



Que faire d'une PCR *Pneumocystis jirovecii* positive dans un LBA?

Dr Nathalie De Castro

SMIT Saint-Louis

30/11/2017

nathalie.de-castro@aphp.fr





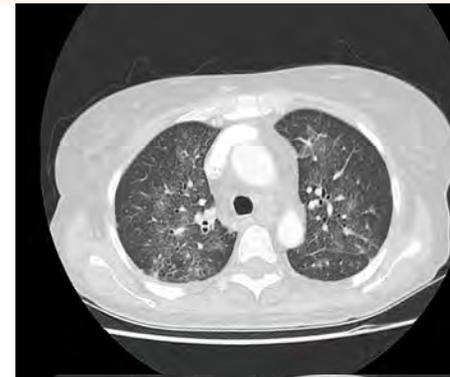
Quizz

Quizz 1

1. Avez-vous un laboratoire de mycologie dans votre hôpital ou le diagnostic est externalisé?
2. Savez vous quels tests sont utilisés pour le diagnostic de PCP dans votre laboratoire?
 1. Coloration
 2. IFI
 3. PCR
3. Si vous utilisez la PCR pour faire le diagnostic de PCP
 1. Est-ce c'est une PCR quantitative?
 2. C'est sur LBA uniquement? Autres prélèvements respiratoires?
 3. Êtes vous satisfait-e de son utilisation?
 4. Connaissez-vous les seuils pour distinguer colonisation/infection?
4. La PCR....Vous n'en avez jamais entendu parler pour le diagnostic de PCP
5. Utilisez-vous le dosage de β D glucane en routine?

Quizz 2

- Mme N. 67 ans
- Lymphome T angio-immunoblastique en échappement
- Dernière chimio : mustine 3
- Pas de bactérie Bactrim fortes doses???
- Détresse respiratoire à 39
- Lymphopénie $100 \mu\text{L}$
- LBA impossible
- Et pas de transfert en réa...



Quizz 2

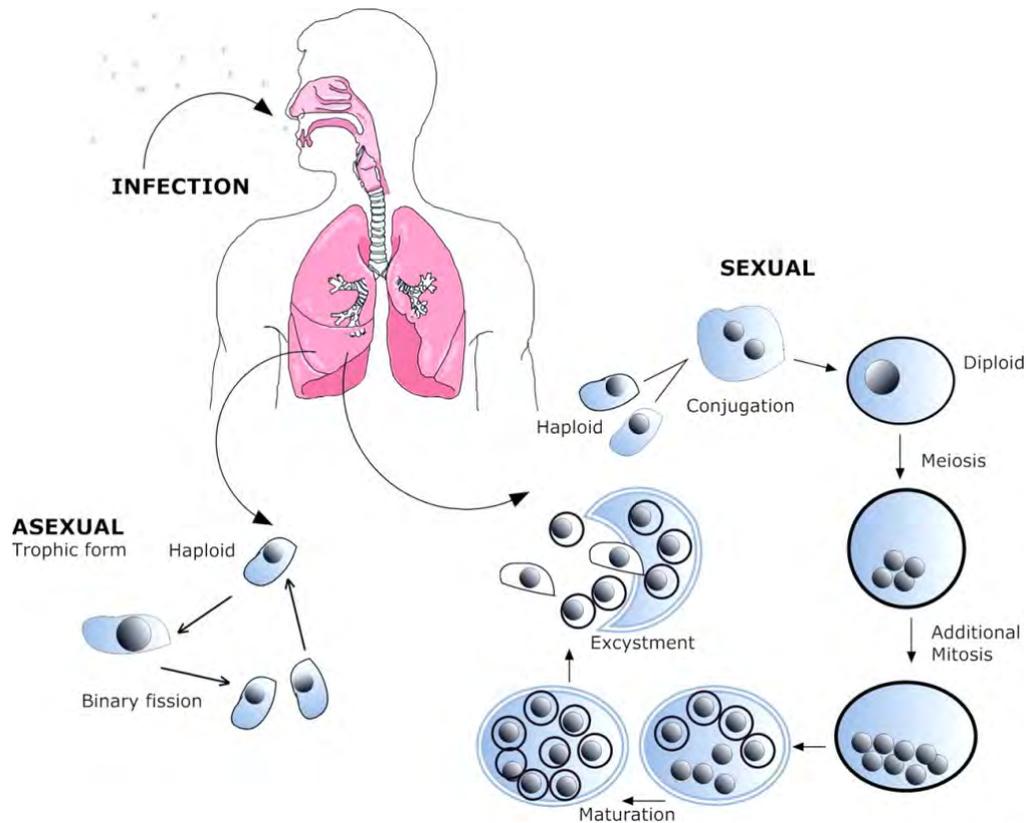
- Quels examens?
 - Expectoration induite
IFI négative; PCR négative
 - β d Glucan
Négatif
- Evolution
 - >1 mois d'hospitalisation..
 - Persistance de la fièvre...
 - Amélioration respiratoire...Sous diurétiques
⇒ Fièvre spécifique? Nodules spécifiques?
⇒ Corticothérapie : apyrexie...Soins palliatifs





