

Académie d'Orléans –Tours
Université François-Rabelais

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Année 2016

N°

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 23 janvier 2003 tient lieu de :

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE PAR

Claire FRANCK-MARTEL
Née le 15 Avril 1986 à Clermont-Ferrand (63)

Présentée et soutenue publiquement le 6 Avril 2016

**DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA PNEUMONIE A *PNEUMOCYSTIS JIROVECHII*.
PERFORMANCE D'UNE TECHNIQUE DE FLUORESCENCE POUR LA
DETECTION DES KYSTES DANS LES LAVAGES BRONCHO-ALVEOLAIRES.**

Jury

Président de Jury : Professeur Laurent MEREGHETTI, PU-PH Bactériologie, UFR Médecine, Université de Tours

Directeur de thèse : Docteur Guillaume DESOUBEAUX, MCU-PH Parasitologie-Mycologie, UFR Médecine, Université de Tours

Membres du jury :

Professeur Christian ANDRES, PU-PH Biochimie-Biologie moléculaire, UFR Médecine, Université de Tours

Professeur Isabelle DIMIER-POISSON, PU Immunologie parasitaire, UFR Pharmacie, Université de Tours

Professeur Jacques CHANDENIER, PU-PH Parasitologie-Mycologie, UFR Médecine, Université de Tours

Docteur Eric BAILLY, PH Parasitologie-Mycologie, CHU de Tours

**UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS**

DOYEN

Professeur Patrice DIOT

VICE-DOYEN

Professeur Henri MARRET

ASSESSEURS

Professeur Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*
Professeur Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Professeur Hubert LARDY, *Moyens – relations avec l'Université*
Professeur Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, *Médecine générale*
Professeur François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*
Professeur Philippe ROINGEARD, *Recherche*

SECRETAIRE GENERALE

Madame Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Professeur Emile ARON (†) – 1962-1966

Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962

Professeur Georges DESBUQUOIS (†)- 1966-1972

Professeur André GOUAZÉ - 1972-1994

Professeur Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004

Professeur Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES

Professeur Alain AUTRET

Professeur Catherine BARTHELEMY

Professeur Jean-Claude BESNARD

Professeur Philippe BOUGNOUX

Professeur Patrick CHOUTET

Professeur Etienne DANQUECHIN-DORVAL

Professeur Guy GINIES

Professeur Olivier LE FLOCH

Professeur Etienne LEMARIE

Professeur Chantal MAURAGE

Professeur Léandre POURCELOT

Professeur Michel ROBERT

Professeur Jean-Claude ROLLAND

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – P. BAGROS – G. BALLON – P.BARDOS – J.L. BAULIEU – C.

BERGER – P. BEUTTER – C. BINET – P. BONNET – M. BROCHIER – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – B. GRENIER – A. GOUAZE – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – J. LANSAC – Y. LANSON – J. LAUGIER – P. LECOMTE – G. LELORD – G. LEROY – Y. LHUINTE – M. MARCHAND – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINÉ – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – P. RAYNAUD – A. ROBIER – A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – J. THOUVENOT – B. TOUMIEUX – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

MM.	ALISON Daniel.....	Radiologie et imagerie médicale
	ANDRES Christian	Biochimie et biologie moléculaire
	ANGOULVANT Denis.....	Cardiologie
	ARBEILLE Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
	AUPART Michel.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	BABUTY Dominique	Cardiologie
	BALLON Nicolas	Psychiatrie ; addictologie
Mme	BARILLOT Isabelle.....	Cancérologie ; radiothérapie
MM.	BARON Christophe	Immunologie
	BERNARD Louis	Maladies infectieuses et maladies tropicales
	BODY Gilles	Gynécologie et obstétrique
	BONNARD Christian	Chirurgie infantile
Mme	BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
MM.	BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	BRUNEREAU Laurent	Radiologie et imagerie médicale
	BRUYERE Franck	Urologie
	BUCHLER Matthias	Néphrologie
	CALAIS Gilles.....	Cancérologie, radiothérapie
	CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
	CHANDENIER Jacques	Parasitologie, mycologie
	CHANTEPIE Alain.....	Pédiatrie
	COLOMBAT Philippe	Hématologie, transfusion
	CONSTANS Thierry	Médecine interne, gériatrie
	CORCIA Philippe	Neurologie
	COSNAY Pierre.....	Cardiologie
	COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et imagerie médicale
	COUET Charles	Nutrition
	DE LA LANDE DE CALAN Loïc	Chirurgie digestive
	DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
	DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique
	DESTRIEUX Christophe	Anatomie
	DIOT Patrice	Pneumologie
	DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague ..	Anatomie & cytologie pathologiques
	DUCLUZEAU Pierre-Henri.....	Médecine interne, nutrition
	DUMONT Pascal	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	EL HAGE Wissam	Psychiatrie adultes
	EHRMANN Stephan	Réanimation d'urgence
	FAUCHIER Laurent	Cardiologie
	FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	FOUQUET Bernard	Médecine physique et de réadaptation
	FRANCOIS Patrick.....	Neurochirurgie
	FROMONT-HANKARD Gaëlle.....	Anatomie & cytologie pathologiques
	FUSCIARDI Jacques	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale ; médecine
d'urgence	GAILLARD Philippe	Psychiatrie d'adultes
	GOGA Dominique	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
	GOUDEAU Alain	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière

	GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
	GRUEL Yves	Hématologie, transfusion
	GUERIF Fabrice	Biologie et médecine du développement et de la
reproduction		
	GUILMOT Jean-Louis	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
	GUYETANT Serge	Anatomie et cytologie pathologiques
	GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
	HAILLOT Olivier	Urologie
	HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique
	HANKARD Régis	Pédiatrie
	HERAULT Olivier	Hématologie, transfusion
	HERBRETEAU Denis	Radiologie et imagerie médicale
Mme	HOMMET Caroline	Médecine interne, gériatrie
MM.	HUTEN Noël	Chirurgie générale
	LABARTHE François	Pédiatrie
	LAFFON Marc	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine
d'urgence		
	LARDY Hubert	Chirurgie infantile
	LAURE Boris	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
	LEBRANCHU Yvon	Immunologie
	LECOMTE Thierry	Gastroentérologie, hépatologie
	LESCANNE Emmanuel	Oto-rhino-laryngologie
	LINASSIER Claude	Cancérologie, radiothérapie
	LORETTE Gérard	Dermato-vénéréologie
	MACHET Laurent	Dermato-vénéréologie
	MAILLOT François	Médecine interne, gériatrie
	MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
	MARRET Henri	Gynécologie-obstétrique
Mme	MARUANI Annabel	Dermatologie-vénéréologie
MM.	MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
	MORINIERE Sylvain	Oto-rhino-laryngologie
Mme	MOUSSATA Driffa	Gastro-entérologie
MM.	MULLEMAN Denis	Rhumatologie
	ODENT Thierry	Chirurgie infantile
	PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
	PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
	PATAT Frédéric	Biophysique et médecine nucléaire
	PERROTIN Dominique	Réanimation médical, médecine d'urgence
	PERROTIN Franck	Gynécologie-obstétrique
	PISELLA Pierre-Jean	Ophtalmologie
	QUENTIN Roland	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	REMERAND Francis	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
	ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
	ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	ROYERE Dominique	Biologie et médecine du développement et de la
		reproduction
	RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
	SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
	SALIBA Elie	Biologie et médecine du développement et de la
reproduction		
Mme	SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et médecine nucléaire
MM.	SIRINELLI Dominique	Radiologie et imagerie médicale
	THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
Mme	TOUTAIN Annick	Génétique
MM.	VAILLANT Loïc	Dermato-vénéréologie
	VELUT Stéphane	Anatomie
	VOURC'H Patrick	Biochimie et biologie moléculaire
	WATIER Hervé	Immunologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

M. LEBEAU Jean-Pierre
Mme LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie

PROFESSEURS ASSOCIES

MM..... MALLET Donatien Soins palliatifs
POTIER Alain Médecine Générale
ROBERT Jean Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme ANGOULVANT Théodora..... Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
M. BAKHOS David..... Physiologie
Mme BERNARD-BRUNET Anne..... Cardiologie
M. BERTRAND Philippe Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication
Mme BLANCHARD Emmanuelle Biologie cellulaire
BLASCO Hélène Biochimie et biologie moléculaire
M. BOISSINOT Éric Physiologie
Mme CAILLE Agnès Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication
M. DESOUBEAUX Guillaume Parasitologie et mycologie
Mmes DOMELIER Anne-Sophie Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane Biophysique et médecine nucléaire
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie..... Anatomie et cytologie pathologiques
M. GATAULT Philippe..... Néphrologie
Mmes GAUDY-GRAFFIN Catherine Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUILLEUX Valérie Immunologie
GUILLON-GRAMMATICO Leslie Biostatistiques, Informatique médical et Technologies de Communication
MM. HOARAU Cyrille..... Immunologie
HOURIOUX Christophe Biologie cellulaire
Mmes LARTIGUE Marie-Frédérique..... Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
LE GUELLEC Chantal Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
MACHET Marie-Christine Anatomie et cytologie pathologiques
MM. PIVER Eric..... Biochimie et biologie moléculaire
ROUMY Jérôme Biophysique et médecine nucléaire
PLANTIER Laurent Physiologie
Mme SAINT-MARTIN Pauline Médecine légale et droit de la santé
MM. SAMIMI Mahtab Dermatologie-vénéréologie
TERNANT David Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique

MAITRES DE CONFERENCES

Mmes AGUILLON-HERNANDEZ Nadia Neurosciences
ESNARD Annick Biologie cellulaire
M. LEMOINE Maël..... Philosophie
Mme MONJAUZE Cécile Sciences du langage - orthophonie
M. PATIENT Romuald..... Biologie cellulaire
Mme RENOUX-JACQUET Cécile Médecine Générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M. IVANES Fabrice Cardiologie

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

M.	BOUAKAZ Ayache	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
Mmes	BRUNEAU Nicole	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
	CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
MM.	CHARBONNEAU Michel	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
	GAUDRAY Patrick	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	GILOT Philippe	Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
	GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
Mmes	GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
	GRANDIN Nathalie	Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
MM.	KORKMAZ Brice	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
	LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 930
	LE PAPE Alain	Directeur de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
Mme	MARTINEAU Joëlle	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
MM.	MAZURIER Frédéric	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
	MEUNIER Jean-Christophe	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 966
	RAOUL William	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
Mme	RIO Pascale	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1069
M.	SI TAHAR Mustapha	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

Mme	DELORE Claire	Orthophoniste
MM.	GOUIN Jean-Marie	Praticien Hospitalier
	MONDON Karl	Praticien Hospitalier
Mme	PERRIER Danièle	Orthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

Mme	LALA Emmanuelle	Praticien Hospitalier
M.	MAJZOUB Samuel	Praticien Hospitalier

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

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

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Laurent MEREGHETTI, je vous remercie, tout d'abord, de me faire l'honneur de présider cette thèse. Vous m'aviez aussi acceptée dans votre service, je vous remercie encore pour toutes les connaissances enseignées au cours de ce stage de bactériologie. Veuillez trouver par ce travail le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur Isabelle DIMIER-POISSON, vous avez accepté de faire partie de ce jury et de juger ce travail. Veuillez recevoir mes remerciements respectueux.

A Monsieur le Professeur Christian ANDRES, je vous remercie pour l'intérêt que vous portez à ce travail. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jacques CHANDENIER, je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire pour la réalisation de cette thèse. Je n'oublierai pas les cours de parasitologie que vous meniez avec autant de passion et de pédagogie.

A Monsieur le Docteur Eric BAILLY,

Sans votre aide et votre expertise en mycologie, cette thèse n'aurait pu se réaliser et j'en suis profondément reconnaissante. Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez apporté dans cette discipline passionnante.

A Monsieur le Docteur Guillaume DESOUBEAUX, qui m'a confié ce travail.

Je te remercie pour ta grande disponibilité, ta patience et ta bonne humeur constante. Je n'oublierai pas tout le temps passé pour m'encadrer et me conseiller au cours de cette thèse avec des délais impartis parfois serrés.

Je remercie tous ceux qui ont participé et m'ont soutenu au cours de ce travail...

Ces remerciements vont vers ma famille, mes amis, les rencontres que j'ai pu faire cette année.

A Juliette, la plus belle merveille que la vie m'ait confiée. Depuis un an, tu as bouleversé ma vie...Tu illumines constamment mon quotidien et me donnes le courage d'avancer.

A Maman, toujours présente et à l'écoute, je te remercie pour ton grand soutien au cours de ce travail, mais aussi pour toutes les années précédentes depuis la première année de médecine... Nous avons traversé de dures épreuves toutes les deux mais tu ne m'as jamais laissée de côté. J'espère que tu trouveras par ce travail l'expression de toute ma reconnaissance.

A Papa, j'espère que tu prendras plaisir en découvrant ce travail et que je ne te décevrai pas...

A ma sœur, Clémence et mon frère, Pierre-Louis, je vous remercie infiniment pour votre soutien que je n'oublierai pas.

Clémence, j'espère pouvoir te le rendre lorsque tu passeras également ta thèse. Je te souhaite tout le meilleur pour continuer ton parcours pour le moment sans faille.

Pierre-Louis, je te souhaite aussi tout le meilleur à venir et notamment de trouver ta voie.

A ma cousine Nathalie, malgré la distance, nous avons toujours été proches, tu n'as jamais manqué de bons conseils et d'attentions touchantes.

A Pierre, mon petit filleul.

A ma grand-mère, Mamie Madeleine, qui nous a quittés trop tôt...Tu resteras toujours un beau modèle de réussite personnel et professionnel.

A tous mes amis de Clermont, Lille et Paris :

A Romain et Fanny, Perrine pour toutes ces années passées à la fac de médecine à Clermont, je vous remercie pour ce soutien mutuel au cours de nos études.

A Agnès, Eglantine, Marie-Alix, des amies de longue date toujours aussi fidèles...

A Elodie Standley et Bérengère Ponroy, je vous remercie pour votre amitié, ces agréables moments en votre présence. J'ai été particulièrement touchée par toutes vos visites et marques d'attention cette année, je sais pouvoir vous faire confiance.

A Amélie Foucault pour l'année d'internat que nous venons de passer. Je te remercie : travailler à tes côtés fut un réel plaisir.

A Charlotte Mauroy, pour ton amitié.

Aux techniciennes du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie : Béatrice, Isabelle, Lucie, Ophélie.

Diagnostic biologique de la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii*. Performance d'une technique de fluorescence pour la détection des kystes dans les lavages broncho-alvéolaires.

Résumé

Contexte : Le diagnostic biologique de la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* est habituellement établi à partir de prélèvements respiratoires grâce à des méthodes de coloration classique et /ou de la biologie moléculaire. Des techniques peu coûteuses, rapides et faciles à mettre en œuvre sont espérées pour améliorer la procédure diagnostique actuelle.

Objectif : En comparaison avec les méthodes de laboratoire habituelles, nous avons évalué la performance diagnostique d'une méthode de fluorescence par calcofluor pour la détection directe de kystes de *Pneumocystis jirovecii* dans les échantillons respiratoires.

Matériel et méthodes : Des liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA) de patients avec suspicion de pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* ont été analysés de façon prospective sur une période de trois ans au CHRU de Tours : sur dépôts répétés, la performance diagnostique du calcofluor a été systématiquement comparée avec celle d'un kit commercial basé sur le principe d'immunofluorescence directe. En complément, une technique classique de coloration par MGG (May-Grünwald Giemsa) ainsi qu'une *Polymerase Chain Reaction* quantitative (PCRq) en temps réel ont été effectuées. Le diagnostic définitif de pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* a été porté par un groupe de cliniciens indépendants sur des arguments cliniques, radiologiques et biologiques.

Résultats : Au total, 481 liquides de LBA ont été évalués : 42 avaient au moins une technique diagnostique positive. Finalement, 35 patients ont été considérés comme réellement atteints d'une pneumonie à *Pneumocystis jirovecii*. La sensibilité de la technique de fluorescence par calcofluor était de 74,3 %, et était de 34,6%, 60,0% et 82,9% pour la coloration MGG, l'immunofluorescence directe du kit commercial et la PCRq. Sa spécificité était de 99,6%, et celles des autres techniques étaient de 100,0 %, 99,3 % et 99,4% respectivement. L'ensemble des tests statistiques ne mettait pas en évidence de supériorité d'une méthode par rapport à la fluorescence directe à base de calcofluor. En revanche, la réalisation technique de celle-ci était plus rapide et offrait une visualisation plus nette des kystes de *P. jirovecii*.

Discussion et conclusion : De par son coût de revient extrêmement faible et sa rapidité d'exécution, l'utilisation systématique du calcofluor dans le LBA se positionne comme une alternative valable pour le diagnostic de première intention de la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii*.

Mots clés : *Pneumocystis jirovecii* ; calcofluor ; lavage broncho-alvéolaire; immunofluorescence monoclonale directe.

Biological diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Diagnostic performance of a fluorescence technique for direct detection of cysts in bronchial-alveolar lavage fluids.

Abstract

Background : The biological diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia is usually based on investigation of respiratory fluids by conventional staining methods and/or molecular biology. Alternative techniques that would be cheap, rapid and easy-to-use are still expected to make more effective this diagnostic procedure.

Objectives : In comparison with usual methods, we assessed diagnostic performance of an in-house technique based on calcofluor brightener for direct detection of *Pneumocystis jirovecii* cysts in respiratory specimens.

Material and methods : Bronchial-alveolar lavage fluids (BALFs) from patients with suspicion of PCP infection were prospectively analyzed over a three year-period at CHRU of Tours. Diagnostic yield by calcofluor brightener was systematically compared on replicate smears with those of a commercial kit based on monoclonal immunofluorescence assay (IFA). In addition, a standard staining by MGG and a real time quantitative Polymerase chain reaction (qPCR) were performed. The final diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia was performed by a group of independent clinicians, and based on clinical, radiological and biological evidences.

Results : 481 BALFs were analysed : 42 were found positive for *Pneumocystis jirovecii*. 35 patients were indeed diagnosed with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Sensitivity of calcofluor brightener technique was 74,3%, and respectively 34,6%, 60,0% and 82,9% for MGG staining, direct immunofluorescence of commercial kit and PCR. Specificity was 99,6% and respectively 100,0%, 99,3% and 99,4% for the other tests. The whole statistical analysis did not set the superiority of any methods over calcofluor direct fluorescence. However, the technical execution of calcofluor was quicker and provided an even better visualization of *Pneumocystis jirovecii* cysts.

Discussion and conclusion :

Because of its low cost and timeliness, the systematic use of calcofluor on broncho-alveolar lavage is a valuable alternative first-line diagnostic test for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*; calcofluor brightener; bronchial-alveolar lavage fluids; direct monoclonal immunofluorescence.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	3
LISTE DES FIGURES.....	4
LISTE DES TABLEAUX.....	5
INTRODUCTION.....	6
PARTIE 1 : PRESENTATION DE L'AGENT PATHOGENE	
<i>PNEUMOCYSTIS JIROVECHII</i>.....	8
I. <u>Historique</u>.....	8
II. <u>Taxonomie</u>.....	10
A. <u>L'hypothèse parasitaire</u>	10
B. <u>L'hypothèse fongique</u>	10
III. <u>Cycle biologique</u>.....	11
IV. <u>Modes de transmission</u>.....	15
A. <u>Une contamination <i>de novo</i></u>	15
B. <u>Une transmission horizontale par voie aéroportée</u>	15
PARTIE 2 : APPROCHE DIAGNOSTIQUE DE LA PNEUMONIE	
<i>A PNEUMOCYSTIS JIROVECHI</i>.....	17
I. <u>Arguments épidémiologiques en fonction des populations à risque</u>.....	17
A. <u>Les nourrissons et les enfants</u>	17
• <u>Les nourrissons prématurés ou malnutris</u>	17
• <u>Les nourrissons et enfants immunodéprimés infectés par le VIH</u>	17
• <u>Les enfants atteints de déficits immunitaires primitifs</u>	18
• <u>Les enfants hébergés en oncologie pédiatrique</u>	18
B. <u>Les adultes immunodéprimés VIH</u>	18

C.	<u>Les adultes immunodéprimés non VIH</u>	19
•	<u>Les adultes atteints d'hémopathies malignes</u>	19
•	<u>Les adultes atteints de cancers solides</u>	20
•	<u>Les adultes atteints de maladies inflammatoires ou auto-immunes</u>	20
•	<u>Les adultes transplantés d'organes solides</u>	20
II.	<u>L'orientation clinique</u>	22
A.	<u>La description de la forme pulmonaire</u>	22
B.	<u>Les particularités des rares présentations extrapulmonaires</u>	27
III.	<u>Les tentatives de confirmation par les outils biologiques</u>	28
A.	<u>Choix du prélèvement</u>	29
•	<u>Le lavage broncho-alvéolaire</u>	29
•	<u>L'expectoration induite</u>	29
•	<u>Le liquide de rinçage oro-pharyngé</u>	30
•	<u>Les biopsies transbronchiques et transpariétales</u>	30
B.	<u>Les différentes techniques disponibles pour l'examen microscopique direct</u> ...	30
•	<u>May-Grünwald Giemsa</u>	31
•	<u>Gomori Gocrott</u>	32
•	<u>Bleu de toluidine</u>	33
•	<u>Calcofluor</u>	35
•	<u>Autres colorations</u>	38
C.	<u>L'immunofluorescence directe</u>	38
D.	<u>La biologie moléculaire</u>	40
E.	<u>Les biomarqueurs</u>	44
•	<u>Le (1, 3)- β-D-glucane</u>	44
•	<u>Les autres biomarqueurs</u>	45

PARTIE 3 : TRAVAIL EXPERIMENTAL.....48

DISCUSSION ET CONCLUSION.....69

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....72

TRAVAUX ANNEXES EN LIEN AVEC *PNEUMOCYSTIS JIROVECHII*.84

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomal

CMV: Cytomégalovirus

Cq: *quantitative cycle*

GMS: *Grocott's Methenamine Silver*

LBA: Lavage broncho-alvéolaire

MGG: May-Grünwald Giemsa

PCP : Pneumonie à *Pneumocystis jirovecii*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PCRq : *Polymerase Chain Reaction* quantitative

Pj : *Pneumocystis jirovecii*

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

UV : Ultraviolet

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle hypothétique de <i>Pneumocystis jirovecii</i> illustré par des images prises en microscopie électronique à transmission	13
Figure 2 : Phase sexuée et asexuée du cycle de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	14
Figure 3 : Répartition des patients avec une PCP prouvée dans une étude multicentrique française entre 2007 et 2010.....	21
Figure 4 : Radiographie thoracique montrant un infiltrat interstitiel bilatéral chez un patient atteint d'une pneumonie à <i>Pneumocystis jirovecii</i>	25
Figure 5 : Coupe tomodensitométrique thoracique en fenêtre parenchymateuse montrant des plages en verre dépoli au cours d'une PCP	26
Figure 6 : Coupe tomodensitométrique thoracique en fenêtre parenchymateuse montrant des structures kystiques lors d'une PCP inaugurale chez un patient de 37 ans au stade SIDA (54 CD4/mm ³).....	27
Figure 7 : Coupe histologique de la muqueuse d'un colon sigmoïde (x400-x1000) avec coloration de Gomori Grocott chez un patient infecté par le VIH au stade SIDA présentant une colite à <i>Pneumocystis jirovecii</i>	28
Figure 8 : Détection microscopique (x1000) de formes de <i>Pneumocystis jirovecii</i> isolées à partir d'échantillons de LBA, et colorées avec une technique MGG	32
Figure 9 : Détection microscopique (x 1000) de kystes de <i>Pneumocystis jirovecii</i> à l'aide d'une coloration de Gomori Gocrott.....	33
Figure 10 : Détection microscopique (x1000) de kystes de <i>Pneumocystis jirovecii</i> isolés à partir d'un échantillon de LBA et colorés au bleu de toluidine.....	34
Figure 11 : Kystes de <i>Pneumocystis jirovecii</i> colorés au blanc de calcofluor en microscopie à fluorescence.....	36
Figure 12 : Formule chimique du calcofluor, Fluorescent Brightener 28® (Sigma).....	37
Figure 13 : Détection de multiples kystes de <i>Pneumocystis jirovecii</i> avec une technique « maison » à base de calcofluor bleu en microscopie à fluorescence.....	37
Figure 14 : Détection de kystes de <i>Pneumocystis jirovecii</i> via des anticorps monoclonaux en microscopie à fluorescence.....	39
Figure 15 : Principe de la PCR temps réel avec la sonde TaqMan TM -MGB.....	42

Figure 16 : Exemple de courbes d'amplification obtenues avec le LightCycler 480® (Roche Applied Science) au CHRU Bretonneau (Tours)	43
Figure 17 : Courbe d'étalonnage obtenue à partir de dilutions successives d'ADN de <i>Pj</i>	43
Figure 18 : Biosynthèse de la S-adénosylméthionine.....	46

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Signes tomodensitométriques retrouvés dans la PCP.....	23
Tableau 2 : Présentation clinique et approche diagnostique de la PCP chez les patients infectés par le VIH et ceux non infectés par le VIH.....	24

INTRODUCTION

Pneumocystis jirovecii est un champignon opportuniste transmis par voie aéroportée interhumaine. Il est l'agent pathogène responsable de la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* (PCP). La PCP se produit surtout chez les patients immunodéprimés, comme les sujets infectés par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) ou ceux ayant des hémopathies malignes. *Pneumocystis jirovecii* (*Pj*) est difficilement cultivable *in vitro*, en particulier dans le cadre d'une activité de routine de laboratoire. Ainsi, le diagnostic définitif de la PCP doit être réalisé par une observation directe du champignon et / ou la détection de son ADN à partir de prélèvements respiratoires, comme les liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA). Cependant, de telles méthodes diagnostiques peuvent être fastidieuses ou délicates à réaliser pour les laboratoires moins expérimentés. Par exemple, les méthodes de colorations historiques pour la détection directe, comme le May-Grünwald Giemsa (MGG), sont connues pour ne pas être assez sensibles, et d'autres sont très difficiles à mettre en œuvre en raison de leur effet cancérogène, comme l'imprégnation argentique par *Grocott's Methenamine Silver* (GMS). D'autre part, des kits commercialisés existent, permettant la détection directe des kystes de *Pj* à l'aide d'anticorps monoclonaux et de conjugués fluorescents, mais ils restent très coûteux. Enfin, la *Polymerase Chain Reaction* quantitative (PCRq) apparaît comme un outil puissant, mais il est impossible de la réaliser quotidiennement en routine dans chaque laboratoire. Avec cette dernière technique, la plupart des laboratoires ne sont toujours pas en mesure de fournir une réponse diagnostique en moins de deux heures. Ce délai correspond déjà au temps d'amplification de la PCR, ce qui peut constituer un véritable obstacle en cas d'urgence médicale. En outre, la valeur seuil exprimée en Cq (*Cycle de quantification*) est encore discutable pour faire la distinction entre la colonisation et l'infection réelle par *Pj*. Parallèlement, des biomarqueurs existent : nous pouvons citer, par exemple, la mesure du (1, 3)- β -D-glucane dans le sang. Cependant, (1, 3)- β -D-glucane manque de spécificité lorsqu'il est utilisé isolément. Au total, des approches diagnostiques alternatives pour le diagnostic de la PCP sont encore nécessaires pour surmonter les limites susmentionnées. L'utilisation de fluorochromes comme le calcofluor pourrait être une solution intéressante et facile d'emploi. Déjà connus pour permettre une coloration sélective par fluorescence des levures ou des champignons filamenteux, l'intérêt de ces fluorochromes dans le cadre du diagnostic de la PCP a été beaucoup moins étudié. Par conséquent, sur une

période de trois ans, nous avons prospectivement évalué une technique « maison » qui utilise un fluorochrome, le calcofluor bleu, pour détecter les kystes de *Pj* dans des échantillons de LBA. Nous avons systématiquement comparé les résultats avec ceux obtenus avec le kit commercial de détection basé sur un anticorps monoclonal et un conjugué fluorescent. En complément, une technique classique de coloration par MGG ainsi qu'une PCRq ont été effectuées. Le diagnostic définitif de PCP a été porté sur des arguments cliniques, radiologiques et biologiques par un groupe de cliniciens indépendants. Il s'agissait-là du *gold standard*.

La première partie de cette thèse sera essentiellement consacrée à une revue de la littérature sur l'agent pathogène de la PCP et les moyens permettant aujourd'hui de porter son diagnostic. Puis dans un second temps, nous exposerons les résultats de nos travaux expérimentaux.

PARTIE 1 : PRÉSENTATION DE L'AGENT PATHOGÈNE, *PNEUMOCYSTIS JIROVECHII*

I. Historique

En 1909, Carlos Chagas décrivait pour la première fois des cas de pneumonies chez les cobayes qu'il croyait infectés par *Trypanosoma cruzi*. A cette époque, Carlos Chagas pensait avoir identifié une nouvelle forme, dite prékystique, de trypanosome (Chagas 1909).

En 1910, Antonio Carini faisait la même observation dans des poumons de rats infectés par *Trypanosoma lewisi* (Carini 1910).

En 1912, le couple Delanoë, à l'Institut Pasteur de Paris, observait les mêmes structures kystiques dans des poumons de rats d'égouts parisiens, forcément non infectés par le trypanosome puisqu'hors zones d'endémie, et différenciaient alors cette entité biologique du trypanosome. Ainsi, cette dernière fut nommée *Pneumocystis carinii* en raison de son tropisme pulmonaire et en hommage à Antonio Carini.

En 1938, Ammich décrivait, en Allemagne, une épidémie de pneumonies interstitielles à cellules plasmocytaires chez des enfants malnutris, sans connaître l'origine de celles-ci (Ammich 1938). Ce n'est qu'en 1952, grâce à Vanek et Jirovec, qu'un lien fut établi entre le genre *Pneumocystis*, découvert 40 ans plus tôt, et les pneumonies interstitielles chez les enfants prématurés et malnutris (Vanek and Jirovec 1952). Plus tard, dans les années 1960, en parallèle de l'essor des traitements immunosuppresseurs, on observait des cas de pneumonies à *Pneumocystis* chez des patients greffés d'organes et des patients atteints de cancer. *Pneumocystis* fut alors reconnu comme étant un agent pathogène opportuniste (Spencer 1965). En 1981, une épidémie de pneumonies à *Pneumocystis* fut rapportée par le CDC (*Centers for Disease Control*) d'Atlanta (Georgie, USA). Elle concernait uniquement des homosexuels atteints de sarcome de Kaposi, c'est-à-dire une population bien différente de celles susmentionnées, décrites jusqu'ici. Elle fut ainsi à l'origine de la découverte d'une nouvelle maladie virale, le SIDA.

Il faudra attendre la fin des années 1980 pour que la biologie moléculaire confirme l'existence de plusieurs espèces au sein du genre *Pneumocystis*. Des études expérimentales, confortées par des approches génétiques, ont tendu à montrer une spécificité d'hôte propre à chaque

espèce (Gigliotti *et al* 1993 ; Aliouat-Denis *et al.* 1994 ; Mazars *et al.* 1995). En 1994, lors des troisièmes ateliers internationaux sur les protistes opportunistes (*Third International Workshop on Opportunistic Protists*, IWOP-3), la nomenclature trinomiale préconisée par l'ICBN (*International Code of Botanical Nomenclature*) fut tout d'abord adoptée de façon provisoire. Avec ce système, le nom latin de chaque espèce d'hôte où se développe le pathogène fut rattaché à *Pneumocystis carinii*. Pour l'Homme, l'espèce infectante s'appelait alors *Pneumocystis carinii formae specialis hominis*. En 1999, l'appellation *Pneumocystis jirovecii*, en hommage au Docteur Otto Jirovec, était enfin retenue pour l'espèce retrouvée chez l'Homme. Le genre *Pneumocystis* ne désignait donc plus une seule entité, mais un groupe hétérogène d'espèces eucaryotes étroitement adaptées à différents mammifères et largement répandues dans l'écosystème (Aliouat-Denis *et al.* 2008 ; Cushion 2004). L'appellation *Pneumocystis carinii* était néanmoins conservée pour l'une des deux espèces retrouvées chez le rat (*Rattus norvegicus*).

Actuellement de nombreuses espèces ont été mises en évidence dans le règne animal. De plus, au sein de l'espèce *P. jirovecii*, des analyses de séquences d'ADN tendaient à démontrer l'existence d'une biodiversité génotypique faisant même évoquer la possibilité de plusieurs sous-espèces (Stringer *et al.* 2002).

