

# Nouvelle analyse au LSPQ: Détection de *Pneumocystis* par TAAN quantitatif (87050)

Webinaire  
20 juin, 2019

Philippe Dufresne, Ph. D. RMCCM  
Microbiologiste - Spécialiste clinique en biologie médicale  
Mycologie médicale  
Laboratoire de santé publique du Québec (INSPQ)

[www.inspq.qc.ca](http://www.inspq.qc.ca)

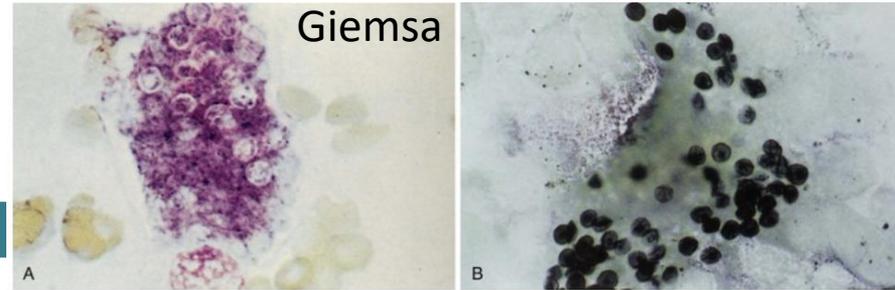
[philippe.dufresne@inspq.qc.ca](mailto:philippe.dufresne@inspq.qc.ca)

514 457-2361 p.2226

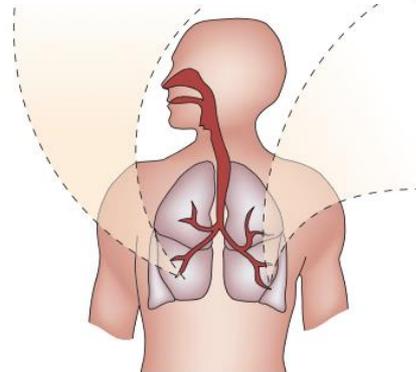
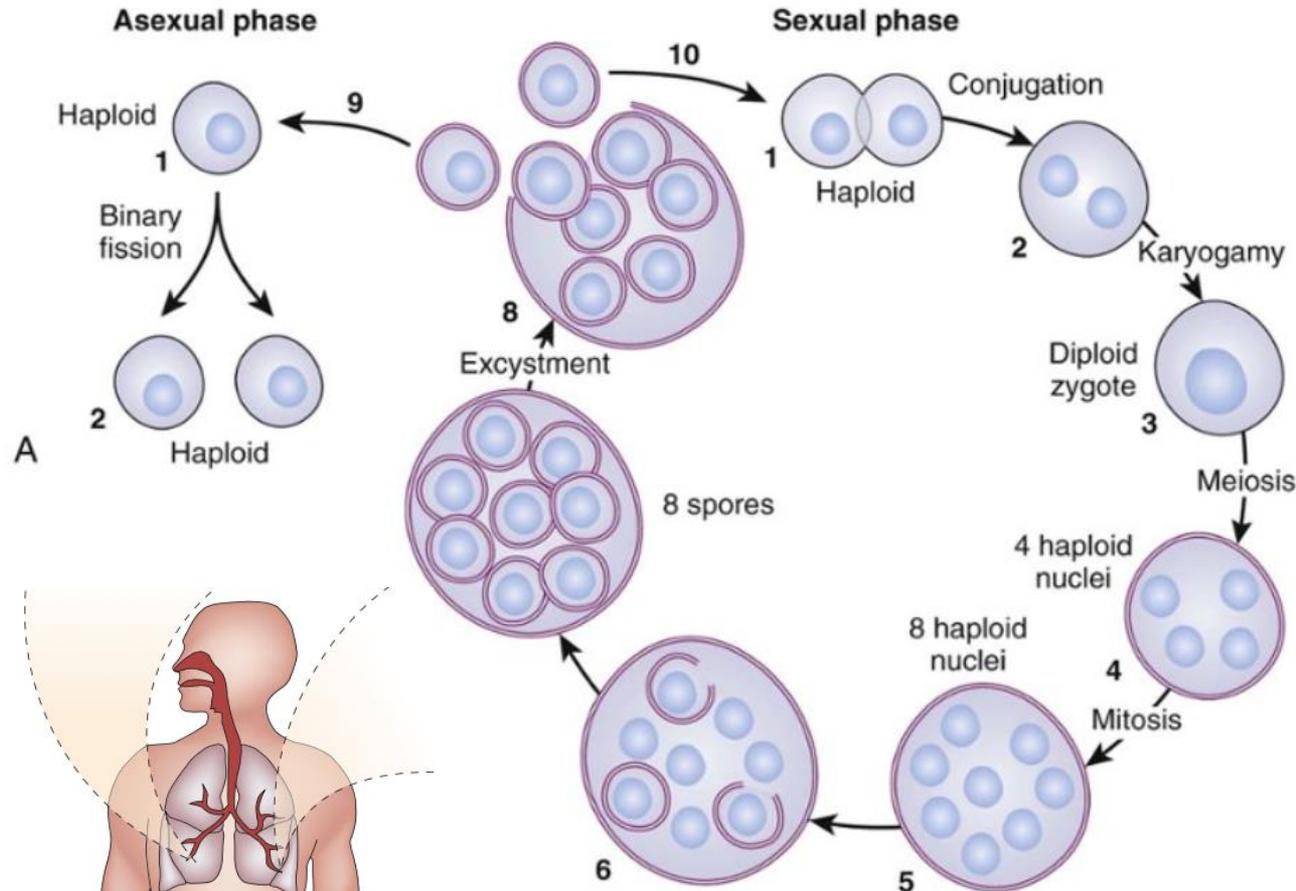
# Plan

