	45
2. La méthodologie générale	46
3. Etude 1. Évaluation technique RT-PCR multiplex dans le diagnostic des infections cutanées humaine des champignons filamenteux kératinophiles.....	49
3.1. Introduction	51
3.2. Objectif	53
3.3. Matériels et méthodes	53
3.4. Résultats	59
3.5. Discussion	65
3.6. Conclusions	73
4. Étude 2. Infections de la peau avec champignons filamenteux kératinophiles chez les patients immunodéprimés	75
4.1. Introduction	77
4.2. Objectif	78
4.3. Matériels et méthodes	78
4.4. Résultats	81
4.5. Discussion	100
4.6. Conclusions	117
5. Étude 3. Évaluation de la sensibilité in vitro des dermatophytes à cinq agents antifongiques en utilisant la méthode de microdilution successives	119
5.1. Introduction	121
5.2. Objectif	122
5.3. Matériels et méthodes	122
5.4. Résultats	125
5.5. Discussion	133
5.6. Conclusions	142
Références	143

Mots-clés: champignons filamenteux kératinophiles, dermatophytes, amplification en chaîne par polymérase, immunosuppression, antifungigramme, antifongique

INTRODUCTION

Dermatophytosis sont définie comme une infection fongique superficielle de la peau causée par des champignons filamenteux keratinophile (dermatophytes) regroupés en trois genres: *Trichophyton*, *Microsporum* et *Epidermophyton*. Les dermatophytes sont des organismes ubiquitaires peuvent être trouvés dans n'importe quelle région géographique dans toute la population. Dermatophytosis sont des conditions communes de la peau qui représentent de véritables problèmes de santé publique de leur prévalence et de la morbidité associée. Leur incidence est estimée à environ 20-25% de la population en général, et un nombre croissant¹.

Au cours du siècle dernier, il ya eu des changements considérables dans le spectre étiologique des infections dermatophytes. Les facteurs prédisposant tels que la migration de la population, l'industrialisation, vieillissement de la population et l'incidence accrue de maladies telles que le diabète, le cancer, le HIV, les troubles circulatoires, ou des antibiotiques et des traitements immunosuppresseurs ont influencé le profil épidémiologique de l'infection à dermatophytes. Connaissance des tendances épidémiologiques de la dermatophytoses et leurs agents étiologiques peuvent permettre la mise en œuvre des mesures de santé publique pour arrêter la tendance de ces infections.

L'ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

Spectre des dermatophytes isolées à partir de lésions de la peau a changé au cours des 100 dernières années, reflétant la situation socio-économique, mode de vie et les possibilités de migration de la population. Améliorer les conditions de vie a été associés à un déclin des espèces zoophiles et une augmentation des infections à dermatophytes anthropophile. *T. rubrum* est l'agent le plus souvent en cause de tinea pedis, onychomycose, cruris et tinea corporis à travers le monde. En Europe, en particulier dans les pays méditerranéens, l'incidence de l'infection *M. canis* a fortement augmenté au cours des dernières décennies, devient un problème épidémiologique important. La connaissance des dermatophytes espèce prédominante fournit une meilleure compréhension des facteurs de risque pour les infections fongiques superficielles et futures tendances épidémiologiques.

Les infections dermatophytes sont généralement superficielles, mais chez les personnes immunodéprimées peuvent causer de graves infections disséminées². Manifestations de l'infection sont toujours le résultat de l'interaction entre les agents pathogènes fongiques et les défenses d'hôte³. Lors de l'infection dermatophytes responsables de la modulation dermatophytic la

maladie est considérée comme immunité à médiation cellulaire⁴ et les antigènes dermatophytes activés les cellules T suppresseurs et T helper⁵. De nombreux agents pathogènes qui causent des infections cutanées normalement localisée, autolimitée, peut avoir un taux élevé de morbidité et de mortalité chez les personnes immunodéprimées^{6,7}.