Aujourd'hui, en France, la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* (PCP) représente la deuxième infection fongique invasive avec une fréquence de 26,1 % après les candidémies (Bitar *et al.* 2014) ; et on peut noter une recrudescence de cas dans la population des immunodéprimés non VIH par rapport à la population des sujets infectés par le VIH, depuis le début des années 2000.

Pneumocystis jirovecii, agent opportuniste de la PCP, est alors l'espèce strictement humaine et cosmopolite.

Au sein de cette espèce, plusieurs génotypes existent.

L'agent pathogène ne touche pas uniquement les patients infectés par le VIH. De même, une recrudescence de cas a pu être observée chez les patients immunodéprimés non VIH dans les années 2000.

II. Taxonomie

A. L'hypothèse parasitaire

Jusqu'à la fin des années 1980, *Pneumocystis spp.* était considéré comme un protozoaire, plutôt qu'un champignon.

Plusieurs arguments étayaient cette hypothèse :

- Le cycle de réplication est proche de celui des protozoaires et la présence de prolongements cytoplasmiques appelés filopodes confère aux trophozoïtes un aspect amiboïde (de Souza *and* Bechimol 2005).
- La culture *in vitro* est impossible sur milieux usuels en mycologie ;
- *Pneumocystis* est doué d'une synthèse *de novo* des folates à partir de l'acide para-aminobenzoïque, comme en sont capables les *Apicomplexa*.
- On observe une sensibilité vis-à-vis de certains antiparasitaires tels que l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole ou la pentamidine, et une résistance aux molécules antifongiques.
- L'absence d'ergostérol dans la membrane expliquerait la résistance aux antifongiques qui y sont normalement actifs, comme l'amphotéricine B et les azolés (Kaneshiro 1998).

B. L'hypothèse fongique

D'autres arguments, plus récents, orienteraient plutôt la classification de *Pneumocystis* vers le règne des *Fungi*.

- D'un point de vue morphologique, on peut noter une forme kystique évoquant des spores de champignons ou asques, des mitochondries possédant des *cristae* et l'absence d'organite très visible (Stringer *et al.* 2002).
- La paroi du kyste trilamellaire (couche externe, couche moyenne et membrane plasmique), riche en chitine et en (1,3)- β -D-glucane, fait évoquer une paroi fongique (Matsumoto *et al.* 1989 ; Ruffolo *et al.* 1989). Cette propriété permet d'ailleurs l'imprégnation de certaines colorations à des fins diagnostiques.
- Sur le plan moléculaire, le séquençage nucléotidique codant l'ADNr 16S-like ou le gène de la thymidylate synthase révèle des homologies de séquence avec les levures Ascomycètes

telles que *Saccharomyces cerevisiae* ou *Candida albicans* (Edman *et al.* 1988 ; Pixley *et al.* 1991 ; Stringer *et al.* 1989).

- La mise en évidence du facteur d'élongation EF3 est spécifique des espèces fongiques.

Après plusieurs controverses, l'approche moléculaire a permis de classer finalement *Pneumocystis* dans le règne des *Fungi*. Cet Ascomycète est un champignon atypique avec des particularités morphologiques et structurales.

La classification suivante est proposée :

- . Phylum : ASCOMYCOTA
- . Sous-phylum : *Taphrinomycotina*
- . Classe : *Pneumocystidomycetes*
- . Ordre : *Pneumocystidales*
- . Famille : *Pneumocystidaceae*
- . Genre : *Pneumocystis*

III. Cycle biologique

L'étude du cycle de *Pneumocystis* a été fastidieuse en raison du caractère difficilement cultivable de ce micro-organisme (Atzori *et al.* 1998). Les techniques de microscopie électronique à transmission (Figure 1) et de cytométrie en flux ont permis néanmoins de formuler des hypothèses sur les différentes étapes de son cycle biologique (Aliouat-Denis *et al.* 2009 ; Martinez *et al.* 2011). Néanmoins, toutes les interrogations n'ont pas été élucidées, notamment concernant la nature des formes infectantes.

Sur le plan morphologique, *Pneumocystis* se présente schématiquement sous trois formes principales : une forme végétative ou trophozoïte, une forme pré-kystique et une forme kystique mature (Aliouat-Denis *et al.* 2009 ; Thomas and Limper 2004) :

- Les formes végétatives, ou trophozoïtes, sont très variables en forme et en taille, allant de 2 à 12 μm . Elles sont mononucléées, amiboïdes et sont munies d'élongations, les filopodes, visibles en microscopie électronique leur permettant de s'arrimer très étroitement aux cellules épithéliales de type I, au niveau des alvéoles pulmonaires, où elles se multiplient activement, tout en restant extracellulaires. C'est à partir des grands trophozoïtes que se forment les prékystes.
- Les prékystes, ou sporocystes, ont une forme ovoïde et mesurent 3,5 à 6 μm . Ils résultent de la fusion asexuée de deux formes trophiques haploïdes suivie d'étapes sexuées de méioses et de mitoses, par accouplement de formes trophiques mononucléées (Figure 2). Ils sont d'abord mononucléés, et deviennent multinucléés. Ainsi, il existe trois stades de prékystes, précoce, intermédiaire et tardif, en fonction du nombre de noyaux (1 à 8) et de la structure de la paroi.
- Les kystes matures, éléments probablement infectants, mesurent 4 à 7 μm de diamètre. Ils sont de forme ovoïde et libèrent *in situ* 8 corps intrakystiques, ou ascospores, qui se transforment rapidement en trophozoïtes. Les ascospores libérées mesurent 1 à 2 μm . Les kystes vides ont une forme en ballon dégonflé caractéristique.

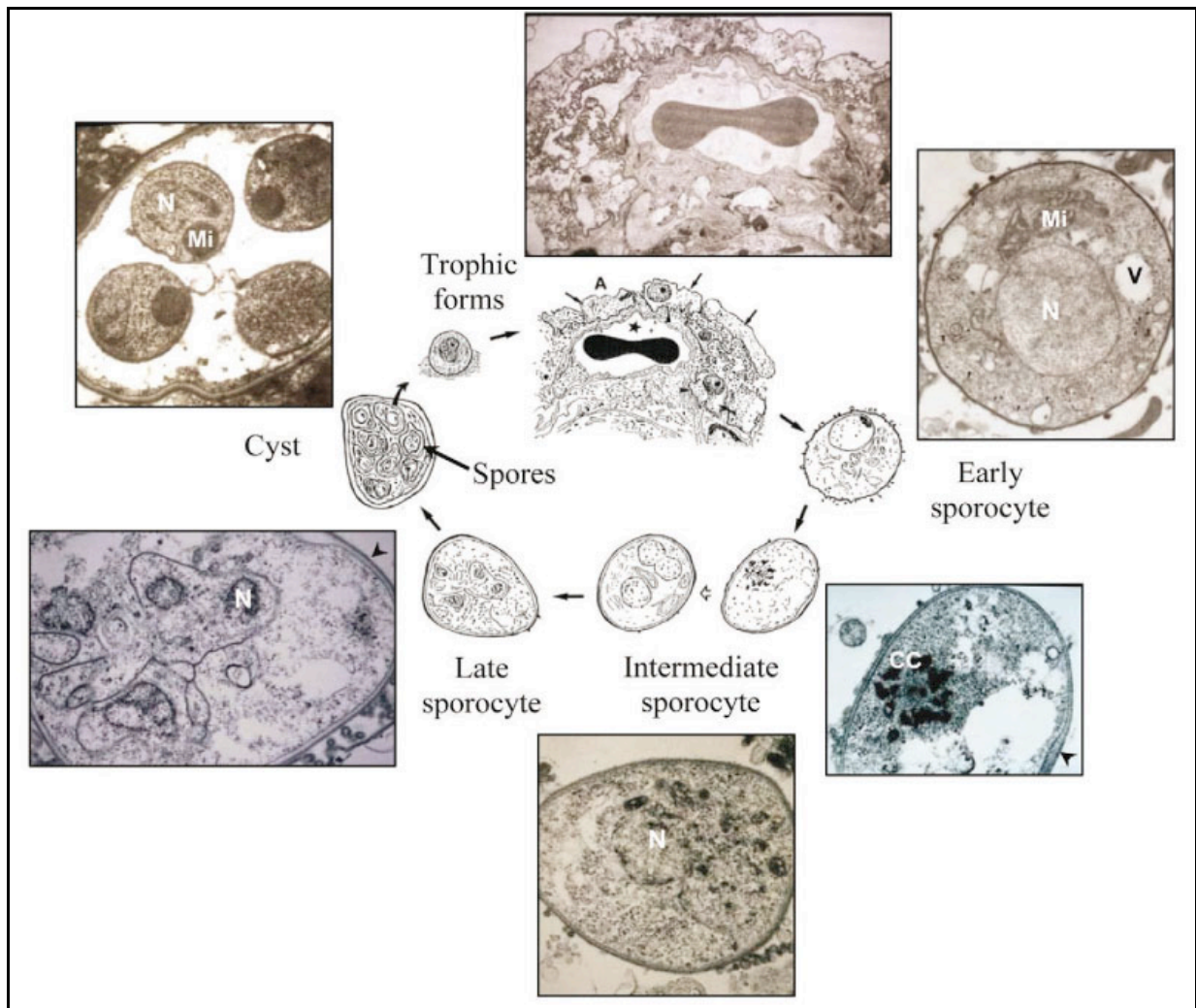


Figure 1 : Cycle hypothétique de *Pneumocystis jirovecii* illustré par des images prises en microscopie électronique à transmission (Source : d'après Aliouat-Denis *et al.* 2009)

CC : Chromosomes condensés ; Mi : Mitochondrie ; N : Noyau ; V : Vacuole

Deux modes de multiplication interviennent au cours du cycle biologique : un mode asexué par fission binaire de la forme trophique ; un mode de reproduction sexuée par accouplement de formes trophiques mononuclées (Figure 2).

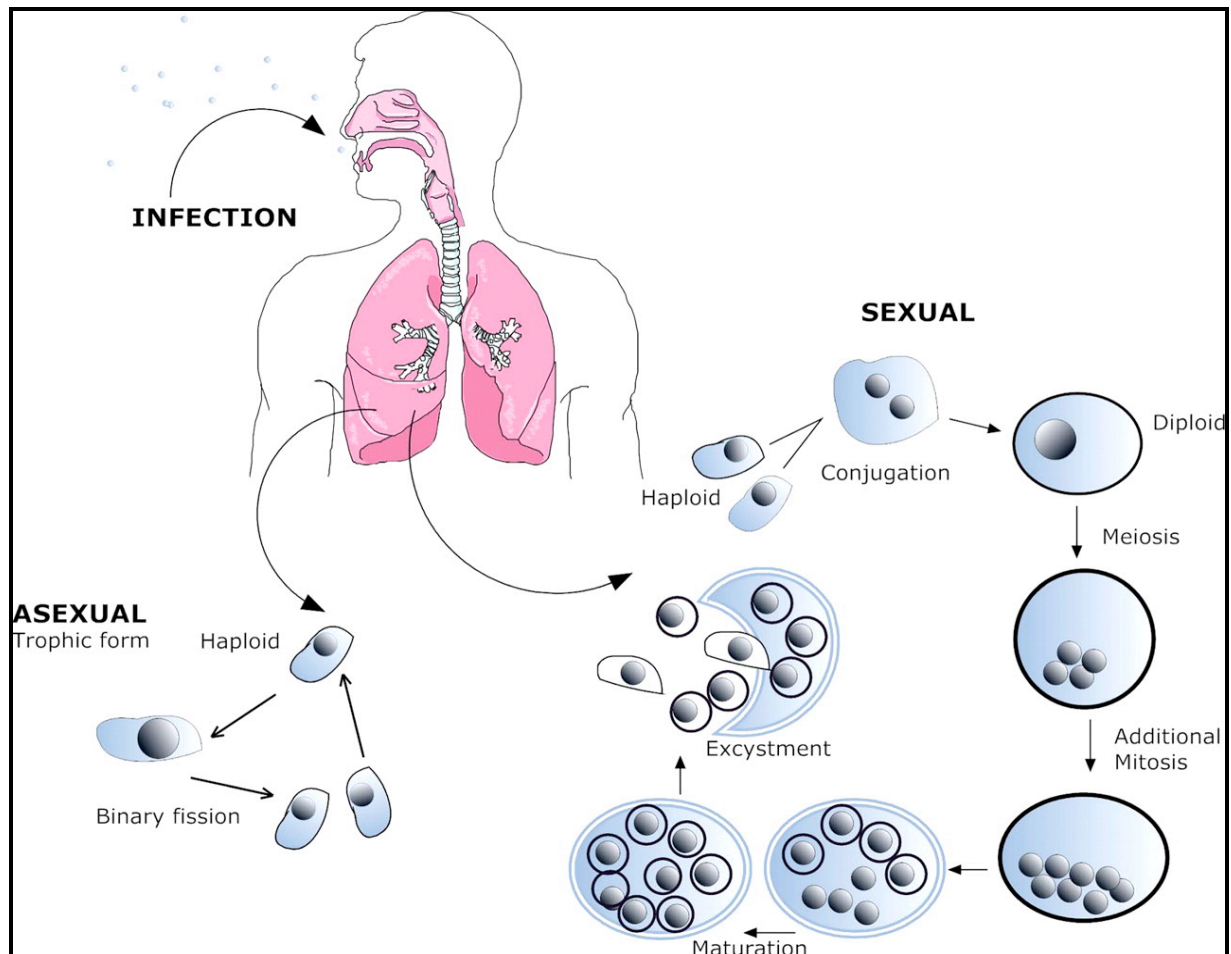


Figure 2 : Phase sexuée et asexuée du cycle de *Pneumocystis jirovecii*

(Source : d'après Beck *et al.* 2009)

Le cycle de *Pneumocystis* se déroule au sein des alvéoles pulmonaires de l'hôte infecté en passant par trois stades successifs : la forme végétative ou trophozoïte, le prékyste et le kyste. Au cours du cycle, deux modes de multiplication sont possibles à partir des formes végétatives. A la fin du cycle, les ascospores libérées par le kyste mature pourront débiter alors un nouveau cycle.

IV. Modes de transmission

A. Une contamination *de novo*

Pendant plusieurs années, la première hypothèse avancée pour expliquer la survenue de forme clinique de PCP était basée sur l'existence de formes latentes ou quiescentes de *Pneumocystis jirovecii* à partir d'un portage de façon chronique depuis l'enfance. En effet, plusieurs observations témoignaient des séroprévalences élevées chez des enfants sains en bas âge : d'après Pifer *et al.*, deux tiers des enfants immunocompétents à 4 ans présentaient des anticorps anti-*Pneumocystis* (Pifer *et al.* 1977). Une étude plus récente mettait en évidence 85 % de séroconversions chez des nourrissons de 20 mois (Vargas *et al.* 2001). Ainsi, on pouvait croire que ces formes latentes étaient capables de se réactiver pour expliquer la survenue de la PCP en cas d'immunodépression. Depuis, de nombreuses études épidémiologiques et génotypiques ont réfuté cette hypothèse.

La transmission de l'agent de la PCP se ferait plutôt par contamination *de novo* à partir d'une souche exogène. Ainsi, dans les modèles animaux, il a été montré que l'hôte immunocompétent parvient en général à éradiquer le champignon en moins d'un an, et *Pneumocystis* n'a pas été retrouvé, y compris par PCR, dans les poumons de sujets sains (Hugues 1998). La disparition de l'ADN de *Pj* chez des patients guéris de PCP, étaye également l'hypothèse de la recontamination au détriment de celle de réactivation (Chabé *et al.* 2009), même si certains auteurs ont montré que des individus pouvaient être transitoirement porteurs du champignon (Morris *et al.* 2002).

Enfin, des études de typage réalisées lors d'épisodes itératifs de PCP ont révélé que près de 50 % des souches étaient en réalité différentes entre le premier et le second épisode (Stringer *et al.* 1996 ; Hugues 1998).

B. Une transmission horizontale par voie aéroportée

Aujourd'hui, le mode de transmission par voie aérienne semble le plus probable, et la source interhumaine semble privilégiée. Cette notion de source commune aéroportée était en fait apparue relativement précocement avec les cas d'épidémies chez des enfants prématurés ou

malnutris, mais également en milieu hospitalier dans certaines unités de pédiatrie, oncologie, soins intensifs, transplantation rénale et maladies infectieuses.

Depuis, les analyses de génotypage sur des cas groupés de PCP ont confirmé cette idée (De Boer *et al.* 2007 ; Höcker *et al.* 2005). L'apport de la biologie moléculaire a permis de retrouver de l'ADN de *Pj* dans l'environnement et notamment dans l'air hospitalier (Bartlett *et al.* 1997). D'après les travaux de Choukri *et al.*, on retrouvait l'ADN de *Pj* jusqu'à 3 mètres dans la chambre d'un patient atteint de PCP et jusqu'à 8 mètres à l'extérieur (Choukri *et al.* 2010). Ceci souligne la probable exhalation du micro-organisme par l'hôte infecté. Par ailleurs, l'ADN a également été retrouvé au niveau nasal ou pharyngé chez du personnel soignant en contact avec des patients développant une PCP avec des similitudes génotypiques. Ce constat tendait à montrer la potentielle transmission interhumaine du champignon, mais aussi le rôle de porteurs sains transitoires joué par les infirmières et les médecins, en tant que personnes infectées non malades. Par contrôle de la phase initiale et avant élimination du champignon par le système immunitaire, il est ainsi probable que les sujets immunocompétents, colonisés de façon temporaire par *Pj*, jouent un rôle épidémiologique en participant à maintenir un niveau de transmission important dans la population générale (Morris *et al.* 2008).

A l'heure actuelle, le mode de contamination de *Pj* retenu est une contamination de *novo* avec une transmission aéroportée à partir de sujets infectés ou colonisés (Chabé *et al.* 2009 ; Dumoulin *et al.* 2010).

Grâce à la biologie moléculaire, le concept d'infection nosocomiale (Damiani *et al.* 2012) a aussi été évoqué chez des patients hospitalisés immunodéprimés. En outre, des incertitudes persistent concernant la forme infectante de ce micro-organisme.

PARTIE 2 : APPROCHE DIAGNOSTIQUE DE LA PNEUMONIE A *PNEUMOCYSTIS JIROVECHII*

I. Arguments épidémiologiques en fonction des populations à risque

A. Les nourrissons et les enfants

- Les nourrissons prématurés ou malnutris

Pour mémoire, les premiers cas de PCP ont été décrits chez les nourrissons prématurés ou malnutris dans les années 1930 (Ammich 1938). On les nommait « pneumonies plasmocytaires » avant de les reconnaître comme infections dues à *Pneumocystis* en 1950.

Ces pneumonies survenaient chez des nourrissons âgés de 2 à 3 mois avec une incubation longue et un début très insidieux. Cliniquement, on distinguait une tachypnée et une cyanose péri-orale aboutissant à une détresse respiratoire généralement sans toux ni fièvre. Le taux de mortalité était de 25 % en l'absence de traitement.

- Les nourrissons et enfants immunodéprimés infectés par le VIH

Par la suite, des cas de PCP ont été observés chez les nourrissons et enfants immunodéprimés infectés par le VIH. L'incidence de la maladie était élevée, de l'ordre de 40 %, avant l'ère des antirétroviraux efficaces dans les pays développés. De par l'amélioration du suivi des grossesses à risque et la rareté de telles naissances, ces cas demeurent aujourd'hui exceptionnels, sauf dans les pays en voie de développement. Le début clinique est progressif avec tachypnée, fièvre et toux. La mortalité est de 100 % en l'absence de traitement.

- Les enfants atteints de déficits immunitaires primitifs

Il s'agit de cas de PCP survenant sur des déficits immunitaires congénitaux. On peut citer notamment les déficits immunitaires combinés sévères (Berrington *et al.* 2000) mais aussi les hypogammaglobulinémies, les syndromes d'hyperIgM liés à l'X, les agammaglobulinémies liées à l'X. L'apparition de la PCP dans le cadre de ces déficits apparaît souvent chez le nourrisson au cours de la première année de vie.

Le début est brutal avec dyspnée, toux sèche et fièvre pouvant conduire à une détresse respiratoire avec une mortalité de 100 % en l'absence de traitement.

- Les enfants hébergés en oncologie pédiatrique

Parmi les cancers de l'enfant, les hémopathies malignes sont particulièrement exposées au risque de PCP. D'après Hugues *et al.*, 21 % des enfants leucémiques développaient une PCP en l'absence de prophylaxie anti-*Pneumocystis* (Hugues 1977). Parallèlement, Poulsen *et al.* remarquaient une incidence de 18 % chez les enfants atteints de leucémies aiguës lymphoblastiques (Poulsen *et al.* 2001). Les taux de mortalité sont élevés, avoisinant 100 % en l'absence de traitement.

B. Les adultes immunodéprimés VIH

L'incidence de la PCP diminue de 14,3 % par année chez les sujets infectés par le VIH sur la période 2001-2010 (Bitar *et al.* 2014).

Néanmoins, d'après le rapport du BEH (Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire) du 24 mars 2015, la PCP apparaît comme la principale pathologie inaugurale du SIDA en 2013 en France. En effet, parmi l'ensemble des pathologies inaugurales, 31 % des adultes présentaient de façon isolée une PCP ce qui plaçait cette entité devant la tuberculose (17 %), la toxoplasmose cérébrale (10 %), le sarcome de Kaposi (10%) et la candidose œsophagienne (9%). Le nombre de PCP en tant que pathologie inaugurale du SIDA restait stable sur la période 2003-2013, contrairement aux autres pathologies inaugurales les plus fréquentes qui ont tendance à diminuer.

La PCP se développe généralement quand le nombre de lymphocytes T CD4 + est à moins de 200 cellules/mm³ (Huang *et al.* 2006), et plus particulièrement à moins de 100 cellules /mm³.

En revanche, si la diminution des lymphocytes T CD4 + est un facteur prédisposant à la survenue de la PCP, la charge virale élevée ne semble pas être un facteur de risque (Kaplan *et al.* 2001).

C. Les adultes immunodéprimés non VIH

En France, l'incidence de la PCP augmente de 13,3 % par année chez les sujets immunodéprimés non VIH sur la période 2001-2010 (Bitar *et al.* 2014).

En 2014, l'étude multicentrique de Roux *et al.* (Figure 4) soulignait une prédominance de diagnostics de PCP établis dans la population des immunodéprimés non VIH : près de 60 % des cas de PCP survenaient dans cette catégorie de patients.

D'après des études rétrospectives, les catégories les plus à risque parmi les sujets VIH négatifs (Pagano *et al.* 2005 ; Bollée *et al.* 2007) sont :

- les adultes avec hémopathies malignes
- les patients sous corticothérapie à forte dose dans le cadre de cancers solides
- les sujets avec des maladies inflammatoires ou auto-immunes
- les individus transplantés d'organes solides.

- Les adultes atteints d'hémopathies malignes

Parmi les hémopathies, le risque de développer une PCP paraît supérieur pour les leucémies lymphoblastiques et les lymphomes non hodgkiniens, où les taux d'attaque sont de l'ordre de 0,2 à 0,5 % (Roux *et al.* 2010).

D'autres patients en hématologie sont à risque :

- les patients recevant des stéroïdes au long cours ou à forte dose
- les patients greffés de moelle ou de cellules souches hématopoïétiques (surtout dans les greffes allogéniques)
- les patients traités par anticorps anti-CD20 (rituximab) ou anti-CD52 (alemtuzumab)

- les patients présentant une lymphopénie profonde et prolongée (par exemple, une chimiothérapie à base de fludarabine.).

- Les adultes atteints de cancers solides

Le taux d'attaque de la PCP est de l'ordre de 0,1 %, tous cancers confondus, et de 0,7 % pour les tumeurs cérébrales dont les patients concernés semblent, en effet, plus exposés en raison des traitements par corticoïdes au long cours (Roux *et al.* 2010).

- Les adultes atteints de maladies inflammatoires ou auto-immunes

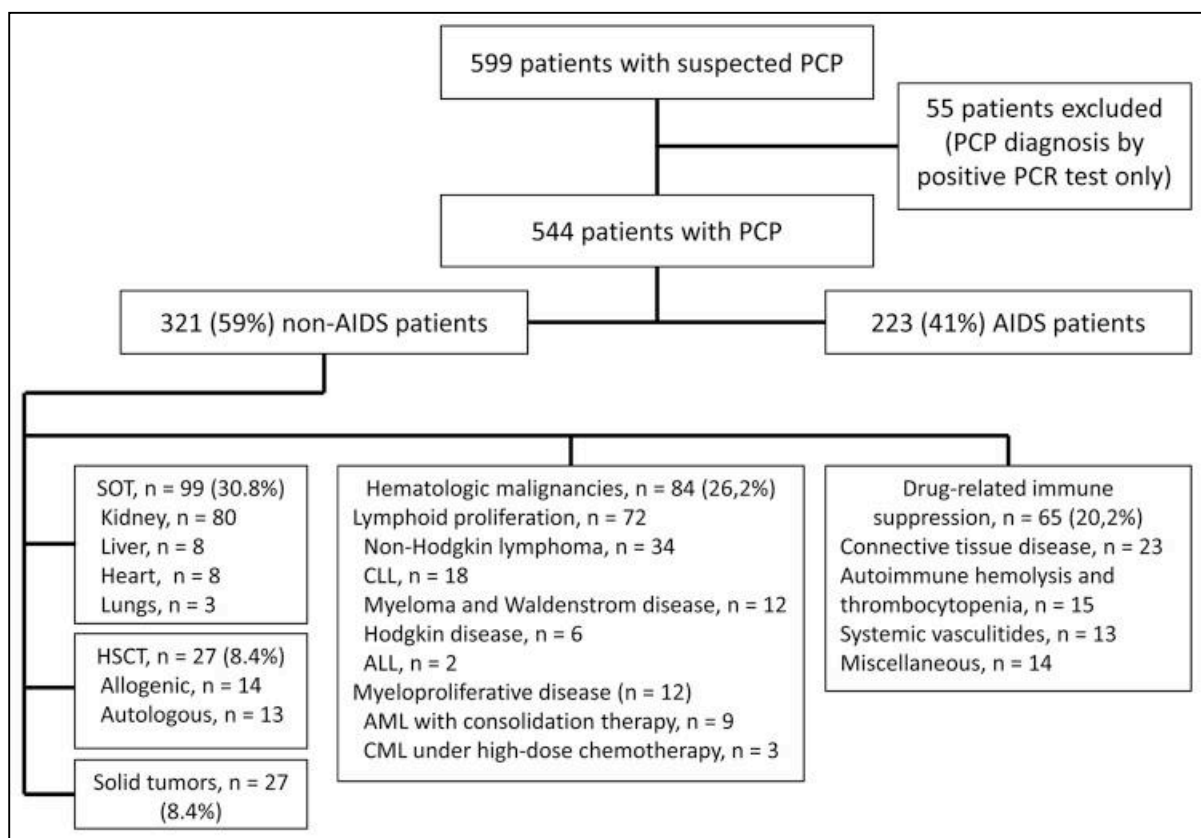
Plusieurs maladies de systèmes (Godeau *et al.* 1994) ont été décrites comme facteurs de risque de la PCP. De plus, les thérapeutiques associées comportent souvent des corticoïdes ou d'autres traitements cytotoxiques (Kamano *et al.* 2009). Par exemple, d'après Chew *et al.*, la prise orale moyenne de corticoïdes dans le groupe atteint de PCP était de 55,5 mg par jour versus 10,7 mg par jour dans le groupe non atteint (Chew *et al.* 2015).

- Les adultes transplantés d'organes solides

Tous les types de transplantations peuvent être exposés à la PCP, en particulier durant la période correspondant à la première année suivant la greffe.

Les traitements prescrits aux patients transplantés (immunosuppresseurs, sérum anti-lymphocytaire) et les co-infections (CMV, hépatite C, tuberculose...) contribuent largement au développement de la PCP (Radisic *et al.* 2009 ; Iriart *et al.* 2015).

Les taux d'attaque semblent plus élevés dans les transplantations pulmonaires (5% d'après Gordon *et al.* 1999) devant les transplantations cardiaques, hépatiques et rénales. Toutefois, les cas de PCP en transplantation rénale sont largement décrits dans la littérature : les traitements immunosuppresseurs entraînent des lymphopénies affectant particulièrement les lymphocytes T CD4+. Des cas groupés de PCP dans les unités de transplantation rénale sont également observés (Sassi *et al.* 2012 ; Nankivell *et al.* 2013). Dans l'étude de Roux *et al.*, près de 25 cas des patients de PCP chez les patients non VIH, survenaient chez des transplantés rénaux (Roux *et al.* 2014) (Figure 3).



ALL : Acute Lymphoid Leukemia ; AML : Acute Myeloid Leukemia ; CLL : Chronic Lymphoid Leukemia ;
CML : Chronic Myeloid Leukemia ; HSCT : Hematopoietic Stem Cell Transplant ; SOT : Solid Organ Transplant

Figure 3 : Répartition des patients avec une PCP prouvée dans une étude multicentrique française entre 2007 et 2010 (Source : d'après Roux *et al.* 2014)

Cette étude incluait systématiquement les patients admis dans 17 hôpitaux universitaires français de janvier 2007 à décembre 2010 et présentant une PCP prouvée.

II. L'orientation clinique

A. La description de la forme pulmonaire

Globalement, la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* se traduit par une triade classique d'apparition progressive composée de fièvre, de toux sèche et de dyspnée d'intensité croissante dans 50 % des cas. Cependant, au début de l'infection, ces signes cliniques peuvent être absents. Il peut aussi exister des formes fébriles pures. L'auscultation pulmonaire est souvent normale au début. L'étude des gaz du sang montre une hypoxie dans la majorité des cas.

La radiographie pulmonaire objective un infiltrat interstitiel diffus bilatéral à prédominance hilare (Figure 4) mais peut ne retrouver aucune anomalie dans 25 % des cas dans la phase initiale (Schielp *and* Yarrish 1999). A l'inverse, lorsque le diagnostic est tardif, les patients se présentent dans un tableau d'insuffisance respiratoire aiguë. La radiographie pulmonaire est quasi opaque en «verre dépoli» ou «poumons blancs». Sur les coupes tomодensitométriques, la PCP se caractérise par des plages de verre dépoli confluentes, bilatérales et symétriques, à prédominance péri-hilaire, épargnant l'extrême périphérie et les culs-de-sac pleuraux (Figure 5). Plus rarement, on peut observer des plages de condensation alvéolaire, des micronodules et des épaississements septaux. Le *crazy paving* est le terme utilisé en cas d'association d'images en verre dépoli et d'épaississements septaux. Les signes tomодensitométriques en faveur d'un diagnostic de PCP sont résumés dans le Tableau 1.

Notons que de rares cas de formes granulomateuses ont été décrits dans la littérature (Wakefield *et al.* 1994 ; Pontier *et al.* 2004).

En cas de guérison, l'évolution se fait le plus souvent sans séquelle mais dans certains cas, on peut voir apparaître une fibrose (Marchiori *et al.* 2005).

Finalement, la présentation clinique pulmonaire est assez variable d'un patient à l'autre, et les signes ne sont pas spécifiques. Cependant, deux grands types de présentation clinique peuvent être schématiquement opposés : la symptomatologie est exacerbée chez les patients immunodéprimés non VIH (Thomas *et al.* 2004 ; Roux *et al.* 2010) contrairement aux patients infectés par le VIH. Dans la première situation, le tableau clinique est brutal et aigu, avec une phase prodromique de moins d'une semaine contrairement aux patients VIH où cette phase est relativement longue jusqu'à quatre semaines. Sur le plan radiologique, il n'existe pas de différences notables entre ces deux tableaux (Roux *et al.* 2010), à part les formes kystiques

prédominant aux lobes supérieurs que l'on retrouve chez 10 à 30 % des patients VIH. Généralement résolutive, cette dernière peut se compliquer de pneumothorax (Figure 6) et être fatale. Les différences observées entre les patients VIH et les patients non VIH peuvent s'expliquer par la réaction immunitaire spécifique de l'hôte. Nous aborderons aussi, ultérieurement, les difficultés du diagnostic biologique et les différences entre ces deux grands types de présentations cliniques. Le tableau 2 récapitule brièvement ces deux présentations.

Enfin, notons que des cas isolés de PCP chez des sujets *a priori* immunocompétents ont été sporadiquement décrits par différents auteurs (Al Soub *et al.* 2004 ; Riel *et al.* 2009). Les cas rapportés présentent souvent des tableaux cliniques sévères pouvant aller jusqu'à la détresse respiratoire aiguë (Nejmi *et al.* 2010). Il est probable que toutes les investigations chez ces patients n'ont pas pu être menées correctement afin de s'assurer de l'absence d'immunodépression sous-jacente.