- Survol de la Pneumocystose et outils de Dx
- Présentation du TAAN quantitatif
  - Performance en validation
  - Type de spécimens acceptés et volume requis
  - Information au rapport
- Discussion sur seuil clinique
  - Formulaire d'infos cliniques à compléter
  - Seuils cliniques ailleurs
- Service de génotypage (sur demande)

# Cycle d'infection



## Trophique (infection aiguë)



Cyste ( $\beta$ -D-glucan – chitine)

- Parasite fongique obligatoire/ non cultivable.
- Tropicisme pour les poumons (infection rarement extrapulmonaire)
- Exposition avant l'âge de 4 ans (80%). Bénin/asymptomatique
- Pneumonie fulminante chez patients immunosupprimés

# Patients PCP VIH vs. non-VIH

Symptômes non-spécifiques: toux sèche, fièvre, dyspnée, infiltrats diffus-poumons

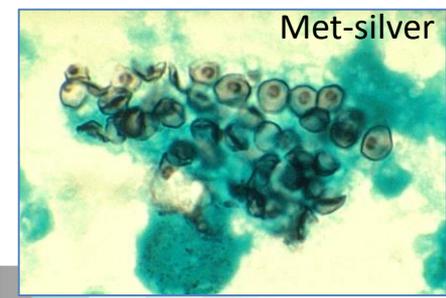
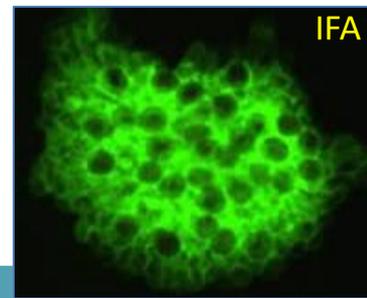
- **VIH**

- CD4<sup>+</sup> < 200 (rare depuis HART - VIH non-traité)
- Présentation clinique subaiguë
- Mortalité: ~10%

- **Non-VIH**

- Incidence en augmentation: greffe organe solide, cellules souches, chimiothérapie, maladies inflammatoires chroniques.
- Très aiguë, mais **charge plus faible** (Dx plus difficile)
- **Mortalité élevée: ~30-60% (décès survient rapidement)**

# Dx *Pneumocystis*



Photos: CDC gov

Par examen microscopique sur spécimen respiratoire

Méthode	Spécimen	Sens.	Spéc.	Commentaire
<b>EXAMEN MICROSCOPIQUE</b>				
Calcofluor	LBA	~ 75%	> 99%	Faible sensibilité si charge faible (cyste)
Gomori-met/silver	LBA	~ 75%	> 99%	Faible sensibilité si charge faible (cyste)
Giemsa / Toluidine	LBA	< 50 %	> 99%	Non recommandé, faible sens. (troph.)
<b>Immunofluorescence (Ab)</b>	<b>LBA</b>	<b>~ 90%</b>	<b>~ 95%</b>	<b>Recommandée (cyste et troph.)</b>
<b>AUTRES MÉTHODES</b>				
$\beta$ -D-glucan	Serum/ LBA	> 90%	> 85%	Haute valeur prédictive négative Réaction croisée avec autres mycoses Faux positifs possibles
Détection par TAAN (PCR)	LBA	> 99%	> 99%	Sensibilité maximale Distinction colonisation vs. infection?

