

Mycologie

ESSAI DE DÉPISTAGE PRÉCOCE DE LA CRYPTOCOCCOSE PULMONAIRE PAR MISE EN CULTURE D'EXPECTORATIONS

Par P. MUKAMURANGWA (1), J. BOGAERTS (2), H. Taelman (3),
J. BATUNGWANAYO (3), A. KAGAME (3), P. VAN DE PERRE (4) & D. SWINNE (1) (5)

Attempts for an early detection of pulmonary cryptococcosis by sputum culture.

Summary: Cryptococcosis is a serious opportunistic infection occurring in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients.

As the number of infected patients with the human immunodeficiency virus (HIV) in Central Africa and especially in Rwanda increases, the prevalence of cryptococcosis can also be expected to rise.

An earlier diagnosis and treatment will improve the prognosis of cryptococcosis. As it is widely accepted that the lungs are the portal of entry for the yeast, 270 sputum samples coming from 230 patients attending the Centre Hospitalier de Kigali (CHK)—Rwanda for lung diseases, were investigated.

Cr. neoformans var neoformans was cultured from 8 samples coming from 5 out of 230 patients.

A retrospective review showed that 4 out of 5 patients were infected with HIV, a predisposing factor for cryptococcosis.

Résumé : La cryptococcose est une infection opportuniste très fréquente au cours du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). L'augmentation rapide et continue du nombre de sujets infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) en Afrique centrale et notamment au Rwanda, a pour corollaire une augmentation du nombre de cas de cryptococcose. Pour améliorer le pronostic, un dépistage précoce permettant d'entreprendre rapidement un traitement est souhaitable. La voie pulmonaire étant classiquement la porte d'entrée de la levure, nous avons recherché *Cryptococcus neoformans*, l'agent de la cryptococcose, dans 270 échantillons d'expectorations de 230 patients venus consulter au Centre Hospitalier de Kigali (CHK) — Rwanda pour des problèmes pulmonaires. *Cr. neoformans var. neoformans* a été isolé à partir de 8 échantillons provenant de 5 patients sur 230 (2 %). L'analyse rétrospective des dossiers de 4 patients sur 5 a montré qu'ils étaient infectés par le VIH, facteur prédisposant à la cryptococcose.

INTRODUCTION

Cryptococcus neoformans est responsable d'infections systémiques au cours desquelles l'atteinte du système nerveux central (SNC) est prédominante.

Contractée par inhalation, la cryptococcose peut rester localisée au niveau des poumons (4, 6, 11) voire se résorber (8) si l'on est en présence d'hôtes immunocompétents. Par contre, si l'on est en présence d'hôtes immunodéprimés, cette infection va se disséminer atteignant d'autres organes avec une affinité particulière pour le SNC (11, 22). Il est actuellement bien établi que les patients infectés par le virus

d'immunodéficience humaine (VIH) constituent un groupe à hauts risques pour la cryptococcose (12, 21). Si le taux de prévalence de la cryptococcose chez ce type de patient est estimé à 7 % aux USA (5, 23), quelques données épidémiologiques africaines le situent entre 13 % et 20 % en Afrique Centrale (13, 21). Au Centre Hospitalier de Kigali (CHK) — Rwanda, Taelman *et al.* (19) ont observé en effet ces dernières années une poussée épidémique de cas de cryptococcose, qui est passée de 1 cas par an en 1983 à 2 cas par semaine en 1990 et ce en rapport direct avec l'épidémie de SIDA qui sévit au Rwanda. A quelques exceptions près (3, 10), tous les cas de cryptococcose associés au SIDA sont dus à la variété *neoformans* (17).

Par ailleurs, les travaux réalisés en Afrique centrale par Swinne *et al.* (16, 18) montrent que cette variété se retrouve dans l'environnement. Celui-ci constitue donc une source permanente de contami-

(1) Laboratoire de Mycologie, Institut de Médecine tropicale, Anvers, Belgique.

(2) Service de Microbiologie, Centre Hospitalier de Kigali, Rwanda.

(3) Service de Médecine Interne, Centre Hospitalier de Kigali, Rwanda.