Tableau 1 : Signes tomodensitométriques retrouvés dans la PCP (Source : d'après Tissot *et al.*, CHRU Brest)

Signes fréquents	Signes rares
<ul style="list-style-type: none"> • Verre dépoli +++ • <i>Crazy paving</i> • Bronchectasies par traction • Distribution bilatérale et symétrique • Prédominance aux territoires supérieurs • Respect des régions sous pleurales 	<ul style="list-style-type: none"> • Lésions nodulaires • Adénomégalies • Calcifications • Épanchement pleural • Distribution unilatérale

Tableau 2 : Présentation clinique et approche diagnostique de la PCP chez les patients infectés par le VIH et ceux non infectés par le VIH

(Source : d'après Adler *et al.* 2008)

Présentation	VIH +	VIH –
Durée des prodromes	28 jours	< 7 jours
Mode de début	Progressif	Brutal
Clinique	Non spécifique (toux sèche, dyspnée, fièvre)	Non spécifique (toux sèche, dyspnée, fièvre)
PaO ₂ moyenne à l'AA	69 mmHg/9,2 kPa	50 mmHg/6,6 kPa
Recours à la VM	+	+++ (60-70% des cas)
Charge en <i>Pneumocystis jirovecii</i>	Importante	Faible
Mortalité	Environ 10% (si pas de VM)	Environ 30 à 60%
Sensibilité diagnostique du LBA	Excellente (environ 95%)	Faible
Neutrophilie au LBA	Faible	Elevée

AA : Air Ambiant ; Pa O₂ : Pression artérielle en oxygène ; VM : Ventilation Mécanique

La pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* doit être évoquée devant la triade classique « fièvre, toux, dyspnée » chez un patient immunodéprimé avec des signes radiologiques de pneumonie interstitielle. Cependant, les signes cliniques et radiologiques manquent parfois de spécificité, d'où l'intérêt d'apporter des preuves biologiques pour confirmer ou infirmer le diagnostic.

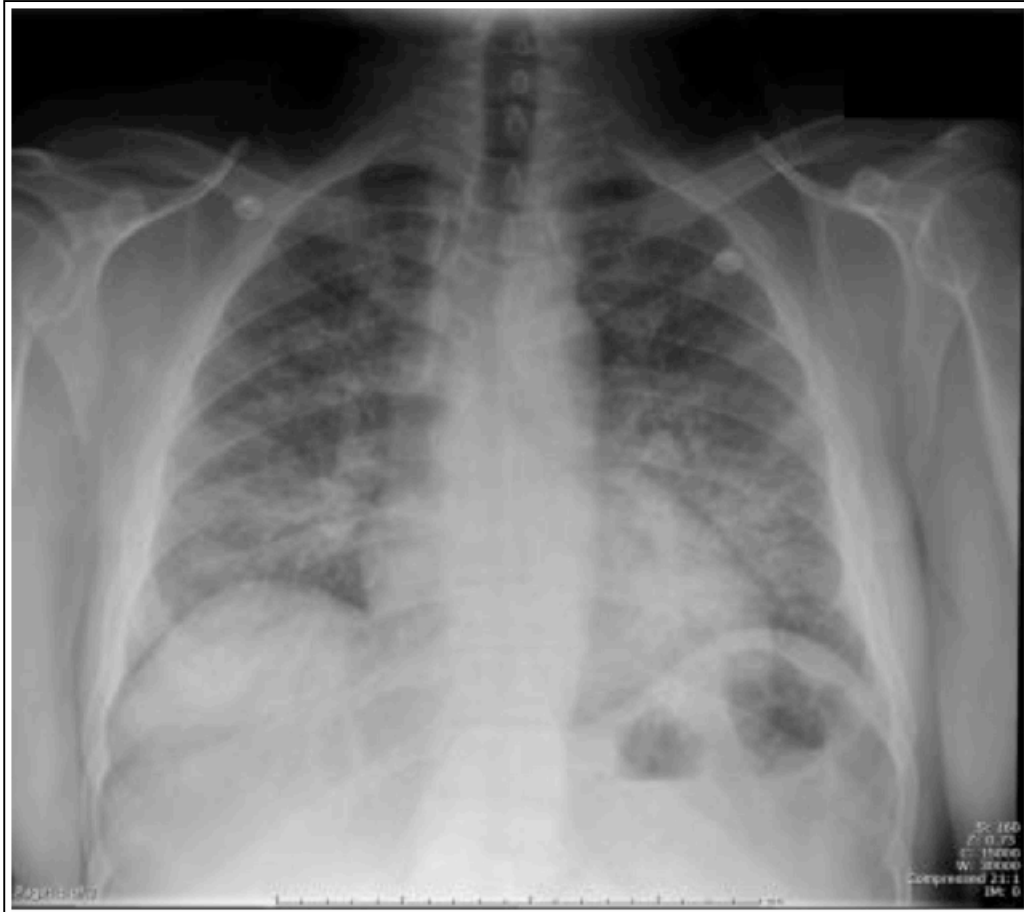


Figure 4 : Radiographie thoracique montrant un infiltrat interstitiel bilatéral chez un patient atteint d'une pneumonie à *Pneumocystis jirovecii*

(Source : d'après site internet : <http://emedicine.medscape.com/article/225976overview#a9>)

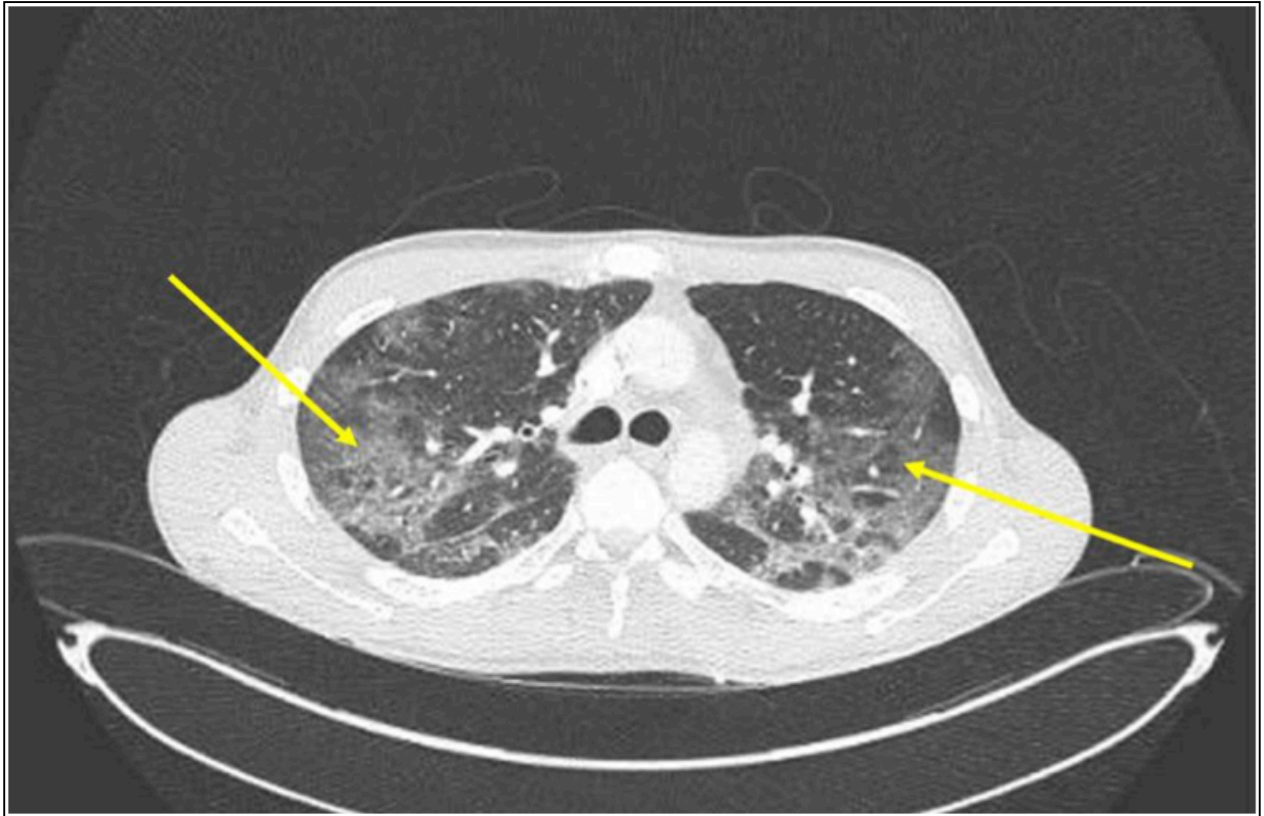


Figure 5 : Coupe tomodensitométrique thoracique en fenêtre parenchymateuse montrant des plages en verre dépoli au cours d'une PCP (flèches jaunes). Celles-ci sont péri-hilaires bilatérales et symétriques confluentes, « en ailes de papillon ». L'absence d'effacement des structures vasculaires et bronchiques caractérise le verre dépoli, et la différence d'une condensation alvéolaire (Source : Image radiologique d'un patient atteint de PCP, hospitalisé au CHRU Bretonneau, Tours)

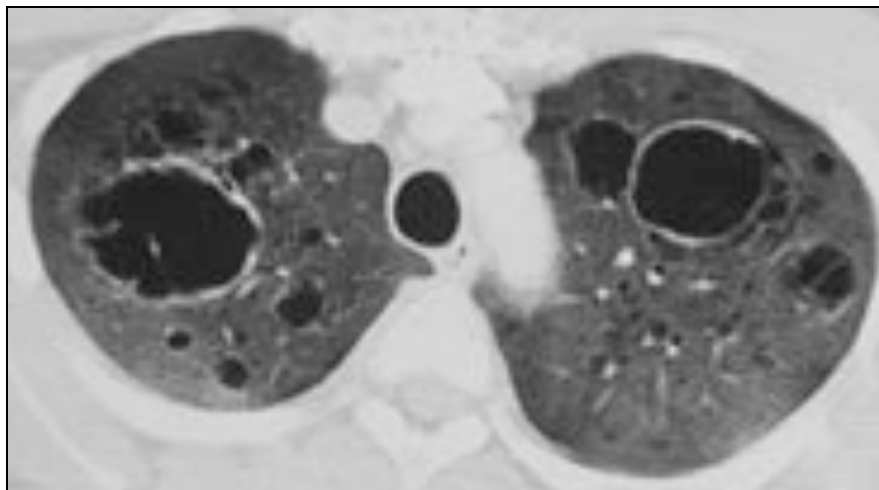


Figure 6 : Coupe tomodensitométrique thoracique en fenêtre parenchymateuse montrant des structures kystiques lors d'une PCP inaugurale chez un patient de 37 ans au stade SIDA (54 CD4/mm³)

Scanner thoracique montrant un aspect de verre dépoli diffus avec multiples images kystiques bi-apicales. Ultérieurement, cette PCP hypoxémiante sévère s'était compliquée d'un pneumothorax dont l'issue a été fatale (Source : d'après Lacombe *et al.* 2007)

B. Les particularités des rares présentations extrapulmonaires

Très rares, les formes extrapulmonaires sont dues à un essaimage du microorganisme par voie sanguine provoquant ensuite une atteinte disséminée ou localisée dans certains organes particuliers. La localisation splénique est la plus fréquente, mais tous les organes peuvent être atteints (foie, moelle, plèvre, ganglions, thyroïde, mastoïde, conduit auditif, rétine...). Des formes pseudo-tumorales digestives ont été décrites (Valdebenito *et al.* 2015) (Figure 7). Les formes pulmonaires sont alors rarement associées.

Il a été suggéré que les formes extrapulmonaires de diagnostic difficile pouvaient être favorisées par l'usage d'aérosols de pentamidine. L'abandon de cette pratique fait que ces formes sont devenues exceptionnelles (Ng *et al.* 1997).

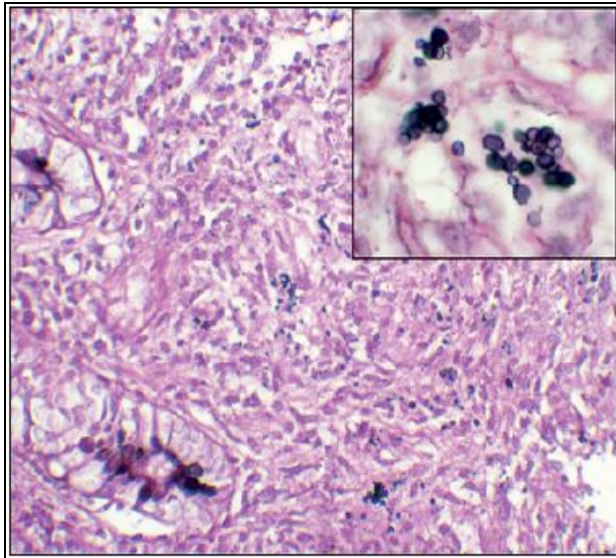


Figure 7 : Coupe histologique de la muqueuse d'un colon sigmoïde (x400-x1000) avec coloration de Gomori Grocott chez un patient infecté par le VIH au stade SIDA présentant une colite à *Pneumocystis jirovecii* .L'histologie révèle un infiltrat inflammatoire granulomateux avec lésions kystiques de 4-6 µm correspondant à des kystes de *Pneumocystis jirovecii* (Source : d'après Valdebenito *et al.* 2015).

III. Les tentatives de confirmation par les outils biologiques

Le manque de spécificité du tableau clinico-radiologique pour établir le diagnostic de PCP conduit à la réalisation de prélèvements respiratoires adaptés en vue d'une analyse mycologique de confirmation. Le choix du prélèvement est une première étape importante dans l'examen biologique pour porter un diagnostic de certitude.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, nous distinguons maintenant deux entités dans le diagnostic de PCP : celle survenant schématiquement chez les patients VIH et celle chez les patients non VIH. En conséquence, l'approche biologique du diagnostic doit être considérée différemment en fonction de ces deux contextes. Le diagnostic biologique est plus fastidieux chez les patients non VIH où les charges fongiques sont beaucoup plus faibles par rapport aux patients VIH. Des techniques plus sensibles doivent donc être mises en place pour pallier cette difficulté.

A. Choix du prélèvement

- Le lavage broncho-alvéolaire

Le lavage broncho-alvéolaire (LBA), réalisé au cours d'une fibroscopie bronchique, est un prélèvement respiratoire relativement pénible. Il est réalisé au préalable de toute biopsie bronchique. Le patient doit être à jeun et le geste se fait sous anesthésie locale ou générale. Un volume donné de sérum physiologique stérile est instillé à température ambiante dans un territoire alvéolaire (2 à 3 instillations de 100 mL), puis le liquide est ré-aspiré. Le lavage recueille donc les cellules et substances des cavités aériques distales. Sa composition reflète l'infiltrat cellulaire interstitiel et le contenu alvéolaire. A partir du LBA, plusieurs examens peuvent être réalisés. Celui-ci sera réparti dans les différents laboratoires suivant le contexte clinique et les habitudes propres à chaque centre (microbiologie, cytologie...)

En cas de suspicion d'infection, le premier lavage sera destiné à la microbiologie.

Concernant le diagnostic de PCP, la plupart des auteurs s'accordent pour préconiser ce prélèvement profond dans la mesure du possible (Roux *et al.* 2010). Il s'agit du prélèvement de choix pour le diagnostic de la PCP. Les sensibilités étant supérieures à celles des autres types de prélèvements : globalement, entre 80 et 100 % chez les patients VIH, et entre 50 et 70% chez les patients non VIH (Sing *et al.* 2000) avec les techniques de colorations classiques.

- L'expectoration induite

L'expectoration induite est une technique moins invasive comparativement au LBA. Elle s'effectue après nébulisation de sérum salé hypertonique et idéalement kinésithérapie respiratoire (afin de déclencher un phénomène de toux). En raison du caractère peu invasif, il pourrait être intéressant de choisir ce prélèvement chez des patients VIH avec des charges fongiques élevées (Kovacs *et al.* 1988). Les sensibilités diagnostiques sont inférieures à celles du LBA avec les techniques de colorations habituelles. Afin de compenser ce manque de sensibilité, l'expectoration induite pourrait donc davantage se prêter à des techniques plus sensibles comme la biologie moléculaire.

- Le liquide de rinçage oro-pharyngé

Ce prélèvement n'est pas invasif et peu contraignant. Il consiste à faire « gargariser » un patient à jeun avec 10 mL de sérum physiologique. Selon les auteurs, ce prélèvement s'avère intéressant pour les enquêtes épidémiologiques (Juliano *et al.* 2015) et évaluer la transmission des souches en milieu hospitalier par des études de génotypage. De plus, le recueil du prélèvement est relativement aisé, et peut se faire au niveau du personnel soignant sans infliger la contrainte du LBA. Les obstacles de ce prélèvement sont le manque de sensibilité et le risque de présence d'inhibiteurs de PCR au niveau de la sphère ORL. Enfin, les conditions d'acheminement sont délicates avec un délai restreint de moins d'une heure afin d'éviter la dégradation enzymatique de l'ADN.

- Les biopsies transbronchiques et transpariétales

Ces pratiques invasives, non sans risque de complications pour les patients (hémorragiques...), ne sont pas utilisées en pratique courante pour le diagnostic de PCP. Elles sont destinées davantage à l'examen anatomo-pathologique.

B. Les différentes techniques disponibles pour l'examen microscopique

Les difficultés rencontrées sur la culture de *Pneumocystis jirovecii* ne permettent pas la pratique de cette dernière pour une activité de routine.

Le diagnostic de PCP repose essentiellement sur l'examen microscopique direct.

Il est indispensable d'associer au moins deux techniques de coloration dont une doit être panoptique s'intégrant dans une démarche diagnostique globale à la fois parasitologique (Desoubeaux *et al.* 2015) et mycologique.

- May-Grünwald Giemsa

La coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) est une technique panoptique, permettant la détection à la fois des kystes, des prékystes et des trophozoïtes de *Pj*. Elle apprécie également d'autres micro-organismes (tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*, levures, filaments mycéliens...) et la cellularité du prélèvement.

L'intérieur des kystes de *Pj* est coloré en violet (Walker *et al.* 1989) avec une paroi claire non colorée qui apparaît en négatif. A l'intérieur des kystes, on peut discerner les corps intrakystiques : ils sont au nombre de 8 maximum, disposés en rosette. Cependant, les kystes sont difficilement décelables et apparaissent généralement au sein des amas spumeux associés aux formes trophiques et aux prékystes (Figure 8). On repère aisément ces formes lorsque la charge fongique est élevée. Les trophozoïtes mesurent de 2 à 5 µm de diamètre. Ils possèdent une membrane fine, sont pléiomorphes avec souvent un noyau excentré et sont assez rares. Cette technique rapide ne nécessite qu'une vingtaine de minutes pour être réalisée. Elle est facile à mettre en œuvre et peu coûteuse. Des kits sont commercialisés sous forme de flacons prêts à l'emploi (Hemacolor®, Diff-Quick®, RAL 555®) permettant une coloration encore plus rapide. Néanmoins, l'interprétation délicate, nécessite un entraînement pour le lecteur. Cette coloration manque de sensibilité.

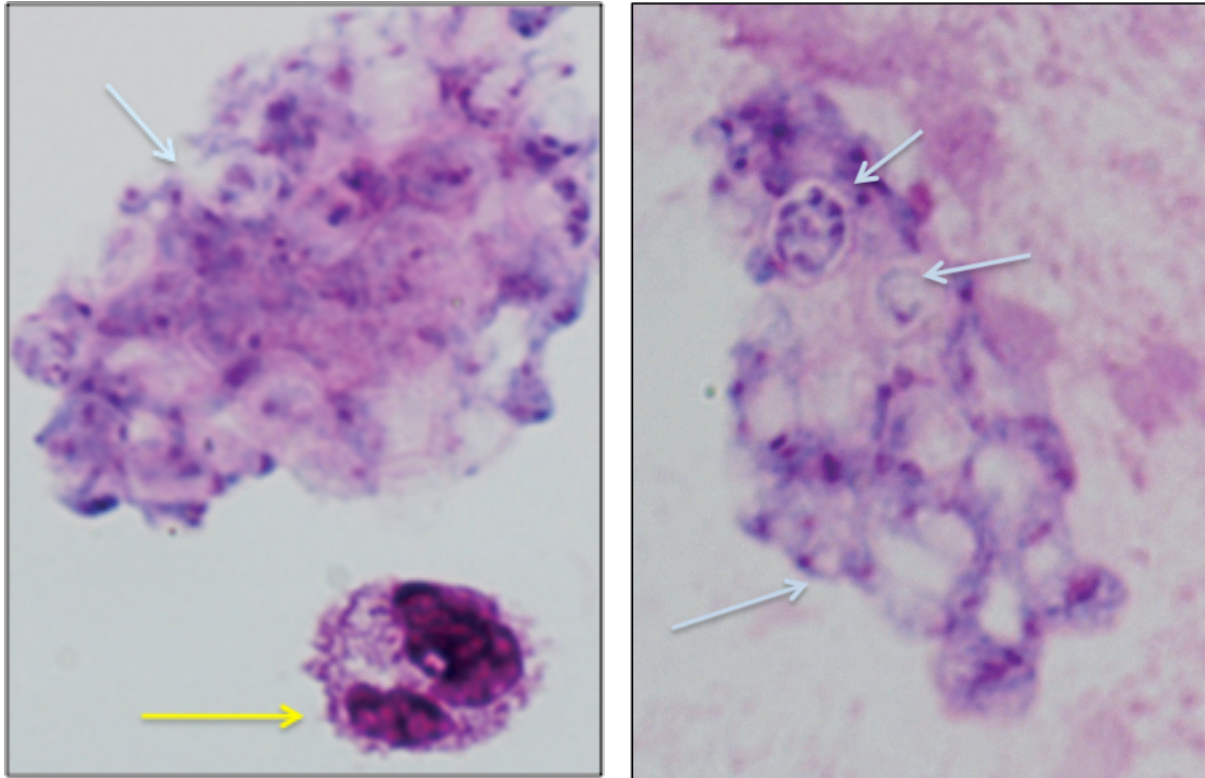


Figure 8 : Détection microscopique (x1000) de formes de *Pneumocystis jirovecii* isolées à partir d'échantillons de LBA, et colorées avec une technique MGG (Source : d'après Calderón *et al.* 2010)

Image de gauche : Amas spumeux avec différentes formes de *Pj* dont des trophozoïtes. En bas de la photo, on observe un polynucléaire neutrophile (flèche jaune).

Image de droite : Différents stades du cycle de *Pj* sont représentés de haut en bas :

- un kyste mature bien visible et contenant huit ascospores,
- une ascospore mononucléée,
- un amas de trophozoïtes observé en bas.

- Gomori Gocrott

La technique d'imprégnation argentique de Gomori Gocrott est longue, requérant deux heures, mais le temps peut être réduit avec une technique rapide dite de Musto (Musto *et al.* 1982). Les kystes et prékystes deviennent visibles grâce à une structure particulière de leurs parois (*a priori* absente des trophozoïtes) permettant le dépôt de particules d'argent. Les kystes sont ronds ou aplatis, souvent avec un aspect froissé, plissé, donnant aussi des images de "parenthèses". Ils sont généralement disposés en amas.

On observe ainsi des images en « nids d'abeilles » aux contours noirs qui se détachent très nettement sur un fond vert clair (Figure 9). D'autres éléments tels que les levures ou les filaments mycéliens (Gocrott 1955) sont capables de prendre cette coloration. Cependant, la technique peut présenter des difficultés de réalisation et nécessite un certain entraînement qui la rend peu reproductible, les kystes pouvant être confondus avec d'autres éléments. De plus, elle est toxique pour l'utilisateur.

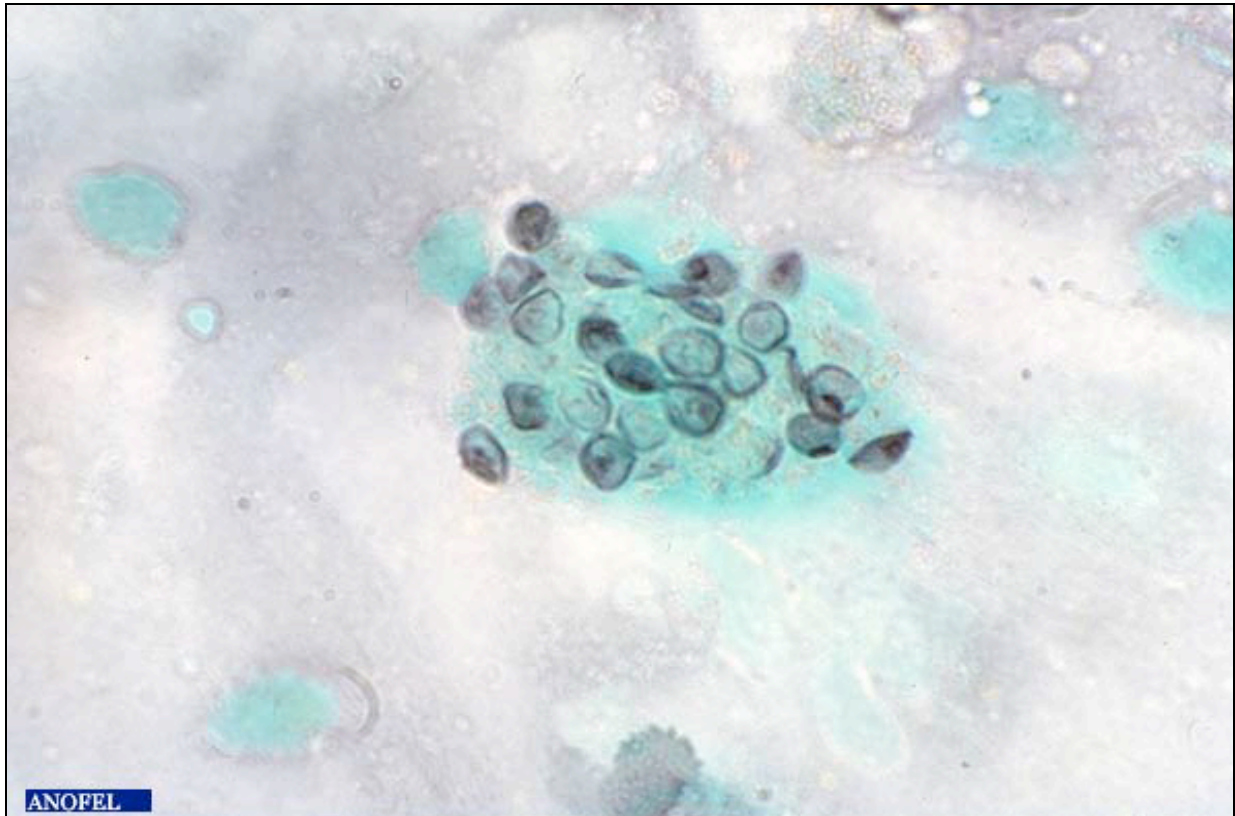


Figure 9 : Détection microscopique (x 1000) de kystes de *Pneumocystis jirovecii* à l'aide d'une coloration de Gomori Gocrott

(Source : CD de l'ANOFEL, Association française des enseignants de parasitologie et mycologie)

- Bleu de toluidine

Ce colorant basique génère des colorations métachromatiques : les différents éléments histologiques prennent des nuances différentes (Chalvardjian 1963).

Cette technique simple et rapide présente ainsi un bon contraste entre le microorganisme et le fond de la préparation. De la même manière que la coloration de Gomori Gocrott, le bleu de toluidine a une affinité particulière pour les composants de la paroi des levures et autres éléments fongiques dont les kystes de *Pj*. Ces derniers sont colorés en bleu violet (Figure 10). Les avantages et limites sont superposables à ceux de la coloration de Gomori Gocrott.

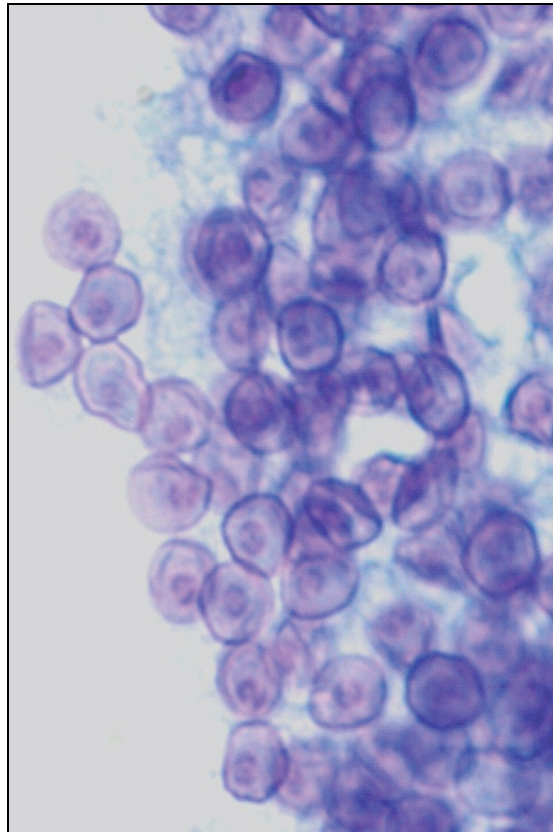


Figure 10 : Détection microscopique (x1000) de kystes de *Pneumocystis jirovecii* isolés à partir d'un échantillon de LBA et colorés au bleu de toluidine (Source : d'après Calderón *et al.* 2010)

Les techniques de colorations citées jusqu'à présent ont des sensibilités très variables selon les auteurs, et parfois très faibles notamment chez les patients non VIH allant jusqu'à 38-53 % (Tapparel *et al.* 2010). Au total, ces constats nous paraissent insuffisants pour conclure de façon définitive au diagnostic de PCP à partir de ces seuls outils biologiques à disposition.

- Calcofluor

Ce type de coloration est peu étudié en France pour le diagnostic de PCP.

Cependant, en 1961, Darken avait déjà signalé la fixation d'un agent de blanchiment fluorescent, le blanc de calcofluor, à partir de cultures de levures et d'autres champignons (Darken 1961). Par la suite, l'utilisation du blanc de calcofluor a été sporadiquement décrite pour détecter la présence d'hyphes et de levures directement dans des prélèvements cliniques (Hageage *and* Harrington 1984).

Plus récemment, le calcofluor a été largement utilisé pour la détection des champignons dans des préparations directes et des coupes tissulaires déparaffinées. Baselski et Robison avaient signalé l'utilisation du calcofluor dans la détection des kystes de *Pj* au sein des échantillons de LBA (Baselski *and* Robison 1989). Ces résultats avaient été confirmés par Milligan (Milligan 1992).

Le calcofluor apparaît comme un colorant fluorescent d'utilisation rapide et simple. Microscopiquement, différentes structures sont capables de capter cette fluorescence tels les kystes d'*Acanthamoeba*, les microsporidies, les éléments fongiques divers... En effet, ce fluorochrome a la capacité de se fixer à la chitine et à la cellulose que l'on retrouve dans la majorité des éléments fongiques ou chez certains parasites ou arthropodes.

Suite à une excitation avec de la lumière ultraviolette, ce fluorochrome est en mesure de révéler les parois kystiques de *Pj* (Figure 11). Cette technique, rapide et peu coûteuse, nécessite que le laboratoire soit équipé d'un microscope à fluorescence.