# TAAN quantitatif pour détection de *Pneumocystis*

[www.inspq.qc.ca](http://www.inspq.qc.ca)

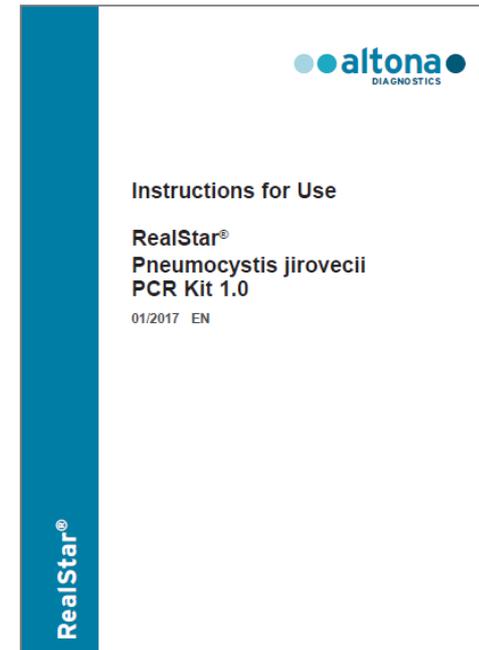
# TAAN quantitatif pour PCP

Plusieurs trousse commerciale et protocoles maison disponibles

- Cibles mtLSU ou mtSSU pour la plupart

## Real Star<sup>®</sup> *Pneumocystis jirovecii* 1.0

- TAAN en temps réel (qualitatif ou quantitatif)
- Recommandée par SickKids à Toronto
- IVD (pas Santé Canada – à venir)
  
- Cible: mtLSU (mitochondriale – multi copies)
- 4 standards quantification (10-10 000 copies)
- Contrôle interne (inhibition PCR)



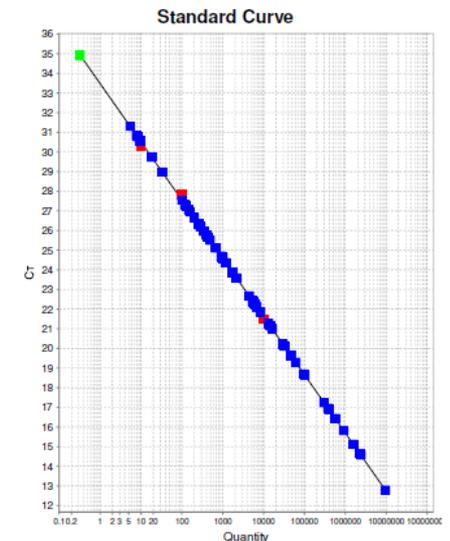
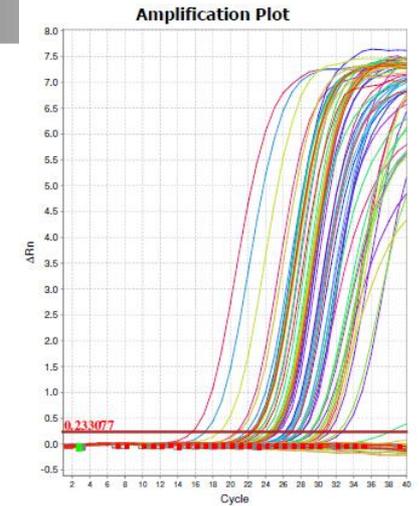
# Validation TAAAN RealStar® *P. jirovecii*

## Validation sur 135 spécimens

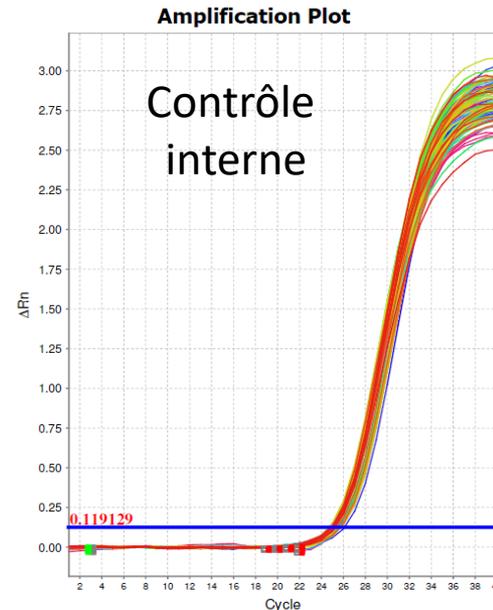
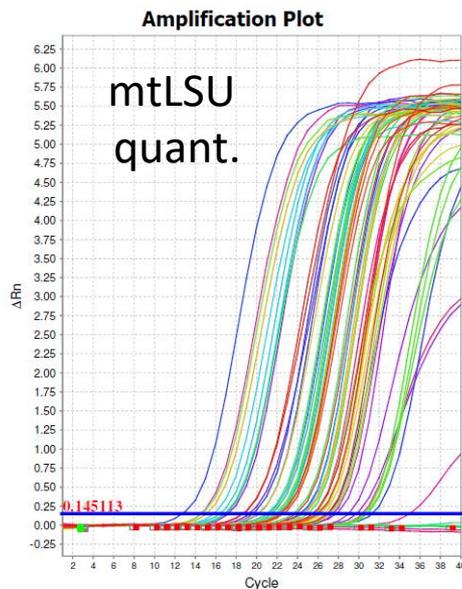
- 81 positifs / 19 positifs faibles / 35 négatifs
- 90% LBA / 7% sécrétions bronchiques
- Extraction sur robot Nuclisens® eMAG®