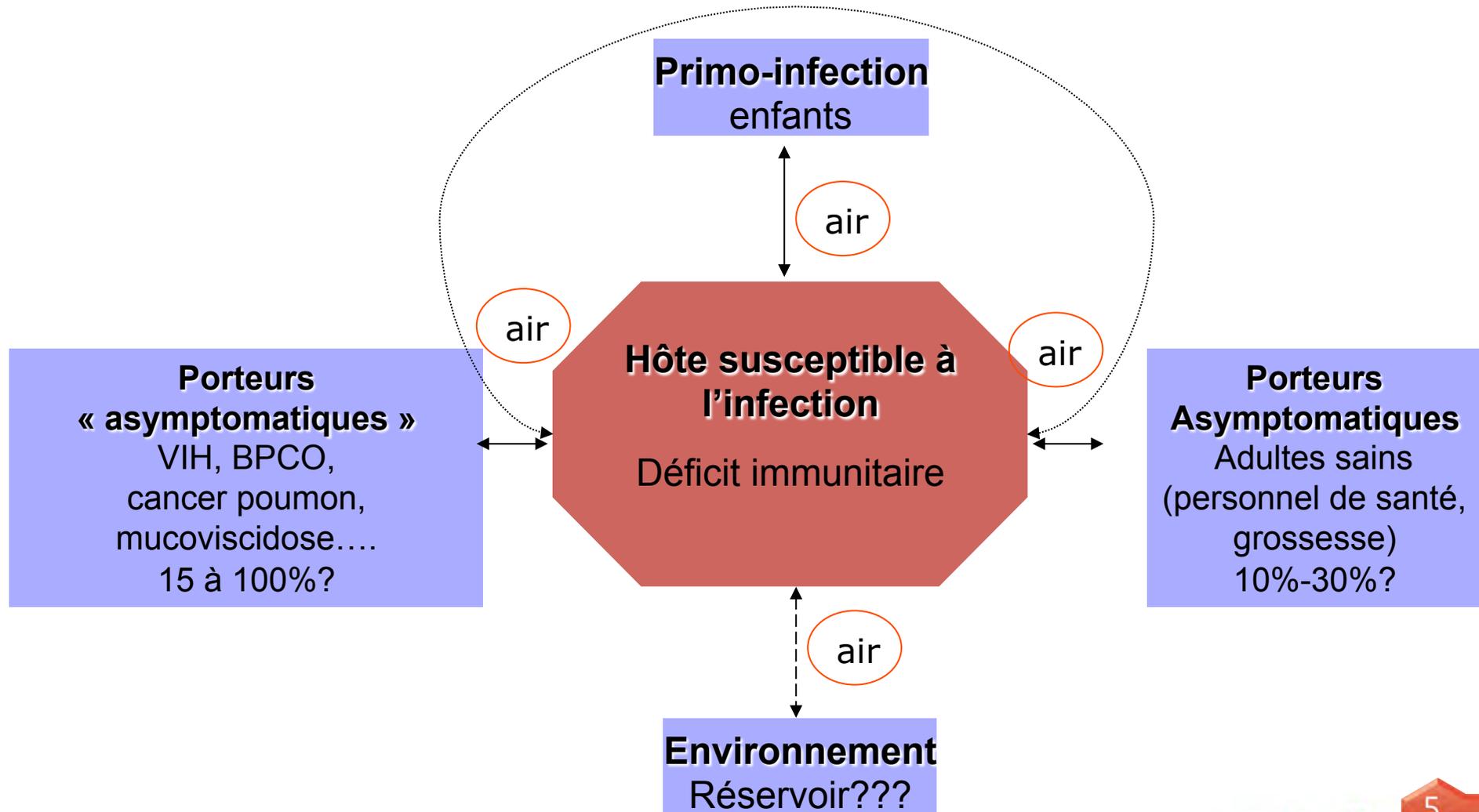
Que faire d'une PCR *Pneumocystis jirovecii* positive dans un LBA?