Actuellement, des tests de laboratoire de routine révèlent dermatophytoses comprennent les structures fongiques par l'examen microscopique direct des échantillons cliniques et d'identifier les espèces macroscopiques et microscopiques dermatophytes dans des cultures *in vitro* cultivés sur milieux de Sabouraud. Examen microscopique direct est cependant un moyen rapide et pas cher a l'inconvénient de taux de faux négatifs de 15-30%^{8,9}, et n'est pas spécifique à l'espèce. Des cultures *in vitro* permettre l'identification spécifiques des espèces dermatophytique dans environ 10-15 jours, mais chez certaines espèces atypiques ou à croissance lente, le temps passé à identifier les 3-4 semaines¹⁰. La culture a une sensibilité relativement réduite d'environ 70%, en particulier dans les cheveux et les infections des ongles¹¹ et le taux de résultat faux positifs et de faux négatifs est assez élevé. Dans ce contexte, il devient évidente nécessité d'une méthode simple et rapide pour le diagnostic des infections cutanées à dermatophytes basés sur des techniques de biologie moléculaire.

Prophylaxie antifongique et de traitement empirique ont conduit à d'importants changements épidémiologiques et développer des souches dermatophytes avec une résistance secondaire aux antifongiques et le remplacement des espèces dermatophytic sensibles d'autres avec une résistance intrinsèque¹². Augmentation des infections dermatophytes et que certains patients ont une réponse favorable au traitement antifongique systémique nécessaire à l'expérimentation de nouvelles stratégies thérapeutiques^{13,14}. Le succès du traitement dépend de la capacité de choisir la appropriée antifongique pour éradiquer l'infection dermatophytes. Pour anticiper cette possibilité, en particulier chez les patients immunodéprimés, dans les tests de sensibilité *in vitro* est absolument nécessaire pour aider les cliniciens à choisir le bon traitement.

CONTRIBUTION PERSONNELLE

1. Les objectifs de l'étude

Dans cette étude, nous avons cherché à atteindre les objectifs suivants :

1. Évaluation de la fréquence des formes cliniques d'infections dermatophytes chez les patients étudiés;
2. Évaluation de l'incidence de l'infection par des champignons filamenteux kératinophiles responsable et l'identification des espèces dermatophytes chez les patients immunodéprimés ;
3. Evaluation de précision de multiplex *la réaction en chaîne par polymérase multiplex en temps réel* pour le diagnostic des infections de la peau avec champignons filamenteux keratinofile;
4. Identification d'taux des différentes espèces de champignons filamenteux kératinophiles impliqués dans le déclenchement infections dermatophytes à Brasov;
5. Détermination susceptibilité champignons filamenteux kératinophiles de substances antifongiques utilisés dans thérapie systémique des dermatophytoses.

2. La méthodologie générale

L'étude a porté sur des patients avec une soupçonnée d'infection dermatophytique cutanée qui ont été consultés dans l'ambulatorio de dermatologie de Braşov ou ont été hospitalisé à l'hôpital d'urgence de Braşov (départements de dermatologie, de l'oncologie, la néphrologie, le diabète, les maladies de nutrition, les maladies infectieuses) du 01.05 .2009 à 30.04.2011. L'étude est une étude prospective, longitudinale, le type observationnelle réalisée avec le consentement éclairé des patients. De chaque patient inclus dans l'étude ont été recueillies matériel pathologique des lésions cutanées: squames, pièce d'ongle ou de cheveux. Ont été pris comme 681 échantillons cliniques (351 échantillons curetage sous-unguéale, 307 échantillons de squames et 23 échantillons de cheveux). Chaque échantillon a été divisé en trois parties égales: l'une pour l'examen microscopique direct, un pour la culture sur milieu de Sabouraud et l'autre pour l'analyse par PCR en temps réel, ce dernier étant maintenu à -20⁰ C à l'exécution du PCR.

3. Etude 1. Évaluation technique RT-PCR multiplex dans le diagnostic des infections cutanées humaine des champignons filamenteux kératinophiles