(4) Programme National de Lutte contre le SIDA, Kigali, Rwanda.

(5) Manuscrit n° 1421. Accepté le 31 janvier 1994.

nation et/ou de recontamination pour les patients SIDA/VIH+, et ce par la voie pulmonaire.

La détection précoce de la cryptococcose au stade de la localisation pulmonaire primitive permettrait l'instauration d'un traitement spécifique avant la dissémination de l'infection. L'objectif de notre étude a consisté à évaluer la rentabilité de la culture d'expectorations sur un milieu sélectif comme méthode de détection de la cryptococcose pulmonaire chez des patients hospitalisés pour une affection respiratoire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Échantillons

L'enquête s'est déroulée entre décembre 1991 et février 1992. *Cr. neoformans* a été recherché dans les expectorations de 230 patients (2 hommes/1 femme), venus consulter au CHK pour des problèmes pulmonaires : 270 échantillons d'expectorations ont été récoltés et ensemencés.

En effet, chez certains patients, plusieurs prélèvements ont été analysés car nous avons ensemencé les échantillons destinés normalement à la recherche de *Mycobacterium tuberculosis* où un minimum de trois prélèvements est exigé.

La recherche d'antigènes solubles n'a pu être effectuée que dans le sérum de 3 des 5 patients (n° 1, n° 2 et n° 3) dont les expectorations étaient positives.

La positivité pour le VIH n'a pu être précisée que pour 4 des 5 patients présentant *Cr. neoformans* dans leurs expectorations.

Technique

Le milieu d'isolement est un milieu au *Guizotia abyssinica* sur lequel les colonies de *Cr. neoformans* sont brunes. Ce milieu contient un extrait aqueux de *G. abyssinica* (50 g de graines broyées/500 ml eau distillée; bouillir 20 minutes; filtrer; q. s. 1 000 ml eau distillée), 1,5 % d'agar, 0,5 % de glucose, 0,1 % de créatinine, 0,1 % KH_2PO_4 , 0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 % chloramphénicol et 0,05 % de diphényl.

0,5 ml d'expectorations sont étalées à la surface du milieu coulé en boîtes de Pétri.

L'incubation maximale est de 2 semaines à 25° C.

Les critères d'identification de *Cr. neoformans* selon BARNETT *et al.* (1), sont basés sur l'assimilation de l'inositol, de la créatinine; la non-assimilation du lactose et du KNO_3 ainsi que la capacité à croître à 37° C.

Un test d'assimilation de D-proline, permet de préciser la variété (7).

Le diagnostic sérologique a été réalisé à l'aide d'un kit commercial Immy (Immuno-Mycologics, Norman, Oklahoma) permettant le dépistage d'antigènes solu-

bles de *Cr. neoformans* dans le sérum, le liquide céphalo-rachidien (LCR) ou les autres liquides biologiques de patients atteints de cryptococcose.

RÉSULTATS

Cr. neoformans var. *neoformans* a été obtenu au moins une fois en culture chez 5 patients sur 230 soit chez 2 %. Le tableau n° I nous donne les résultats pour ces 5 patients.

Tab. I. — Isolement de *Cr. neoformans* var. *neoformans* à partir d'expectorations de 5 patients.

N° patients	Nb expecto+ /Nb tot. échant.	UFC*/ml	intervalle de temps (jours)
1	1/3	2	0
		0	15
		0	20
2	4/4	400	0
		100	10
		600	15
		10	20
3	1/2	16	0
		0	14
4	1/1	2	-
5	1/1	36	-
Total	8/11		

* : unité formant une colonie.

Sur un total de 11 échantillons prélevés chez ces 5 patients, seuls 8 ont donné une culture positive.

Le nombre de colonies variait de 2 UFC/ml à 600 UFC/ml.

Le patient n° 1 était infecté par le VIH et soigné pour une tuberculose disséminée (pleurale, péricardique, médiastinale). Il a bien répondu à un traitement anti-tuberculeux.

Chez ce patient, *Cr. neoformans* a été isolé à partir d'un prélèvement sur 3. Les deux contrôles suivants, réalisés dans un intervalle de 20 jours, se sont montrés négatifs.