Pneumocystis jirovecii : transmission



- Transmission inter-humaine par voie aérienne
- Réservoir voies aériennes des sujets sains
- Forme infectante : trophozoïtes? kystes?
- Pas de réservoir environnemental connu mais présence dans l'air et distribution géographique
- Séroprévalence élevée dès l'enfance
- Champignon non cultivable

Pneumocystis jirovecii réservoir: voies aériennes



Beck et al. *Eukaryotic Cell* 2009

Pneumocystose : diagnostic?

Patients infectés par le VIH



Patients non infectés par le VIH



PCP patients immunodéprimés non VIH : diagnostic

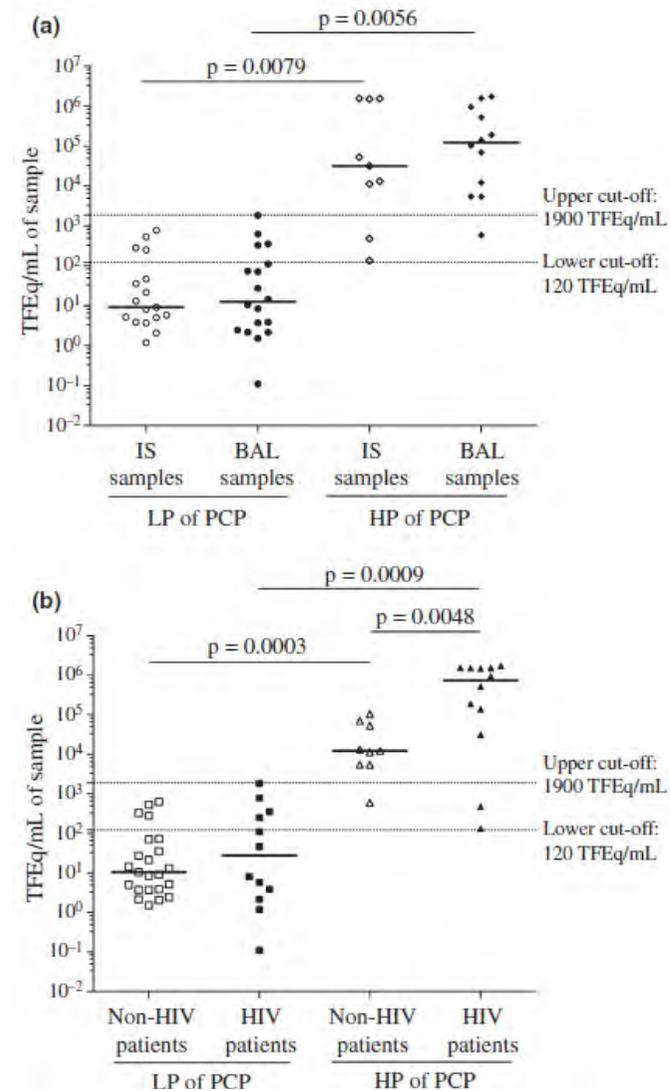
- Absence de culture.
- Recherche de *P. jirovecii* :

LBA >> expectoration induite

- Examen direct avec colorations spécifiques souvent négatif
 - Immunofluorescence avec anticorps monoclonaux plus sensible mais souvent négative également y compris dans LBA
 - PCR en temps réel:
 - * Pas de technique standardisée
 - * Non validée de façon prospective
 - * Très sensible mais problème de distinguer « colonisation »
- seuil pour de PCP
- * Très bonne valeur prédictive négative : 100%**

PCP non VIH qPCR + : « Colonisation » ou PCP?

- 238 patients immunodéprimés (VIH+ ou -) et pneumonie
- PCR temps réel sur 166 LBA +115 expectorations induites
- Patients classés entre faible ou forte probabilité de PCP sans le résultat de la PCR



Alanio *et al.* CMI 2011

PCP non VIH qPCR + : « Colonisation » ou PCP?