- $R^2$  of 0.999 / efficacité PCR: > 98%
- 0,3 à  $9,6 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L détectées (cT: 12,8 to 34,9)



# Validation TAAAN RealStar® *P. jirovecii*



- Pas d'inhibition PCR observée
- Même avec échantillons traités pour décont. TB

Limite de détection (LoD): 0,2 copies par  $\mu\text{L}$  (Ct  $\sim$  34,9)

# Performance vs. PCR MLST (5 cibles)

Résultats PCR MLST de géotypage comme standard de référence

N=135	Concordance avec PCR MLST	Discordance avec PCR MLST	%
Sensibilité	98 positifs	2 faux négatifs	98,0%
Spécificité	34 négatifs	1 faux positif	97,1%

- Concordance globale de 97,8% (132/135) avec PCR MLST (5 cibles)
  - Les 2 faux négatifs sont des positifs faibles à la PCR MLST (Ct >35 et < 3/5 cibles positives)
  - Le seul faux positif à la limite de détection de la qPCR Altona (cT 34,93)

# Performance vs. Dx clinique

Résultats de Dx cliniques conventionnels comme standard de référence (113/135)  
IFA,  $\beta$ -D glucan ou pathologie/cytologie

N=113	Concordance Dx clin.	Discordance Dx clin.	%
Sensibilité	80 positifs	5 faux positifs	94,1%
Spécificité	27 négatifs	1 faux négatifs	96,4%

Concordance globale de 94,7% (107/113)

- 4 des 5 faux positifs = faibles positifs par MLST (attendu vu sensibilité TAAN)
- 1 faux négatifs. Aussi négatif par PCR MLST

**Limite: pas de revue complète des dossiers cliniques pour s'assurer qu'il s'agit de cas véritables de PCP.**

# TAAN de détection - modalités

- Analyse offerte depuis le 14 juin
  - Lettre annonce  
[https://www.inspq.qc.ca/sites/default/files/lspq/lettre\\_annonce\\_pneumocystis\\_jirovecii\\_taan\\_quantitatif.pdf](https://www.inspq.qc.ca/sites/default/files/lspq/lettre_annonce_pneumocystis_jirovecii_taan_quantitatif.pdf)
  - Guide de service  
<https://www.inspq.qc.ca/lspq/repertoire-des-analyses/pneumocystis-jirovecii-detection-d-acides-nucleiques-taan-quantitatif>
- Pas pour Dx de première intention
  - Patients avec Dx non-concluant ou négatif en première ligne avec symptômes compatibles
- Dx conventionnel préalable (formulaire requis)
  - Immunofluorescence
  - Coloration
  - $\beta$ -D glucan
  - ...

# TAAN quantitatif *Pneumocystis*- modalités

- **Transport:**
  - Réfrigérés (2-8°C) ou congelés (< -55°C)
  - Envoi sur glace sèche si délais d'expédition >24 hrs
- **Volume demandé: > 0,5 mL**
  - Volume minimal 0,2 mL
  - La quantification au rapport sera basée sur un extrait de 200 µL d'échantillon primaire

# TAAN quantitatif Pneumocystis- modalités

## Spécimens acceptés

- LBA (préférable)
- Expectations / Sécrétions bronchiques

## Spécimens acceptés, mais sous réserve

- Écouvillons nasopharyngés
  - **Attention: sensibilité réduite (environ -5X) – peu d'expérience, effet sur quantification pas testé (commentaire au rapport)**
  - Suggérons milieu UTM **2mL**

## Spécimens non-acceptés (veuillez nous contacter au besoin)

- Spécimens non-respiratoires
- Tissus

# TAAN quantitatif *Pneumocystis*- modalités

- Temps réponse:
  - 3-7 jours ouvrables
  - Fréquence 1 fois semaine (vendredi)
  - Spécimen doit être reçu jeudi avant 16h00
  - Voir calendrier des analyses du LSPQ  
<https://www.inspq.qc.ca/lspq/horaire-des-analyses>