Matériels et méthodes

Dans la première étude de ce document pour déterminer la spécificité et la sensibilité des multiplex en temps réel technique de PCR (RT-PCR) ont été examinés 681 échantillons cliniques: 351 échantillons de curetages sous-unguéaux, 307 échantillons de squames et 23 du cheveu. Chaque échantillon a été effectuées tant de test diagnostique de référence (examen microscopique direct et la culture sur milieu de Sabouraud) et le chercheur (RT-PCR). Extraction d'ADN à partir d'échantillons cliniques a été réalisée en kit d'extraction d'ADN QIAamp kit (Allemagne) après predigestion enzymatique préalable à la protéinase K. RT-PCR cible était ITS1 région située entre les gènes codant pour les régions 18S et 5.8S de la rARN. Primers spécifiques pour les dermatophytes et sondes d'hybridation (chacune composée d'une sonde anchor et une sonde de détection) ont été sélectionnées à l'aide des serveurs du Centre for Biotechnology Information et Multalin. Sondes ont été marquées avec des fluorochromes: à l'extrémité 3' à la fluorescéine (FL-520), et à l'extrémité 5' avec LC Red 610, Red LC 640, LC Red 670 ou Red LC 705. Sondes anchor ont été conçus pour être complémentaires de séquences ITS1 de deux ou trois espèces de dermatophytes, tandis que sondes de détection complémentaires à seulement certaines espèces dermatophytes, permettant ainsi à la technique de détection et d'identification à 3 espèces différentes du même échantillon sur les courbes fusions différent. La polymérisation a été réalisée sur LightCycler 2.0 (Roche®). La présence de courbes d'amplification dans les canaux 610, 640, 670 et 705 nm de la LightCycler, en liaison avec une courbe de fusion spécifique d'une température de fusion et d'amplitude de crête de température de fusion $\geq 0,01$ sont considérées comme positives pour certaines espèces de dermatophytes. RT-PCR spécificité a été analysé en utilisant 10 souches dermatophytique de référence obtenues à partir CBS Fungal Biodiversity Centre (Pays-Bas). Pour déterminer la sensibilité de la PCR RT a été préparée une maître solution des acides nucléiques isolés six souches de dermatophytes référence qui ont été sélectionnés pour le test de tous les canaux de fluorescence.

Résultats

La présence de dermatophytes dans les échantillons examinés par l'examen mycologique traditionnelle (examen microscopique et la culture) a été détectée dans 28,48% des échantillons testés. Globalement, il est apparu que l'examen microscopique directe avaient une plus grande sensibilité que la

culture, l'identification des filaments de mycélium ou de spores dans 27,6% des échantillons, alors que la culture était de diagnostic dans seulement 23,6% des échantillons. La valeur prédictive positive de l'examen microscopique direct a été 87,44% et 98,7% de la culture. La valeur prédictive négative était de test classique pour l'examen microscopique 96,78% directement et 91,89% pour la culture. Dans la culture sur Sabouraud milieu ont été identifiés 137 dermatophytes de genre *Trichophyton* (*T. rubrum* dans 117 échantillons, *T. interdigitale* dans 17 échantillons, *T. asteroides* en cas, *T. quinckeanum* dans 2 cas), 20 genres *Microsporum* (*M. canis* dans 19 échantillons et *M. audouinii* dans un échantillon), et 4 genres *Epidermophyton* (*E. floccosum* dans 4 échantillons). Le milieu de culture Sabouraud ont été identifiés 6 cas d'association de une infection dermatophytic avec levures, dans 41 cas il y avait une infection isolée par *C. albicans*, et 3 échantillons ont été isolés non-dermatophytes moules.

RT-PCR sensibilité était de 97,5% plus élevé que les méthodes classiques de diagnostic mycologique. RT-PCR a une spécificité de 100%, une valeur prédictive positive de 100% et une valeur prédictive négative de 98,96%. RT-PCR obtenu une augmentation significative (22,9%) taux de identifier dermatophytes dans des échantillons cliniques par rapport à la culture ($p < 0,0001$). PCR en temps réel a une valeur diagnostique dans 198 échantillons étant identifiés 170 espèces du genre *Trichophyton* (*T. rubrum* dans 146 échantillons, *T. interdigitale* dans 21 échantillons), 23 du genre *Microsporum* (*M. canis* dans 22 échantillons et *M. audouinii* dans un échantillon), et 5 du genre *Epidermophyton* (*E. floccosum* dans 5 échantillons). *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. verrucosum* et *M. ferugineum* qui ont été inclus dans la technique de détection par PCR n'ont pas été identifiés dans aucun échantillon. La concordance au niveau de genre entre les résultats de la culture et de RT-PCR a été de 100% et au niveau de l'espèce a été 95,65%. Même s'il n'est pas identifié par la culture ou mixte infection dermatophytic par RT-PCR ont été détectés deux cas d'association de l'infection des ongles à *T. rubrum* et *T. interdigitale*. Dans 18,6% des échantillons dans lesquels la culture développés non-dermatophytes par RT-PCR peut détecter et un dermatophytes.