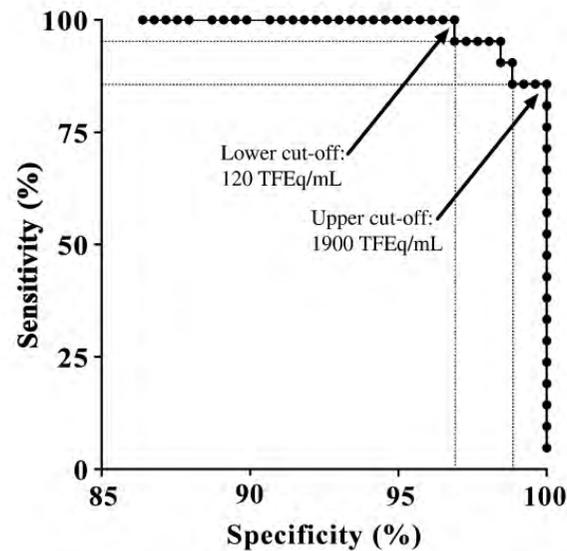


FIG. 2. Receiver operator characteristic curve of real-time PCR for *Pneumocystis pneumonia* (PCP) diagnosis. TFEq, trophic form equivalents.

TABLE 3. Results of the real-time PCR assay for the 278 respiratory samples

Samples (%)	HP of PCP (n = 21), no. (%)		LP of PCP (n = 257), no. (%)	
	HIV (n = 12)	Non-HIV (n = 9)	HIV (n = 69)	Non-HIV (n = 188)
Positive qPCR (n = 56)	12 (100)	9 (100)	12 (17.4)	23 (12.2)
Quantification				
>1900 TFEq/mL (upper cut-off value)	10 (83.3)	8 (88.9)	0	0
120–1900 TFEq/mL (grey zone)	2 (16.7)	1 (11.1)	4 (5.8)	4 (2.1)
<120 TFEq/mL (lower cut-off value)	0	0	8 (11.6)	19 (10.1)

HIV, human immunodeficiency virus; HP, high probability; LP, low probability; PCP, *Pneumocystis pneumonia*; qPCR, quantitative PCR; TFEq, trophic form equivalents.

Diagnostic PCP: qPCR+ IF-

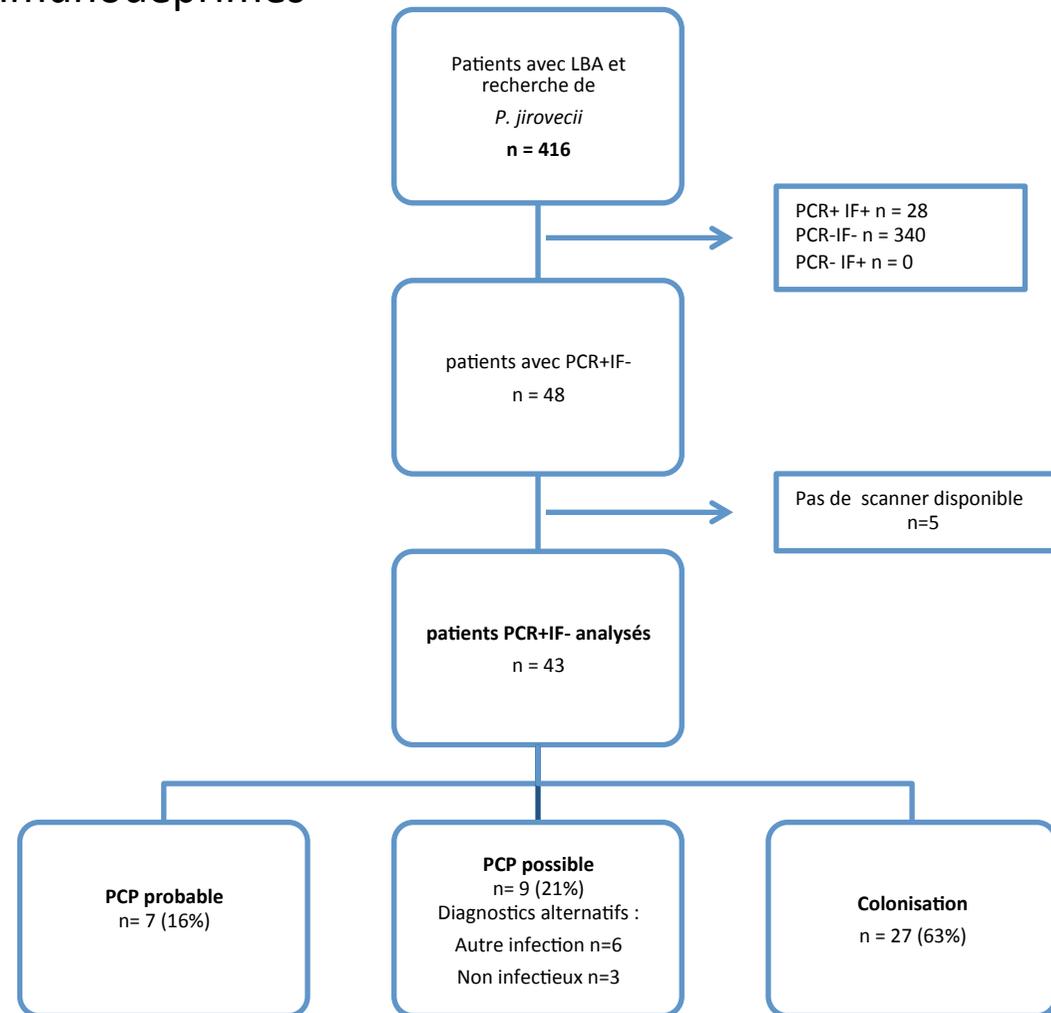
- **Détection de *Pneumocystis jirovecii* par PCR quantitative dans le LBA de patients immunodéprimés avec examen direct en immunofluorescence négatif : pneumonie ou colonisation à *Pneumocystis jirovecii*?**

