

Original article

Sensibilité aux antifongiques des *Candida spp* isolés dans les candidoses digestives chez les sujets séropositifs au VIH à Yaoundé-Cameroun

Antifungal susceptibility patterns among the clinical isolates of Candida Spp in digestive candidosis in the HIV-positive subjects

Gonsu Kamga H^{1,2}, Kechia Agem FA¹, Tegankam Dorice¹,
Toukam Michel¹, Sando Zacharie^{1,2}, Moyou Somo R¹.

¹ Département de Microbiologie, Hématologie et Maladies infectieuses, Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Université de Yaoundé1.

² Département des sciences morphologiques et d'Anatomie pathologique, Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Université de Yaoundé1.

³ Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé.

Auteur correspondant: Hortense Gonsu Kamga

Email: hgonsu@gmail.com

ABSTRACT

PURPOSE / AIM

The increase in fungal infections and mainly digestive candidiasis is a public health problem especially in immunocompromised patients affected by AIDS. The purpose of this study was to contribute to the efficient management of digestive candidiasis in HIV positive subjects. The main objective was to describe the profile of sensibility of antifungals to the *Candida spp* isolated in the digestive candidosis in the HIV-positive subjects.

METHODS

A cross sectional and descriptive study was carried from September 2011 to January 2012. Oral cavity swab and stool were sowed on the Candichrom II culture medium for isolation and identification. The filamentation test was performed to distinguish *C. albicans* from *C. dublinensis*. Antifungal susceptibility test was done by diffusion disks method using amphotericine B, fluconazole, ketoconazole, miconazole, nystatine, and itraconazole. Epi-info software 7 was used for data analysis and Excel for graphics.

RESULTS

We identified 4 species: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida dublinensis* and *Candida tropicalis* with the predominance of *Candida albicans* (45,65%) and *Candida glabrata* (44,92 %). It emerged from our study that 99 % of isolate were sensitive to miconazole, 87% to ketoconazole, 62 % to itraconazole, 38 % to fluconazole and 5 % to amphotericine B. *Candida glabrata* was the most multiresistant.

CONCLUSION

Azole derivatives were more active than the polyenes. Fluconazole activity is limited. Because of appearances of more resistant strains of *Candida* to usual antifungals, we recommend the use of ketoconazole as alternative to fluconazole.

RÉSUMÉ

OBJECTIFS

Les mycoses digestives sont habituellement retrouvées chez les sujets immunodéprimés en particulier les patients atteints de SIDA, Le but de cette étude était de contribuer à une meilleure prise en charge des candidoses digestives chez les sujets positifs au VIH. L'objectif principal était d'étudier le profil de sensibilité aux antifongiques des *Candida spp* isolés chez ces patients.

MÉTHODES

Il s'agit d'une étude transversale et descriptive réalisée de septembre 2011 à janvier 2012. Après avoir obtenu le consentement des patients, un écouvillonnage du muguet buccal et les selles ont été ensemencés sur milieu sélectif Candichrom II. Le test de filamentation a permis de discriminer *C. albicans* de *C. dublinensis*. L'antifongogramme a été réalisé par méthode de diffusion sur gélose casitone. Les antifongiques testés étaient : amphotéricine B, fluconazole, kétoconazole, miconazole, nystatine, itraconazole. Le logiciel EPI info 7 a été utilisé pour l'analyse des données et Excel pour les graphiques.

RÉSULTATS

Nous avons identifié 4 espèces : *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida dublinensis* et *Candida tropicalis* avec une prédominance de *Candida albicans* (45,65%) et *Candida glabrata* (44,92%). La quasi-totalité des souches 99% étaient sensibles au miconazole, 87% au kétoconazole, 62% à l'itraconazole, 38% au fluconazole, 5% à l'amphotéricine B. L'espèce ayant présenté le plus de résistance aux antifongiques était *Candida glabrata*.