Globalement 23,9% des échantillons prélevés sous-unguéal, 34,52% des échantillons d'squames et 34,78% des échantillons de cheveux ont été positifs pour les dermatophytes par RT PCR comparativement à 18,8% des échantillons ongles, 28 66% des échantillons de peau et de 30,4% des échantillons de cheveux en utilisant un milieu de culture Sabouraud.

Conclusions

Selon les résultats de l'évaluation de la précision du diagnostic des infections par dermatophytes en temps réel de PCR multiplex technique peut

appuyer les conclusions suivantes: méthode multiplex PCR en temps réel avait une sensibilité (97,5%) et la spécificité (100%) supérieure aux techniques classiques de diagnostic des infections à dermatophytes obtenant une augmentation significative de la détection directement à partir d'échantillons cliniques dermatophytes que la culture ($p < 0,0001$), avec une valeur prédictive positive de 100% et une valeur prédictive négative de 98,96%. Même si PCR en temps réel semble être plus cher que la culture sur milieu de Sabouraud, la différence de coût n'est pas très grande, PCR peut remplacer les deux méthodes classiques de diagnostic mycologique, et justifiées à l'aide PCR en temps réel dans les laboratoires cliniques de routine.

4. Étude 2. Infections de la peau avec champignons filamenteux kératinophiles chez les patients immunodéprimés

Dans cette étude, nous avons cherché à évaluer l'incidence des infections par des champignons filamenteux kératinophiles, des espèces causant et leurs formes cliniques chez les patients immunodéprimés.

Matériels et méthodes

L'étude a porté sur des patients avec des maladies différentes qui associe une diminution de la réponse immunitaire (cancer, VIH, diabète, insuffisance rénale chronique, l'hépatite chronique, de cirrhose, de la malnutrition, l'alcoolisme chronique, la tuberculose, la transplantation d'organes immunosuppresseurs), voir par mycoses cutanées en ambulatoire de dermatologie de Braşov ou hospitalisé dans l'hôpital régional d'urgence clinique de Braşov. Il a aussi créé un groupe de contrôle composé de patients immunocompétents qui présentaient des signes d'infections dermatophytique. Ainsi, l'étude a inclus 351 patients (152 hommes et 199 femmes) atteints de diverses maladies avec immunodéficiences, âgés entre 8 et 87 ans (âge moyen 55,18 années), et un groupe témoin comprenant 287 patients immunocompétents de contrôle (125 hommes et 162 femmes) âgés entre 5 et 91 ans (âge moyen 54,59 années).

Résultats

Prévalence de l'infection dermatophytique était de 33,9% chez les patients immunodéprimés groupe et 29,27% respectivement du groupe contrôle ($p=0,2111$, $OR=1,24$). Onychomycose est la forme clinique la plus fréquente des dermatophytosis en les deux groupes de patients immunodéprimés et que des sujets immunocompétents, avec une prévalence de 15,95% et 12,54% des sujets étudiés. Les formes cliniques suivantes étaient par ordre de fréquence: tinea pedis (8,26% et 9,06%), cruris (3,13% et 2,78%), tinea corporis (3,98% et 2,44%), tinea manum (0,85% et 0,7%), tinea faciei

(0,57% et 1,04%), tinea capitis (0,57% et 0,7%) et tinea barbae (0,57% et 0%). Les pourcentages de formes cliniques de dermatophytosis dans les deux immunodéprimés et immunocompétents groupes de sujets étaient relativement égaux, sauf onychomycose ($p=0,22$, $OR=1,32$) et tinea corporis ($p=0,27$, $OR=1,66$) étaient plus fréquentes chez immunodéprimés sujets.

T. rubrum est le principal agent étiologique des infections dermatophytique dans tous les sous-groupes de population étudiés, avec une part totale de 72,9%, suivi par *T. interdigitale* 11,8%, *M. canis* 10,8%, *E. floccosum* avec 2,46%, *T. quinckeanum* 0,98%, *M. audouinii* de 0,48% et *T. asteroides* 0,48%. Les pourcentages d'infections d'une espèce dermatophytique étaient similaires dans les deux groupes, une légère différence peut être remarqué que *T. rubrum* (plus élevé dans le groupe d'étude, 74,79% à 70,23%) et *T. interdigitale* (plus élevé dans le groupe de contrôle, 14,28% à 10,08%), la différence n'était pas statistiquement significative ($p>0,05$).