S. Gazagnes^{1,5}, N. De Castro¹, J. Menotti^{2,5}, S. Chevret^{3, 5}, S. Bretagne^{2,5}, A. Bergeron^{3,5}, J-M. Molina^{1,5}

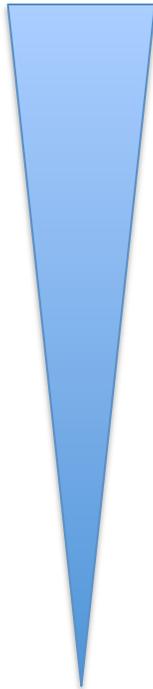
¹ Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, ²Service de Mycologie –Parasitologie, ⁴ Service de biostatistiques et information médicale, ⁵Service de pneumologie, APHP-Hôpital Saint-Louis, Paris, France; ⁵ Université Paris 7, Paris, France

Diagnostic PCP: qPCR+ IF-

Etude retrospective de 1 an sur les LBA réalisés entre octobre 2010 et décembre 2011 chez des patients adulte immunodéprimés



Diagnostic PCP: qPCR+ IF-



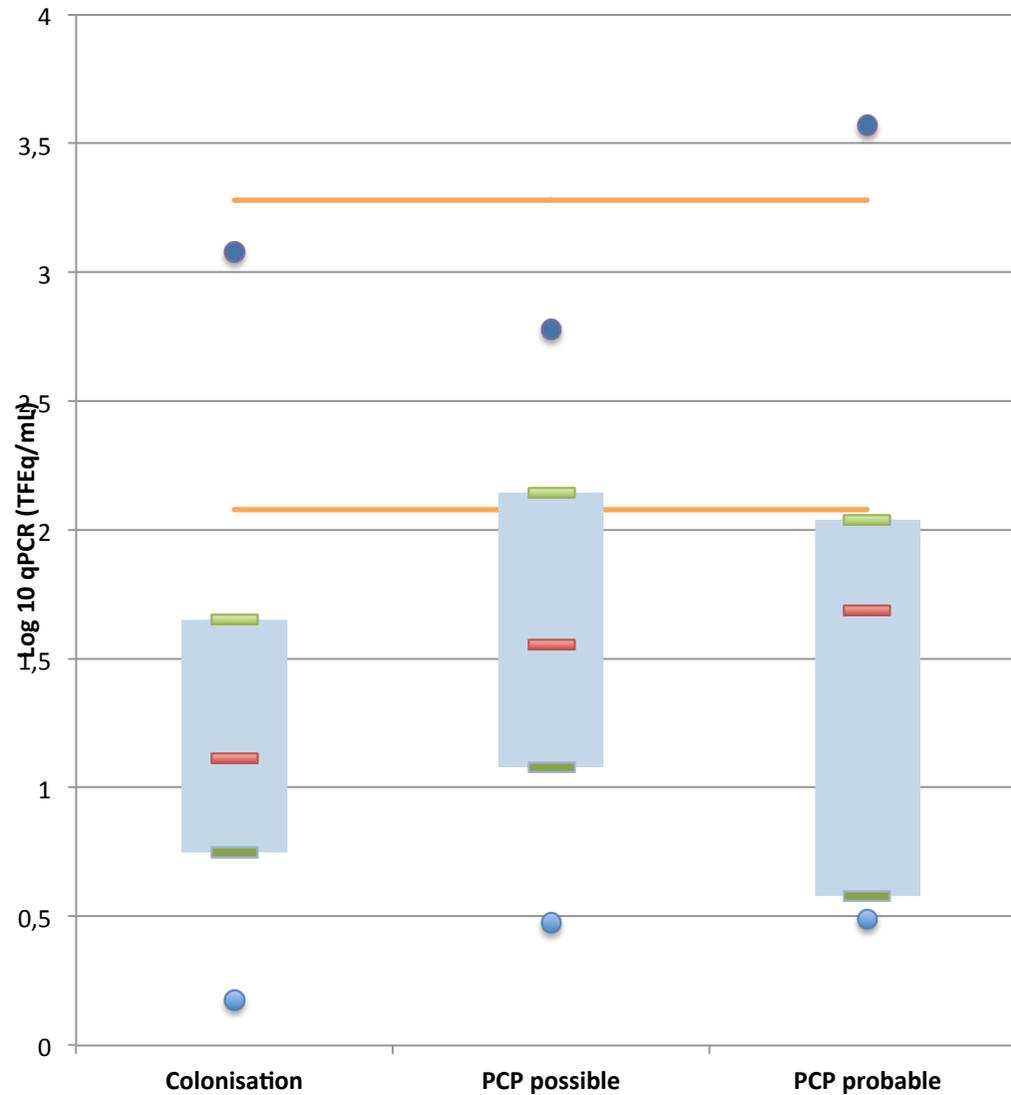
PCP probable ET	<ul style="list-style-type: none"> - Terrain: Immunodépression - Tableau clinique: ≥ 2 symptômes parmi: fièvre, toux, dyspnée - Scanner : verre dépoli, lignes septales, micronodules - Traitement spécifique de PCP (cotrimoxazole fortes doses ou atovaquone) - Absence de diagnostic différentiel (Bactérien, viral, myco-parasitaire, cardiaque ou médicamenteux)
PCP possible ET	<ul style="list-style-type: none"> - Terrain: Immunodépression - Tableau clinique : ≥ 2 symptômes parmi: fièvre, toux, dyspnée - Scanner verre dépoli, lignes septales, micronodules - Traitement spécifique de PCP (cotrimoxazole fortes doses ou atovaquone) - Diagnostic différentiel et traitement associé
Colonisation OU	<ul style="list-style-type: none"> - Terrain: Immunodépression - Absence des critères précédents - Evolution favorable sans traitement spécifique de PCP