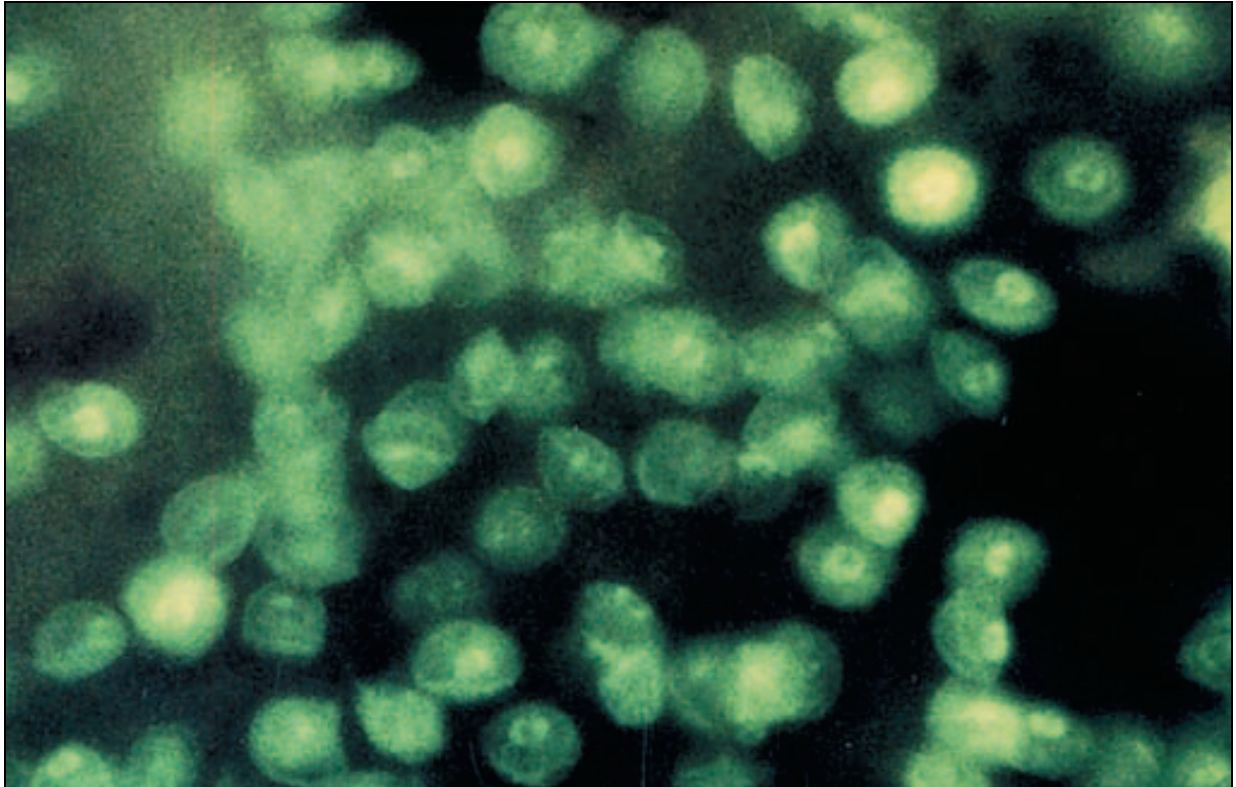


Figure 11 : Kystes de *Pneumocystis jirovecii* colorés au blanc de calcofluor en microscopie à fluorescence (excitation avec une lumière UV et filtre interférentiel de 520 nm)

(Source : d'après Harrington 2008)

Malgré quelques travaux par le passé, cette coloration a été peu évaluée. Cependant, pour tous les avantages techniques susmentionnés, cette approche diagnostique nous semblait pertinente. C'est pourquoi une technique « maison » à base de calcofluor bleu a été mise en place dans le service de parasitologie-mycologie-médecine tropicale au CHRU de Tours. Après une étape de centrifugation du LBA, 20 µL du culot de centrifugation sont déposés sur une lame de verre. La fixation consiste en une incubation dans du méthanol pendant 10 min. La lame est ensuite recouverte avec une solution de calcofluor 0,2% (Fluorescent Brightener 28®, Sigma, Saint-Louis, MO, USA) (Figure 12) pendant 10 minutes. Cette solution de calcofluor a été préalablement reconstituée à partir de 0,1g de poudre 200% avec 100 ml d'eau distillée jusqu'à dissolution totale, puis mélangée à volumes égaux avec une suspension de bleu Evans à 1% (Evans 50g® bleu, MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France). Chaque lame est lue avec un microscope à fluorescence à l'objectif x 50, et une lumière d'excitation à 510-560 nm (Figure 13). Nous reparlerons de cette coloration « maison » ultérieurement, dans la partie dédiée aux travaux expérimentaux.

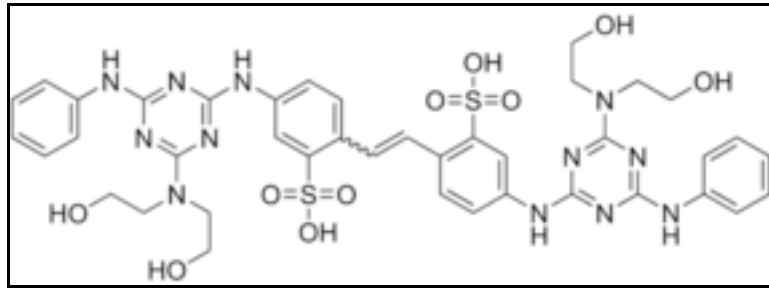


Figure 12 : Formule chimique du calcofluor, Fluorescent Brightener 28® (Sigma)

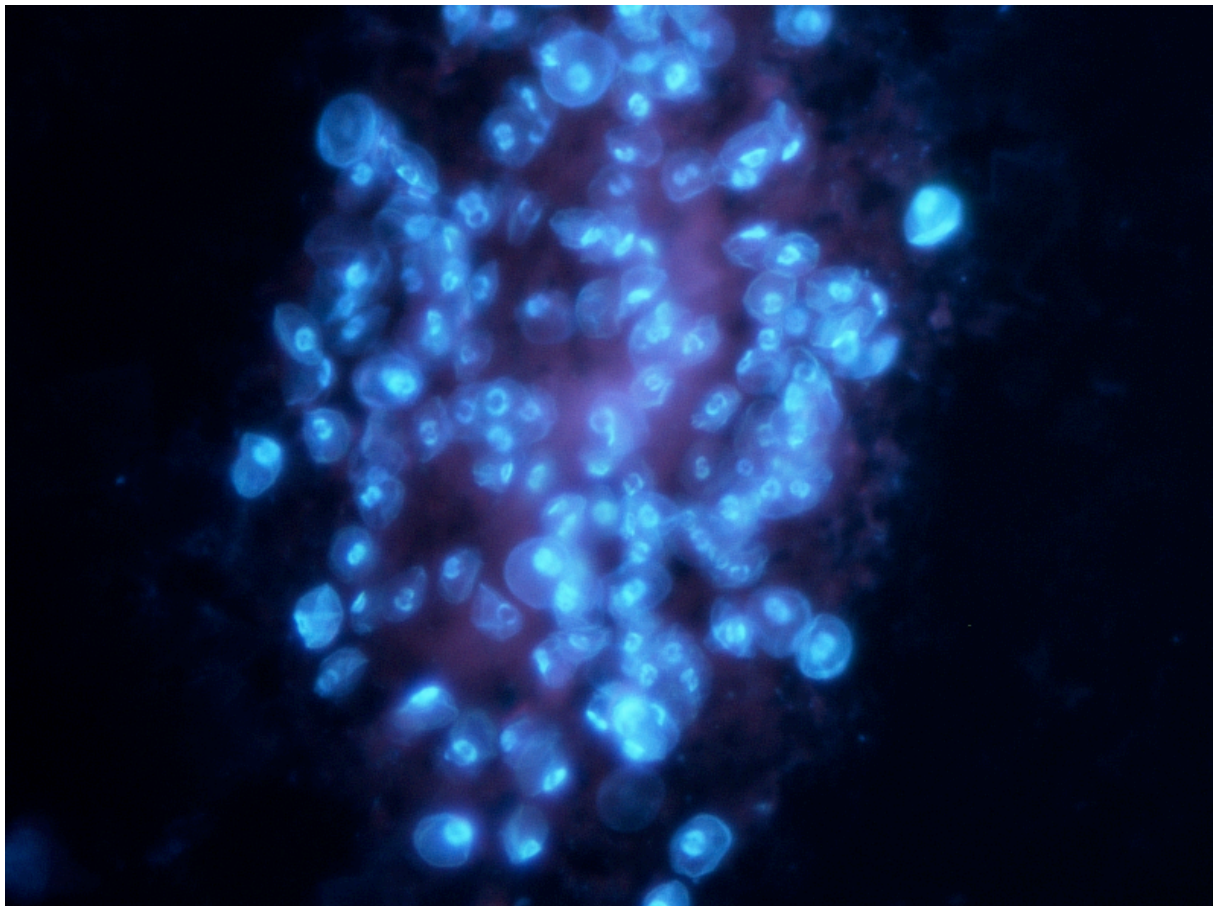


Figure 13 : Détection de multiples kystes de *Pneumocystis jirovecii* avec une technique « maison » à base de calcofluor bleu en microscopie à fluorescence (Source : Service de Parasitologie-Mycologie-Médecine tropicale, CHRU Bretonneau, Tours)

- Autres colorations

D'autres colorations permettent de visualiser *Pneumocystis jirovecii*. Nous pouvons citer la coloration de Gram Weigert qui colore les corps intrakystiques en violet ; cette technique est difficilement interprétable en raison des débris cellulaires, également colorés en violet, gênant considérablement la lecture microscopique.

Enfin, nous pouvons mentionner la coloration de PAS (*Periodic Acid Schiff*) qui imprègne la paroi des kystes visibles occasionnellement à l'examen anatomo-pathologique.

C. L'immunofluorescence directe

Des anticorps monoclonaux spécifiques des kystes de *Pj* ont été développés dans le milieu des années 1980 permettant l'élaboration de techniques d'immunofluorescence.

Différents kits d'immunofluorescence sont aujourd'hui commercialisés : par exemple, le kit MONOFLUO™ *Pneumocystis jirovecii* IFA Test Kit® (Bio-Rad®).

Le principe du test est basé sur la fixation d'anticorps monoclonal spécifiquement au niveau des kystes de *Pj*. Après lavage de la préparation et incubation avec un anticorps conjugué fluorescent dirigé contre l'anticorps monoclonal, les échantillons positifs prennent alors une couleur vert pomme brillant : les kystes colorés apparaissent comme de grosses structures de forme ronde à elliptique, soit isolées, soit groupées (Figure 14). Les sporozoïtes et les trophozoïtes peuvent aussi se colorer, apparaissant comme des structures relativement petites, en forme de croissant ou pléiomorphes.

En outre, la matrice extracellulaire amorphe peut aussi prendre une couleur vive. Les autres organismes et matières cellulaires présents dans les échantillons des voies respiratoires sont contre-colorés en rouge, rouge orangé ou orange, mais ne présentent pas les caractéristiques fluorescentes des kystes de *Pj*.

Selon les kits, une valeur seuil de kystes observés est définie par le fournisseur pour que l'échantillon soit considéré positif. Un ou deux kystes fluorescents détectés apportent généralement une réponse équivoque, mais pour s'assurer d'une spécificité suffisante, certains fabricants préconisent un seuil à cinq kystes. En effet, un excès de mucus dans les échantillons peut empêcher une coloration adéquate, par rétention non spécifique du réactif de coloration.

L'utilisation d'une technique d'immunofluorescence directe, à partir de LBA constitue une méthode relativement simple et rapide permettant de détecter *Pj*. On observe un gain de sensibilité par rapport aux colorations usuelles de détection directe (Vedy *et al.* 2009).

Néanmoins, cette technique d'immunofluorescence directe a un coût nettement supérieur par rapport aux colorations précédentes et nécessite un recrutement important pour éviter d'arriver à la date de péremption affichée sur chaque kit.

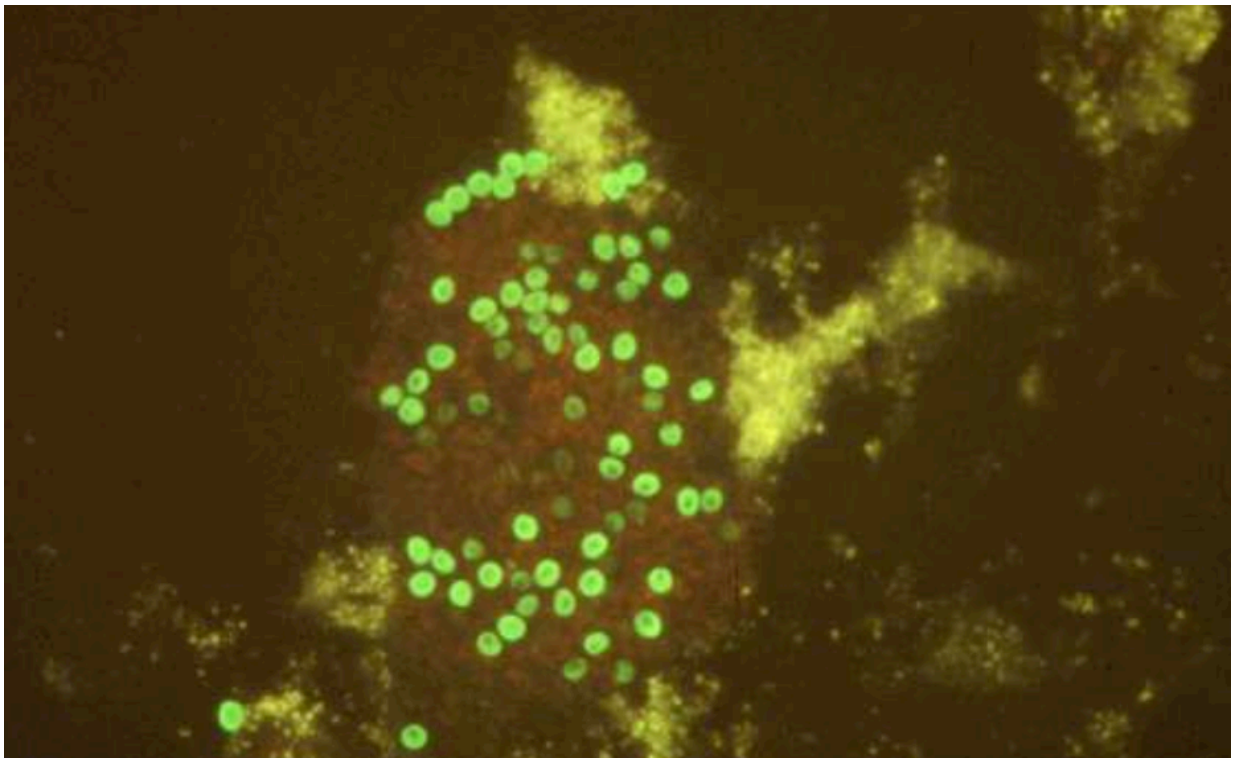


Figure 14 : Détection de kystes de *Pneumocystis jirovecii* via des anticorps monoclonaux en microscopie à fluorescence (Source : CD de l'ANOFEL Association française des enseignants de parasitologie et mycologie)

Les kystes sont de forme arrondie, de couleur vert pomme. Autour des kystes, on remarque des fragments cellulaires colorés en rouge.

D. La biologie moléculaire

Grâce à l'apparition de la biologie moléculaire, la détection de *Pneumocystis jirovecii* a été nettement améliorée. En 1990, l'équipe de Wakefield *et al.* a développé une technique d'amplification d'ADN spécifique de *Pj*, utilisant comme amorce une séquence d'ARNr du gène 5S mitochondrial (Wakerfield *et al.* 1991).

Par ailleurs, plusieurs cibles ont pu être utilisées pour l'amplification :

- les régions ITS (*internal transcribed spacer*)
- la grande sous-unité ribosomale de l'ADN mitochondrial (mtLSU)
- la DHPS (dihydroptéroate synthase),
- la DHFR (dihydrofolate reductase),
- la TS (thymidylate synthase),
- la β -tubuline,
- le gène *cdc2*
- la glycoprotéine de surface, *Major Surface Glycoprotein* (MSG).

Du fait d'une sensibilité élevée, la PCR pourrait pallier *a priori* le manque de sensibilité des techniques microscopiques de détection directe. En particulier, dans les cas d'infection où les charges fongiques sont faibles, comme chez les sujets non VIH. Il existe aussi un intérêt épidémiologique pour détecter par *screening* le portage sain chez les sujets colonisés transitoirement.

Depuis les travaux de Wakerfield, plusieurs études ont mis en évidence les performances de cette technique : les sensibilités étaient respectivement de l'ordre de 80-100 % et de 70-85 % dans le LBA et l'expectoration induite. Les spécificités étaient également excellentes entre 80-100 % sur le LBA et 90-95 % dans l'expectoration induite (Roux *et al.* 2010). De plus, cette technique présente une excellente Valeur Prédictive Négative (VPN) jusqu'à 100 % chez les patients immunodéprimés (Azoulay *et al.* 2009). La PCR conventionnelle ne permettant pas une quantification, une méthode plus rapide et sensible a été développée par Larsen afin d'espérer apprécier la charge fongique dans l'échantillon (Larsen *et al.* 2004) : la PCR quantitative en temps réel (PCRq). Ainsi, plusieurs études ont tenté d'établir des *cut off* pour distinguer les patients colonisés des patients infectés, et ceci en fonction du type d'immunosuppression (Alanio *et al.* 2011).

La technologie utilisée au CHRU de Tours est une PCR temps réel avec une sonde *TaqMan*TM MGB basée sur le principe du FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). La cible utilisée est la grande sous-unité ribosomale de l'ADN mitochondrial (mtLSU).

Brièvement, dans ce système utilisant une sonde *TaqMan*TM – MGB, le fluorophore *reporter* est associé à un *quencher* non fluorescent. Ce qui rend possible la détection de deux cibles différentes au cours d'une même réaction PCR. L'intensité de la fluorescence émise par le fluorophore *reporter* dans une sonde *TaqMan*TM (Figure 15) est mesurée en fin de chaque cycle d'amplification.

Cette fluorescence détectée en temps réel est proportionnelle à la quantité d'ADN amplifiée. Elle est interprétée sous forme d'une courbe exponentielle correspondant à l'amplification (Figure 16). Le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour atteindre une fluorescence donnée est proportionnel à la quantité d'ADN cibles initialement présente : on parle de Cq ou *quantitative cycle*. La valeur du Cq est déterminée dans la phase exponentielle, à l'intersection de la ligne de seuil (*threshold*) avec la courbe de fluorescence (Figure 16). Elle correspond au niveau de fluorescence pour lequel un échantillon est considéré négatif ou positif.

Afin de quantifier les échantillons positifs, nous effectuons une gamme d'étalonnage à partir de dilutions successives (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) de l'ADN de *Pj* en partant d'une concentration connue de formes trophiques par millilitre (TFEq / mL). Par extrapolation, les valeurs obtenues des Cq des échantillons positifs sont reportées sur la courbe d'étalonnage (Figure 17), afin d'en déduire la charge fongique.

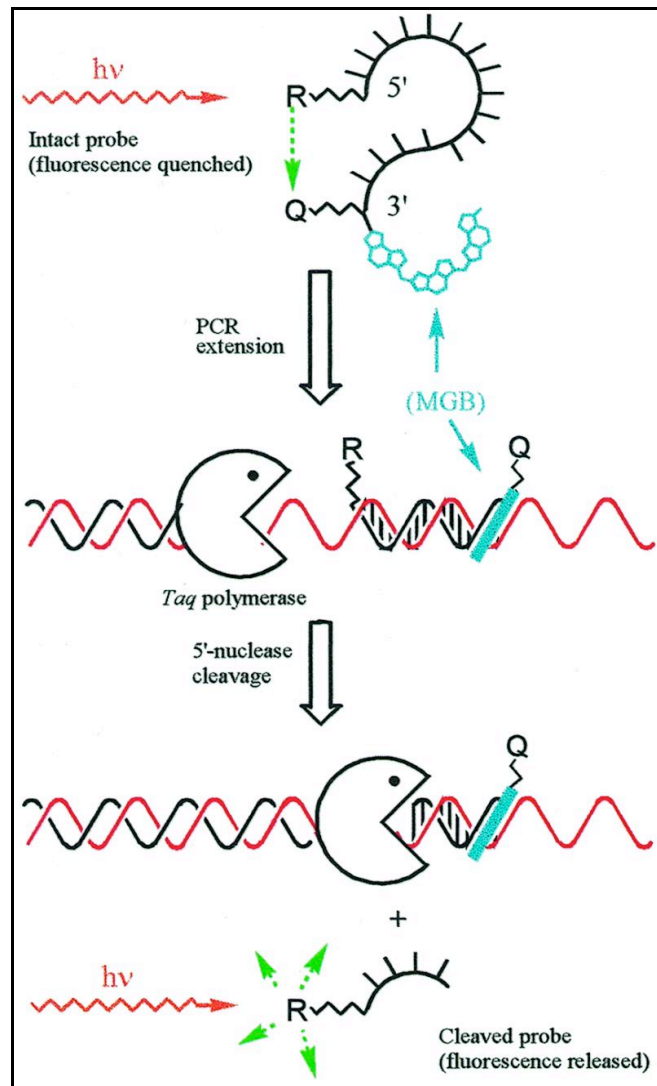


Figure 15 : Principe de la PCR temps réel avec la sonde *TaqMan*TM-MGB (Source : d'après Kuttyvavin *et al.* 2000)

R : reporter ; Q : quencher

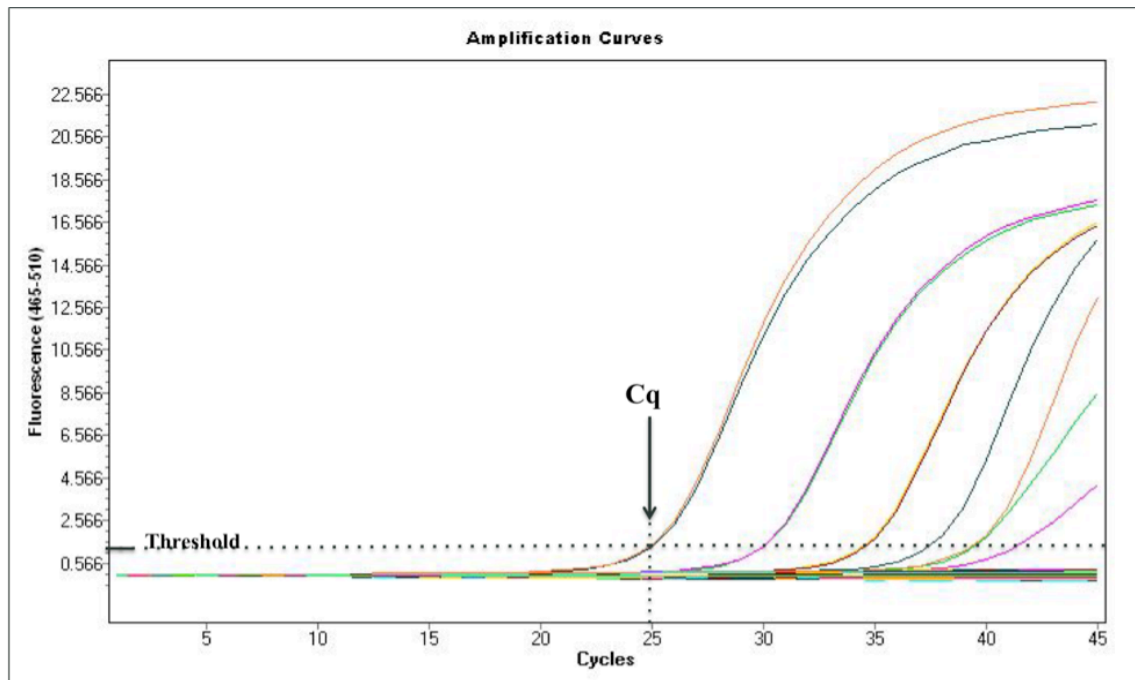


Figure 16 : Exemple de courbes d'amplification obtenues avec le LightCycler 480® (Roche Applied Science) au CHRU Bretonneau (Tours)

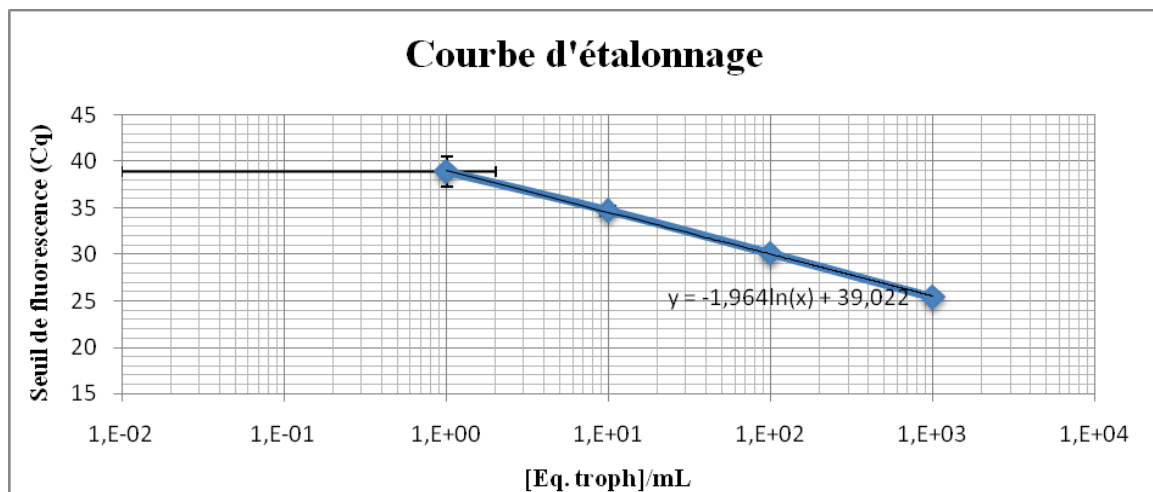


Figure 17 : Courbe d'étalonnage obtenue à partir de dilutions successives d'ADN de *Pj*

E. Les biomarqueurs

- Le (1, 3)- β -D-glucane

Composant naturel ubiquiste de l'environnement, le (1, 3)- β -D-glucane est un polysaccharide du squelette pariétal de la paroi de nombreux champignons.

Ce composant est libéré et circule dans le sang des patients atteints d'infections fongiques invasives à *Candida spp.* et *Aspergillus spp.* ainsi que dans les pneumonies à *Pneumocystis jirovecii*. Il peut également être détecté lors d'infections fongiques invasives à *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, etc...

Ce marqueur précoce d'infections fongiques invasives se positive jusqu'à 15 jours avant l'apparition des signes cliniques ou la détection d'agents fongiques dans le sang. Le prélèvement pour son dosage est réalisé à partir de sérum.

D'après les recommandations de l'EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*), en 2008, les indications à réaliser cet examen sont les suivantes (De Pauw *et al.* 2008) :

- Surveiller et diagnostiquer des infections fongiques invasives chez les patients à risque (transplantés de moelle osseuse ou d'organes solides, patients sous corticothérapie ou traitements immunosuppresseurs, chirurgie digestive, néoplasies, patients prématurés ou âgés) et/ou de réanimation.
- Suivre l'efficacité du traitement antifongique adapté en cas d'infection invasive fongique.

En cas de suspicion de PCP chez un patient VIH, le dosage plasmatique de (1, 3)- β -D-glucane pourrait être proposé si le LBA n'est pas réalisable (Criton 2012). En effet, ce biomarqueur présente une bonne sensibilité, mais une faible spécificité pour le diagnostic de PCP. Une valeur élevée du (1, 3)- β -D-glucane présente une importante valeur prédictive positive pour diagnostiquer la PCP chez les patients atteints du SIDA avec des symptômes respiratoires (Wood *et al.* 2013).

Cependant, l'usage de ce biomarqueur doit être parcimonieux, et être interprété avec l'ensemble des données cliniques, radiologiques et biologiques. Il pourrait être intéressant pour surveiller des patients à risque de PCP en l'absence d'autre infection fongique.

L'inconvénient majeur de ce biomarqueur réside dans les nombreux faux positifs, notamment en cas :

- de bactériémie,
- d'hémodialyse sur membrane de cellulose,
- de l'utilisation de compresses chirurgicales,
- d'une chirurgie digestive,
- d'injection d'albumine,
- d'immunoglobulines par voie intraveineuse,
- d'utilisation de β lactamines hémi-synthétiques (amoxicilline-acide clavulanique, pipéracilline-tazobactam).

Dans une étude récente (Damiani *et al.* 2015), le (1, 3)- β -D-glucane a été mesuré dans des liquides broncho-alvéolaires et permettrait de différencier une colonisation d'une véritable PCP : des taux significativement élevés étaient détectés chez les patients atteints de PCP (valeur moyenne à 20 588 pg/mL) comparativement aux patients colonisés (valeur moyenne à 105 pg/mL) et aux patients non infectés (valeur moyenne à 74 pg/mL).

Si négatif, le dosage du (1, 3)- β -D-glucane présente un intérêt pour écarter une PCP. Il ne peut se substituer à une technique de diagnostic direct ou de biologie moléculaire.

Cependant, cet examen non invasif peut être intéressant pour orienter le diagnostic dans certains cas précis, notamment lorsqu'un LBA n'est pas réalisable par exemple.

- Les autres biomarqueurs

Plusieurs biomarqueurs sont cités dans la littérature. Ces derniers s'intègrent comme des éléments d'orientation vers un diagnostic de PCP, mais ne permettent toujours pas un diagnostic de certitude.

➤ Le lactate deshydrogénase (LDH)

Largement décrite, l'élévation de ce marqueur est signe de souffrance cellulaire et dans le cas de la PCP reflète des lésions d'inflammation pulmonaire non spécifiques (Thomas *et al.* 2004).

➤ La S-adénosylméthionine (SAM ou AdoMet)

La S-adénosylméthionine est un métabolite important dans de nombreuses fonctions cellulaires. La plupart des organismes à l'exception de *Pneumocystis jirovecii*, une rickettsie et une espèce d'*Amoeba* sont capables de synthétiser ce métabolite à partir d'ATP et de méthionine grâce à la S-adénosylméthionine synthétase (Figure 18).

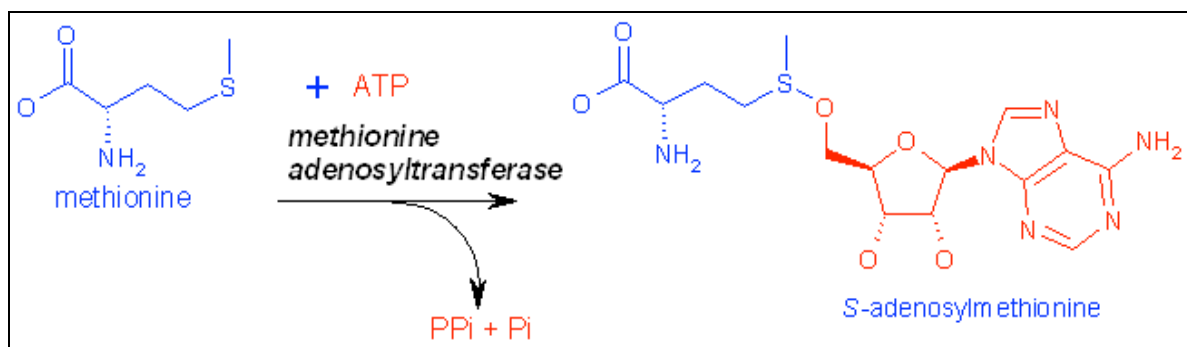


Figure 18 : Biosynthèse de la S-adénosylméthionine

Cette exception métabolique de *Pj* fait que la diminution de la teneur plasmatique en SAM pourrait constituer un marqueur diagnostique de la PCP (Skelly *et al.* 2003 ; Skelly *et al.* 2008). Inversement, les taux de SAM plasmatiques s'élèvent rapidement après le traitement. Ce dosage est réalisé par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Il existe également des risques d'interférences en cas d'infections pulmonaires concomitantes ou de cancers. Ce qui limite aussi l'utilisation de ce biomarqueur dont le coût est élevé.

➤ La glycoprotéine KL-6 (Krebs von den Lungen)

La glycoprotéine KL-6 est présente au niveau de la paroi des pneumocytes de type II et des macrophages alvéolaires, et se trouve élevée dans le sérum et les LBA chez les patients avec une pneumonie interstitielle (Kobayashi *et al.* 1995). La PCP est une des maladies dans lesquelles la glycoprotéine KL-6 augmente dans le sérum. Elle témoigne avant tout de la souffrance tissulaire au cours de la PCP.

PARTIE 3 : TRAVAIL EXPERIMENTAL

Précédemment, dans la partie de cette thèse consacrée à l'analyse bibliographique, nous avons étayé les avantages et limites des outils diagnostiques pour tenter de confirmer le diagnostic de PCP. Afin d'apporter une réponse rapide et précise au clinicien, des techniques de laboratoire performantes doivent être mises en place en complément de celles actuellement à disposition.

Dans ce travail, nous avons cherché à évaluer la pertinence d'une méthode de microscopie directe « maison » par calcofluor bleu pour la détection directe de kystes de *Pneumocystis jirovecii* dans les LBA. Comparée ici avec les méthodes de laboratoire habituelles, cette technique n'est actuellement pas utilisée pour le diagnostic de PCP dans d'autres centres en France et n'a été que rarement testée par ailleurs.

Des LBA de patients avec suspicion de PCP ont été analysés de façon prospective sur une période de près de trois ans au CHRU de Tours : sur dépôts répétés, la performance diagnostique du calcofluor bleu a été systématiquement comparée avec celle d'un kit commercial basé sur le principe d'immunofluorescence directe. En complément, une technique classique de coloration par MGG ainsi qu'une PCRq ont été effectuées. Les performances diagnostiques de chacune de ces méthodes ont été calculées et analysées.