Parmi les patients diabétiques ont trouvé une association statistiquement significative entre l'âge de plus de 50 ans et le taux d'infection dermatophytique ($p=0,0016$, $OR=3,83$, $RR=2,7$). La durée du diabète ne semble pas être un facteur prédisposant ou infections dermatophytique chez les sujets diabétiques de type 1 ($p=1$, $OR=1$, $RR=1$), ou chez les patients diabétiques de type 2 ($p=0,72$, $OR=1,14$, $RR=1,09$). Taux d'HbA1c a été corrélée avec la présence d'infections dermatophytes seulement chez les sujets diabétiques de type 2 ($p=0,59$, $OR=1,22$, $RR=1,069$). Étude des complications métaboliques et dégénératives associées au diabète ont montré une association statistiquement significative entre maladie artérielle périphérique des membres inférieurs ($p=0,0422$; $RR=1,57$; $OR=2,03$), et la présence de dermatophytes à ce niveau, et entre une neuropathie périphérique et les infections dermatophytes ($p=0,0255$; $RR=1,67$; $OR=2,11$). Onychomycose et tinea pedis ont été les manifestations les plus fréquentes de l'infection à dermatophytes chez les patients diabétiques avec une prévalence de 46,55% et 27,58% respectivement. *T. rubrum* était le plus fréquent agent étiologiques dermatophytique de la onychomycose (88,8%), tinea pedis (87,5%), tinea manum (100%) et tinea cruris (66,67%), et *M. canis* a été isolé dans la plupart des cas de tinea corporis (80%) des patients diagnostiqués avec le diabète.

Taux d'infection dermatophytique chez les patients atteints de tumeurs malignes était de 30,4% observée dans la fréquence beaucoup plus élevée de l'infection à dermatophytes chez les patients présentaient des hémopathies malignes (55,5%) comparativement à ceux dont les cancers solides (24,3%) ($OR=3,88$, $p=0,1$). Aspect clinique des dermatophytoses chez les patients atteints néoplasie a pris la forme d'une onychomycose dans 50% des cas de tinea pedis dans 28,5% des patients, tinea corporis, tinea capitis et tinea cruris

à 7,14% des cas chacun. *T. rubrum* était les dermatophytes les plus fréquemment isolées dans 78,5% des cas, suivi par *T. interdigitale*, *M. canis* et *E. floccosum* chacun dans 7% des cas.

Sur les 29 patients sous hémodialyse après une enquête mycologique, des échantillons entraîné positif pour les dermatophytes à 41,38% de ces. L'incidence des infections dermatophytes ne sont pas corrélés avec la durée de l'MRC évolution durable ou effectuer une hémodialyse (OR=1, RR=1, p=NS), mais la présence d'un diabète comme cause de la maladie rénale chronique est un facteur de risque indépendant pour les infections dermatophytes (OR=2, RR=1,5, p=0,3622). Infections dermatophytes ont été diagnostiqués chez 31,25% des patients infectés par le VIH. L'incidence des infections dermatophytes corrélés à la fois la durée de l'évolution de l'infection par VIH (OR=1,8, RR=1,5) et une diminution de CD4 (OR=1,8, RR=1,5), au lieu de cela virémie n'était pas un facteur de risque indépendant pour les infections dermatophytes (OR=0,52, RR=0,67, p=NS). 36,36% des patients atteints de traitement immunosuppresseur présentaient des infections dermatophytes (OR=1,24, p=0,61). L'incidence des infections dermatophytes en corrélation avec la durée du traitement immunosuppressive (OR=1,48, RR=1,28 p=0,5323). Une association statistiquement significative entre le type de médicaments immunosuppresseurs et des infections dermatophytique ont été trouvés seulement dans le traitement avec le méthotrexate (OR=1,68, p=0,22). A aussi été calculée les infections fréquence des infections dermatophytique chez les patients présentant une maladie hépatique chronique (27,77%) souffrant de malnutrition (33,33%), la tuberculose (50%) et le syndrome de Down (66,7%), mais le nombre de patients était trop faible pour avoir une signification statistique.