Diagnostic PCP: qPCR+ IF-

		Total	Pneumocystose		Colonisation	PCP vs colonisation
			Probable	Possible		Analyse univariée
						p
n		43	7	9	27	-
Age, années	moy (min-max)	60 (27-96)				0.35
Sexe, Hommes	n (%)	24 (56%)	6 (86%)	5 (56%)	13 (48%)	0.22
Immunodépression*	n (%)	36 (84%)	7 (100%)	8 (89%)	21 (78%)	0.29
VIH	n (%)	4 (9%)	2 (29%)	0	2 (7%)	0.62
CD4, /mm ³	moy (min-max)	230 (83-350)	140 (83-200)		320 (290-350)	0.73
Hémopathies	n (%)	21 (49%)	3 (43%)	6 (67%)	12 (44%)	0.54
Cancer solide	n (%)	6	1	0	5	-
Allogreffe de moelle osseuse	n (%)	5	1	2	2	0.34
Greffe d'organe	n (%)	3	1	0	2	-
Maladies autoimmunes	n (%)	6	1	2	3	0.65
Corticothérapie	n (%)	13 (30%)	2 (29%)	4 (44%)	7 (26%)	0.5
Prophylaxie Pj		3 (7%)	1	1	1	0.54
Tableau clinique						
Toux sèche	n (%)	34 (80%)	7 (100%)	8 (89%)	19 (70%)	0.12
Fièvre	n (%)	25 (58%)	6 (86%)	8 (89%)	11 (41%)	p=0,004
Dyspnée	n (%)	23 (53%)	7 (100%)	7 (78%)	10 (37%)	p=0,01
Toux+fièvre+dyspnée	n (%)	27 (63%)	7 (100%)	9 (100%)	11 (41%)	
Images scanner compatibles	n (%)	23 (53%)	7 (100%)	9 (100%)	7 (26%)	p<0.001
Traitement curatif de PCP	n (%)	18 (42%)	7 (100%)	9 (100%)	2 (7%)	p<0.0001
Réanimation	n (%)	6 (14%)	2 (29%)	3 (33%)	1 (4%)	p=0,021
Décès	n (%)	4 (9%)	1 (14%)	3 (33%)	0	p=0,005
Résultat de PCR						
PCR en TFEq/mL, mediane (IQR)		21 (4-59)	49 (4-110)	36 (12-140)	13(6-45)	p=0.23
PCR<120 TFEq/mL	n (%)	35 (81%)	5 (72%)	6 (67%)	24 (89%)	p=0,48
PCR entre 120 et 1900 TFEq/mL	n (%)	7 (16%)	1 (14%)	3 (33%)	3 (11%)	p=0,22
PCR > 1900 TFEq/mL	n (%)	1 (2%)	1 (14%)	0	0	