CODE*	ANALYSES	FRÉQUENCES (JOUR)	LE SPÉCIMEN DOIT ÊTRE REÇU AVANT
87050	<i>Pneumocystis</i> ; détection (TAAN quantitatif)	1 fois par semaine (vendredi)	Jeudi 16:00

# TAAN quantitatif *Pneumocystis*- rapport

## Echantillon

Échantillon clinique, Lavage bronchoalvéolaire

No. Référence client:  
S55186 (42934583)

Date de prélèvement: **2019-06-06**

Date de réception au LSPQ: 2019-06-11

Analyse demandée: **Pneumocystis - Recherche et quantification  
d'acides nucléiques**

Échantillon: L00150245001

**Pneumocystis jirovecii**

Technique: PCR quantitative avec détection en temps réel

Résultat

**DéTECTÉ**

**Pneumocystis jirovecii ADN  
Quantification**

**43** copies/µl

DéTECTÉ?

Quantification

Pas de seuil pour  
le moment  
À interpréter à la  
lumière des infos  
cliniques  
disponibles

Épreuve de détection de *Pneumocystis* effectuée par PCR quantitative avec trousse IVD de Realstar *Pneumocystis jirovecii* PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics).

Il n'existe présentement pas de seuil clinique pour départager les patients colonisés (asymptomatiques) de ceux ayant une infection véritable à *P. jirovecii*. La valeur de quantification obtenue doit être interprétée en fonction des manifestations cliniques, tests radiologiques et autres tests de laboratoires disponibles.

Institut national  
de santé publique

Québec



# Seuil clinique (colonisation/infection)

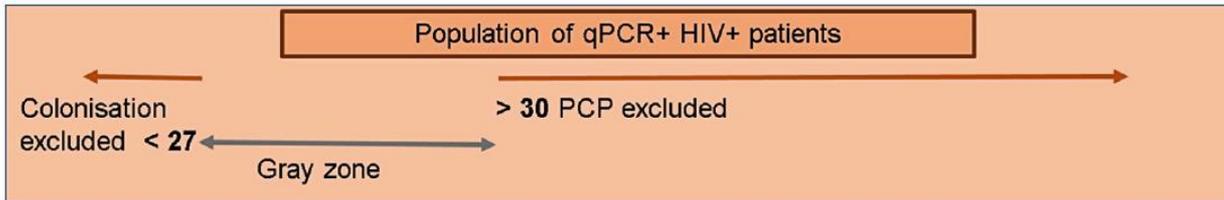
[www.inspq.qc.ca](http://www.inspq.qc.ca)

# Où fixe-t-on le seuil clinique d'infection?

Plusieurs études récentes:

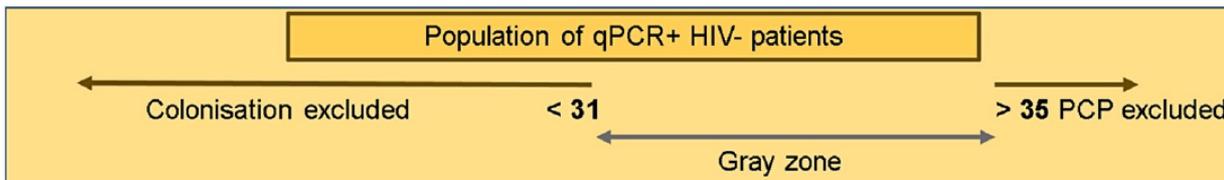
- IFA- /qPCR+ patient: infection ou colonisation?
- dépend du groupe de patient (VIH vs. non-VIH)

mtLSU qPCR: Fauchier T (2016) JCM 54:6



VIH (Ct):

< 27: infection  
27-30: zone grise  
> 30: colonisation



Non-VIH (Ct):

< 31: infection  
31-35: zone grise  
> 35: colonisation

Seuil d'infection à une concentration plus faible  
(Ct plus élevée) pour non-VIH