La partie suivante de ce travail sera consacrée à cette étude analytique. Les résultats sont présentés sous forme d'un article scientifique dont la soumission à un journal à comité de lecture est imminente.

Interest of calcofluor brightener for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in bronchial-alveolar lavage fluids: a single-centre prospective study.

Guillaume DESOUBEAUX^{1,2,*}, Claire FRANCK-MARTEL¹, Agnès CAILLE^{3,4}, Nicolas DRILLAUD¹, Marie-Alix LESTRADE CARLUER DE KYVON^{1,2}, Éric BAILLY¹, Jacques CHANDENIER^{1,2}

1. CHU de Tours, Service de Parasitologie – Mycologie – Médecine tropicale, Tours - France
2. Université François-Rabelais, CEPR - INSERM U1100 / Équipe 3, Faculté de Médecine, Tours – France
3. CHU de Tours, Service de Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de communication, Tours, France
4. Université François-Rabelais, PRES Centre-Val de Loire, Inserm - CIC 1415, Tours, France

* Corresponding author: guillaume.desoubaux@univ-tours.fr

CHU de Tours, Service de Parasitologie – Mycologie – Médecine tropicale, Hôpital Bretonneau
Pôle de Biologie Médicale, Bâtiment B2A – 1^{er} étage
2 boulevard Tonnellé, 37044 CHU de TOURS Cedex 9
Tel.: +33(0)2-34-37-89-26
Fax: +33(0)2-47-47-80-82

Short-running title: Interest of calcofluor brightener to detect *P. jirovecii*

Figure count: 1

Table count: 2

Conflicts of interest: the authors have no conflicts of interest to declare

ABSTRACT

Background: The biological diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) is usually based on investigation of respiratory fluids by conventional staining methods and/or molecular biology. Alternative techniques that would be cheap, rapid and easy-to-use are still expected to make more effective this diagnostic procedure.

Objective: In comparison with usual methods, we assessed diagnostic performance of an in-house technique based on calcofluor brightener for direct detection of *P. jirovecii* cysts in respiratory specimens

Material and methods: Bronchial-alveolar lavage fluids (BALF) from patients with suspicion of PCP infection were prospectively analyzed over a three year-period in a single centre: diagnostic yield by calcofluor brightener was systematically compared on replicate smears with those of a commercial kit based on monoclonal immunofluorescence assay (IFA). May-Grünwald Giemsa (MGG) staining and quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) were also carried out and compared with. For each patient, gold standard was the definite diagnosis of PCP infection which was approved or rejected by an independent committee in light of the concordance of clinical, radiological and biological arguments.

Results: Overall, 481 BALF were assessed: 42 were found positive for the detection of *P. jirovecii* by at least one lab technique, but only 35 were actually judged as consistent with the definite diagnosis of PCP infection. Sensitivity of calcofluor brightener technique was 74.3% versus 60.0%, 34.6% and 82.9% for IFA, MGG and qPCR. Specificity was 99.6% vs. 100.0%, 99.3% and 99.4% respectively. No technique was shown to be statistically superior to calcofluor brightener.

Discussion and conclusion: In light of its low cost and its easy preparation, usage of calcofluor brightener in BALF appears as a valuable alternative method for the first-line diagnosis of PCP infection in routine.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*; calcofluor brightener; bronchial-alveolar lavage fluids; direct monoclonal immunofluorescence.

INTRODUCTION

Pneumocystis jirovecii is an airborne fungus which is responsible for interstitial pneumonia (1–3). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) infection occurs mostly in immunocompromised patients, like subjects infected with HIV (Human Immunodeficiency Virus) or those with haematological malignancies (4,5), even though other distinct populations have been more recently described (6,7).

As *P. jirovecii* is not easily cultivable *in vitro* (8), the definite biological diagnosis of PCP has to be achieved by direct observation of the fungus and/or detection of its DNA within respiratory fluids, like bronchial-alveolar lavage fluids (BALFs) (2,9,10). However, such diagnostic procedures are not so easy to perform in less experienced labs. For instance, the historical staining method for direct detection, May-Grünwald Giemsa (MGG), are thought to be not sensitive enough, and some others are quite difficult to handle due to their carcinogen effect, like Gomori methenamine-silver (GMS) impregnation (11). Furthermore, commercial kits allowing detection of *P. jirovecii* cysts by the means of monoclonal antibody and fluorescent-conjugated antibody are quite expensive (12). Eventually, PCR (Polymerase Chain Reaction) appears as a powerful tool, but is not daily-feasible in routine in every laboratory (11). Besides, PCR is currently not able to provide a definite diagnostic response by less than two hours. This duration corresponds to time of real-time quantitative PCR (qPCR) run, which can constitute a real boundary in cases of great emergency. Moreover, the cut-off value of the fungal burden, expressed in Cq (Quantitative Cycles) of qPCR or in number of trophic forms equivalent *per* millilitre (TFEq/mL), is still debatable to distinguish between *P. jirovecii* colonization and real PCP infection (10). Noteworthy, surrogate biomarkers exist, like β -D-glucans measurement in blood, but they lack of specificity when used alone (13).

Altogether, alternative diagnostic approaches for PCP diagnosis are still required to overcome these abovementioned limits. For instance, fluorescent brighteners like calcofluor could be an easy-to-use solution. Although these agents are already well-known for enabling selective fluorescence staining of the cell wall of yeasts or filamentous fungi, their interest for the PCP diagnosis has been far less investigated (9,12). Therefore, over a three year-period, we prospectively assessed an in-house method using calcofluor brightener to detect *P. jirovecii* cysts within patient BALF samples. We systematically compared the results with these obtained by the commercial kit of detection based on monoclonal antibodies, and those get by conventional techniques, like MGG staining, and qPCR.

MATERIAL AND METHODS

Study population

This study was prospectively performed in a French teaching hospital (2,008 inpatient beds) over a three-year period [Feb 2010 – Dec 2012]. All surgical and care units for complete hospitalization are represented on site. Were systematically included all the BALFs that were collected, under routine medical practice, from patients with suspicion of PCP infection, whatever their demographics. Non-inclusion criteria were: aged below 15 years old, and/or a lack of sufficient harvested BALF for the below mentioned investigations.

Comparison of the diagnostic techniques based on fluorescence

*In-house method of direct detection of *P. jirovecii* cysts by calcofluor brightener*

First, each BALF was handled under the following conditions: after centrifugation (1730-g, 10 minutes), the pellet was resuspended in 10 mL saline 0.9%, and re-centrifuged. The

supernatant was then discarded. This operation was repeated once. Thereafter, 20µL of the pellet was deposited on spot of a glass slide. Fixing was achieved by incubation in methanol for 10 min. Slides were then placed in contact with 0.2% calcofluor brightener (Fluorescent Brightener 28®, Sigma, Saint-Louis, MO, USA) solution for 10 minutes. Beforehand, calcofluor solution had been reconstituted from 0,1g powder 200% with 100 mL distilled water until total dissolution, and then mixed in equal shares with a suspension of Evans blue 1% (Evans blue 50g®, MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France). Each spot of glass slide was read under a Nikon Eclipse 80i® microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) with a 50x objective, and excitation at 510-560 nm. A second reading by distinct microbiologist was systematically carried out. If a positive result was obtained, the *P. jirovecii* cysts were counted with the aid of a x100 objective.

Commercial method of indirect detection of P. jirovecii cysts by monoclonal antibody and FITC-conjugate

Initial preparation of slides was the same as this described previously for calcofluor fluorescence: deposits were made concomitantly. Glass slides were subsequently submitted to the conditions recommended by the manufacturer of the MonoFluo™ *Pneumocystis jirovecii* IFA test kit® (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France): enzymatic digestion for 30 minutes was followed by two successive incubations with murine monoclonal antibody, and then with FITC-conjugate anti-mouse antibody for 15 minutes each. Each slide was read twice with a 50x objective, with excitation at 465-495 nm. In case of positive observation, *P. jirovecii* cysts were numbered. According to the manufacturer, the positive cut off value was set at five cysts *per* slide, but for this study, we decided to report every sample as soon as at least one cyst was thought to be observed inside.

Comparison with additional diagnostic techniques

Conventional direct detection of P. jirovecii cysts and trophozoites by MGG staining

For this technique, 100µL of native BALF were deposited into a Cytofunnel double® device (Thermo Fisher Scientific, Asnières, France) for Cytospin3® (Thermo Scientific Shandon, Illkirch, France) centrifugation (80-g, 5 minutes), and then coloured using MGG staining (Microscopy Hemacolor®, Millipore, Billerica, MA, USA). The two coloured spots on each glass slide were microscopically read by a senior microbiologist and by a lab technician. *P. jirovecii* cysts and trophozoites were searched at magnification x1000.

DNA detection of P. jirovecii by Polymerase Chain Reaction

P. jirovecii repeated large subunit (mtLSU) rDNA was systematically searched in BALFs using qPCR. Briefly, DNA was extracted from 200µL of BALF pellet (after centrifugation, 1730-g, 10min). First, a preliminary step was conducted using 10µL of lyticase 1IU/µL incubated 10 min at 37°C. Then, extraction was achieved using the QiAmpDNA Mini kit® (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's recommendations. Thereafter, real-time qPCR was carried out on a 25µL-final volume using GoTaq Probe qPCR Master mix® (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and 5µL of each DNA extract. The following oligonucleotides were used: PJF1 : 5'-CTGTTTCCCTTTTCGACTATCTACCTT-3' and PJR1 : 5'-CACTGAATATCTCGAGGGAGTATGAA-3' for the primers, and 5'-FAM-TCGCACATAGTCTGATTAT-MGB-3' for the specific TaqMan® probe, respectively (10). The final concentrations of primers and probe were 0.4µM. MgCl₂ was adjusted to 0.5mM. Amplification was conducted in duplicate on the LightCycler 480 II® Real-Time PCR (Roche Applied Science, La Rochelle, France) under the following conditions: initial

decontamination for 2 min at 50°C, followed by denaturation over 5 min at 95°C, and then 45 cycles of hybridization / elongation, including 15 s at 95°C, 1 min at 60°C, and a final cooling step at 40°C for 30 s. Inhibition was assessed by internal control (Universal Inhibition Control Cy5®, Diagenode Diagnostics, Liège, Belgium) and an endogenous in-house positive internal control (*P. jirovecii* DNA extract). Results were expressed in quantitative cycle (Cq) values and in trophic forms equivalent *per* millilitre (TFEq/mL). TFEq/mL was calculated by interpolation from a calibration curve giving the correspondence with Cq: each qPCR run comprised four serial ten-fold dilutions of a calibrated *P. jirovecii* DNA solution prepared from a suspension of *P. jirovecii* in which trophic forms had been beforehand counted microscopically by two independent expert microbiologists (10). At this time of the study, was considered as positive in qPCR every sample which showed a specific positive signal, whatever its Cq or TFEq/mL value.

Assay performance and analysis

The final diagnosis of PCP infection was systematically approved by independent physicians, and was based on consistency of the abovementioned biological test results with clinical examination, supported by medical imaging (1). Epidemiological data were provided by the Service d'Information Médicale, Épidémiologie et Économie de la Santé, from Tours University Hospital.

Statistical analysis was performed using XLStat v.2014.6.04® software (Addinsoft, Paris, France). Missing data (*e.g.* when total volume of sample was insufficient to complete all the analyses) were managed by the method of mean imputation. For each given lab technique, a true positive was defined as a positive result that was consistent with the definite diagnosis of PCP infection. Diagnostic measures were calculated to assess the performance: sensitivity

(Se), specificity (Sp), predictive values (PPV and NPV) and likelihood ratios (+LR and -LR), as well as Receiver Operating Characteristic (ROC) curves and their respective Areas Under the Curve (AUC). Comparison of diagnostic performance was made by Mc Nemar and Wilcoxon signed-rank tests. The Spearman's rank correlation coefficient was used to assess the correlation of results obtained with the quantitative methods. The α -risk was adjusted at 0.05.

Ethics

The biological samples had been stored in the hospital collection N°DC-20100-1216, approved by the French Ministry of Research. The study registration number N°2015_030 was issued by the Technology and Freedom National Committee (Commission de l'Informatique et des Libertés) on May 27th, 2015. Final approval N°2015 23 was given by the Ethics Committee of Tours University Hospital (Espace de Réflexion Ethique, Région Centre, France).

Authors complied BRISQ guidelines (14).

RESULTS

Study population

Overall, 481 BALFs were prospectively analyzed during the study period. Out of them, 35 had been collected from patients in who the definite diagnosis of PCP infection was subsequently retained by the independent committee in light of clinical presentation, medical imaging and biological arguments (overall estimated incidence of PCP infection: 2.21 episodes *per* 1,000 patient-days). Most were from immunocompromised male above 50 years

old, with mean count for CD₄⁺ lymphocyte equal to 0,110 G/L at time of diagnosis. Less than one third had been receiving chemoprophylaxis anti-*P. jirovecii*. The demographical characteristics at baseline of the 35 infected patients are summarized in Table I.

Diagnostic performance

Results are summarized in Table II.

Overall, 42 BALF out the 481 samples were found positive with at least one technique. Specificity was high for all the lab methods. Only seven of these BALF were actually considered as false-positive: one was due to a non-specific detection with the MonoFluo™ *Pneumocystis jirovecii* IFA test kit®, and six showed qPCR results with Cq ≥ 40 cycles, that is usually consistent with *P. jirovecii* colonization. For two of these latter, the method based on calcofluor brightener was also positive, but the independent committee had decided to indubitably exclude the likelihood of PCP infection.

Sensitivity appeared better for qPCR, but calcofluor brightener was not shown to be statistically inferior ($P=0.55$). The number of *P. jirovecii* cysts that was counted by the means of calcofluor brightener technique was not significantly correlated with the Cq (Spearman's rank correlation coefficient=-0.312; $P=0.07$) or the TFEq/mL value of qPCR (Spearman's rank correlation coefficient=0.007; $P=0.97$).

Method based on calcofluor brightener was 2-fold more sensitive than MGG staining ($P<0.001$). Although we did not achieved to show a significant difference between calcofluor brightener and the MonoFluo™ *Pneumocystis jirovecii* IFA test kit® to detect positive sample ($P=0.07$; AUC=0.870 vs. 0.798 respectively), we noticed a greater facility to recognize and count the cysts with the former one (Figure 1): although there was statistical correlation between the two techniques (Spearman's rank correlation coefficient=0.579; $P <$

0.001), calcofluor brightener allowed visualisation of more numerous *P. jirovecii* cysts in 96.3% cases. Regarding only the cases of definite PCP infection, the mean number of cysts that we were able to count with the calcofluor brightener was 430 *per* glass slide (Standard deviation, 915) *versus* 127 (Sd, 506) with the commercial IFA kit ($P<0.0001$).

DISCUSSION

Pneumocystis jirovecii pneumonia (PCP) is a fungal infection with possible severe consequences (1–3) : to date, mortality rates are still estimated around 20% (15). An accurate and rapid diagnosis would be theoretically able to conduct to an adequate and rapidly-effective treatment, and so to reduce complications (16).

Fluorescent brighteners, like calcofluor, are cheap reagents that have been widely used for a long time to microscopically visualize yeasts and filamentous fungi within clinical samples (17). As *P. jirovecii* has now been classified among *Fungi* (2), it is assumed to become fluorescent when impregnated with any calcofluor brighteners. However, very few thorough works have studied their usefulness for PCP diagnosis in bronchial-alveolar lavage fluids (BALFs) (9). So, we decided to prospectively assess over a three-year period the diagnostic performance of an in-house direct detection method based on calcofluor fluorescence, in such a context.

Despite our study was monocentric, near to 500 respiratory specimens were analyzed. Our methodology was assumed to be robust, because all the collected BALFs were systematically and blinded studied. In a relevant manner, calcofluor technique was compared with a commercial kit, in strictly-similar conditions of slides preparation and slides reading. Moreover, May-Grünwald Giemsa (MGG) staining and real-time quantitative Polymerase

Chain Reaction (qPCR) were systematically performed to attempt to confirm or invalidate the biological diagnosis with respect to clinical and radiological findings (10).

In all, detection by calcofluor brightener exhibited several benefits for the PCP infection diagnosis. First, the technique was shown to be very easy to implement, and slides were quite simple to read. Indeed, *P. jirovecii* cysts shape appear univocal with calcofluor, and some artefactual fluorescence is not assumed to disturb microbiologists, even non-experts. Thereby, calcofluor brightener allows accurate counting of *P. jirovecii* cysts. Given these two latter arguments, observation of one single cyst is thought to be sufficiently specific to announce a positive sample, and unlike in commercial kits, there is here no need to set a cut off value. Besides, although concordance was significantly high with the commercial IFA kit, it should be noted that globally, a larger number of *P.jirovecii* cysts were detected by calcofluor brightener. This finding appears particularly useful in case of low fungal burden. Furthermore, whereas the commercial IFA kit only allows detection of *P. jirovecii* cysts by the means of its monoclonal antibody, calcofluor brightener enables alternative microbiological diagnosis, since it is able to bind to chitin of other fungi and microsporidia (17). Mean time needed from preparation to reading was around 40 minutes only, while the commercial IFA kit required 1 hour 30 minutes because of incubation times for enzyme digestion and for contact with anti-*P.jirovecii* monoclonal antibody, then with FITC-conjugated antibody. The cost-effectiveness is very low for calcofluor reagent: 242€ for 5g of powder which theoretically allows usage for several years, whereas 24 tests of MonoFluo™ *Pneumocystis jirovecii* IFA test kit® cost 520€.

Regarding comparison with other techniques, although *P. jirovecii* trophozoite forms are impossible to be impregnated by the brightener agent, this latter was systematically more sensitive than the MGG staining which is theoretically able to detect both trophozoites and cysts (9,11). Besides, detection by calcofluor brightener was not statistically inferior to qPCR,

although this latter was found very sensitive and very specific as previously reported (18). Noteworthy, it was even positive in four cases of definite PCP infection, while qPCR was negative for them: one was inhibited, whereas the three other were from patients that were already being given cotrimoxazole at time of bronchoscope examination. We hypothesized that anti-*P. jirovecii* therapy rapidly disables detection by qPCR, while visualization of cysts by calcofluor brightener still remains possible since this reagent binds to their skeleton of chitin, whatever the viability of the fungus.

Based on our findings, we have thereafter adjusted our global diagnostic strategy for detection of *P. jirovecii* in BALF samples. In case of high probability of PCP infection, we have now decided to only carry out MGG staining (which allows detection of other pathogens in BALF, like *Toxoplasma gondii* tachyzoites) and calcofluor brightener impregnation in first-line. As its sensitivity appeared us lower than in previous studies (19), MonoFluo™ *Pneumocystis jirovecii* IFA test kit® is no more used in our facility, while qPCR is practiced in a second time only for suspicious or unclear situations, or when BALF is of very poor quality to complete a reliable microscopic observation.

In a near future, larger studies could focus on alternative respiratory fluids, like sputa which are easier to collect, in order to search for potential interest of calcofluor brightener in detecting *P. jirovecii* cysts in superficial samples (20). Nevertheless, according to our experience based on sporadic assays, only BALFs seem sufficiently reliable specimens for such a purpose.

In all, the routine use of calcofluor brightener, according to our recommendations, would make faster and cheaper the first-line biological diagnosis of PCP infection: its features could make it largely available for all the clinical labs, including those in developing countries with limited technical resources (21).

ACKNOWLEDGMENTS

A professional medical writer (Edelman & Associates) provided the editing services and translation of this manuscript from French into English.

FUNDING

The authors did not receive any specific research funding for this study. They declare no conflict of interests. The data was obtained as part of routine work at the University Hospital in Tours, France.

REFERENCES

1. Thomas CF, Limper AH. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis pneumonia*. *Nat Rev Microbiol.* avr 2007;5(4):298-308.
2. Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev.* avr 2012;25(2):297-317.
3. Nevez G, Chabé M, Rabodonirina M, Virmaux M, Dei-Cas E, Hauser PM, et al. Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* infections. *Parasite Paris Fr.* sept 2008;15(3):359-65.
4. Monnet X, Vidal-Petiot E, Osman D, Hamzaoui O, Durrbach A, Goujard C, et al. Critical care management and outcome of severe *Pneumocystis pneumonia* in patients with and without HIV infection. *Crit Care Lond Engl.* 2008;12(1):R28.
5. Fily F, Lachkar S, Thiberville L, Favennec L, Caron F. *Pneumocystis jirovecii* colonization and infection among non HIV-infected patients. *Médecine Mal Infect.* oct 2011;41(10):526-31.
6. Desoubeaux G, Dominique M, Morio F, Thepault R-A, Franck-Martel C, Tellier A-C, et al. Epidemiological outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia are not limited to kidney transplant recipients: genotyping confirms common source of transmission in a liver transplantation unit. *J Clin Microbiol.* 2 mars 2016.
7. Le Gal S, Damiani C, Rouillé A, Grall A, Tréguer L, Virmaux M, et al. A cluster of *Pneumocystis* infections among renal transplant recipients: molecular evidence of colonized patients as potential infectious sources of *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* avr 2012;54(7):e62-71.
8. Schildgen V, Mai S, Khalfaoui S, Lüsebrink J, Pieper M, Tillmann RL, et al. *Pneumocystis jirovecii* can be productively cultured in differentiated CuFi-8 airway cells. *mBio.* 2014;5(3):e01186-01114.
9. Procop GW, Haddad S, Quinn J, Wilson ML, Henshaw NG, Reller LB, et al. Detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory specimens by four staining methods. *J Clin Microbiol.* juill 2004;42(7):3333-5.
10. Alanio A, Desoubeaux G, Sarfati C, Hamane S, Bergeron A, Azoulay E, et al. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* oct 2011;17(10):1531-7.
11. Flori P, Bellete B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, et al. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J Med Microbiol.* juill 2004;53(Pt 7):603-7.
12. Aslanzadeh J, Stelmach PS. Detection of *Pneumocystis carinii* with direct fluorescence antibody and calcofluor white stain. *Infection.* juin 1996;24(3):248-50.

13. Esteves F, Calé SS, Badura R, de Boer MG, Maltez F, Calderón EJ, et al. Diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*: evaluation of four serologic biomarkers. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* avr 2015;21(4):379.e1-379.e10.
14. Moore HM, Kelly AB, Jewell SD, McShane LM, Clark DP, Greenspan R, et al. Biospecimen reporting for improved study quality (BRISQ). *Cancer Cytopathol.* 25 avr 2011;119(2):92-102.
15. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. *Emerg Infect Dis.* juill 2014;20(7):1149-55.
16. Teles F, Seixas J. The future of novel diagnostics in medical mycology. *J Med Microbiol.* avr 2015;64(Pt 4):315-22.
17. Wachsmuth ED. A comparison of the highly selective fluorescence staining of fungi in tissue sections with Uvitex 2B and Calcofluor White M2R. *Histochem J.* avr 1988;20(4):215-21.
18. Azoulay E, Bergeron A, Chevret S, Bele N, Schlemmer B, Menotti J. Polymerase chain reaction for diagnosing *pneumocystis pneumonia* in non-HIV immunocompromised patients with pulmonary infiltrates. *Chest.* mars 2009;135(3):655-61.
19. Cregan P, Yamamoto A, Lum A, VanDerHeide T, MacDonald M, Pulliam L. Comparison of four methods for rapid detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol.* nov 1990;28(11):2432-6.
20. Samuel CM, Whitelaw A, Corcoran C, Morrow B, Hsiao N-Y, Zampoli M, et al. Improved detection of *Pneumocystis jirovecii* in upper and lower respiratory tract specimens from children with suspected *pneumocystis pneumonia* using real-time PCR: a prospective study. *BMC Infect Dis.* 2011;11:329.
21. Latif AH, Tabassomi F, Abolhassani H, Hammarström L. Molecular diagnosis of primary immunodeficiency diseases in a developing country: Iran as an example. *Expert Rev Clin Immunol.* mars 2014;10(3):385-96.

TABLE AND FIGURE LEGENDS

Table I: Overall characteristics at baseline of the patients with definite diagnosis of PCP infection. Abbreviations: $_{95\%CI}$, 95% confidence interval;; G/L, Giga *per* liter (10^9 cells/L); HIV, human immunodeficiency virus; N, number; SD, standard deviation; $^{\text{¥}}$ no way to attest the correct compliance; $^{\text{✧}}$ associations are possible.

Table II: performance of the four lab methods for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Abbreviations: IFA, Immunofluorescence Assay; MGG, May-Grünwald Giemsa; PCR, Polymerase Chain Reaction, $+\infty$, infinite; $_{95\%CI}$, 95% confidence interval

Figure 1: Examples of positive microscopic observation showing *Pneumocystis jirovecii* cysts in bronchial-alveolar lavage fluids. A – Using calcofluor brightener (Fluorescent Brightener 28®, Sigma, Saint-Louis, MO, USA). Note the specific “coffee-bean” shape of the cyst and sporadic presence of a halo around; B – Using fluorescent monoclonal antibodies (MonoFluo™ *Pneumocystis jirovecii* IFA test kit®, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Table I: Overall characteristics at baseline of the patients with definite diagnosis of PCP infection. Abbreviations: ^{95%}CI, 95% confidence interval;; G/L, Giga *per* liter (10⁹ cells/L); HIV, human immunodeficiency virus; N, number; SD, standard deviation; [¥] no way to attest the correct compliance; [✧] associations are possible.

Population with PCP infection (N=35)	Mean (± SD) or N (%)	^{95%} CI
Age (years)	57.71 (± 17.74)	[51.68 – 63.87]
Gender (male)	20 (57.14%)	[40.75 - 73.54%]
Lymphocyte count (G/L)	0.57 (± 0.42)	[0.42 – 0.71G/L]
- CD ₄ ⁺ T-cell count (G/L)	0.11 (±0.15)	[0.04 – 0.18G/L]
Underlying diseases	35 (100.0%)	[100.0 – 100.0%]
- Solid tumors	7 (20.00%)	[6.75 – 33.25%]
- Haematological malignancies	6 (17.14%)	[4.66 – 29.63%]
- Solid organ transplants	11 (31.43%)	[16.05– 46.81%]
o Kidney transplantation	8 (22.86%)	[8.95 – 36.77%]
o Liver transplantation	2 (5.71%)	[0.00 – 13.40%]
o Heart transplantation	1 (2.86%)	[0.00 – 8.38%]
- HIV	6 (17.14%)	[4.66 – 29.63%]
- Inherited immunodeficiency	1 (2.86%)	[0.00 – 8.38%]
- Miscellaneous other diseases	4 (11.43%)	[0.88 – 21.97%]
Clinical course [✧]	35 (100.00%)	[100.00 – 100.00%]
- Fever (≥38°C)	26 (74.26%)	[54.81 – 88.77%]
- Cough	18 (51.43%)	[34.87 – 67.99%]
- Sputum	6 (17.14%)	[4.66 – 29.63%]
- Dyspnoea	24 (70.59%)	[55.27 – 85.90%]
- Chest pain	3 (8.82%)	[0.00 – 18.34%]
- Asthenia	20 (57.14%)	[40.75 – 73.54%]
- Headaches	1 (2.86%)	[0.00 – 8.38%]
Radiological findings [✧]	33 (94.29%)	[86.60 – 100.00%]
- Interstitial lung disease	23 (67.65%)	[51.92 – 83.37%]
- Alveolar consolidation	10 (29.41%)	[14.10 – 44.73%]
- Micronodules	3 (8.82%)	[0.00 – 18.36%]
Anti- <i>P. jirovecii</i> primary chemoprophylaxis [¥]	11 (31.43%)	[16.05– 46.81%]

Table II: performance of the four lab methods for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Abbreviations: IFA, Immunofluorescence Assay; MGG, May-Grünwald Giemsa; PCR, Polymerase Chain Reaction, $+\infty$, infinite; $_{95\%}\text{CI}$, 95% confidence interval

	0.2% calcofluor brightener	MonoFluo™ <i>Pneumocystis jirovecii</i> IFA test kit®	MGG staining	in-house PCR
Sensitivity $_{95\%}\text{CI}$	74.3% [57.7 - 85.9]	60.0% [43.5 - 74.4]	34.6% [20.8 - 51.0]	82.9% [66.8 - 92.2]
Specificity $_{95\%}\text{CI}$	99.6% [98.2 - 100.0]	99.3% [97.9 - 99.9]	100.0% [98.9 - 100.0]	99.4% [97.0 - 99.4]
Predictive positive value $_{95\%}\text{CI}$	92.9% [83.3 - 100.0]	87.5% [74.3 - 100.0]	100.0% [100.0 - 100.0]	82.9% [70.4 - 95.3]
Predictive negative value $_{95\%}\text{CI}$	98.0% [96.7 - 99.3]	96.9% [95.4 - 98.5]	95.1% [93.1 - 97.1]	98.7% [97.6 - 99.7]
Positive likelihood ratio $_{95\%}\text{CI}$	165.6 [41.0 - 669.4]	89.2 [28.0 - 284.5]	$+\infty$ [$+\infty$ [61.6 [27.4 - 138.3]
Negative likelihood ratio $_{95\%}\text{CI}$	0.3 [0.1 - 0.5]	0.4 [0.3 - 0.6]	0.7 [0.5 - 0.8]	0.2 [0.1 - 0.4]

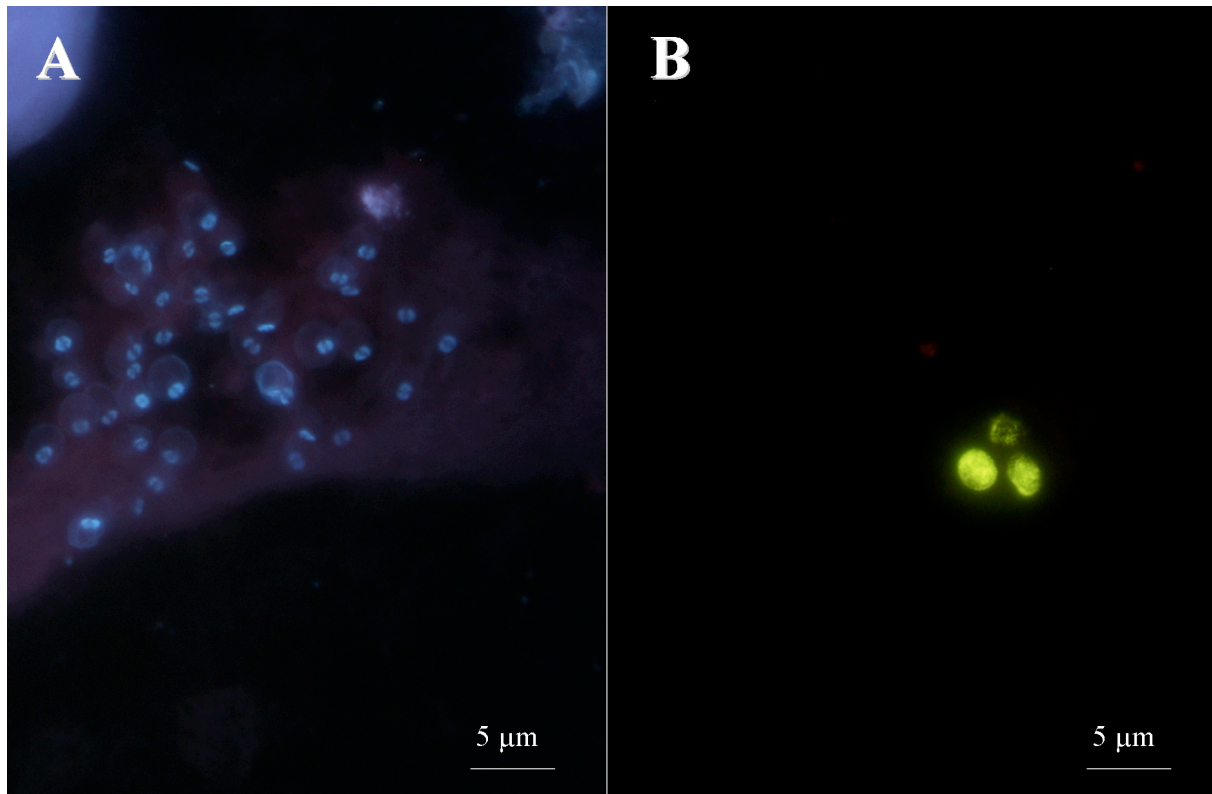


Figure 1: Examples of positive microscopic observation showing *Pneumocystis jirovecii* cysts in bronchial-alveolar lavage fluids

A – Using calcofluor brightener (Fluorescent Brightener 28®, Sigma, Saint-Louis, MO, USA). Note the specific “coffee-bean” shape of the cyst and sporadic presence of a halo around; B – Using fluorescent monoclonal antibodies (MonoFluo™ *Pneumocystis jirovecii* IFA test kit®, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

DISCUSSION ET CONCLUSION

La pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* est une infection fongique invasive avec des complications sévères dans certains cas (Nevez *et al.* 2008 ; Thomas *and* Limper 2007). L'issue peut être fatale et les taux de mortalité sont estimés à 20 % (Bitar *et al.* 2014).