Conclusions

Prévalence des infections dermatophytique dans le groupe des patients immunodéprimés était de 33,9% par rapport à 29,27% dans le groupe contrôle (OR=1,24, p=0,21) et onychomycose est la forme clinique la plus fréquente des dermatophytes dans le groupe des patients immunodéprimés avec une prévalence de 15,95% des sujets étudiés, suivi par le pied d'athlète avec 8,26%. *T. rubrum* est le principal agent étiologique des infections dermatophytique dans tous les sous-groupes de population étudiés, avec une part totale de 72,9%, suivi par *T. interdigitale* avec 11,8%, *M. canis* avec 10,8%, *E. floccosum* avec 2,46%, *T. quinckeanum* avec 0,98%, *M. audouinii* avec 0,48% et *T. asteroides* avec 0,48%.

5. Étude 3. Évaluation de la sensibilité *in vitro* des dermatophytes à cinq agents antifongiques en utilisant la méthode de microdilution successives

Augmentation des infections dermatophytique et que certains patients n'ont pas répondu favorablement au traitement antifongique systémique requise l'essai de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la sensibilité des dermatophytes à des substances antifongiques communément utilisés dans le traitement systémique des dermatophytes (kétoconazole, itraconazole, fluconazole, voriconazole, terbinafine).

Matériels et méthodes

Les tests de sensibilité antidermatophytique été réalisée en utilisant la méthode de microdilution successives dans milieu de culture liquide. 163 échantillons cliniques de patients qui étaient consulté pour soupçonnés d'avoir les infections dermatophytique de la peau, des ongles et des cheveux (117 étaient représentés par *T. rubrum*, 20 par *T. interdigitale*, 19 par *M. canis*, 4 par *E. floccosum*, 2 par *T. quinckeanum* et 1 par *T. asteroides*) ont été analysés. Les tests de sensibilité *in vitro* des dermatophytes ont été utilisées cinq substances antifongique: kétoconazole, l'itraconazole, le fluconazole, le voriconazole et terbinafine. Milieu utilisé pour tester la sensibilité de microdilution était RPMI 1640. Pour chaque substance antifongique ont été réalisées 10 dilutions successives (1:2). Microdilution plaques à 96 puits avec les fonds plats ont été incubées à 30°C pendant 7 jours. Taux de croissance de chaque puits a été évaluée visuellement quotidienne basée sur la comparaison avec la croissance dans les puits contenant uniquement la substance antifongique et sans médicaments. Pour chaque combinaison d'espèce dermatophytic et médicament a été calculé géométrique MIC moyen de faciliter la comparaison avec MIC₅₀ (MIC qui inhibe la croissance de 50% des échantillons) et MIC₉₀ (MIC à laquelle 90% des échantillons sont inhibés).

Résultats

Compte tenu de toutes les espèces dermatophytique qui ont été déterminés sensibilité aux antifongiques des MIC moyenne des cinq antifongiques était: 0,334±0,39 µg/ml pour le kétoconazole, 0,132±0,12 µg/ml pour l'itraconazole, 8,9±5,2 µg/ml pour le fluconazole, 0,163±0,06 µg/ml pour le voriconazole et 0,013±0,007 µg/ml pour la terbinafine. La terbinafine avait la meilleure activité antifongique suivie par l'itraconazole et le voriconazole (p<0,05). Aussi MIC₅₀ et MIC₉₀ de la terbinafine avaient les plus faibles valeurs de les cinq antifongiques pour les dermatophytes testés: 0,012±0,004 µg/ml et

0,025±0,0188 µg/ml. De plus, l'activité antidermatophytique du fluconazole était la plus basse avec une MIC moyenne de 8,946±5,2 µg/ml. Il n'y avait aucune différence statistiquement significative ($p>0,05$) entre les moyennes de MIC de kétoconazole, itraconazole, fluconazole, voriconazole et terbinafine, entre les deux groupes de patients immunodéprimés et immunocompétents respectivement.

L'activité antifongique contre les dermatophytes identifiés dans les deux groupes de patients peuvent se résumer comme suit: terbinafine> itraconazole> voriconazole> kétoconazole> fluconazole. Quatre cas de résistance des dermatophytes à fluconazole (2 souches de *T. interdigitale* et 2 de *M. canis*) et l'autre pour le kétoconazole (1 souche de *T. interdigitale*) ont été enregistrés. Trois des quatre patients (2 atteints de diabète, 1 atteint de tumeurs malignes et 1 infectés par le VIH) à partir des souches isolées étaient résistantes au fluconazole ont reçu un traitement antérieur avec du fluconazole pour les infections à *Candida*.