Le dosage d'antigènes solubles réalisé ultérieurement dans le sérum a été négatif.

Chez le patient n° 2, *Cr. neoformans* a été isolé à partir de chacun des 4 prélèvements, réalisés dans un intervalle de 20 jours.

Ce patient a évolué une semaine après le 1^{er} isolement vers une cryptococcose méningée et généralisée, confirmée par la positivité du dosage d'antigènes solubles dans le sérum avec un titre de 1/16. *Cr. neoformans* var. *neoformans* a été en plus isolé à partir de son LCR.

Le patient n° 3 était un patient VIH+ présentant une pneumopathie récurrente qui a été traitée avec

le cotrimoxazole. Après isolement de *Cr. neoformans* dans un prélèvement sur 2 et malgré un dosage négatif d'antigènes dans son sérum, il a été, pour plus de sécurité, traité à l'itraconazole mais son évolution a été défavorable, car ce patient est décédé.

Le patient n° 4 était un patient VIH+ qui présentait une toux persistante et des hémoptysies, de la fièvre, une pneumopathie bilatérale.

Le diagnostic de sarcome de Kaposi a été posé sur la base d'une bronchoscopie. Chez ce patient, décédé de cette pathologie, les résultats d'expectoration n'ont été obtenus que post-mortem et la sérologie n'a plus pu être réalisée.

Le patient n° 5 était un malade ambulatoire qui ne s'est présenté qu'une seule fois à l'hôpital. La bronchoscopie n'a pas révélé de lésions visibles hormis des œdèmes de la muqueuse bronchique. Aucun traitement spécifique n'a pu être instauré. Il n'a pas non plus été possible d'effectuer de tests sérologiques.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'étude réalisée au Rwanda nous a permis d'isoler *Cr. neoformans* var. *neoformans* à partir d'expectorations de 5 patients fréquentant le CHK pour des problèmes pulmonaires.

Il s'agit dans tous les cas de la variété *neoformans*, c'est-à-dire celle classiquement associée à l'infection par le VIH. Après consultation des dossiers de 4 des 5 patients (n°s 1, 2, 3, 4), nous avons pu déterminer qu'ils étaient VIH+, ce qui constitue un facteur favorisant la cryptococcose disséminée et essentiellement cérébroméningée comme l'ont démontré des travaux antérieurs (11, 22).

Peut-on pour autant relier la présence de *Cr. neoformans* dans les expectorations aux manifestations cliniques observées chez ces cinq patients?

Si HAMMERMAN (8) affirme que le commensalisme peut exister, par contre la plupart des auteurs (9, 14, 15) ont constaté que *Cr. neoformans* ne s'isole que rarement à partir d'expectorations de sujets présumés sains. Sa présence chez un individu est, à leur avis, toujours associée à une infection, parfois minime, du tractus respiratoire. Cette dernière observation doit donc nous inciter à d'autant plus de méfiance que 4 de nos patients (n°s 1, 2, 3, 4) et peut-être même les 5 (n° 5) patients de notre série étaient séropositifs, ce qui est reconnu comme le facteur prédisposant essentiel vis-à-vis de la cryptococcose. Quoi qu'il en soit, chez le patient n° 2, il s'agit incontestablement d'un cas de cryptococcose associée au SIDA. Le dosage d'antigènes solubles réalisé dans le sérum a été positif, confirmant la dissémination de l'infection à un site extrapulmonaire. Une méningite s'est en effet déclarée une semaine après le premier isolement de *Cr. neoformans* à partir de ses expectorations. L'instauration d'un traitement à l'itraconazole s'est accompagnée d'une diminution du nombre de colonies au bout de 2 semaines de traitement.

Chez les patients n°s 1 et 3 chez lesquels le dosage d'antigènes dans le sérum a été négatif et chez qui la culture d'expectorations a permis d'isoler une fois *Cr. neoformans*, nous ne pouvons pas nous prononcer avec certitude mais comme nous venons de le signaler, la présence de *Cr. neoformans* chez des patients VIH+ constitue un signal d'alarme étant donné la possibilité de dissémination et doit donc conduire à un suivi plus étroit.