Un diagnostic biologique rapide et précis est donc espéré par le clinicien afin de confirmer l'hypothèse clinique de PCP et mettre en place un traitement adéquat dans les meilleurs délais.

Les agents fluorescents tels que le calcofluor ont été largement décrits et utilisés depuis longtemps pour détecter microscopiquement les levures et les champignons filamenteux à partir des prélèvements cliniques (Baselski *and* Robison 1989 ; Milligan 1992 ; Wachsmuth 1988). Depuis le changement de taxonomie de *Pneumocystis jirovecii* et son appartenance dans le règne des *Fungi*, il apparaît alors logique que celui-ci soit détectable par des agents fluorescents. Malgré tout, peu de travaux approfondis ont étudié leurs utilités et leurs performances pour le diagnostic de PCP dans les LBA (Procop *et al.* 2009).

Nous avons donc décidé d'évaluer prospectivement sur une période de trois ans, la performance d'une technique de détection directe « maison » basée sur le principe de fluorescence du calcofluor. Bien que notre étude fut monocentrique, près de 500 LBA ont été analysés. Notre méthodologie semble robuste puisque tous les LBA recueillis dans l'activité de routine ont été systématiquement analysés. De façon pertinente, la technique de calcofluor bleu a été comparée à un kit commercial basé sur le principe d'immunofluorescence directe en suivant strictement les mêmes étapes de prétraitement des échantillons. En complément, une coloration MGG et une PCR temps réel quantitative (PCRq) ont été systématiquement réalisées afin de confirmer ou infirmer le diagnostic en confrontation aux éléments clinico-radiologiques.

Finalement, la détection de *Pj* par le calcofluor présentait de nombreux avantages. Tout d'abord, la mise en œuvre de la technique ainsi que la lecture de lame était relativement simple, moyennant un temps nécessaire de 40 minutes seulement. En effet, les formes

kystiques de *Pj* sont aisément reconnues morphologiquement et se distinguent parfaitement les unes des autres, ce qui permet un comptage précis. La fluorescence artéfactuelle observée sur les préparations est minimale, ce qui ne gêne pas la lecture des microbiologistes, même les moins expérimentés.

Compte tenu de ces arguments, l'observation d'un seul kyste s'avère suffisante pour considérer un échantillon positif, contrairement à la technique d'immunofluorescence directe où le résultat est équivoque. Bien que la concordance entre le test d'immunofluorescence et le calcofluor soit élevée, il convient de noter qu'un grand nombre de kystes de *Pj* a été détecté par le calcofluor. Cette constatation semble particulièrement importante en cas de charge fongique faible, notamment chez les patients non VIH représentant une proportion importante des cas de PCP. Dans notre étude, plus de 80 % des cas de PCP concernaient des patients non VIH et près de 30 % étaient des transplantés rénaux.

Grâce à son affinité pour la chitine, le calcofluor présente l'avantage de détecter de façon concomitante d'autres champignons (filaments aspergillaires, levures...), ce qui n'est pas envisageable avec la technique d'immunofluorescence.

Un autre argument en faveur de l'utilisation du calcofluor est le rapport coût-efficacité très faible : 5 grammes de poudre revenant à 242 € pour de calcofluor permettent théoriquement une utilisation pendant plusieurs années, tandis que 24 tests de MONOFLUO™ *Pneumocystis jirovecii* IFA Test Kit ® coûtent 520 €.

En comparaison avec les autres techniques, le calcofluor était significativement plus sensible que la coloration MGG même si cette dernière permet aussi la détection des trophozoïtes. Cependant, le calcofluor n'était pas significativement inférieur à la PCRq.

Dans l'étude, nous avons distingué quatre LBA positifs avec la technique de calcofluor et s'avérant être des cas de PCP prouvés. Pourtant, la PCRq n'avait pas confirmé le diagnostic : en effet, une PCRq était inhibée, et les trois autres négatives correspondaient à des patients déjà traités par triméthoprime-sulfaméthoxazole au cours de la fibroscopie. Nous avons émis l'hypothèse que les traitements à visée anti-*Pneumocystis jirovecii* inhibent rapidement la PCRq alors que le calcofluor permet encore de visualiser les kystes. En se fixant à la paroi, le calcofluor révèle les kystes quelque soit le stade de viabilité du champignon.

Compte tenu de nos résultats, nous avons ajusté notre stratégie concernant le diagnostic biologique de PCP. En cas de forte probabilité d'infection de PCP, nous avons choisi de combiner, en première intention, deux techniques de microscopie directe :

- une coloration MGG, s'insérant dans une démarche microbiologique plus élargie (permettant de visualiser les tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*) (Desoubieux *et al.* 2015)
- une coloration de fluorescence directe, le calcofluor.

La technique d'immunofluorescence par MONOFLUO™ *Pneumocystis jirovecii* IFA Test Kit® n'est plus utilisée dans notre laboratoire, puisqu'elle a été substituée par le calcofluor.

La PCRq intervient alors en seconde intention dans des situations plus complexes en discussion avec le clinicien, ou par exemple, en cas de mauvaise qualité du prélèvement.

Dans les perspectives à venir, des études pourraient s'intéresser à des prélèvements respiratoires moins invasifs tels que les expectorations induites (Samuel *et al.* 2011) afin d'évaluer la performance du calcofluor. Selon notre expérience, à ce jour, seuls les LBA semblent suffisamment fiables pour l'utilisation du calcofluor.

Enfin, selon nos conclusions, la technique de fluorescence par calcofluor en première intention pour le diagnostic de PCP serait la technique la plus rapide et la moins coûteuse. Par ailleurs, cette technique pourrait être facilement disponible dans tous les laboratoires de biologie médicale y compris dans ceux des pays en voie de développement aux ressources techniques limitées (Latif *et al.* 2014).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adler D, Chenivresse C, Similowski T, Soccal PM. *Pneumocystose chez le patient immunosupprimé non VIH*. Rev Med Suisse. 2008 ; 4 : 2525-30.

Alanio A, Desoubreaux G, Sarfati C, Hamane S, Bergeron A *et al*. *Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients*. Clin Microbiol Infect. 2011 ; 17 : 1531-1537.

Aliouat-Denis CM, Chabé M, Demanche C, Aliouat EM, Viscogliosi *et al*. **Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power*. Infect Genet Evol. 2008 ; 8 : 708-726.

Aliouat-Denis CM, Martinez M, Aliouat EM, Pottier M, Gantois *et al*. *The *Pneumocystis* life cycle*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 ; 104 : 419-426.

Aliouat EM, Mazars E, Dei-Cas E, Delcourt P, Billaut P *et al*. **Pneumocystis* cross infection experiments using SCID mice and nude rats as recipient host, showed strong host-species specificity*. J Eukaryot Microbiol. 1994 ; 41(5) : 71S.

Al Soub H, Taha RY, El Deeb Y, Almaslamani M *and* Al Khuwaiter, JY. **Pneumocystis carinii* Pneumonia in a Patient without a Predisposing Illness : Case Report and Review*. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 2004 ; 36 : 618-621.

Ammich O. *Über die nichtsyphilitische interstitielle pneumoniae des ersten kindersalters*. Virchows Arch Pathol Anat. 1938 ; 302 : 539-554.

Atzori C, Aliouat EM, Bartlett MS, Dujardin L, Cargnel A *et al*. *Current in vitro culture systems for *Pneumocystis**. FEMS Immunol Med Microbiol. 1998 ; 22 : 169-172.

Azoulay E, Bergeron A, Chevret S, Bele N, Schlemmer B, Menotti J. *Polymerase chain reaction for diagnosing pneumocystis pneumonia in non-HIV immunocompromised patients with pulmonary infiltrates.* Chest. 2009 ; 135 : 655–61.

Bartlett MS, Vermund SH, Jacobs R, Durant PJ, Shaw MM *et al.* *Detection of Pneumocystis carinii DNA in air samples: likely environmental risk to susceptible persons.* J Clin Microbiol. 1997 ; 35 : 2511-2513.

Baselski, VS, Robison, MK. *A staining kit for detection of opportunistic pathogens in bronchoalveolar lavage specimens.* Am. Clin. Lab. 1989; 8: 36–37.

Beck JM and Cushion MT. *Pneumocystis Workshop: 10th Anniversary Summary.* Eukaryotic Cell. 2009 ; 8(4) : 446–460.

Berrington J, Flood T, Abinun M, Galloway A and Cant A. *Unsuspected Pneumocystis carinii pneumonia at presentation of severe primary immunodeficiency.* Archives of Disease in Childhood. 2000 ; 82(2) :144–147.

Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, *et al.* *Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010.* Emerg Infect Dis. Juill 2014 ; 20(7) : 1149–55.

Bollée G, Sarfati C, Thiery G, *et al.* *Clinical picture of Pneumocystis jirovecipneumonia in cancer patients.* Chest. 2007 ; 132(4) :1 305-10.

Calderón JE, Gutiérrez-Rivero S, Durand-Joly I, Dei-Cas E. *Pneumocystis infection in humans : diagnosis and treatment.* Expert Review of Anti-infective Therapy. 2010 ; 8 (6).

Carini A. *Formas de eschizogonia do Trypanosoma lewisi.* Bol Soc Med Cir São Paulo.1910 ; 18: 204.

Cazein F, Pillonel J, Le Strat Y, Pinget R, Le Vu S, Brunet S, et al. Découvertes de séropositivité VIH et de sida, France, 2003-2013. Bull Épidémiol Hebd. 2015 ; (9-10) : 152-61.

Centers for Disease Control. *Pneumocystis pneumonia*. Los Angeles MMWR. 1981 ; 30 :250-52.

Chabé M, Nevez G, Totet A, Fréalle E, Delhaes L, Aliouat EM, Dei-Cas E. *Pneumocystis transmission*. Journal of Medical Mycology. 2009 ; 29(4) : 276-84.

Chagas C. *New type of human trypanosomiasis*. Bull Soc Pathol Exot. 1909 ; 102 : 352-355.

Chalvardjian AM and Grawe LA. *A new procedure for the identification of Pneumocystis carinii cysts in tissue sections and smears*. Journal of Clinical Pathology. 1963 ; 16(4) : 383–384.

Chew LC, Maceda-Galang LM, Tan YK, Chakraborty B, Thumboo J. *Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with autoimmune disease on high-dose glucocorticoid*. J Clin Rheumatol. 2015 Mar ; 21(2) :72-5.

Choukri F, Menotti J, Sarfati JC, Lucet C, Nevez G et al. *Quantification and spread of Pneumocystis jirovecii in the surrounding air of patients with Pneumocystis pneumonia*. Clin Infect Dis. 2010 ; 51 : 259-265.

Criton C. *Sida et maladie opportuniste : intérêt du 1,3-beta-D-glucane pour le diagnostic de pneumocystose pulmonaire chez le patient VIH*. SidaSciences.Inist. 21 février 2012 ;disponible sur : <http://sidasciences.inist.fr/?Sida-et-maladie-opportuniste>

Cushion MT. *Pneumocystis: unraveling the cloak of obscurity*. Trends Microbiol : 2004 ; 12 :2 43–249.

De Boer MG, Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Gaasbeek A, Berger SP, Gelinck LB et al. *An outbreak of Pneumocystis jirovecii pneumonia with 1 predominant genotype among*

renal transplant recipients: interhuman transmission or a common environmental source? Clin Infect Dis. 2007 ; 44: 1143-1149.

Desoubeaux G, Cabanne É, Franck-Martel C, Gombert M, Gyan E, Lissandre S, Renaud M, Monjanel H, Dartigeas C, Bailly É, Van Langendonck N, Chandenier J. *Pulmonary toxoplasmosis in immunocompromised patients with interstitial pneumonia: a single-centre prospective study assessing PCR-based diagnosis* . J Clin Pathol. 2016 Jan 4.

De Souza W, Benchimol M. *Basic biology of Pneumocystis carinii: a mini review*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005 ; 100 : 903–908.

Damiani C, Choukri F, Le Gal S, Menotti J, Sarfati C, Nevez G *et al*. *Possible Nosocomial Transmission of Pneumocystis jirovecii*. Emerging Infectious Diseases. 2012 ; 18(5) : 877–878.

Damiani C, Le Gal S, Da Costa C, Virmaux M, Nevez G, Totet A. *Combined quantification of pulmonary Pneumocystis jirovecii DNA and serum (1- 3)- β -D-glucan for differential diagnosis of pneumocystis pneumonia and Pneumocystis colonization*. J Clin Microbiol. 2013 ; 51 : 3380-3388.

Darken M. *Applications of Fluorescent Brighteners in Biological Techniques*. Science. 1961 ; 133 : 1704-1705.

De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards, JE, Calandra T *et al*. *Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group*. Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America. 2008 ; 46(12) : 1813–1821.

Dumoulin A, Mazars E, Seguy N, Gargallo-Viola D, Vargas S *et al*. *Transmission of Pneumocystis carinii disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000 ; 19 : 671-678.

Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi D, Elwood HJ, Sogin M. *Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi*. Nature. 1988 ; 334 : 519-22.

Gigliotti FA, Harmsen G, Haidaris CG and Haidaris P J. **Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species*. Infect Immun. 1993 ; 61 : 2886-2890.

Godeau B, Coutant-Perronne V, Le Thi Huong D, et al. **Pneumocystis carinii* pneumonia in the course of connective tissue disease: report of 34 cases*. J Rheumatol. 1994 ; 21(2) : 246-51.

Gordon SM, La Rosa SP, Kalmadi S, et al. *Should prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in solid organ transplant recipients ever be discontinued?* Clin Infect Dis. 1999 ; 28(2) : 240-6.

Grocott G. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's Methenamine silver nitrate technique. Am J Clin Pathol. 1955 ; 25 : 975-979.

Hageage GJ, Harrington BJ. *Use of calcofluor white in clinical mycology*. Lab. Med. 1984; 15: 109-112.

Harrington BJ. *Staining of Cysts of *Pneumocystis jirovecii* (*P. carinii*) With the Fluorescent Brighteners Calcofluor White and Uvitex 2B: A Review* Lab Med. 2008 ; 39 (12) : 731-735.

Hocker B, Wendt C, Nahimana A, Tonshoff B and Hauser PM. *Molecular evidence of *Pneumocystis* transmission in pediatric transplant unit*. Emerg Infect Dis. 2005 ; 11 : 330-332.

Huang L, Morris A, Limper AH, Beck JM. *An official ATS workshop summary: recent advances and future directions in *Pneumocystis* pneumonia*. Proc Am Thorac Soc. 2006 ; 3 : 655-64.

Hughes WT. *Current issues in the epidemiology, transmission, and reactivation of *Pneumocystis carinii**. Semin Respir Infect. 1998 ; 13 : 283-8.

Hughes WT, Kuhn S, Chaudhary S, *et al*. *Successful chemoprophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonitis*. N Engl JMed. 1977 ; 297 : 1419–1426.

Igor V. Kutyavin, Irina A. Afonina, Alan Mills, Vladimir V. Gorn, Eugeny A. Lukhtanov, Evgeniy S. Belousov, Michael J. Singer, David K. Walburger, Sergey G. Lokhov, Alexander A. Gall, Robert Dempcy, Michael W. Reed, Rich B. Meyer, and Joe Hedgpeth. *Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures*. Nucleic Acids Res. 2000 ; 28(2): 655–661.

Iriart X, Challan Belval T, Fillaux J, Esposito L, Lavergne RA, Cardeau-Desangles I, Roques O, Del Bello A, Cointault O, Lavayssière L, Chauvin P, Menard S, Magnaval JF, Cassaing S, Rostaing L, Kamar N, and Berry A. *Risk Factors of *Pneumocystis* Pneumonia in Solid Organ Recipients in the Era of the Common Use of Posttransplantation Prophylaxis*. American Journal of Transplantation. 2015 ; 15 : 190–199.

Juliano JJ, Barnett E, Parobek C, Taylor SM, Meshnick SR, Stone S, Chang E, Fong S and Huang L. *Use of Oropharyngeal Washes to Diagnose and Genotype *Pneumocystis jirovecii**. Open Forum Infectious Diseases. 2015 ; 2(3).

Kaneshiro ES, Collins MS, Cushion MT. *Inhibitors of sterol biosynthesis and amphotericin B reduce the viability of *Pneumocystis carinii* f.sp. *carinii**. Antimicrob Agents Chemother. 2000 ; 44 : 1630–1638.

Kaplan JE, Hanson DL, Jones JL, Dworkin MS. *Adult and Adolescent Spectrum of HIV Disease Project Investigators. Viral load as an independent risk factor for opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents*. AIDS. 2001 ; 15 : 1831–6.

Kobayashi J, Kitamura S. KL-6: a serum marker for interstitial pneumonia. Chest. 1995 Aug ; 108(2) : 311-5.

Komano Y, Harigai M, Koike R, *et al*. *Pneumocystis jirovecipneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab: a retrospective review and case-control study of 21 patients*. Arthritis Rheum. 2009 ; 61(3) : 305-12.

Kovacs JA, Ng VL, Masur H, *et al*. *Diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies*. N Engl J Med. 1988 ; 318(10) :589-93.

Lacombe C, Lewin M, Monnier-Cholley L, Pacanowski J, Poirot JL, Arrivé L, Tubiana JM. *Imagerie des pathologies thoraciques chez le patient VIH au stade sida*. Journal de radiologie. 2007 ; 88(9) : 1145-1154.

Larsen HH, Huang L, Kovacs JA, *et al*. *A prospective, blinded study of quantitative touch-down polymerase chain reaction using oral-wash samples for diagnosis of pneumocystis pneumonia in HIV-infected patients*. J Infect Dis. 2004 ; 189(9):1679-83.

Latif AH, Tabassomi F, Abolhassani H, Hammarström L. *Molecular diagnosis of primary immunodeficiency diseases in a developing country: Iran as an example*. Expert Rev Clin Immunol. mars 2014 ; 10(3): 385-96.

Louis M, Guitard J, Jodar M, Ancelle T, Magne D, Lascols O, Hennequin C. *Impact of HIV Infection Status on Interpretation of Quantitative PCR for Detection of Pneumocystis jirovecii*. J Clin Microbiol. December 2015 ; 53 : 12 3870-3875.

Marchiori E, Muller NL, Soares Souza A Jr, Escuissato DL, Gasparetto EL, Franquet T. *Pulmonary disease in patients with AIDS: High-resolution CT and pathologic findings*. AJR Am J Roentgenol. 2005 ; 184 : 757-64.

Martinez A, Aliouat EM, Standaert-Vitse A, Werkmeister E, Pottier M *et al*. *Ploidy of cell-sorted trophic and cystic forms of Pneumocystis carinii*. PLoS One. 2011 ; 6: e20935.

Matsumoto Y, Matsuda S, Tegoshi T. *Yeast glucan in the cyst wall of Pneumocystis carinii*. J Protozool. 1989 ; 36 : 21-2.

Mazars E, Odberg-Ferragut C, Dei-Cas E, Fourmaux MN, Aliouat EM *et al*. *Polymorphism of the thymidylate synthase gene of Pneumocystis carinii from different host species*. J Eukaryot Microbiol. 1995 ; 42 : 26-32.

Mekinian A, Queyrel V, Durand-Joly I *et al*. *PCR Pneumocystis jirovecii positive chez les patients atteints de maladie auto-immune: Pneumocystose pulmonaire ou simple colonisation?* Rev Med Interne. 2010 ; 31: 194-199.

Milligan, T. *Cellufluor staining of bronchoalveolar lavage samples*. J Clin Microbiol. 1992 ; 30:754.

Morris A, Beard CB, Huang L. *Update on the epidemiology and transmission of Pneumocystis carinii*. Microbes Infect. 2002 ; 4 :95-103.

Morris A, Wei K, Afshar K *et al*. *Epidemiology and clinical significance of Pneumocystis colonization*. J Infect Dis. 2008 ; 197 : 10-17.

Musto L, Flanigan M, and Elbadawri A. *Ten minute silver stain for Pneumocystis Carinii and fungi in tissue sections*.Arch Pathol Lab Med. 1982 ; 106:292-294.

Nankivell BJ, Firacative C, Kable K, Chen S CA, and Meyer W. *Molecular Epidemiology Linking Multihospital Clusters of Opportunistic Pneumocystis jirovecii Pneumonia*. Clin Infect Dis. 2013 ; 57 (7) : 1058-1059.

Nejmi H, Ziati J, Tijani A, Charaf K, Eladib AR, Younous S, Samkaoui MA and Zougari L. *Pneumopathie à Pneumocystis jiroveci chez une patiente immunocompétente*. Médecine et maladies infectieuses. 2010 ; 40, 241-242.

Nevez G, Chabé M, Rabodonirina M, Virmaux M, Dei-Cas E, Hauser PM, *et al*. *Nosocomial Pneumocystis jirovecii infections*. Parasite Paris Fr. sept 2008; 15(3): 359-65.

Ng V L, Yajko DM, and Hadley WK. *Extrapulmonary pneumocystosis*. Clinical Microbiology Reviews. 1997 ; 10(3), 401–418.

Pagano L, Caira M, Fianchi L. *Pulmonary fungal infection with yeasts and pneumocystis in patients with hematological malignancy*. Ann Med. 2005 ; 37(4):259-69.

Poulsen A, Demeny AK, Bang Plum C, et al. *Pneumocystis carinii pneumonia during maintenance treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia*. Med Pediatr Oncol. 2001; 37:20–23.

Pontier S, Bussato F, Daste G, Gesnestal M, Recco P, Nevez G, Escamilla R. *Pneumocystose à forme granulomateuse*. Revue des Maladies Respiratoires. 2004 ; 21 (5) : 989-92.

Pifer LL, Hughes WT, Murphy MJ Jr. *Propagation of Pneumocystis carinii in vitro*. Pediatr Res. 1977 Apr ; 11(4):305–316.

Pixley FJ, Wakefield AE, Banerji S and Hopkin JM. *Mitochondrial gene sequences show fungal homology for Pneumocystis carinii*. Mol Microbiol. 1991 ; 5 : 1347-1351.

Procop GW, Haddad S, Quinn J, Wilson ML, Henshaw NG, Reller LB, et al. *Detection of Pneumocystis jiroveci in respiratory specimens by four staining methods*. J Clin Microbiol. juill 2004; 42(7): 3333-5.

Radisic M, Lattes R, Chapman JF, Del Carmen Rial M, Guardia O, Seu F, Gutierrez P, Goldberg J and Casadei DH. *Risk factors for Pneumocystis carinii pneumonia in kidney transplant recipients: a case-control study*. Transplant Infectious Disease. 2003 ; 5: 84–93.

Riel AM, Rakotoarivony ST, Fenomanana J, Raherimalala A , Raharimanana RN and Andrianjatovo JJ . *Une observation d'une pneumopathie sévère à Pneumocystis jiroveci chez un sujet immunocompétent*. Revue d'anesthésie réanimation. 2009 ; 1 : 11-13.

Roux A, Canet E, Valade S, Gangneux-Robert F, Hamane S, Lafabrie A *et al.* *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Patients with or without AIDS, France. Emerging Infectious Diseases. 2014 ; 20(9) ; 1490–1497.

Roux A, Lemiale V, Kouatchet A, Vincent F, Bollé G Roux P and Azoulay E. *Pneumocystose pulmonaire en dehors de l'infection à VIH*. Réanimation. 2010 ; 19 : 327-338.

Ruffolo JJ. *Pneumocystis carinii* Cell Structure. In: Walzer, PD, editor. *Pneumocystis carinii* Pneumonia. 2nd ed. Marcel Dekker. 1994 ; 25-43.

Samuel CM, Whitelaw A, Corcoran C, Morrow B, Hsiao N-Y, Zampoli M, *et al.* *Improved detection of Pneumocystis jirovecii in upper and lower respiratory tract specimens from children with suspected pneumocystis pneumonia using real-time PCR: a prospective study*. BMC Infect Dis. 2011; 11 : 329.

Sassi M, Ripamonti C, Mueller NJ, Yazaki H, Kutty G *et al.* *Outbreaks of Pneumocystis Pneumonia in 2 Renal Transplant Centers Linked to a Single Strain of Pneumocystis: Implications for Transmission and Virulence*. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012 ; 54(10) : 1437–1444.

Sasso M, Chastang-Dumas E, Bastide S, Alonso S, Lechiche C, Bourgeois N, Lachaud L. *Performances of four real-time PCR assays for diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia*. J Clin Microbiol. 2016 ; 54 : 625–630.

Schliep TC, Yarrish RL. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Semin Respir Infect. 1999 ; 14 : 333-343.

Sing A, Trebesius K, Roggenkamp A, *et al.* *Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for Pneumocystis carinii in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups*. J Clin Microbiol. 2000 ; 38(4) : 1461-7.

Skelly MJ, Hoffman J, Fabbri M, Holzman RS, Clarkson AB Jr, Merali S. *S-adenosylmethionine concentrations in diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia.* Lancet. 2003 ; 361 : 1267-1268.

Skelly MJ, Holzman RS, Merali S. *S-adenosylmethionine levels in the diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia in patients with HIV infection.* Clin Infect Dis. 2008 ; 46 : 467-471.

Spencer H. *Opportunistic Infections. Pneumocystis Infection.* Proc R Soc Med. 1965 ; 58 : 349-350.

Stringer JR, Beard CB, Miller RF and Wakefield AE. *A new name (Pneumocystis jiroveci) for Pneumocystis from humans.* Emerg Infect Dis. 2002 ; 8 : 891-896.

Stringer SL, Stringer JR, Blase MA, Walzer PD and Cushion MT ; *Pneumocystis carinii: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi.* Exp Parasitol. 1989 ; 68 : 450-461.

Stringer JR, Walzer PD. *Molecular biology and epidemiology of Pneumocystis carinii infection in AIDS.* AIDS .1996 ; 10 : 561-71.

Tapparel L, Petignat PA, Praz G. *Diagnostic de la pneumonie à Pneumocystis jirovecii chez le patient non VIH.* Rev Med Suisse. 2010; 1922-1925.

Thomas CF Jr, Limper AH. *Pneumocystis pneumonia.* N Engl J Med. 2004 ; 350:2487-98.

Thomas CF, Limper AH. *Current insights into the biology and pathogenesis of Pneumocystis pneumonia.* Nat Rev Microbiol. avr 2007; 5(4): 298-308.

Tissot V, Michelot A, Le Calloch R, Treguer L *et al. Dossiers de Pneumocystose chez patients sous immunosuppresseurs ;*
disponible sur : <http://pe.sfrnet.org/Data/ModuleConsultationPoster/pdf/2011/1/c4ec7192-d8d5-407e-b9a1-4ce1a634218a.pdf>

Valdebenito, Carlos, Bonacic, Macarena, Matamala, Jennifer, and Wolff, Marcelo. *Extrapulmonary pneumocystosis: a case report*. Revista chilena de infectología. 2015 ; 32(3) : 344-349.

Vanek J and Jirovec O. Parasitic pneumonia. *Interstitial plasma cell pneumonia of premature, caused by pneumocystis Carinii*. Zentralbl Bakteriologie Parasitenkd Infektionskr Hyg. 1952 ; 158 : 120-127.

Vargas SL, Hugues WT, Santolaya ME, Ulloa AV, Ponce CA *et al*. *Search for primary infection by Pneumocystis carinii in a cohort of normal, healthy infants*. Clin Infect Dis. 2001 ; 32 : 855-861.

Vedy S, Ragot C, Robet Y, Puyhardy JM. *Pneumocystis jiroveci : mise à jour épidémiologique, physiopathologique et biologique*. Annales de Biologie Clinique. 2009 ; 67 (4) : 369-379.

Wachsmuth ED. *A comparison of the highly selective fluorescence staining of fungi in tissue sections with Uvitex 2B and Calcofluor White M2R*. Histochem J. avr 1988 ; 0(4): 215-21.

Walker J, Conner G, Ho J, Hunt C, and Pickering L. *Giemsa staining for cysts and trophozoites of Pneumocystis carinii*. Journal of Clinical Pathology. 1989 ; 42(4) : 432-434.

Wakefield AE, Guiver L, Miller RF, *et al*. *DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia*. Lancet. 1991; 337(8754) : 1378-9.

Wakefield AE, Miller RF, Guiver LA, Hopkin JM. *Granulomatous Pneumocystis Carinii pneumonia : DNA amplification studies on bronchoscopic alveolar lavage samples*. J Clin Pathol. 1994 ; 47 : 664-6.

Wood BR, Komarow L, Zolopa AR, Finkelman MA, Powderly WG and Sax PE. *Test Performance of Blood Beta-Glucan for Pneumocystis Jirovecii Pneumonia in Patients with AIDS and Respiratory Symptoms*. AIDS. 2013 ; 27(6), 967–972.

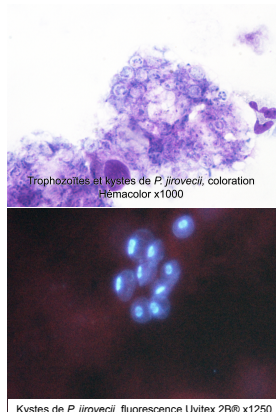
TRAVAUX ANNEXES EN LIEN AVEC *PNEUMOCYSTIS JIROVECHII*

Extraction d'ADN de *Pneumocystis jirovecii* à l'aide de la trousse MycoGENIE® *Aspergillus fumigatus* DNA extraction (Ademtech)

Eric BAILLY¹, Elodie DEBIEU¹, Claire FRANCK-MARTEL¹, Guillaume DESOUBEAUX^{1,2}, Jacques CHANDENIER^{1,2}

¹ Service de Parasitologie-Mycologie-Médecine tropicale, CHRU de Tours

² CEPR, Inserm U1100, équipe 3, Université François-Rabelais de Tours



Introduction:

Le diagnostic biologique de la pneumocystose est souvent perçu par le clinicien comme un diagnostic d'urgence devant l'hypoxie et l'insuffisance respiratoire de patients toujours immunodéprimés.

Schématiquement, il est basé sur deux approches :

- Un diagnostic présomptif négatif = absence de bêta-D-glucane sérique ;
- Un diagnostic de certitude = présence de l'agent infectieux, *Pneumocystis jirovecii*, prouvée par des méthodes microscopiques (coloration MGG, imprégnation argentique, fluorescence directe, fluorescence indirecte) ou par PCR, à partir de prélèvements respiratoires.

Au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Tours, nous avons basé notre stratégie diagnostique sur une méthode rapide, performante et peu coûteuse de fluorescence directe par UVITEX 2B®, associée à une coloration de type MGG rapide (Hemacolor®). Limités par des contraintes logistiques, nous ne réalisons le diagnostic moléculaire qu'au cas par cas.

Dans le souci constant d'améliorer le service rendu (fiabilité du résultat, temps de réponse, coût de l'opération), nous avons évalué l'intérêt d'une nouvelle méthode d'extraction d'ADN de *P. jirovecii*, à partir d'un kit normalement dévolu au diagnostic d'aspergillose et basé sur l'usage de microbilles aimantées : **MycoGENIE® *Aspergillus fumigatus* DNA extraction (Ademtech)**.

Après vérification préliminaire de la compatibilité de la trousse pour la technique de PCR en temps réel utilisée au CHU de Tours, nous avons comparé, à large échelle, le rendement du kit **MycoGENIE® *Aspergillus fumigatus* DNA extraction (Ademtech)** par rapport aux colonnes **Qiagen® DNA mini kit (Qiagen)**, classiquement utilisées dans ce contexte.

Matériel et Méthode:

Etude rétrospective [Janvier 2014-Janvier 2015]

39 liquides de lavage bronchiolo-alvéolaire (LBA) de patients immunodéprimés. (congelés à -20°C).

- 19 positifs (Uvitex 2B® + (± MGG +))
- 20 négatifs (Uvitex 2B® - et MGG -)

Deux extractions en parallèle

- avec le kit DNA Mini kit® (Qiagen) selon Alanio, Desoubeaux et al¹,
- avec la trousse MycoGENIE® *Aspergillus fumigatus* DNA extraction (Ademtech) selon les recommandations du fabricant

Ci-dessous sont présentées les séquences des différentes étapes d'extraction menées pour chaque méthode, ainsi que le déroulement chronologique.