CONCLUSION

Les dérivés azolés sont plus actifs que les polyènes. L'activité du fluconazole est limitée. Nous recommandons aux prescripteurs de préconiser l'utilisation du kétoconazole qui est plus actif et peut être une alternative au fluconazole.

INTRODUCTION

Les mycoses, infections généralement bénignes chez les sujets immunocompétents, ne touchent que la peau, les cheveux, les ongles, les muqueuses et cèdent spontanément. Chez les individus dont le système immunitaire est affaibli, comme dans le cas du syndrome immunodéficient acquis (SIDA), de telles infections appelées dermatophytoses, candidoses peuvent persister pendant de longues périodes.

Les candidoses sont des affections cosmopolites provoquées par des levures appartenant au genre *Candida*. Ce dernier est incriminé dans plus de 80% des infections à levures. Son spectre clinique est varié. Il va des atteintes superficielles, en particulier les muqueuses respiratoires, digestives, et génitales aux localisations profondes (mycoses pulmonaires) et disséminées (mycoses septicémiques) [1]

Dans les candidoses digestives, les levures du genre *Candida* sont responsables de 90% des mycoses du tube digestif. Elles sont généralement provoquées par un passage à l'état pathogène de ces micro-organismes endogènes, à la faveur d'une défaillance de l'hôte. *C. albicans* est l'agent étiologique majeur. On rencontre avec une incidence beaucoup plus faible *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et *C. guilliermondii* [2] ; Les atteintes digestives peuvent se manifester par des diarrhées chroniques ou dyspepsies, nécessitant des biopsies digestives pour histopathologie à visée étiologique.

La recrudescence des mycoses, constitue un problème de santé publique chez les sujets immunodéprimés tels que les patients séropositifs au VIH. La prise en charge de ces maladies qui sur un terrain affaibli constituent souvent le premier motif de consultation, nécessite un diagnostic biologique précis et un traitement approprié. C'est ainsi que nous nous sommes proposé d'étudier le profil de sensibilité aux antifongiques habituellement utilisés des *Candida spp.* isolés chez ces patients [2].

METHODOLOGIE

Il s'agit d'une étude transversale, descriptive et prospective qui s'est déroulée de septembre 2011 à janvier 2012.

Le recrutement des patients a été fait au Centre de traitement agréé du VIH du Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé (CHUY) et à l'hôpital du jour de l'Hôpital Central de Yaoundé (HCY).

Les analyses mycologiques ont été réalisées au Laboratoire de bactériologie du CHUY. Un échantillonnage consécutif non probabiliste a été réalisé et la taille calculée de l'échantillon était de 246 patients.

Était inclus dans l'étude tout patient adulte séropositif au VIH présentant des signes de candidose digestive,

naïf aux antifongiques et ayant consenti à participer à l'étude.

L'examen physique a consisté à rechercher les lésions buccales, en particulier le muguet.

Le prélèvement de la muqueuse buccale a été fait par écouvillonnage. Les selles ont été recueillies dans un pot stérile. Les prélèvements ont été conservés dans un sac isotherme et acheminés au laboratoire dans un délai maximum de deux heures.

L'examen direct consistait à réaliser un état frais. La mise en culture a été faite sur milieux chromogènes (Candichrom II) permettant l'isolement et l'identification rapide des levures du genre *Candida*, par la technique des quadrants. L'incubation a été faite à 37°C, en atmosphère aérobie pendant 24 à 48 heures.

L'identification était basée sur la couleur des colonies. *Candida albicans* et *Candida dublinensis* produisant des colonies bleues à verdâtres, la différenciation étant faite par le test de filamentation du sérum qui était positif pour *Candida albicans*. Les colonies de *C. glabrata* étaient beiges et plus grosses que celles de *C. albicans*.