Chez le patient n° 4 dont la sérologie n'a pas pu être contrôlée, tout laisse penser qu'il aurait aussi pu, étant séropositif, évoluer vers une cryptococcose s'il n'était pas décédé d'un sarcome de Kaposi.

Enfin, chez le patient n° 5, un traitement spécifique n'a pas pu être instauré et sa sérologie a été impossible à réaliser, le patient ayant quitté l'hôpital. Par conséquent, nous ne pouvons rien dire.

En conclusion, est-il intéressant d'essayer de dépister la cryptococcose pulmonaire par mise en culture d'expectorations? Insistons tout d'abord sur le fait qu'il s'agit là d'une technique peu coûteuse qui, réalisée sur un bon milieu sélectif, va permettre d'isoler le moindre *Cr. neoformans* présent dans les expectorations, ce qui est bien sûr intéressant puisqu'il s'agit d'un essai de dépistage précoce.

Certains auteurs lui préfèrent d'autres techniques plus sensibles telles la mise en culture de liquides de lavage bronchoalvéolaires (2) mais ces prélèvements sont déjà plus difficiles à obtenir et ceci devient un inconvénient si l'on souhaite un dépistage à grande échelle.

Nos essais nous ont permis de repérer 5 patients positifs dont 1 seul manifestement avait déjà atteint un stade avancé de cryptococcose puisqu'il présentait des antigènes solubles dans son sérum. Dans 2 des 4 autres cas, les résultats ont permis d'isoler la levure alors que les résultats sérologiques étaient encore négatifs. Dans les 2 derniers cas, les contrôles sérologiques n'ont pas pu être effectués.

Si l'on prend en considération le fait que le SIDA constitue le facteur prédisposant le plus souvent impliqué dans le développement de la cryptococcose, que 4 patients étaient VIH+ et qu'ils venaient consulter pour des problèmes pulmonaires, ces isolements même uniques prennent toute leur signification.

Nous considérons donc que, le seul fait d'isoler *Cr. neoformans* même à une seule reprise chez de tels patients, constitue un signal d'alarme et c'est à ce titre que nous pensons pouvoir recommander d'effectuer cette recherche peu coûteuse et facile à réaliser chez tout patient VIH+, présentant une pathologie pulmonaire d'étiologie inconnue.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Pr Ch. DE VROEY ainsi que l'ensemble du personnel du Service de mycologie pour leurs conseils judicieux, Mlle A. HENRY de l'AGCD qui a sub-

ventionné cette recherche, les autorités du Ministère de la santé du Rwanda et le Dr M. NGABONZIZA, Directeur du CHK qui nous ont accordé l'autorisation de réaliser ce travail sur le terrain.