Extraction par colonnes (Qiagen)

- 200 µL d'échantillon + Lyticase
Bain Marie 30 min, 37°C
- 180 µL tampon ATL + Proteinase K
Bain Marie 20 min, 56°C
- 200 µL tampon AL
Bain Marie 10 min, 70°C

Extraction par microbilles (Ademtech)

- 200 µL d'échantillon
400 µL tampon de capture
385 µL d'éthanol absolu
15 µL de microbilles
- Mélanger, laisser reposer 5 min à T° ambiante
- Aimer les billes 2 min (aimant Adem-mag MODULO)
- Retirer le surnageant

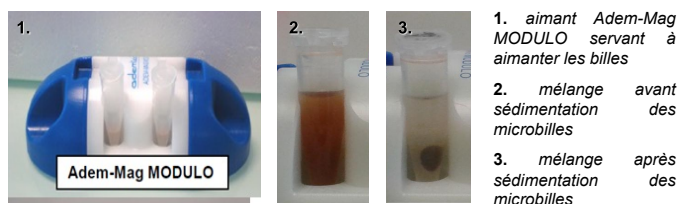
- 200 µL d'éthanol absolu
Transférer dans une colonne
Centrifuger 1 min, 10 000 trs
- 500 µL tampon AW1
Centrifuger 1 min, 10 000 trs
- 500 µL tampon AW2
Centrifuger 1 min, 10 000 trs

- 800 µL de tampon LB Washing Buffer
Mélanger, aimer les billes 2 min
Retirer le surnageant
- 800 µL de tampon Washing Buller II
Mélanger, aimer les billes 2 min
Retirer le surnageant
- 800 µL d'éthanol à 70%
Mélanger, aimer les billes 2 min
Retirer le surnageant
- Laisser sécher le culot,

- 200 µL tampon AE
- Laisser reposer à T° ambiante
- Centrifuger 5 min, 10 000 trs
Eluat = Extrait d'ADN

- 60 µL tampon élution, mélanger
Bain marie 5 min, 50°C
- Aimer 2 min
Surnageant = Extrait d'ADN

Amplification moléculaire menée en parallèle pour les deux extraits d'ADN d'un même échantillon sur Light Cycler 480 II (Roche), selon Alanio, Desoubeaux et al¹



Résultats:

Extraction plus rapide avec le kit MycoGENIE® *Aspergillus fumigatus* DNA extraction (Ademtech) (au total : 90 min versus 150 min pour une série de 6 à 7 échantillons)

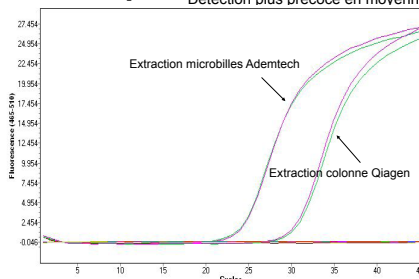
- moins d'étapes (5 versus 7)
- moins de matériel (absence de centrifugation, une seule étape de bain-marie versus trois)
- moins de réactifs additionnels (absence de lyticase, pas de protéinase K)

Amplification qualitative comparable pour les deux kits

- tous les échantillons positifs en Uvitex 2B® sont positifs en PCR quelque soit la méthode d'extraction : 16 d'emblée, et 3 après dilution car primitivement inhibés avec les deux méthodes d'extraction ;
- 16 échantillons Uvitex 2B® - ont été confirmés négatifs en PCR quelque soit la méthode d'extraction ;
- 4 échantillons Uvitex 2B® - sont sortis PCR + avec les deux techniques, (dont trois avec un Cq élevé à 40 d'interprétation difficile).

Amplification quantitative meilleure avec le kit MycoGENIE® *Aspergillus fumigatus* DNA extraction (Ademtech)

- Détection plus précoce en moyenne de 3,4 cycles [0 - 7] (médiane = 3)



Exemple de courbes d'amplification: l'extrait obtenu avec la trousse MycoGENIE[®] est détecté après 24 cycles, celui obtenu à l'aide d'une colonne Qiagen après 30 cycles.

Conclusion :

La trousse d'extraction d'ADN fongique **MycoGENIE® *Aspergillus fumigatus* DNA extraction (Ademtech)**

est qualitativement aussi efficace que la méthode sur colonnes Qiagen pour l'extraction d'ADN de *P. jirovecii* dans les LBA ;

permet d'obtenir un résultat quantitatif meilleur en termes de nombre de Cq ;

présente une grande facilité de mise en œuvre, intéressante dans le cadre d'un diagnostic d'urgence unitaire ou d'une petite série, et est automatisable.

Molecular epidemiological investigation of clustered *Pneumocystis jirovecii* pneumonias in four liver transplant patients

Éric BAILLY^{1*}, Manon DOMINIQUE¹, Rose-Anne THEPAULT², Claire FRANCK-MARTEL¹, Florent MORIO^{3,4}, Jacques CHANDENIER^{1,5}, Guillaume DESOUBEAUX^{1,5}

1- CHU de Tours, Service de Parasitologie – Mycologie – Médecine tropicale, Tours - France; 2- Université François-Rabelais, Imagerie et Cerveau - INSERM U930 / Équipe 2, Faculté de Médecine, Tours - France; 3- CHU de Nantes, Institut de Biologie, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Nantes, France; 4- Université de Nantes Atlantique, EA 1155-ICiMed, Nantes, France; 5- Université François-Rabelais, CEPR - INSERM U1100 / Équipe 3, Faculté de Médecine, Tours - France; * e-mail corresponding author: e.bailly@chu-tours.fr

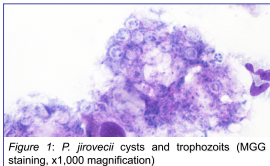


Figure 1: *P. jirovecii* cysts and trophozoites (MGG staining, x1,000 magnification)

Objectives

The main purpose of this study was to look for epidemiological links between cases of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) infections that surprisingly occurred in **four recently-liver transplant patients**, over a five-month period at Tours University Hospital, France.

Table 1: Overall characteristics of the included patients. The four clustered cases of PCP which concomitantly that occurred in liver recipients are underlined.

Study population (N=28)	Mean (± SD) or N (%)	95% CI
Age (years)	56.3 (±15.2)	[50.4 – 60.2y]
Gender (male)	22 (78.6%)	[63.4 – 93.8%]
Lymphocyte count (G/L)	0.5 (±0.3)	[0.3 – 0.7 G/L]
- CD4+ T-cell count (G/L)	0.1 (±0.1)	[0.1 – 0.2 G/L]
Underlying diseases		
- Solid tumors	4 (14.3%)	[1.3 – 27.2%]
- Haematological malignancies	1 (3.6%)	[0.0 – 10.4%]
- Solid-organ transplantation	8 (28.5%)	[11.8 – 45.3%]
o Liver transplantation	4 (14.3%)	[1.3 – 27.2%]
o Kidney transplantation	4 (14.3%)	[1.3 – 27.2%]
- Human Immunodeficiency Virus	11 (39.3%)	[21.2 – 57.4%]
- Autoimmune diseases	3 (10.7%)	[0.0 – 22.2%]
- Miscellaneous other diseases	1 (3.6%)	[0.0 – 10.4%]
Primary chemoprophylaxis (yes)	3 (10.7%)	[0.0 – 22.2%]
Anti- <i>P. jirovecii</i> curative therapy	28 (100%)	[100.0 – 100.0%]
- trimethoprim/sulfamethoxazole and/or	27 (96.4%)	[89.6 – 100.0%]
- Atovaquone and/or	10 (35.7%)	[18.0 – 53.5%]
- Pentamidine isethionate	1 (3.6%)	[0.0 – 10.4%]
Total duration (days)	22.8 (±6.1)	[20.4 – 25.2d]
Clinical outcome (overall survival)	22 (81.5%)	[66.8 – 96.1%]

Material and methods

Retrospective monocentric study [Jan 2013-Feb 2015]

28 bronchial-alveolar lavage fluids (BALFs) previously found positive for *P. jirovecii* (stored at -20°C) (Figure 1 & Table I)

- 4 from clustered PCP cases in liver recipients
- 24 from epidemiologically-unrelated PCP in immunocompromised control patients

Genotyping by Multi Locus Sequence Typing (MLST)

- total DNA extraction by Qiagen DNA mini kit® (Qiagen)
- amplification by PCR at three independent loci
 - Manganese superoxide dismutase (SOD)
 - Large subunit mitochondrial rRNA (mt26S)
 - Cytochrome B (CYB)
- sequencing by ABI-3130XL® genetic analyzer (Life Technologies SA)
- data analysis by CodonCode Aligner 5.1.5® (CodonCode Corporation) and comparison with reference sequences: GenBank No. AF146753 (SOD), M58605 (mt26S) and AF320344 (CYB)
- phylogenetic study by MEGA 6.06® software (Centre for Evolut. Med. & Informatics)

Results

PCR ⇒ overall amplification success rate = 78.6%

- SOD locus = 78.6%
- mt26S locus = 96.4%
- CYB locus = 82.2%

MLST ⇒ high discrimination power (Table II)

- very high nucleotide polymorphism for all the unrelated strains
 - 18 distinct genotypes for the 18 successfully-amplified samples from control patients
 - 5 mixed infections
- 100% allelic similarity for the four strains from liver recipients
 - one single genotype = SOD1 - mt26S allele 3 - CYB2

phylogenetic study ⇒ reliable separating power (Figure 2)

- heterogeneous distribution for all the unrelated *P. jirovecii* strains
- close relationship for the four strains from liver recipients

Table II: Allelic profiles of all the *P. jirovecii* strains in the SOD, mt26S and CYB regions. The four clustered cases of PCP which concomitantly occurred in liver recipients are underlined.

Patient No.	SOD locus				mt26S locus				CYB locus															
	rt position	SOD genotype			rt position	mt26S genotype			CYB genotype															
	110	191	216	SOD	54-57	80	85	248	288	279	298	348	362	369	516	547	588	675	742	832-833	838	CYB genotype		
1410896	C	T	T	SOD1	4Aa	C	C	T	A	Allele 3	C	C	A	C	G	C	C	C	A	C	TT	T	CYB2	
1411271	C	T	T	SOD1	4Aa	C	C	T	A	Allele 3	C	C	A	C	G	C	C	C	A	C	TT	T	CYB2	
1411359	C	T	T	SOD1	4Aa	C	C	C	T	A	Allele 3	C	C	A	C	G	C	C	A	C	TT	T	CYB2	
1411604	C	T	T	SOD1	4Aa	C	C	T	A	Allele 3	C	C	A	C	G	C	C	C	A	C	TT	T	CYB2	
1510480	T	T	C	SOD2	4Aa	C	C	S	T	A	Allele 3	T	C	A	C	G	C	C	A	C	TT	C	CYB8	
15104574	C/T	T	T/C	Mixed (SOD1/SOD2)	4Aa	C	C/T	T/C	A	Mixed (Allele 3/8)	C	C	A	C	G	C	C	C	A	C	TT	C	CYB1	
13112213	C	T	T	SOD1	4Aa	C	C	C	A	Allele 2	C	C	A	C	G	C	C	C	A	C	TT	T	CYB2	
1310096	C	T	T	SOD1	4Aa	C	T	C	A	Allele 9	T	C	A	C	G	T	C	C	A	C	TT	C	CYB5	
13104713	T	T	C	SOD2	4Aa	C	C	C	G	Allele 1	C	C	A	C	G	C	C	C	A	C	TT	C	CYB1	
13105381	T/C	T	C/T	Mixed (SOD1/SOD2)	4Aa	C	A/T	C	A	Mixed (Allele 1/8)	C	C	A	C	G	C/T	C	C	A	C	TT	C	Mixed (CYB1/CYB8)	
13105059	C	T	T	SOD1	4Aa	C	A	C	A	Allele 7	T	C	A	C	G	C	C	C	A	C	TT	C	CYB5	
13103136	C	T	C	SOD4	4Aa	C	C	T	A	Allele 3	T	C	A	C	G	C	C	C	A	C	TT	C	CYB6	
13101009	T	T	C	SOD2	4Aa	C	C	C	A	Allele 2	T	C	A	C	G	C	C	C	A	C	TT	C	CYB8	
14104272	/	/	/	ND	4Aa	C	C	C	T	A	Allele 3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	ND	
14105842	/	/	/	ND	4Aa	C	C	C	T	A	Allele 3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	ND	
13100758	C	T	T/C	Mixed (SOD1/SOD4)	4Aa	C	C/T	C	A	Mixed (Allele 3/8)	T	C	A	C	G	T	C	C	A	C	TT	C	CYB1	
13106160	C	T	T	SOD1	4Aa	C	C	T	A	Allele 3	C	C	A	C	G	C	C	C	A	C	TT	C	CYB5	
15100207	C	T	T	SOD1	4Aa	C	A	C	A	Allele 7	T	C	A	C	G	T	C	C	A	C	TT	C	CYB5	
15103807	C	T	T	SOD1	4Aa	C	A	C	A	Allele 7	C	C	A	C	G	C	C	C	A	C	TT	C	CYB1	
14114231	C	T	T	SOD1	4Aa	C	T	C	A	Allele 8	C	C	A	C	G	T	C	C	A	C	TT	C	CYB6	
14106185	T/C	T	C/T	Mixed (SOD1/SOD2)	4Aa	C	T	C	A	Allele 8	C	C	A	C	G	C/T	C	C	A	C	TT	C	Mixed (CYB1/CYB8)	
14104271	C/T	T	T/C	Mixed (SOD1/SOD2)	4Aa	C	C/T	T/C	A	Mixed (Allele 3/8)	T/C	C	A	C	G	C/T	C	C	A	C	TT	C	Mixed (CYB8/CYB9)	
14104959	C	T	T	SOD1	4Aa	C	T	C	A	Allele 9	T	C	A	C	G	C	C	C	A	C	TT	C	CYB8	
15100228	T	T	C	SOD2	4Aa	C	C	C	T	A	Allele 3	C	C	A	C	G	C	C	C	A	C	TT	C	CYB1
14104393	/	/	/	ND	4Aa	C	C	T	A	Allele 3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	ND	
14102165	/	/	/	ND	4Aa	C	C	C	T	A	Allele 3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	ND	
14106057	/	/	/	ND	4Aa	C	C	C	T	A	Allele 3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	ND	
13102194	/	/	/	ND	/	/	/	/	/	ND	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	ND	

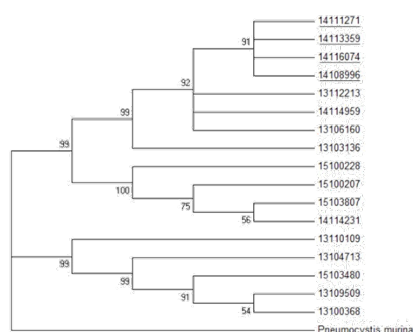


Figure 2: Phylogenetic tree of *P. jirovecii* strains, according to UPGMA method/MLST analysis. The four clustered cases of PCP which concomitantly occurred in liver recipients are underlined. Were excluded of this construction all the samples with mixed genotypes and those with amplification failures.

Conclusion

This study showed that PCP remains a public health issue and requires effective measures to prevent it in immunocompromised patients. It also emphasized the **relevancy of genotyping** during investigation of outbreaks.

Our results confirmed high phylogenetic diversity in *P. jirovecii* strains amongst all the epidemiologically-unrelated immunocompromised patients.

Besides, we have provided for the first time molecular evidences of a very rare example of linked-**clustered PCP in liver transplant patients**. Epidemiological investigation actually showed that concerned patients were found to be hospitalized at concomitant days, with several overlapping dates of outpatient visits. These findings supported the evidence of **nosocomial PCP outbreak**.

Epidemiological Outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia Are Not Limited to Kidney Transplant Recipients: Genotyping Confirms Common Source of Transmission in a Liver Transplantation Unit

AQ: au **Guillaume Desoubieux^{a,b}, Manon Dominique^a, Florent Morio^{c,d}, Rose-Anne Thepault^e, Claire Franck-Martel^a, Anne-Charlotte Tellier^f, Martine Ferrandière^f, Christophe Hennequin^g, Louis Bernard^{b,h}, Ephrem Salaméⁱ, Éric Bailly^a, Jacques Chandenier^{a,b}**

AQ: aff CHU de Tours, Service de Parasitologie-Mycologie-Médecine Tropicale, Tours, France^a; Université François-Rabelais, CEPR, INSERM U1100/Équipe 3, Faculté de Médecine, Tours, France^b; CHU de Nantes, Institut de Biologie, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Nantes, France^c; Département de Parasitologie et Mycologie Médicale, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, EA1155-IlCiMed, Faculté de Pharmacie, Nantes, France^d; Université François-Rabelais, Imagerie et Cerveau, INSERM U930/Équipe 2, Faculté de Médecine, Tours, France^e; CHU de Tours, Service de Réanimation Chirurgicale, Tours, France^f; CHU Saint-Antoine, Laboratoire de Parasitologie & Mycologie, Paris, France^g; CHU de Tours, Service de Médecine Interne & Maladies Infectieuses, Tours, France^h; CHU de Tours, Service de Chirurgie Digestive, Endocrinienne et Transplantation Hépatique, Tours, Franceⁱ

Over a 5-month period, four liver transplant patients at a single hospital were diagnosed with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP). This unusually high incidence was investigated using molecular genotyping. Bronchoalveolar lavage fluids (BALF) obtained from the four liver recipients diagnosed with PCP were processed for multilocus sequence typing (MLST) at three loci (*SOD*, *mt26s*, and *CYB*). Twenty-four other BALF samples, which were positive for *P. jirovecii* and collected from 24 epidemiologically unrelated patients with clinical signs of PCP, were studied in parallel by use of the same method. *Pneumocystis jirovecii* isolates from the four liver recipients all had the same genotype, which was different from those of the isolates from all the epidemiologically unrelated individuals studied. These findings supported the hypothesis of a common source of contamination or even cross-transmission of a single *P. jirovecii* clone between the four liver recipients. Hospitalization mapping showed several possible encounters between these four patients, including outpatient consultations on one particular date when they all possibly met. This study demonstrates the value of molecular genotyping of *P. jirovecii* isolated from clinical samples for epidemiological investigation of PCP outbreaks. It is also the first description of a common source of exposure to a single *P. jirovecii* clone between liver transplant recipients and highlights the importance of prophylaxis in such a population.

Pneumocystis jirovecii pneumonia (PCP) is an opportunistic fungal infection. Interstitial lung disease and a febrile cough, with or without sputum, are typically observed (1). PCP epidemiology has evolved substantially for the past decade: its incidence was largely reduced in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV) after the advent of active antiretroviral therapy (2), whereas it is now a great concern in non-HIV patients, such as those with hematological malignancies (3) and those who have undergone solid organ transplantation (SOT) (4). For instance, in France, its incidence in such non-HIV individuals increased from 0.13 to 0.35 case/10⁵ individuals/year over the 2001–2010 period (5). Regarding the example of renal transplant recipients in England, the number of PCP cases increased 388% from 2006 to 2010, while the number of renal transplantations increased by only 25% (2).

While the exact route of transmission is not fully understood, the results of several studies support an interhuman airborne transmission route (1). Thus, whereas PCP used to occur mainly in the form of isolated cases, several clusters were recently reported, mostly from renal transplant wards (6).

Pneumocystis jirovecii replication cannot be obtained routinely in culture (7), so PCP diagnosis relies on microscopic observation of respiratory samples, mostly bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples, or on molecular detection of *P. jirovecii* DNA by real-time quantitative PCR (qPCR) (1, 8). These techniques are not suitable for investigating the transmission routes of *P. jirovecii* (1, 9) or for epidemiological investigations of a PCP outbreak (10).

Thus, alternative molecular tools (9, 10), such as multilocus sequence typing (MLST), microsatellite genotyping, or PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis, have been used to trace strain circulation in the context of hospitals (11–13). Microsatellite genotyping may be more appropriate for detection of mixed infections (14), and PCR-RFLP analysis of the mitochondrial large-subunit rRNA gene (*mtLSU*) alone has appeared to be sufficient for roughly distinguishing between strains (12, 13), but MLST has been shown to be highly reproducible and facilitates comparison of data from different laboratories (11).

Here we report a cluster of four PCP infections that occurred over a 5-month period in our liver transplantation unit. Molecu-

Received 21 January 2016 Returned for modification 8 February 2016

Accepted 19 February 2016

Accepted manuscript posted online 2 March 2016

Citation Desoubieux G, Dominique M, Morio F, Thepault R-A, Franck-Martel C, Tellier A-C, Ferrandière M, Hennequin C, Bernard L, Salamé E, Bailly E, Chandenier J. 2016. Epidemiological outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia are not limited to kidney transplant recipients: genotyping confirms common source of transmission in a liver transplantation unit. J Clin Microbiol 54:000–000. doi:10.1128/JCM.00133-16.

Editor: D. W. Warnock

Address correspondence to Guillaume Desoubieux, guillaume.desoubieux@univ-tours.fr.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

lar typing demonstrated the genetic similarity of the *P. jirovecii* DNAs collected from the four liver recipients, and epidemiological investigation revealed 10 possible encounter dates.

MATERIALS AND METHODS

Context of the study. Our university hospital has 2,008 beds and includes three main sites dispersed over a few kilometers; the liver transplantation unit is located at the surgical site. Liver transplantation activity started there on 1 January 2011. The immunosuppressive regimen relied on a combination of tacrolimus, mycophenolate mofetil, and prednisone. Until the time of the present study, only two spaced PCP cases, in 2011 and 2012, had previously been diagnosed among 285 liver transplant patients. In contrast, four liver recipients, herein referred to as P1 to P4, were diagnosed with PCP during a 5-month period (25 June 2014 to 13 November 2014).

Biological procedure for routine PCP diagnosis. The diagnostic procedure in our lab relies on both direct examination by conventional methods, using May Grünwald-Giemsa staining (Millipore Merck Chimie SAS, Fontenay-sous-Bois, France) and Uvitex 2B fluorescence (Ciba-Geigy, Basel, Switzerland) (visualization of one cyst is sufficient), and the results of a real-time qPCR that targets the *P. jirovecii* mtLSU gene by using the oligonucleotide primers PjF1 (5'-CTGTTTCCCTTTCGACTATCTACC TT-3') and PjR1 (5'-CACTGAATATCTCGAGGGAGTATGAA-3') and the TaqMan-MGB PjSL probe (5'-6-carboxyfluorescein [FAM]-TCGCA CATAGTCTGATTAT-MGB-3'), as described previously (8). The positive cutoff value for qPCR was set at 35 quantitative cycles (C_q). Each clinical sample was tested in duplicate. Inhibition was assessed with an exogenous positive internal control (universal inhibition control Cy5; Diagenode, Seraing-sur-Meuse, Belgium).

The final diagnosis of PCP infection was systematically approved by physicians, based on clinical examination and medical imaging and supported by the results of the above-mentioned biological tests when at least one of the latter was positive (15).

Study population and biological samples. BALF specimens from the four liver transplant patients (P1 to P4) plus 24 other BALF specimens found positive for *P. jirovecii* between January 2013 and April 2015 (and corresponding to 24 patients [P5 to P28]) were included. The latter samples were collected from individuals with a definitive diagnosis of PCP. These individuals had been hospitalized at different times and in different wards of our institution and were thought to be epidemiologically unrelated to patients P1 to P4. Cases of colonization, i.e., cases with a positive qPCR but a negative direct examination and an absence of clinical and radiological signs of PCP, were not included.

Genotyping of *P. jirovecii* isolates from clinical samples. BALF samples were centrifuged ($1,730 \times g$, 10 min), and each pellet was resuspended in 200 μ l phosphate-buffered saline. DNA was extracted using a QIAmp DNA minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. DNA extracts were stored at -20°C until subsequent analysis. PCR was carried out in a 25- μ l final volume, using 5 μ l of 5 \times Q5 reaction buffer (New England BioLabs France, Evry, France), 0.5 μ l of 10 mM (each) deoxynucleoside triphosphates (dNTPs; Promega, Charbonnières, France), 0.25 μ l of 5-U/ μ l Taq Q5 high-fidelity DNA polymerase (New England BioLabs France, Evry, France), and 5 μ l of DNA extract. As previously reported (16, 17), the oligonucleotide primers were used at a final concentration of 0.5 μ M to amplify the following loci: the manganese superoxide dismutase gene (*SOD*), the mitochondrial rRNA gene (mt26S; also referred to as the mtLSU rRNA gene), and the cytochrome *b* gene (*CYB*). A Biometra T3000 (Thermal Gradient Technology, Rochester, NY) apparatus was used under the following conditions: initial denaturation for 30 s at 98°C followed by 40 cycles of hybridization and elongation (10 s at 98°C , 30 s at 60°C , and 30 s at 72°C), with a final elongation step at 72°C for 120 s and an unlimited cooling step at 4°C . Nucleotide sequencing was achieved using a BigDye Terminator, version 1.1, kit (Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France), the primers indicated above, and an ABI-3130XL genetic analyzer (Life Technologies

SAS, Saint-Aubin, France). Nucleotide sequences were analyzed using CodonCode Aligner 5.1.5 software (CodonCode Corporation, Centerville, MA) (11, 18). The NCBI GenBank accession numbers for the reference sequences are as follows: AF146753 for *SOD*, M58605 for mt26S, and AF320344 for *CYB*.

Phylogenetic relationships. Phylogenetic relationships between the *P. jirovecii* strains were established according to the unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA) by use of MEGA v6.06 software (The Biodesign Institute, Tempe, AZ), with 1,000 bootstrap samples. *Pneumocystis murina* reference sequences (GenBank accession numbers XM_007875480.1, AB626627.1, and XM_007875288.1 for *SOD*, mt26S, and *CYB*, respectively) were used as outgroups.

Transmission map. To study patient movements within the hospital and to identify possible sites of encounter for the four liver transplant recipients with PCP (P1 to P4), dates of outpatient visits and hospitalization were extracted from the medical records in the hospital computing database (Dossier Patient Partagé, Cerner SAS, Paris-La Défense, France).

Statistical analysis. XLStat 2014 (Addinsoft, Paris, France) for Windows (Microsoft, Issy-les-Moulineaux, France) was used for statistical analysis.

Ethics. BALF were stored in the hospital collection (accession no. DC-20100-1216) as approved by the French Ministry of Research. This work was approved by the ethics committee of Tours University Hospital (Espace de Réflexion Ethique, Région Centre, France; approval no. 2015 23). The study registration number (2015_030) was issued by the Technology and Freedom National Committee (Commission de l'Informatique et des Libertés) on 27 May 2015. The study was carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and complied with BRISQ guidelines (19).

RESULTS

Study population. The four clustered cases of PCP infection (P1 to P4) occurred a mean of 113.8 days after liver transplantation (standard deviation [SD], 33.3 days). The attack rate was estimated to be 9.76% over the study period (25 June 2014 to 13 November 2014), versus 0.82% in the 243 liver recipients from the previous period (1 January 2011 to 25 June 2014). All four patients were males who were more than 50 years old. None had been receiving anti-*P. jirovecii* chemoprophylaxis. Cough was the most prevalent clinical sign. The mean lymphocyte count was below 10^9 cells/liter for each.

The control cohort of unrelated patients (P5 to P28) included HIV-infected individuals, kidney recipients, and patients with autoimmune diseases or cancer. Only three of them were being given anti-*P. jirovecii* primary chemoprophylaxis when *P. jirovecii* was isolated (but with no way of ensuring correct compliance for two individuals prescribed trimethoprim-sulfamethoxazole; the other patient was given aerosols of pentamidine isethionate monthly).

The demographic characteristics of the 28 patients are summarized in Table 1.

***P. jirovecii* genotyping.** MLST results for all patients (P1 to P28) are reported in Table 2. In all, 22 clinical samples (78.6%) were successfully analyzed at the *SOD* locus, 27 (96.4%) at the mt26S locus, and 23 (82.1%) at the *CYB* locus. *P. jirovecii* genotyping was thus fully resolved for the four liver transplant recipients (P1 to P4) and for 18 of the controls. Some haplotypes at certain positions in the *SOD* (T/191), mt26S (4xA/54-57 and C/80), and *CYB* (C/299, A/348, C/362, G/369, C/547, A/675, C/742, and TT/832-33) loci were identical in all samples tested. The mt26S and *CYB* loci both allowed the identification of five distinct genotypes, while only three were demonstrated with the *SOD* locus. Heterozygous allelic positions were observed in five

TABLE 1 Patient characteristics^a

Characteristic	Value (mean \pm SD or <i>n</i> [%]) (95% CI)	
	Cases (<i>n</i> = 4)	Controls (<i>n</i> = 24)
Age (yr)	55.5 \pm 5.0 (45.2–65.8)	57.5 \pm 13.9 (49.5–63.3)
Male gender	4 (100.0) (100.0–100.0)	18 (75.0) (57.7–92.3)
Lymphocyte count (10 ⁹ cells/liter)	0.38 \pm 0.17 (0.00–0.79)	0.56 \pm 0.32 (0.34–0.78)
CD4 ⁺ T-cell count (10 ⁹ cells/liter)	0.19 \pm 0.20 (0.00–1.97)	0.11 \pm 0.07 (0.07–0.15)
Underlying disease		
Solid tumors		4 (16.7) (1.8–31.6)
Hematological malignancies		1 (4.2) (0.0–12.2)
Solid organ transplantation	4 (100.0) (100.0–100.0)	4 (16.7) (1.8–37.6)
Liver transplantation	4 (100.0) (100.0–100.0)	
Kidney transplantation		4 (16.7) (1.8–31.6)
HIV		11 (45.8) (25.9–65.8)
Autoimmune diseases		3 (12.5) (0.0–25.7)
Miscellaneous other diseases		1 (4.2) (0.0–12.2)
Clinical course		
Fever ($\geq 38^{\circ}\text{C}$)	2 (50.0) (1.0–99.0)	17 (70.8) (52.6–89.0)
Cough	4 (100.0) (100.0–100.0)	19 (79.2) (62.9–95.4)
Sputum	2 (50.0) (1.0–99.0)	6 (25.0) (7.7–42.3)
Dyspnea	2 (50.0) (1.0–99.0)	19 (79.2) (62.9–95.4)
Chest pain		2 (8.3) (0.0–19.4)
Asthenia	3 (75.0) (32.6–100.0)	19 (79.2) (62.9–95.4)
Headaches	1 (25.0) (0.0–67.4)	1 (4.2) (0.0–12.2)
Radiological findings ^b		
Interstitial lung disease	4 (100.0) (100.0–100.0)	19 (79.2) (62.9–95.4)
Alveolar consolidation		2 (8.3) (0.0–19.4)
Micronodules		4 (16.7) (1.8–31.6)
Anti- <i>P. jirovecii</i> primary chemoprophylaxis ^c	0 (0.0) (0.0–0.0)	3 (12.5) (0.0–25.7)
Anti- <i>P. jirovecii</i> curative therapy ^b		
TMP-SMX	4 (100.0) (100.0–100.0)	23 (95.8) (87.8–100.0)
Atovaquone	1 (75.0) (32.6–100.0)	7 (29.2) (11.0–47.4)
Pentamidine isethionate		1 (4.2) (0.0–12.2)
Total duration of PCP (days)	21.0 \pm 0.0 (21.0–21.0)	23.1 \pm 4.4 (20.3–26.0)
Clinical outcome (survival)	2 (50.0) (1.0–99.0)	19 ^d (82.6) (67.2–98.1)

^a Abbreviations: 95% CI, 95% confidence interval; SD, standard deviation; TMP-SMX, trimethoprim-sulfamethoxazole.

^b Associations are possible.

^c There is no way to determine whether compliance was satisfactory.

^d One patient was lost to follow-up.

clinical samples (17.9%), consistent with mixed *P. jirovecii* infections.

Altogether, MLST evidenced 19 complete multilocus genotypes. The 18 *P. jirovecii* strains from epidemiologically unrelated patients each corresponded to different genotypes (B to N). In stark contrast, the *P. jirovecii* strains from the four liver recipients all exhibited the same single genotype (genotype A), supporting either a common source of contamination or cross-contamination between patients. It should be noted that patients P15, P16, P18, and P21 displayed the same allele for the mt26S locus as that for patients P1 to P4, but because amplification of the *SOD* and *CYB* sequences was unsuccessful for their strains, it was not possible to determine whether the strains belonged to the same clone as that involved in the four liver recipients.

Phylogenetic relationships. Phylogenetic analysis (Fig. 1) indicated that the epidemiologically unrelated *P. jirovecii* strains were heterogeneously dispersed, whereas the strains from patients P1 to P4 were tightly clustered (supported by bootstrap values of $\geq 90\%$).