L'antifongogramme a été réalisé sur la base de l'examen direct avec la présence d'au-moins une levure par champ microscopique au grossissement 40X, de filaments fongiques à l'examen du produit pathologique et la présence d'au-moins 20 colonies dans le milieu de culture après 24 heures d'incubation. Le test de sensibilité des souches de *Candida* isolées a été réalisé par la technique de diffusion des disques sur gélose Casitone. L'ensemencement par écouvillonnage a été effectué à partir d'une suspension microbienne dans 10 ml d'eau physiologique de manière à obtenir l'indice 3 de Mac Farland. Les antifongiques testés étaient : l'amphotéricine B, le fluconazole, le kétoconazole, le miconazole, la nystatine et l'itraconazole. Les géloses ainsi ensemencées ont été incubées à 35-37°C pendant 24 à 48 heures selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) de 2011.

La lecture et l'interprétation ont été faites après mesure entre le bord du disque et la limite de la zone d'inhibition.

Un diagnostic gratuit et une prescription médicale pour la prise en charge de la candidose digestive leur ont été proposés. Les patients ont été soumis à un questionnaire.

L'analyse des données a été faite à l'aide du logiciel Epi-info 7 et EXCEL pour les graphiques.

RÉSULTATS

La population était constituée de 188 patients, soit 72% de femmes et 28% d'hommes. avec un sex ratio F/H de 3 / 1.

L'âge moyen était de 39.50 ± 10.35 ans avec un minimum de 18 ans et un maximum de 62 ans.

.La répartition des patients en fonction du taux de CD4 a révélé que 6% avaient un taux de CD4 > 500, 51% entre 200 et 499 CD4 et 43% un taux de CD4 < 200. La notion de prise d' d'antirétroviraux (ARV) était retrouvée chez 48% patients. Parmi les 138 cultures positives, 2 espèces ont été prédominantes: *C. albicans*, 63(46%) et *C. glabrata*, 62 (45%).

Le stade clinique B du SIDA était le plus fréquent (95%).

Au total, 260 prélèvements ont été effectués, soit 89 (34,2%) écouvillonnages du muguet buccal et 171(65,76%) échantillons de selles. (Tableau I)

Les espèces les plus retrouvées dans le muguet buccal ont été *C. albicans* et *C. dublinensis* (figure 1)

Les espèces les plus isolées dans les selles étaient : *C. glabrata* et *C. tropicalis*

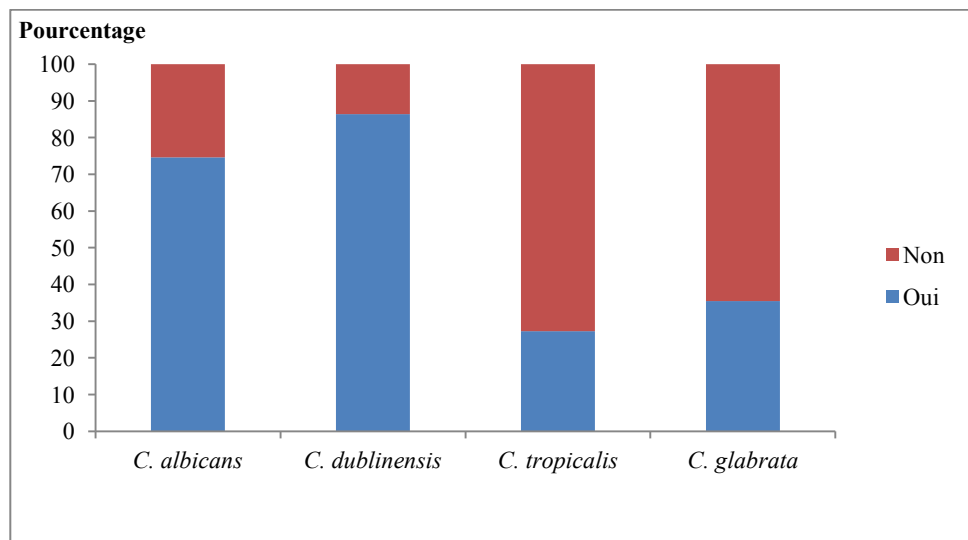


Fig. 1 Fréquence des espèces isolées dans le muguet

Sur 138 cultures positives, nous avons eu 20 cas de coïnfections, dont 12 coïnfections *C. albicans* - *C. glabrata*, 2 *C. albicans* - *C. tropicalis*, 5 *C. dublinensis* - *C. glabrata*, 1 *C. dublinensis* - *C. tropicalis*