Diagnostic PCP: qPCR+ IF-

Résultat quantitatif des PCR en fonction du diagnostic de colonisation ou PCP



17 Gzaignes *et al.* 2017 in press.

Diagnostic PCP: seuils qPCR?

- Dans notre étude :
 - Tous les patients avec PCR+ et IF négative (sauf 1) avaient des PCR qui les auraient classés comme colonisés...
 - PCR > au seuil définissant « colonisation » chez seulement 5 des 16 patients classés PCP sur arguments cliniques et radiologiques (4 zone grise et 1 seul > seuil PCP...)

	Seuils PCR proposés par le labo	Groupe colonisation Médiane (IQR)	Groupe PCP possible Médiane (IQR)	PCP Probable Médiane (IQR)
Gazaignes et al. (Paris)	PCP >1900 TFEq/mL (<26,4 CT) Colonisation <120 TFEq/mL (>30,4 CT)	Médiane TFEq/m : 13 (6-45) >30,4 CT	Médiane TFEq/m 36 (12-140) >30,4 CT	Médiane TFEq/m 49 (4-110) >30,4 CT
Robert-Gangneux et al. (Rennes)	PCP ? Colonisation?	n = 35 Moy Ct : 36,1+/-0,3	n=41 Moy Ct 34,6+/-0,5	n=35 Moy Ct 34,1+/-0,5
Fauchier et al. (Nice)	PCP <31 CT (VIH+<27 VIH-<31) Colonisation >35 CT (VIH+>30 VIH->35)	n = 152 Moy CT 35	n = 73 Moy CT 28+/-2	-

Fauchier et al. J Clin Microbiol 2016

Robert-Gangneux et al. J Clin Microbiol 2014

Diagnostic PCP en hématologie :recommandations ECIL 2016

Table 1. Recommended diagnosis of PCP in adult patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients (it is not recommended that PCP diagnosis should rely only on clinical criteria or imaging)

Specimen/technique	Recommended usage	Strength of recommendation	Quality of evidence
Diagnostic specimen			
BAL fluid	allows detection of multiple aetiologies	A	II
other (non-invasive specimens ^a)	alternative specimen to BAL	B	II
Diagnostic technique			
Respiratory samples			
immunofluorescence assays	most sensitive microscopic diagnostic method	A	II
real-time quantitative PCR	routine diagnosis allowing quantification	A	III
	exclusion of PCP by negative result in BAL only	A	II
Serum			
β-D-glucan	detection in serum as a contributive diagnostic tool	A	II
	exclusion of PCP by negative result	A	II
genotyping using multilocus sequence markers	investigation of suspected outbreaks	A	II
detection of dihydropteroate synthase mutations	not recommended in case of treatment failure	B	II

^aIncludes induced sputa, sputa and upper respiratory samples (nasopharyngeal aspirates, nasal or oral washes).