BIBLIOGRAPHIE

1. BARNETT (J. A.), PAYNE (R. W.) & YARROW (D.). — Yeast, characteristics and identification. *University Press*, Cambridge, 1986.
2. BAUGHAM (R. P.), RHODES (J. C.), DOHN (M. N.), HENDERSON (H.) & FRAME (P. T.). — Detection of cryptococcal antigen in bronchoalveolar lavage fluid: a prospective study of diagnostic utility. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1992, **145**, 1226-1229.
3. BOGAERTS (J.), TAELEMAN (H.), BATUNGWANAYO (J.), VAN DE PERRE (P.) & SWINNE (D.). — Two cases of HIV-associated cryptococcosis due to the variety *gattii* in Rwanda. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1993, **87**, 63-64.
4. CAMPBELL (G. D.). — Primary pulmonary cryptococcosis. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1965, **94**, 236-243.
5. CHUCK (S. L.) & SANDE (M. A.). — Infections with *Cr. neoformans* in the AIDS. *New Engl. J. Med.*, 1989, **321**, 794.
6. COHEN (A. A.), DAVIS (A.) & FINEGOLD (S. M.). — Chronic pulmonary cryptococcosis. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1964, **91**, 414-423.
7. DUFAIT (R.), VELHO (R.) & DE VROEY (CH.). — Rapid identification of the two varieties of *Cr. neoformans* by D-proline assimilation. *Mykosen*, 1987, **30**, 483.
8. HAMMERMAN (K. J.), POWELL (K. E.), CHRISTIANSON (CH. S.), HUGGIN (P. M.), LARSH (H. W.), VIVAS (J. R.) & TOSH (F. E.). — Pulmonary cryptococcosis, clinical forms and treatment. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1973, **108**, 1117-1123.
9. HOWARD (D. H.). — The commensalism of *Cr. neoformans*. *Sabouraudia*, 1973, **11**, 171-174.
10. KAPEND'A (K.), KOMICHELO (K.), SWINNE (D.) & VANDEPITTE (J.). — Meningitis due to *Cryptococcus neoformans biovar. gattii* in a Zairian AIDS patient. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 1987, **6**, 320-321.
11. KERKERING (T. M.), DUMA (R. J.) & SHADOMY (S.). — The evolution of pulmonary cryptococcosis. *Ann. Int. Med.*, 1981, **94**, 611-616.
12. KOVACS (J. A.), KOVACS (A. A.), POLIS (M.), WRIGHT (W. C.) *et al.* — Cryptococcosis in the acquired immune deficiency syndrome. *Ann. Int. Med.*, 1985, **103**, 533.
13. LAROCHE (R.), DEPPNER (M.), FLOCH (J. J.), KADENDE (P.), GOASGUEN (J.), SAUNIÈRE (J. F.) & DUPONT (B.). — La cryptococose à Bujumbura, Burundi. A propos de 80 cas observés en 42 mois. *Bull. Soc. Pathol. Ex.*, 1990, **83**, 159-169.
14. RANDHAWA (H. S.) & PAL (M.). — Occurrence and significance of *Cr. neoformans* in the respiratory tract of patients with bronchopulmonary disorders. *J. Clin. Microbiol.*, 1977, **5**, 5-8.
15. RANDHAWA (H. S.) & PALIWAL (D. K.). — Occurrence and significance of *Cr. neoformans* in the oropharynx and on the skin of a healthy human population. *J. Clin. Microbiol.*, 1977, **6**, 325-327.
16. SWINNE (D.), KAYEMBE (K.) & NIYIMI (M.). — Isolation of saprophytic *Cr. neoformans* var. *neoformans* in Kinshasa, Zaire. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1986, **66**, 57-61.
17. SWINNE (D.), NKURIKIYINFURA (J. B.) & MUYEMBE (T. L.). — Clinical isolates of *Cr. neoformans* from Zaire. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 1986, **5**, 50-52.
18. SWINNE (D.), DEPPNER (M.), LAROCHE (R.), FLOCH (J. J.) & KADENDE (P.). — Isolation of *Cr. neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis in Bujumbura, Burundi. *AIDS*, 1989, **3**, 389-390.
19. TAELEMAN (H.), CLERINX (J.), KAGAME (A.), BATUNGWANAYO (J.), NYIRABAREJA (A.) & BOGAERTS (J.). — Cryptococcosis, another growing burden for Central Africa. *The lancet*, 1991, **338**, Sept. 21, 761.
20. TESTA (J.), VOHITO (M. D.) & GEORGES (A. J.). — Cryptococcosis et SIDA à Bangui. *Bull. Soc. Franç. Mycol. Méd.*, 1988, **17**, 117-120.
21. VANDEPITTE (J.). — Clinical aspects of cryptococcosis in patients with AIDS. In « Mycoses in AIDS patients ». Ed. by H. VANDEN BOSSCHE *et al.*, Plenum Press, New York, 1990, 115-122.
22. YOUNG (E. J.), HIRSH (D. D.), FAINSTEIN (W.) & WILLIAMS (T. W.). — Pleural effusions due to *Cr. neoformans*: a review of the literature and report of two cases with cryptococcal antigen determination. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1980, **121**, 743-747.
23. ZUGER (A.), LOUE (E.), HOLZMAN (R. S.), SIMBERKOFF (M. S.) & RAHAL (J. J.). — Cryptococcal disease in patients with acquired immune deficiency syndrome. Diagnostic features and outcome of treatment. *Ann. Int. Med.*, 1986, **104**, 234-240.