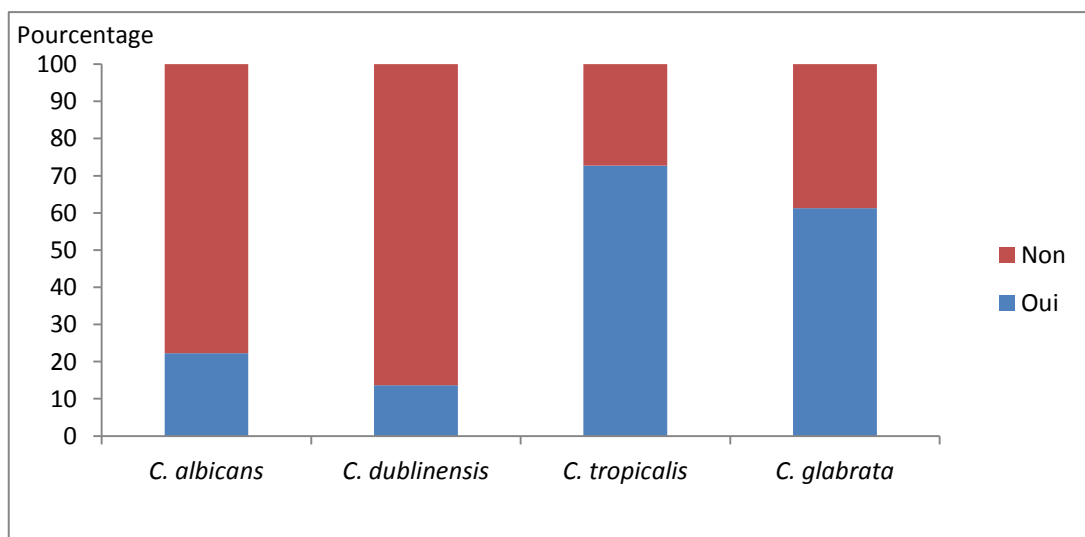


Fig. 2 Fréquence des espèces isolées dans les selles.

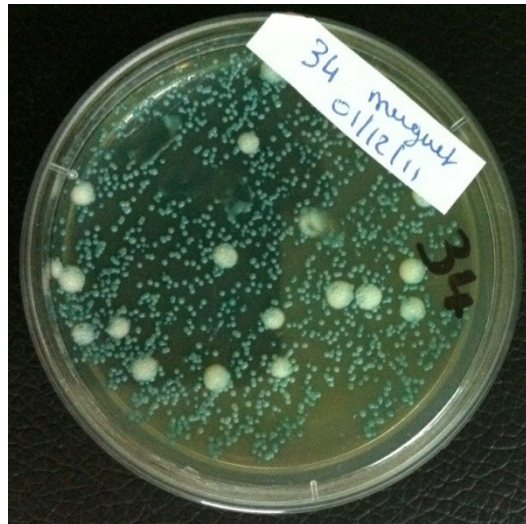


Fig. 3 Aspect d'une culture de muguet.
Petites colonies - *C. albicans*. Grosses colonies - *C. glabrata*

Plus le taux le CD4 est bas, plus la fréquence des *Candida* était élevée.

La présence des espèces *C. albicans*, *C. dublinensis*, et *C. tropicalis* était significativement associée à un taux de CD4 inférieur à 200, avec des *p-value* respectives de $p=0.003$, $p=0.003$ et $p=0,026$.

Il n'y a pas eu d'association significative entre le taux de CD4 et *C. glabrata*. ($P=0,27$)

Toutes les espèces retrouvées étaient moins fréquentes chez les patients sous ARV, cependant l'association entre l'isolement d'une espèce et la

prise d'ARV était significative dans la plupart des cas avec pour *C. albicans* $p=0,007$, *C. dublinensis* $p=0,003$, *C. glabrata* $p=0,02$; la fréquence de *C. tropicalis* ne dépendait pas de la prise d'ARV, car l'association n'était pas significative ($P=0.15$).