L'analyse de la sensibilité des dermatophytes isolées chez des patients atteints de diabète sucré, avec malignité, avec l'MRC, l'infection à VIH, les traitements immunosuppresseurs, une maladie hépatique chronique, la malnutrition, la tuberculose a été observé que les valeurs moyennes de MIC de l'ensemble des cinq antifongiques sont égales ou supérieures que celles dues à des dermatophytes sélectionnés de le groupe de contrôle individus, la différence n'était pas statistiquement significative ($p>0,05$). Les variations dans le profil d'activité de chaque espèce dermatophytique séparément aux substances antifongiques sont plus élevées chez les sujets immunodéprimés.

Conclusions

Pour toutes les espèces testées dermatophytique, terbinafine avait la meilleure activité antidermatophytique et le fluconazole était la plus faible activité antidermatophytique. Classement général pour toutes les espèces dermatophytique d'activité antifongique de cinq antifongiques étudiée a été: terbinafine> itraconazole> voriconazole> kétoconazole> fluconazole. Il y avait aussi quatre cas de résistance à des dermatophytes au fluconazole et un contre kétoconazole; 4 étaient dans le groupe des patients immunodéprimés (2 avec le diabète, 1 à la malignité, 1 infection par le VIH) et un en le groupe de contrôle.

Compte tenu de toutes les espèces de dermatophytique isolées, aucune différence statistiquement significative n'a été observée ($p>0,05$) entre les souches de sensibilité dermatophytique isolées chez des patients immunodéprimés et de patients provenant de groupe de contrôle.

Références

- ¹ Vander Straten MR, Hossain MA, Ghannoum MA. Cutaneous infections dermatophytosis, onychomycosis, and tinea versicolor. *Infect Dis Clin North Am.* 2003 Mar;17(1):87-112.
- ² Rodwell GEJ, Bayles CL, Towersey L, Aly R. The prevalence of dermatophyte infection in patients infected with human immunodeficiency virus. *International Journal of Dermatology* 2008; 47(4):339-43.
- ³ Quatresooz P, Piérard-Franchimont C, Arrese JE, Piérard GE. Clinicopathologic presentations of dermatomycoses in cancer patients. *JEADV* 2008;22:907-917.
- ⁴ Almeida SR. Immunology of dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008;166(5-6):277-283.
- ⁵ Calderon RA. Immunoregulation of dermatophytosis. *Critical Reviews in Microbiology* 1989;16(5):339-69.
- ⁶ Odom RB. Common superficial fungal infections in immunosuppressed patients. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31: S56-S59.
- ⁷ Elewski EB, Sullivan J. Dermatophytes as opportunistic pathogens. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30(6): 1021-1022.
- ⁸ Machouart-Dubach M, Lacroix C, de Chauvin MF, Le Gall I, Giudicelli C, Lorenzo F, Derouin F. Rapid discrimination among dermatophytes, *Scytalidium spp.*, and other fungi with a PCR-restriction fragment length polymorphism method. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):685-90.
- ⁹ Liu HN, Lee DD, Wong CK. KONCPA: a new method for diagnosing tinea unguium. *Dermatology* 1993; 187: 166-8.
- ¹⁰ Rippon J.W. Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Philadelphia. (1988).
- ¹¹ Bergmans AM, Schouls LM, van der Ent M, Klaassen A, Bohm N, Wintermans RG. Validation of PCR-reverse line blot, a method for rapid detection and identification of nine dermatophyte species in nail, skin and hair samples. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 778-788.
- ¹² Roberts DT, Taylor WD, Boyle J. Guidelines for treatment of onychomycosis. *Br J Dermatol.* 2003; 148:402-10.
- ¹³ Odds, F., J. Ausma, F. Van Gerven, F. Woestenborghs, L. Meerpoel, J. Heeres, H. Vanden Bossche, and M. Borgers. In vitro and in vivo activities of the novel azole antifungal agent r126638. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:388-391.
- ¹⁴ Tatsumi, Y., M. Yokoo, H. Senda, and K. Kakehi. Therapeutic efficacy of topically applied KP-103 against experimental tinea unguium in guinea pigs in comparison with amorolfine and terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3797-3801.