Hospitalization mapping. The movements of the four liver recipients (P1 to P4) within the university hospital are summarized in Fig. 2. This transmission map revealed 10 possible encounter dates, including 7 dates for visits to the outpatient clinic of the liver transplantation unit (arrows 2 and 5 to 10). Patient P1 was first diagnosed as positive for PCP 73 days after undergoing liver transplantation. Twenty-four weeks before PCP diagnosis, patient P2 encountered P1 during hospitalization in the liver transplantation unit, while he was in his early posttransplantation period. Patient P3 may have met P1 five

TABLE 2 Allelic profiles of the *SOD*, *mt26S*, and *CYP* regions in all the *P. jirovecii* strains studied^a

Patient no.	Date of diagnosis (mo-day-yr)	SOD locus					mt26S locus					CYB locus												CYB genotype (1,2)	Multilocus genotype ^a					
		SOD genotype (1,2)					nt at position(s) ^b :					mt26S genotype (1,3)					nt at position(s) ^b :													
		110	191	215					54-57	80	85	248	288	279	299	348	362	369	516	547	566	675	742			832-833	838			
P1	06-25-14	C	T	T	SOD1	4×A	C	C	T	A	C	C	A	C	G	C	C	C	C	A	C	C	TT	T	CYB2	A				
P2	08-08-14	C	T	T	SOD1	4×A	C	C	T	A	C	C	A	C	G	C	C	C	C	A	C	C	TT	T	CYB2	A				
P3	09-22-14	C	T	T	SOD1	4×A	C	C	T	A	C	C	A	C	G	C	C	C	C	A	C	C	TT	T	CYB2	A				
P4	11-13-14	C	T	T	SOD1	4×A	C	C	T	A	C	C	A	C	G	C	C	C	C	A	C	C	TT	T	CYB2	A				
P5	01-09-13	C	T	T	SOD1	4×A	C	C	T	A	C	C	A	C	G	T	C	C	C	A	C	C	TT	C	CYB5	B				
P6	01-17-13	C	T	T/C	Mixed (SOD1/SOD4)	4×A	C	C/T	C	A	C	C	A	C	G	T	C	C	C	A	C	C	TT	C	CYB5	Mixed ^f				
P7	03-08-13	C	T	C	SOD4	4×A	C	C	T	A	C	C	A	C	G	C	C	C	C	A	C	C	TT	C	CYB8	C				
P8	04-10-13	T	T	C	SOD2	4×A	C	C	C	G	C	C	A	C	G	C	C	C	C	A	C	C	TT	C	CYB1	D				
P9	04-23-13	T/C	T	C/T	Mixed (SOD2/SOD1)	4×A	C	A/T	C	A	C	C	A	C	G	C/T	C	C	C	A	C	C	TT	C	Mixed (CYB1/CYB6)	Mixed ^f				
P10	05-10-13	C	T	T	SOD1	4×A	C	C	T	A	C	C	A	C	G	C	C	C	C	A	C	C	TT	C	CYB1	E				
P11	07-17-13	C	T	T	SOD1	4×A	C	C	C	A	C	C	A	C	G	C	C	C	C	A	C	C	TT	C	CYB8	F				
P12	07-29-13	T	T	C	SOD2	4×A	C	C	C	A	C	C	A	C	G	C	C	C	C	A	C	C	TT	C	CYB8	G				
P13	09-12-13	/	/	/	ND	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	ND	ND				
P14	09-12-13	C	T	T	SOD1	4×A	C	C	C	A	C	C	A	C	G	C	C	C	C	A	C	C	TT	T	CYB2	H				
P15	02-12-14	/	/	/	ND	4×A	C	C	T	A	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	ND	ND ^g				
P16	04-18-14	/	/	/	ND	4×A	C	C	T	A	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	ND	ND ^g				
P17	03-25-14	C/T	T	T/C	Mixed (SOD1/SOD2)	4×A	C	C/T	T/C	A	T/C	A	C	G	C/T	C	C	C	C	A	C	C	TT	C	Mixed (CYB8/CYB6)	Mixed ^f				
P18	03-25-14	/	/	/	ND	4×A	C	C	T	A	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	ND	ND ^g				
P19	03-27-14	/	/	/	ND	4×A	C	C	T	A	C	C	A	C	G	T	C	C	C	A	C	C	TT	C	CYB6	ND				
P20	05-05-14	T/C	T	C/T	Mixed (SOD2/SOD1)	4×A	C	T	C	A	C	C	A	C	G	C/T	C	C	C	A	C	C	TT	C	Mixed (CYB1/CYB6)	Mixed ^f				
P21	05-15-14	/	/	/	ND	4×A	C	C	T	A	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	ND	ND ^g				
P22	10-07-14	C	T	T	SOD1	4×A	C	T	C	A	C	C	A	C	G	T	C	C	C	A	C	C	TT	C	CYB6	I				
P23	10-21-14	C	T	T	SOD1	4×A	C	T	C	A	C	C	A	C	G	C	C	C	C	A	C	C	TT	C	CYB8	J				
P24	01-06-15	C	T	T	SOD1	4×A	C	C	A	C	C	C	A	C	G	T	C	C	C	A	C	C	TT	C	CYB5	K				
P25	01-06-15	T	T	C	SOD2	4×A	C	C	T	A	C	C	A	C	G	C	C	C	C	A	C	C	TT	C	CYB1	L				
P26	03-16-15	T	T	C	SOD2	4×A	C	C	T	A	C	C	A	C	G	C	C	C	C	A	C	C	TT	C	CYB8	M				
P27	03-23-15	C	T	T	SOD1	4×A	C	C	A	C	C	C	A	C	G	C	C	C	C	A	C	C	TT	C	CYB1	N				
P28	04-08-15	C/T	T	T/C	Mixed (SOD1/SOD2)	4×A	C	C/T	T/C	A	T/C	A	C	C	G	C	C	C	C	A	C	C	TT	C	CYB1	Mixed ^f				

^a The four clustered cases of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (P1 to P4) in liver recipients are underlined. Abbreviations: A, adenine; CYB, cytochrome *b* gene; C, cytosine; -, nucleotide deletion; /, sequencing failure; G, guanine; mt26S, mitochondrial rRNA gene; NA, not available; ND, unspecified; nt, nucleotide; SOD, manganese superoxide dismutase gene; T, thymine.

^b Numbering is according to the SOD reference sequence (GenBank accession no. AF146753).

^c Numbering is according to the mt26S reference sequence (GenBank accession no. M58605).

^d Numbering is according to the CYB reference sequence (GenBank accession no. AF320344).

^e More than one *P. jirovecii* genotype (for each patient sample displaying a mixed genotype, the putative combination of genotypes is given, based on the hypothesis that the *P. jirovecii* genome is haploid).

^f Since only mt26S (*SOD* and *CYB* are single-copy genes) was successfully amplified for each, it was impossible to determine whether the multilocus genotype was or was not the same as that of the isolates from patients P1 to P4.

However, identity with the sequences of the isolates from patients P1 to P4 was in no case total (99%), and there was one additional nucleotide gap. The four concerned patients (P15, P16, P18, and P21) were all kidney recipients, and PCP occurred over a 3-month period for them. They were not hosted in the same geographical site of our hospital as the four liver recipients with PCP and consequently never met them.

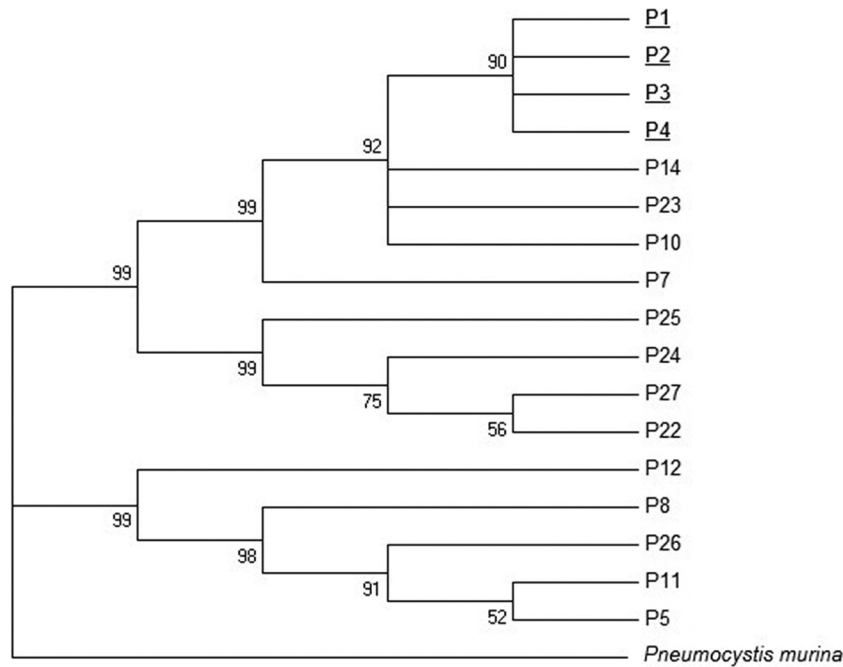


FIG 1 Phylogenetic tree of *P. jirovecii* strains based on the nucleotide sequences of their *SOD*, *mt26S*, and *CYB* regions, according to the UPGMA method. The four clustered cases of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (P1 to P4) which occurred concomitantly in liver recipients are underlined. All samples with mixed genotypes and those with amplification failures were excluded from this representation. The outgroup sequences are from *Pneumocystis murina* and were referenced with the following NCBI GenBank accession numbers: [XM_007875480.1](#) (*SOD*), [AB626627.1](#) (*mt26S*), and [XM_007875288.1](#) (*CYB*). The UPGMA method enables matching of strains with the most similar sequences to each other, regardless of the rate of evolution. The minimum bootstrap value was set at 1,000. High bootstrap scores demonstrate the reliability of embranchment.

times and P2 twice (arrows 2, 4 to 7, and 9) before PCP diagnosis, including five encounters between days 27 and 119 after transplantation. Patient P4 may have encountered P3 (arrow 3) and P2 (arrow 8) 76 days and 10 days before transplantation,

respectively. P4 may also have encountered P1, P2, and P3 in the outpatient clinic of the liver transplantation unit 33 days after the graft, and also P1 again, 14 days later (arrows 9 and 10).

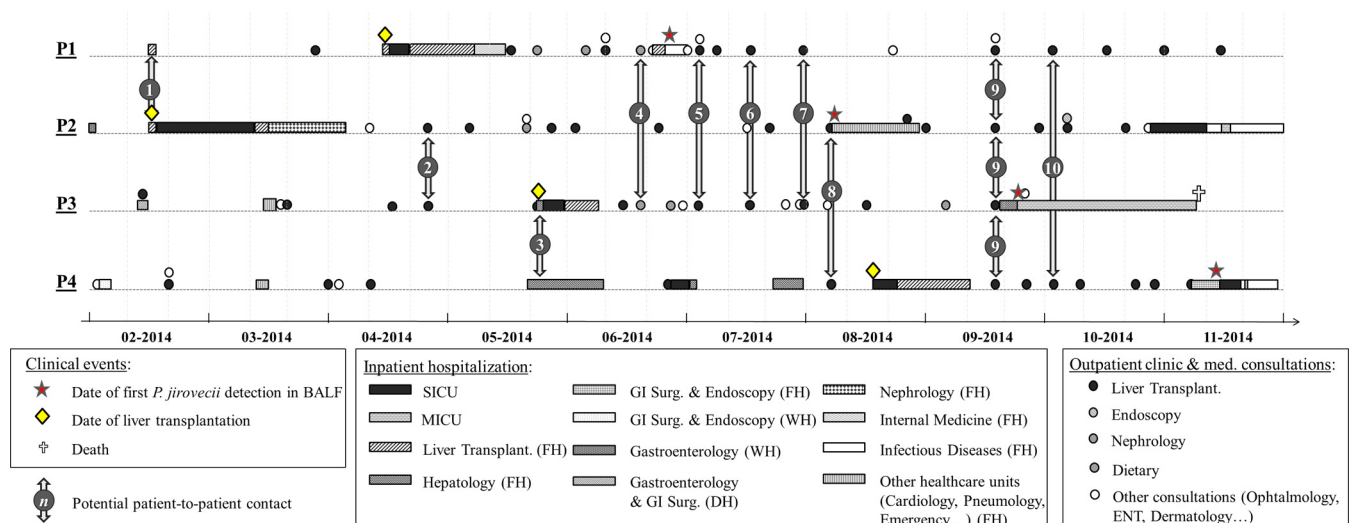


FIG 2 Transmission mapping of *P. jirovecii* among liver transplant recipients. The x axis shows dates (month-year), and the y axis shows patient numbers. The four clustered cases of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (P1 to P4) which occurred concomitantly in liver recipients are underlined. They were all due to strains with no mutation in the dihydropteroate synthetase (DHPS) gene, which is debated to be involved in resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Numbered arrows denote the 10 encounter dates compatible with interindividual *P. jirovecii* transmission. Arrows 9 indicate possible contacts for all four liver transplant patients (18 September 2014) in the outpatient clinic of liver transplantation. Other arrows point to dates of possible one-on-one encounters. Abbreviations: BALF, bronchoalveolar lavage fluid; DH, day of hospitalization; ENT, ear-nose-throat; FH, full hospitalization; GI, gastrointestinal; med., medical; MICU, medical intensive care unit; SICU, surgical intensive care unit; Surg., surgery; Transplant., transplantation; WH, week of hospitalization.

DISCUSSION

Pneumocystis jirovecii is an opportunistic fungus with strict human host specificity. It is responsible for a severe respiratory disease, *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) (1, 20). One potential route of infection is currently believed to be patient-to-patient transmission mediated by airborne droplets (1), and the hypothesis related to contamination from an environmental source has largely been rejected (9, 10).

Previously reported PCP outbreaks in SOT patients generally occurred in kidney recipients, and later after transplantation (6, 21). In contrast, PCP is thought to be a rare event in liver recipients: in older reports, the overall incidence of PCP was around 1% (4, 22). This observation may be supported by the fact that liver transplantations overall are practiced less commonly than kidney transplantations (for instance, 285 versus 480, respectively, in our study over the period from 1 January 2011 to 13 November 2014). Interestingly, in the present study, four PCP infections were unusually diagnosed in liver recipients within a 5-month period in 2014. We analyzed the reasons for this sudden cluster, as the diagnostic procedures and immunosuppressive regimens had remained similar over the past 5 years and thus could not explain this emergence. Except for one patient of the cluster, the individuals with PCP were not more immunocompromised than and their respective underlying disease was not more serious than that of other liver recipients during the same period. It should be noted that our institution did not apply systemic anti-PCP chemoprophylaxis for liver transplant patients because the incidence of this opportunistic infection had always remained lower than 0.01 (two cases among 285 patients over 4 years). Indeed, although it has been shown that the risk of acquiring PCP may increase in SOT recipients not taking effective prophylaxis (6, 23, 24), routine prophylaxis is recommended only for centers with an incidence of PCP of at least 3 to 5% among transplant recipients (25). In such health care settings, trimethoprim-sulfamethoxazole remains the drug of choice (80 to 160/400 to 800 mg orally daily or three times weekly [grade I] for at least 6 to 12 months posttransplantation [grade III]) (26). Some authors also recommend strict hospital segregation of immunocompromised individuals with PCP (patients at risk of PCP should not share a hospital room with a patient with PCP) and the systematic use of face-mask filtering to prevent airborne *P. jirovecii* transmission among infected patients (18). Nevertheless, clinical data to support this recommendation in practice are insufficient (27), and consequently the issue is still the subject of debate. Because the outbreak spontaneously stopped in our hospital by the end of 2014, it was considered only a sporadic event that should not force changes in our clinical practices. No subsequent PCP case has been reported so far.

Nonetheless, we attempted to explain the epidemiology of this PCP cluster. Globally, the epidemiology of this disease has always been difficult to study (21, 23, 28, 29), mainly due to the lack of easy-to-perform methods of culture and because alternative powerful and informative techniques have not been available in all microbiology laboratories (30). However, MLST is now used widely to investigate nosocomial PCP outbreaks and is generally considered the gold standard (6, 10, 11, 18, 31). Recently, Maitte et al. showed that a simple scheme relying on three loci, *SOD*, *mt26S*, and *CYB*, provides sufficient discrimination to be used reliably for epidemiological investigations of PCP outbreaks (11). Our MLST analysis based on this approach indeed highlighted substantial

nucleotide polymorphism in the *P. jirovecii* genome and evidenced several *P. jirovecii* infections involving more than one strain (11, 18, 31, 32). In addition, our findings clearly support the conclusion that liver transplant patients P1 to P4 were all infected by a single genotype of *P. jirovecii*. This conclusion seems robust because, as shown by the phylogenetic tree, data for the three loci combined were sufficient to discriminate between 22 unrelated *P. jirovecii* isolates (10). To our knowledge, this is the first genotypic demonstration of clustered PCP limited only to liver transplant patients (24), whereas numerous studies have reported similar findings for kidney recipients (6, 10, 18), especially in France (10). Thus, in accordance with recent works regarding SOT (26), our study suggests that the use of prophylaxis as widely practiced in most centers of kidney transplantation (22, 26) should also be considered thoroughly for liver recipients.

Our mapping of patient movements in the hospital also supports the hypothesis of nosocomial acquisition and patient-to-patient transmission of *P. jirovecii* among liver transplant patients, at least for patients P2, P3, and P4 (6, 10, 18). Indeed, cross-transmission may have been facilitated in our institution due to the distance between the different wards in charge of those patients leading to multiple transfers and the frequentation of diverse waiting areas of outpatient clinics. The demonstration of interpatient transmission is hampered (9), however, because the exact incubation time of PCP remains unknown, as does the time of *P. jirovecii* excretion into the environmental air (8). In addition, colonized patients without symptoms of PCP may also have played a role in this transmission, though their pulmonary fungal burdens are known to be lower (8). In this study, the periods from encounter with a proven index case to PCP diagnosis were between 4 and 172 days. Due to the retrospective design of this study, we cannot exclude the possibility that the transmission of *P. jirovecii* may have involved asymptomatic subjects, such as transiently colonized nurses and doctors (33). Very few studies have been able to provide molecular evidence that colonized individuals may serve as infectious sources of *P. jirovecii* (10). In contrast, there was no way to assume a common source of contamination by an inert material, such as a bronchoscope, since the BAL procedures for the four patients were not performed in the same health care department and were performed on different days (our sterilizing procedures are scheduled daily).

Conclusions. Our study shows that PCP remains a public health issue and that effective preventive measures are required for immunocompromised patients, especially for liver transplant recipients. We also demonstrated the clinical and epidemiological value of *P. jirovecii* genotyping by a simple MLST scheme for investigations of nosocomial outbreaks.

ACKNOWLEDGMENTS

A professional scientific editing and translation company (Alex Edelman & Associates) was involved in the translation of the manuscript from French into English.

We thank Carole Le Goas for her personal contribution.

We did not receive any research funding specifically for this study. The data were obtained as part of routine work at the University Hospital in Tours, France.

We have no conflicts of interest to disclose.

We were all involved in the conception and design of the study, acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and the final approval of the version to be submitted.

REFERENCES

1. Morris A, Norris KA. 2012. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev* 25:297–317. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00013-12>.
2. Maini R, Henderson KL, Sheridan EA, Lamagni T, Nichols G, Delphe V, Phin N. 2013. Increasing *Pneumocystis pneumonia*, England, UK, 2000–2010. *Emerg Infect Dis* 19:386–392. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1903.121151>.
3. Monnet X, Vidal-Petiot E, Osman D, Hamzaoui O, Durrbach A, Goujard C, Miceli C, Bourée P, Richard C. 2008. Critical care management and outcome of severe *Pneumocystis pneumonia* in patients with and without HIV infection. *Crit Care* 12:R28. <http://dx.doi.org/10.1186/cc6806>.
4. Rodriguez M, Fishman JA. 2004. Prevention of infection due to *Pneumocystis* spp. in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 17:770–782. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.17.4.770-782.2004>.
5. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, Che D, Dromer F. 2014. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001–2010. *Emerg Infect Dis* 20:1149–1155. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2007.131869>.
6. De Boer MGJ, de Fijter JW, Kroon FP. 2011. Outbreaks and clustering of *Pneumocystis pneumonia* in kidney transplant recipients: a systematic review. *Med Mycol* 49:673–680. <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2011.571294>.
7. Schildgen V, Mai S, Khalfaoi S, Lüsebrink J, Pieper M, Tillmann RL, Brockmann M, Schildgen O. 2014. *Pneumocystis jirovecii* can be productively cultured in differentiated CuFi-8 airway cells. *mBio* 5:e01186–14. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01186-14>.
8. Alanio A, Desoubeaux G, Sarfati C, Hamane S, Bergeron A, Azoulay E, Molina JM, Derouin F, Menotti J. 2011. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect* 17:1531–1537. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03400.x>.
9. Choukri F, Menotti J, Sarfati C, Lucet J-C, Nevez G, Garin YJF, Derouin F, Totet A. 2010. Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis pneumonia*. *Clin Infect Dis* 51:259–265. <http://dx.doi.org/10.1086/653933>.
10. Le Gal S, Damiani C, Rouillé A, Grall A, Tréguer L, Virmaux M, Moalic E, Quinio D, Moal M-C, Berthou C, Salio P, Le Meur Y, Totet A, Nevez G. 2012. A cluster of *Pneumocystis* infections among renal transplant recipients: molecular evidence of colonized patients as potential infectious sources of *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis* 54:e62–e71. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir996>.
11. Maitte C, Leterrier M, Le Pape P, Miegville M, Morio F. 2013. Multilocus sequence typing of *Pneumocystis jirovecii* from clinical samples: how many and which loci should be used? *J Clin Microbiol* 51:2843–2849. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01073-13>.
12. Le Gal S, Blanchet D, Damiani C, Guéguen P, Virmaux M, Abboud P, Guillot G, Kérangart S, Merle C, Calderon E, Totet A, Carme B, Nevez G. 2015. AIDS-related *Pneumocystis jirovecii* genotypes in French Guiana. *Infect Genet Evol* 29:60–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.021>.
13. Monroy-Vaca EX, de Armas Y, Illnait-Zaragoza MT, Toraño G, Diaz R, Vega D, Alvarez-Lam I, Calderón EJ, Stensvold CR. 2014. Prevalence and genotype distribution of *Pneumocystis jirovecii* in Cuban infants and toddlers with whooping cough. *J Clin Microbiol* 52:45–51. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02381-13>.
14. Parobek CM, Jiang LY, Patel JC, Alvarez-Martinez MJ, Miro JM, Wordria W, Andama A, Fong S, Huang L, Meshnick SR, Taylor SM, Juliano JJ. 2014. Multilocus microsatellite genotyping array for investigation of genetic epidemiology of *Pneumocystis jirovecii*. *J Clin Microbiol* 52:1391–1399. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02531-13>.
15. Thomas CF, Limper AH. 2007. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis pneumonia*. *Nat Rev Microbiol* 5:298–308. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1621>.
16. Esteves F, Gaspar J, Marques T, Leite R, Antunes F, Mansinho K, Matos O. 2010. Identification of relevant single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii*: relationship with clinical data. *Clin Microbiol Infect* 16:878–884. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03030.x>.
17. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, Hopkin JM. 1990. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 336:451–453. [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)92008-6](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(90)92008-6).
18. Schmoldt S, Schuegger R, Wendler T, Huber I, Söllner H, Hogardt M, Arbogast H, Heesemann J, Bader L, Sing A. 2008. Molecular evidence of nosocomial *Pneumocystis jirovecii* transmission among 16 patients after kidney transplantation. *J Clin Microbiol* 46:966–971. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02016-07>.
19. Moore HM, Kelly AB, Jewell SD, McShane LM, Clark DP, Greenspan R, Hayes DF, Hainaut P, Kim P, Mansfield EA, Potapova O, Riegman P, Rubinstein Y, Seijo E, Somiari S, Watson P, Weier H-U, Zhu C, Vaught J. 2011. Biospecimen reporting for improved study quality (BRISQ). *Cancer Cytopathol* 119:92–102. <http://dx.doi.org/10.1002/cncy.20147>.
20. Nevez G, Chabé M, Rabodonirina M, Virmaux M, Dei-Cas E, Hauser PM, Totet A. 2008. Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* infections. *Parasite* 15:359–365. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2008153359>.
21. Goto N, Oka S. 2011. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in kidney transplantation. *Transpl Infect Dis* 13:551–558. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3062.2011.00691.x>.
22. Kostakis ID, Sotiropoulos GC, Kouraklis G. 2014. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in liver transplant recipients: a systematic review. *Transplant Proc* 46:3206–3208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.09.156>.
23. Arichi N, Kishikawa H, Mitsui Y, Kato T, Nishimura K, Tachikawa R, Tomii K, Shiina H, Igawa M, Ichikawa Y. 2009. Cluster outbreak of *pneumocystis pneumonia* among kidney transplant patients within a single center. *Transplant Proc* 41:170–172. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.10.027>.
24. Rostved AA, Sassi M, Kurtzhals JAL, Sørensen SS, Rasmussen A, Ross C, Gogineni E, Huber C, Kuty G, Kovacs JA, Helweg-Larsen J. 2013. Outbreak of *pneumocystis pneumonia* in renal and liver transplant patients caused by genotypically distinct strains of *Pneumocystis jirovecii*. *Transplantation* 96:834–842. <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e3182a1618c>.
25. Fishman JA. 2001. Prevention of infection caused by *Pneumocystis carinii* in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 33:1397–1405. <http://dx.doi.org/10.1086/323129>.
26. Martin SJ, Fishman JA, AST Infectious Diseases Community of Practice. 2013. *Pneumocystis pneumonia* in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 13(Suppl 4):S272–S279. <http://dx.doi.org/10.1111/ajt.12119>.
27. Kaplan JE, Benson C, Holmes KK, Brooks JT, Pau A, Masur H, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), National Institutes of Health, HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. 2009. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep* 58(RR-4):1–207.
28. Struijk GH, Gijzen AF, Yong SL, Zwinderman AH, Geerlings SE, Lettinga KD, van Donselaar-van der Pant KAMI, ten Berge IJM, Beldman FJ. 2011. Risk of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients long after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 26:3391–3398. <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfr048>.
29. Hennequin C, Page B, Roux P, Legendre C, Kreis H. 1995. Outbreak of *Pneumocystis carinii* pneumonia in a renal transplant unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14:122–126. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02111870>.
30. Ruskin J, Remington JS. 1967. The compromised host and infection. I. *Pneumocystis carinii* pneumonia. *JAMA* 202:1070–1074.
31. Hauser PM, Francioli P, Bille J, Telenti A, Blanc DS. 1997. Typing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* by single-strand conformation polymorphism of four genomic regions. *J Clin Microbiol* 35:3086–3091.
32. Esteves F, Gaspar J, Tavares A, Moser I, Antunes F, Mansinho K, Matos O. 2010. Population structure of *Pneumocystis jirovecii* isolated from immunodeficiency virus-positive patients. *Infect Genet Evol* 10:192–199. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.12.007>.
33. Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. 2001. *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 39:3877–3882. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.11.3877-3882.2001>.

AUTHOR QUERIES

AUTHOR PLEASE ANSWER ALL QUERIES

1

AQau—Please confirm the given-names and surnames are identified properly by the colors.
■ = Given-Name, ■ = Surname

AQaff—Please confirm the following full affiliations or correct here as necessary. This is what will appear in the online HTML version:

- ^aCHU de Tours, Service de Parasitologie-Mycologie-Médecine Tropicale, Tours, France
- ^bUniversité François-Rabelais, CEPR, INSERM U1100/Équipe 3, Faculté de Médecine, Tours, France
- ^cCHU de Nantes, Institut de Biologie, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Nantes, France
- ^dDépartement de Parasitologie et Mycologie Médicale, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, EA1155-IICiMed, Faculté de Pharmacie, Nantes, France
- ^eUniversité François-Rabelais, Imagerie et Cerveau, INSERM U930/Équipe 2, Faculté de Médecine, Tours, France
- ^fCHU de Tours, Service de Réanimation Chirurgicale, Tours, France
- ^gCHU Saint-Antoine, Laboratoire de Parasitologie & Mycologie, Paris, France
- ^hCHU de Tours, Service de Médecine Interne & Maladies Infectieuses, Tours, France
- ⁱCHU de Tours, Service de Chirurgie Digestive, Endocrinienne et Transplantation Hépatique, Tours, France

AQaff—This affiliation line will appear in the PDF version of the article and matches that on page 1 of the proof; corrections to this affiliation line may be made here **or** on page 1 of the proof:

CHU de Tours, Service de Parasitologie-Mycologie-Médecine Tropicale, Tours, France^a; Université François-Rabelais, CEPR, INSERM U1100/Équipe 3, Faculté de Médecine, Tours, France^b; CHU de Nantes, Institut de Biologie, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Nantes, France^c; Département de Parasitologie et Mycologie Médicale, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, EA1155-IICiMed, Faculté de Pharmacie, Nantes, France^d; Université François-Rabelais, Imagerie et Cerveau, INSERM U930/Équipe 2, Faculté de Médecine, Tours, France^e; CHU de Tours, Service de Réanimation Chirurgicale, Tours, France^f; CHU Saint-Antoine, Laboratoire de Parasitologie & Mycologie, Paris, France^g; CHU de Tours, Service de Médecine Interne & Maladies Infectieuses, Tours, France^h; CHU de Tours, Service de Chirurgie Digestive, Endocrinienne et Transplantation Hépatique, Tours, Franceⁱ

Vu, le Directeur de Thèse

**Vu, le Doyen
de la Faculté de médecine de TOURS**

Académie d'Orléans – Tours

Université François-Rabelais

Faculté de Médecine de TOURS

Claire FRANCK-MARTEL

84 pages – 2 tableaux – 18 figures – travaux annexes–

Résumé :

Contexte : Le diagnostic biologique de la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* est habituellement établi à partir de prélèvements respiratoires grâce à des méthodes de coloration classique et /ou de la biologie moléculaire. Des techniques peu coûteuses, rapides et faciles à mettre en œuvre sont espérées pour améliorer la procédure diagnostique actuelle.

Objectif : En comparaison avec les méthodes de laboratoire habituelles, nous avons évalué la performance diagnostique d'une méthode de fluorescence par calcofluor pour la détection directe de kystes de *Pneumocystis jirovecii* dans les échantillons respiratoires.

Matériel et méthodes : Des liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA) de patients avec suspicion de pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* ont été analysés de façon prospective sur une période de trois ans au CHRU de Tours : sur dépôts répétés, la performance diagnostique du calcofluor a été systématiquement comparée avec celle d'un kit commercial basé sur le principe d'immunofluorescence directe. En complément, une technique classique de coloration par MGG (May-Grünwald Giemsa) ainsi qu'une *Polymerase Chain Reaction* quantitative (PCRq) en temps réel ont été effectuées. Le diagnostic définitif de pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* a été porté par un groupe de cliniciens indépendants sur des arguments cliniques, radiologiques et biologiques.

Résultats : Au total, 481 liquides de LBA ont été évalués : 42 avaient au moins une technique diagnostique positive. Finalement, 35 patients ont été considérés comme réellement atteints d'une pneumonie à *Pneumocystis jirovecii*. La sensibilité de la technique de fluorescence par calcofluor était de 74,3 %, et était de 34,6%, 60,0% et 82,9% pour la coloration MGG, l'immunofluorescence directe du kit commercial et la PCRq. Sa spécificité était de 99,6%, et celles des autres techniques étaient de 100,0 %, 99, 3% et 99,4% respectivement. L'ensemble des tests statistiques ne mettait pas en évidence de supériorité d'une méthode par rapport à la fluorescence directe à base de calcofluor. En revanche, la réalisation technique de celle-ci était plus rapide et offrait une visualisation plus nette des kystes de *P. jirovecii*.

Discussion et conclusion : De par son coût de revient extrêmement faible et sa rapidité d'exécution, l'utilisation systématique du calcofluor dans le LBA se positionne comme une alternative valable pour le diagnostic de première intention de la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii*.

Mots clés : *Pneumocystis jirovecii* ; calcofluor ; lavage broncho-alvéolaire ; immunofluorescence monoclonale directe.

Jury :

Président : Professeur Laurent MEREGHETTI, PU-PH Bactériologie, UFR Médecine, Université de Tours

Membres : Professeur Christian ANDRES, PU-PH Biochimie-Biologie moléculaire, UFR Médecine, Université de Tours

Professeur Isabelle DIMIER-POISSON, PU Immunologie parasitaire, UFR Pharmacie, Université de Tours

Professeur Jacques CHANDENIER, PU-PH Parasitologie-Mycologie, UFR Médecine, Université de Tours

Docteur Eric BAILLY, PH Parasitologie-Mycologie, CHU de Tours

Docteur Guillaume DESOUBEAUX, MCU-PH Parasitologie-Mycologie, UFR Médecine, Université de Tours

Date de la soutenance : 6 Avril 2016