Les antifongiques les plus actifs ont été le miconazole, (99%), le kétoconazole, (77%) et l'itraconazole (62%), tous dérivés des azolés.

Plus de la moitié des levures étaient résistantes au fluconazole. Par ailleurs, les polyènes tels que la Nystatine et l'Amphotéricine B étaient inactives.

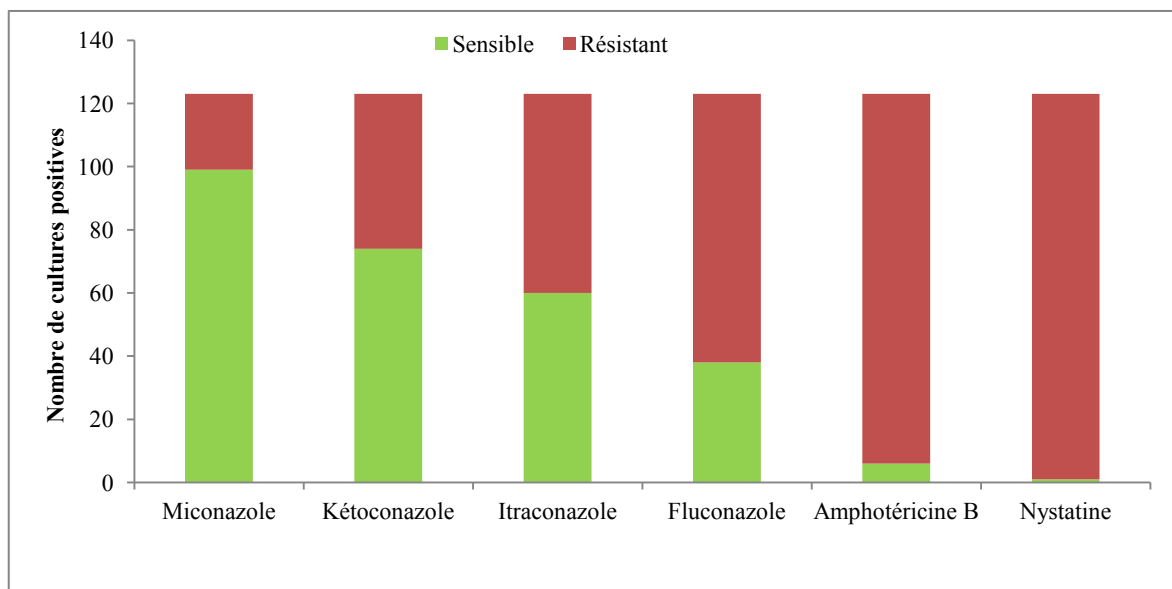


FIGURE 4 : PROFIL DE SENSIBILITÉ DES *CANDIDA* AUX ANTIFONGIQUES TESTÉS

DISCUSSION

Cette évolution de l'antifongothérapie a logiquement entraîné la mise en œuvre beaucoup plus systématique des tests de sensibilité *in vitro* par des méthodes variées [3].

Selon l'EDSC III 2004 (enquête démographique de santé du Cameroun), la proportion de personnes séropositives au VIH augmente avec l'âge : d'un minimum de 1,4 % chez les personnes âgées de 15-19 ans, elle atteint un maximum de 8,9 % dans la tranche de 30-34 ans pour diminuer ensuite à 4,7 % entre 45-49 ans. Les variations de la prévalence selon l'âge différent entre les femmes et les hommes. La prévalence du VIH est de 6,8% pour les femmes contre 4,1% pour les hommes en 2004 [4]. Selon le rapport publié en 2010 par l'agence nationale de la démographie du Sénégal, jusqu'en 2005, les femmes étaient plus touchées par l'infection à VIH, avec un sexe ratio de 5/1. Cette différence pourrait s'expliquer par la configuration anatomique des femmes qui les rend vulnérables, et leur célérité à consulter dans les formations sanitaires.