# Où fixe-t-on le seuil clinique d'infection?

PCP conc.  
distribution

## SickKids avec trousse Altona (200 $\mu\text{L}$ )

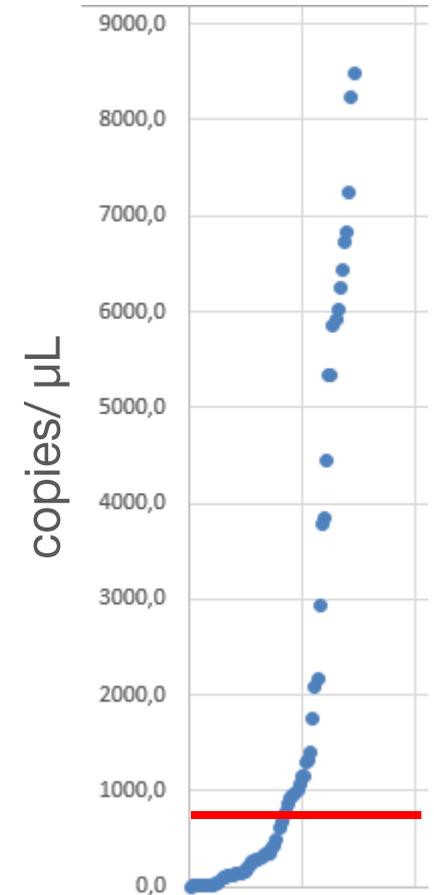
- Standard de référence: IFA
- Seuil: 750 copies /  $\mu\text{L}$  (Ct: 27)
- Taux positivité de 0,9%

## CHU de Lausanne:

- seuil 1000 copies/  $\mu\text{L}$

## LSPQ:

- Conc. enregistrées: 0.2 to  $9 \times 10^6$  copies/  $\mu\text{L}$

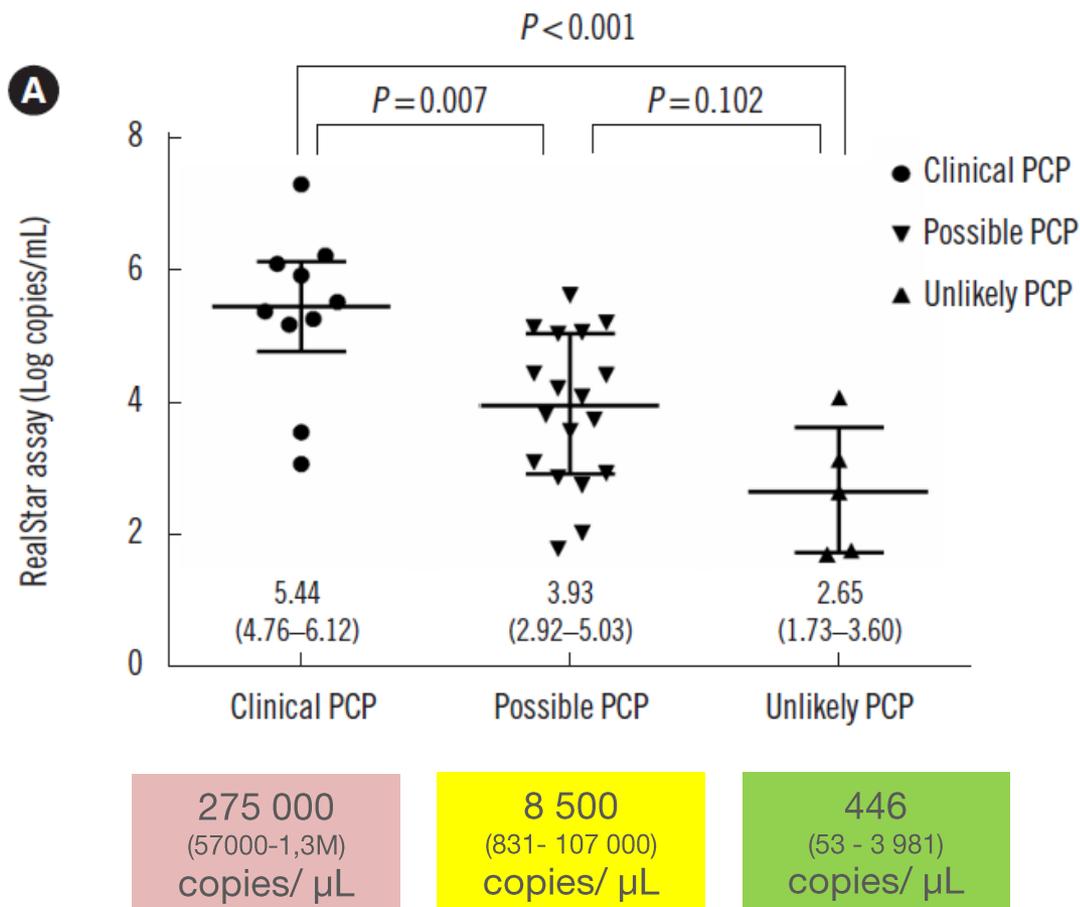


# Comparative Evaluation Between the RealStar *Pneumocystis jirovecii* PCR Kit and the AmpliSens *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*)-FRT PCR Kit for Detecting *P. jirovecii* in Non-HIV Immunocompromised Patients