Alanio *et al.* JAC 2016

Diagnostic PCP en hématologie: algorithme ECIL 2016

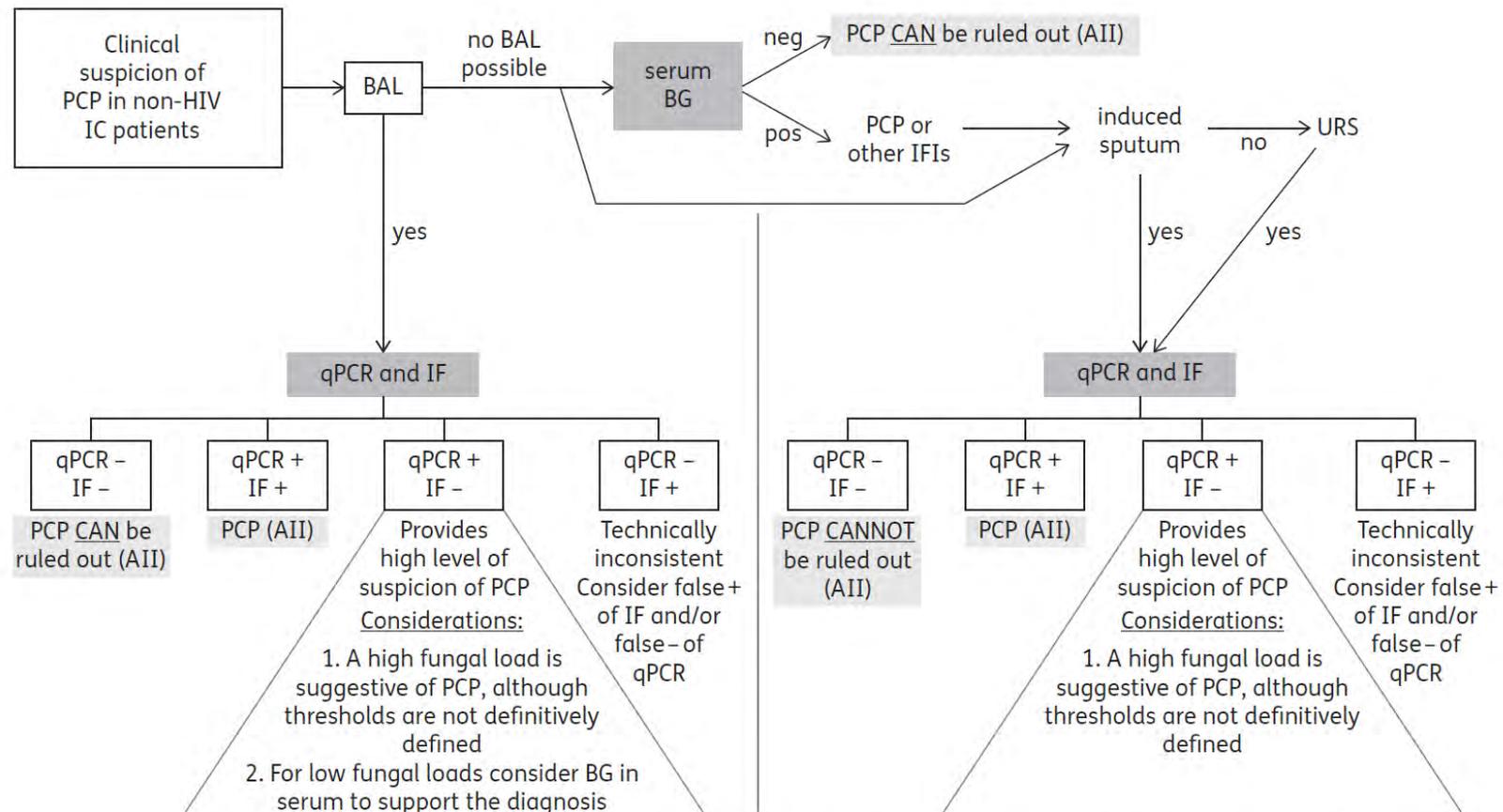


Figure 1. Flow chart for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in non-HIV immunocompromised (IC) patients. Biological tests are highlighted in dark grey and recommendations in light grey. BG, β -D-glucan; A-II, level of recommendation; IFI, invasive fungal infection.

Que faire d'une PCR positive dans un LBA: conclusion

- Ça dépend...
 - **De la clinique+++**
 - Du type d'immunodépression (VIH vs **non VIH**)
 - Du type de prélèvement : **LBA**
 - De votre labo et des seuils
 - De la possibilité de doser β D-glucan
 - Coût
- Quels risques à mal interpréter une PCR + et traiter par excès une PCP ?
 - Toxicité fortes doses cotrimoxazole (hémato, rein)
 - **Ne pas chercher autre diagnostic** chez des patients immunodéprimés non VIH....
- PCR positive sans retenir diagnostic de PCP : prophylaxie...? **OUI!**

Merci pour votre attention!