Les candidoses digestives sont assez fréquentes chez les patients infectés par le VIH et les signes cliniques sont parfois le premier motif de consultation [6]. Selon la classification CDC de 1993, la candidose œsophagienne marque le passage au stade SIDA.

La majorité des patients se trouvaient au stade clinique B soit 95%, phase symptomatique, mais plus de la moitié soit 52% d'eux n'étaient pas sous ARV ; expliquant probablement la fréquence élevée des candidoses digestives.

L'espèce la plus couramment identifiée dans les candidoses digestives est *Candida albicans* [6].

Selon une étude clinique et biologique des diarrhées parasitaires et fongiques chez 66 sujets immunodéprimés dans la zone urbaine et périurbaine de Yaoundé par A. Samé-Ekobo *et al* (1996), la prévalence globale des infections fongiques était de 80,5% et la flore fongique était dominée par l'espèce *C. albicans* [7].

Dans une autre étude réalisée à l'institut de santé publique et de la recherche de Téhéran en 2010, sur 150 patients VIH positifs examinés, 60% ont présenté une candidose oropharyngée. Les souches de *Candida* les plus fréquemment isolées étaient *C. albicans* dans 50,2% des cas, puis *C. glabrata* chez 22% des patients [8].

Dans notre étude, les espèces les plus retrouvées dans le muguet buccal étaient *C. albicans* et *C. dublinensis*. *C. albicans* est la principale espèce incriminée dans les candidoses oropharyngées, *C. dublinensis* ayant un tropisme pour la flore oropharyngée. [6, 9].

Le passage vers une candidose clinique est l'un des meilleurs marqueurs de l'évolution de la maladie, il survient lorsque les CD4 sont inférieurs à 300/ μ l [10].

La prise d'ARV n'influence pas la coïnfection. Quelque soit le cas, les personnes sous ARV sont moins sujettes aux candidoses digestives. Depuis l'avènement des multithérapies antirétrovirales hautement efficaces, l'incidence des candidoses oropharyngées a été significativement réduite chez les patients VIH positifs [8,10]

Selon Pfaller *et al.* 2006, Messer *et al.* 2006, Rex, JH 2000, la prévalence de la résistance acquise peut varier pour certaines espèces géographiquement et avec le temps. Il est par conséquent souhaitable d'obtenir des informations sur les modes de résistance locale, particulièrement pour un traitement approprié des infections sévères. Ils ont également rapporté des cas de résistance chez les patients atteints de SIDA qui avaient reçu un traitement à long terme au fluconazole [11,12, 13]. L'importante croissance des candidoses digestives serait associée à une augmentation de la résistance aux antifongiques. Elle serait liée à l'utilisation systématique en traitement prophylactique ou curatif des mycoses chez les sujets immunodéprimés.

La surconsommation des antifongiques à base de polyène fréquente dans notre environnement pourrait traduire la réduction de la sensibilité aux antifongiques. La sensibilité vis-à-vis des antifongiques diminue chez certaines souches de *Candida* du fait de la pression médicamenteuse. Un traitement antérieur antifongique modifiait la sensibilité de *Candida* aux polyènes [11,12, 13]. Une étude menée dans le service de réanimation du CHU de Grenoble entre 2004 et 2009 a montré que la consommation antérieure d'antifongiques modifiait l'épidémiologie et la sensibilité aux antifongiques des levures appartenant au genre *Candida* [14].

La résistance de *Candida glabrata* aux antifongiques pourrait résulter d'une augmentation de la régulation des gènes CDR (CDR1, CDR2 et MMDP1) responsables du flux cellulaire de la substance médicamenteuse [11,12, 13].