Hee Jae Huh, M.D.<sup>1\*</sup>, Kyoung Ree Lim, M.D.<sup>2\*</sup>, Chang-Seok Ki, M.D.<sup>3</sup>, Kyungmin Huh, M.D.<sup>2</sup>, Hyang Jin Shim, M.T.<sup>4</sup>

## Trousse Altona

- 159 patients IS non-VIH
- Classification par MD
  - 14 PCP clinique
  - 42 PCP possible
  - 103 peu probable
- Zone grise (PCP possible)
- Bonne distinction entre cas cliniques et peu probables ( $p < 0.001$ )



# Où fixe-t-on le seuil clinique d'infection?

Open Forum Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE



## *Pneumocystis* PCR: It Is Time to Make PCR the Test of Choice

Laura Doyle, Sherilynn Vogel, and Gary W. Procop

Section of Clinical Microbiology, Department of Laboratory Medicine, Pathology and Laboratory Medicine Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio

- Dx PCP pendant 1 an Cleveland Clinic (prévalence) :
  - Standard: 11/1583 (0.7%) / Dx TAAN: 44/1457 (3%)
    - 21 / 44 avaient une faible charge
    - Revue des dossiers de faibles charges: 18/19 (95%) avaient un Dx clinique de PCP

**Faux positifs (colonisés): est-ce véritablement un problème?**

Conclusion: Dx TAAN doit être tjrs être interprété selon manifestations cliniques et autres tests de laboratoire.

# Projet de validation du seuil

[www.inspq.qc.ca](http://www.inspq.qc.ca)

# Formulaire de collecte d'infos cliniques (1)

Réinitialiser le formulaire

Institut national  
de santé publique

Québec



Laboratoire de santé publique  
du Québec

## TAAN Détection – *Pneumocystis jirovecii*

### Formulaire de collecte d'informations cliniques

Ce formulaire doit être rempli électroniquement et soumis, en appuyant sur le bouton « **ENVOYER** » au bas du formulaire, maximum 24h après l'envoi du spécimen au LSPQ. Il est également possible d'imprimer le formulaire, de le remplir et de l'annexer à la requête d'analyse lorsque vous acheminez le spécimen au LSPQ.

Numéro de la requête LSPQ :   A  

- Formulaire obligatoire (non nominatif).
- Doit être soumis max. 24 h après envoi du spécimen
- **Soumission électronique (préférable)** ou papier (si électronique impossible).
- Voir lettre annonce ou guide de service pour fichier PDF.

[https://www.inspq.qc.ca/sites/default/files/lspq/Formulaire\\_collecte\\_info\\_p\\_jirovecii.pdf](https://www.inspq.qc.ca/sites/default/files/lspq/Formulaire_collecte_info_p_jirovecii.pdf)

Institut national  
de santé publique  
Québec



# Formulaire de collecte d'infos cliniques (2)

Numéro de la requête LSPQ :   A  

---

**Antécédent médical (cochez [choix multiples possibles] et complétez si requis)**

Greffe de cellules souches

Greffe d'organe solide    Spécifiez l'organe : \_\_\_\_\_

Chimiothérapie

VIH    Spécifiez le décompte (CD4) : \_\_\_\_\_

Autre cause de lymphopénie    Spécifiez le décompte (CD4) : \_\_\_\_\_

Autre agent immunosuppresseur    Spécifiez le nom : \_\_\_\_\_

Autre(s) condition(s) :    Spécifiez : \_\_\_\_\_

---

**Suspicion clinique (cocher)**

Haute (ex. : traitement débuté)       Moyenne       Faible probabilité

---

**Prophylaxie anti-PCP en cours (cochez et complétez si requis)**

Non     Oui    Spécifiez : \_\_\_\_\_

---

**Médication anti-PCP en cours (cochez [choix multiples possibles])**

TMP-SMX     Dapsone     Atovaquone     Atovaquone / Proguanil     Pentamidine (IV)

# Formulaire de collecte d'infos cliniques (3)

## Autres tests diagnostiques effectués (cochez et complétez si requis)

(Note : le TAAN ne sera offert que si au moins une modalité a été effectuée localement)

Analyse	Fait	Non-fait	Résultat
Immunofluorescence - <b>Trousse</b> :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
$\beta$ -D-glucan*	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Pathologie / Cytologie - <b>Coloration</b> :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Imagerie / Radiologie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Autre :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

\*SVP procédez à un prélèvement pour  $\beta$ -D-glucan de manière concomitante si non-fait.

## Personne contact

Médecin traitant / Autre contact : \_\_\_\_\_

Numéro de téléphone : \_\_\_\_\_ Courriel : \_\_\_\_\_

Pour toutes questions au sujet de cette collecte d'informations, contacter Philippe Dufresne au (514) 457-2070 # 2226, responsable du secteur Mycologie au LSPQ ou Aurélie Perret, concernant la compilation des formulaires au (514) 457-2070 # 2259 ou [biologie.moleculaire@inspq.gc.ca](mailto:biologie.moleculaire@inspq.gc.ca).