Selon Shiraz en 2011 en Iran, sur 206 espèces isolées l'espèce la plus résistante au kétoconazole généralement actif était *Candida glabrata* (16,6%) traduisant un grand nombre de petites mutations [15]. Le génome haploïde de *C. glabrata* a donc la plus forte probabilité d'exprimer un gène muté, ainsi que le contexte médical actuel, prônant la prophylaxie dans nombre de pathologies où l'immunité des patients est touchée, représentant un terrain favorable au développement d'une candidose et à la sélection simultanée d'isolats résistants [16].

CONCLUSION

Parmi les espèces isolées, *C. albicans* et *C. glabrata* sont les espèces les plus fréquemment isolées. Des cas de coinfections ont été relevés, notamment *C. albicans* et *C. glabrata*. Plus le taux de CD4 n'est bas, plus la fréquence des espèces isolées sont élevée. Les patients sous ARV sont moins sujets aux

candidoses digestives. *C. glabrata* est l'espèce la plus multirésistante. Les dérivés azolés sont plus actifs que les pyolènes. Parmi les dérivés azolés, le miconazole a été l'antifongique le plus actif, suivi du kétoconazole, de l'itraconazole et du fluconazole.

RÉFÉRENCES

- [1] Badillet G, Bievre C, Gueho E. Champignons contaminants des cultures. Champignons opportunistes. Atlas clinique et biologique. *Varia* 1987;2:132-216
- [2] Dieng Y, Faye-Niang, Ndour-Diop, Sow P S, Dieng T, Soumare M. Sensibilité aux antifongiques des souches de *Candida* responsables des candidoses oropharyngées chez les sujets vivant avec le VIH. *Sidanet* 2005 ;10: 835.
- [3] Grillot R. Les mycoses humaines : démarche diagnostique. Collection option biologie, 2001:93.
- [4] Mosoko J, Affana N. Prévalence du VIH et facteurs associés, EDS Cameroun final report 2004:300.
- [5] CNLS. Rapport du premier semestre 2011 des activités de lutte contre le VIH/SIDA et les IST au Cameroun, 2011: 2.
- [6] Samé- Ekobo A, Lohoué J, Mbassi A. Etude clinique et biologique des diarrhées parasitaires et fongiques chez les sujets immunodéprimés dans la zone urbaine et périurbaine de Yaoundé. *Cahiers d'études et de recherches francophones/santé* 1997;7:349.
- [7] Katirae F, Khosravi A R, Khalajc V, Hajiabdolbaghid M, Khaksarb A, Rasoolinejad M. Candidoses oropharyngées et colonisation orale à levures chez les patients infectés par le VIH. 2010;20:8-14.
- [8] Chabasse D, Guiguen C, Contet-Audonnew. *Mycologie médicale*, Masson, 1999:102.
- [9] Messer, Ronald N, Jones, Thomas R. SENTRY Antimicrobial Surveillance Programm. *J.clin. microbial.* 2006;44(51)782-7. Chercher la correspondance dans mémoire.
- [10] Develoux M, Bretagne S. Candidoses et levures diverses, EMC 2005.
- [11] Pfaller M A, Diekema D J, Rinaldi, Hu R, Vaselo AV, Tiraboschin. *Artemis Disk. Global antifungal Surveillance study* 2006; 43(12) : 5848-59.
- [12] Messer, Ronald N, Jones, Thomas R. SENTRY Antimicrobial Surveillance Programm. *J.clin. microbial.* 2006;44(51)782-7.
- [13] Rex J H, Walsh T J, Sobel J D, Filler S G, Pappas P G, Dismukes W E. Practice guideline for the treatment of candidiasis. 2000; 30:662-78.
- [14] Fournier P. Impact de la consommation d'antifongiques sur *Candida spp.* Etude dans le service de réanimation médicale de 2004 à 2009 au CHU de Grenoble.
- [15] Kamiar Z, Mohammad, Kayvan P, Marjan M, Moosa R, Ghiasi, Hasanein R. Determination of antifungal susceptibility Patterns among the clinical isolates of *Candida Spp.* 2011; 3: 357-60.
- [16] Vandeputte P. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Université d'Angers 2008: 238.