**Envoyer**

# Avenues de recherche?

[www.inspq.qc.ca](http://www.inspq.qc.ca)

# Autres applications du TAAN PCP à évaluer

- Dépistage avec ENP ou rinçage buccal
  - Patients pour lesquels il est difficile de prélever un LBA
  - En contexte d'écllosion pour identifier porteurs
  - Surveillance de cohorte à risque
- Suivi de traitement
  - Suivi de charge (suspicion d'échec au traitement)
  - Ex. patient sous traitement en attente de greffe
- Évaluation de prévalence (Travailleurs? Porteurs asymptomatiques?)

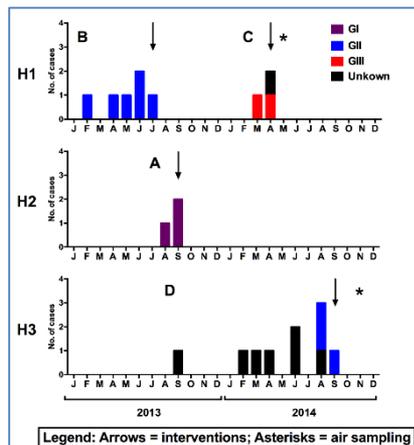
# Génotypage MLST pour investigation d'écllosion

[www.inspq.qc.ca](http://www.inspq.qc.ca)

# Aussi disponible: Génotypage de *Pneumocystis*

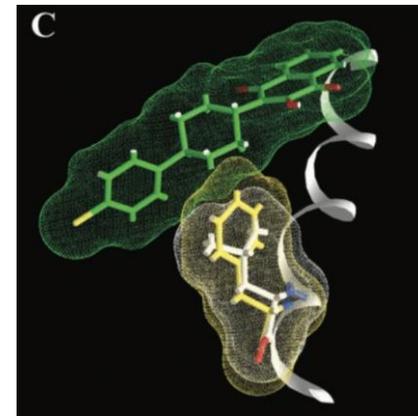
- **MLST *Pneumocystis* (3 gènes: mt26S, CYB, SOD)**
  - Éclosions possibles (>2 cas)
  - Résistance (séquençage cibles DHPS et CYB)
  - Mêmes paramètres pour spécimen et envoi
  - Temps réponse: 14 jour (sur demande seulement)

> 6 éclosions recensées au Qc depuis 2013  
Surtout GMO et greffe rénales



SF Dufresne (HMR)

**Résistance:**  
Éclosion chez patients  
Sous PPx atovaquone



# Sommaire: TAAN quantitatif *Pneumocystis*

[www.inspq.qc.ca](http://www.inspq.qc.ca)

# TAAN de détection - Pneumocystis

## TAAN quantitatif maintenant offert au LSPQ

- >0.5 mL de LBA (ou autres spécimen respiratoires)
- Minimum 200  $\mu$ L
- ENP (avec limitation: si autre prélèvement pas possible)
- Envoi réfrigéré ou congelé

## Pas pour Dx de première intention

- Patients avec Dx non-concluant ou négatif avec symptômes compatibles

Dx conventionnel préalable ( $\beta$ -D glucan concomitant)

Formulaire obligatoire (envoi >24h)

# TAAN de détection - *Pneumocystis*

- Seuil clinique à déterminer
  - Colonisation
  - Infection
- Selon expérience d'autres groupes: seuil possiblement entre 500-1000 copies /  $\mu\text{L}$
- Dx TAAN *Pneumocystis* doit être tjrs être interprété selon manifestations cliniques et résultats d'autres tests de laboratoires

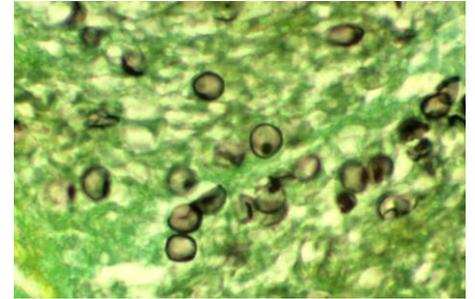
# Remerciements

## Laboratoire de santé publique du Qc

- Lyne Désautels / Sandrine Moreira

## Collaborateurs

- Simon Dufresne (HMR)
- Alex Carignan / Philippe Martin (CHUS)
- Don Vinh (MUHC)
- Dr. Claude Lemieux (CHUM)
- Anne Desjardins (HDQ)



# Questions

