

Place des prélèvements non invasifs dans le diagnostic de la pneumocystose

E. Kaouech, K. Kallel, S. Belhadj, K. Mnif, T. Ben Othmane,
S. Ben Lakhal, T. Ben Châabane, E. Chaker

20^{ème} congrès national d'infectiologie 24 Avril 2010

Pneumocystis jiroveci



pneumopathie interstitielle

déficit immunitaire congénital

déficit immunitaire acquis (SIDA+++)

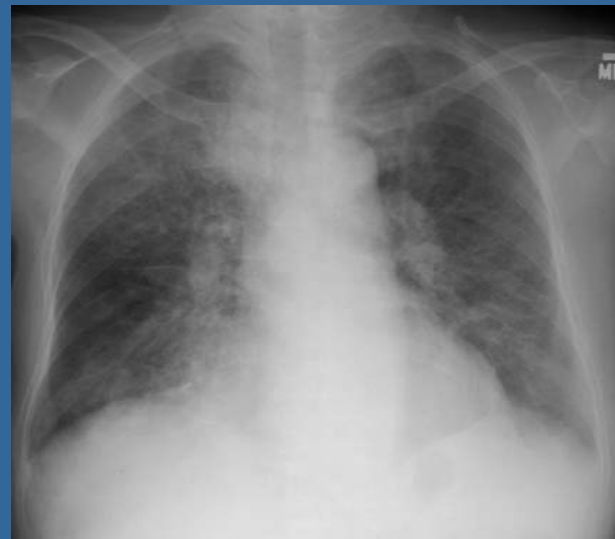
Diagnostic



Aspect clinique

Toux sèche et discrète
Gène respiratoire
Polypnée

Aspect radiologique



Diagnostic

Avant 1982 : biopsie pulmonaire à thorax ouvert

Après 1982 : LBA ++++

Expectoration induite

Crachats

Avenir : rinçage oropharyngé ?

Les sécrétions nasales?

Techniques de coloration spécifiques

Gomori-Grocott, May Grünwald
Giemsa, Gram Weigert et bleu
de toluidine

Biologie moléculaire

PCR en point final, PCR nichée,
RT-PCR

notre étude

Comparer nos résultats (Techniques de coloration et PCR) selon le site de prélèvement

Matériel et méthodes

avril 2005 – décembre 2009

168 patients immunodéprimés

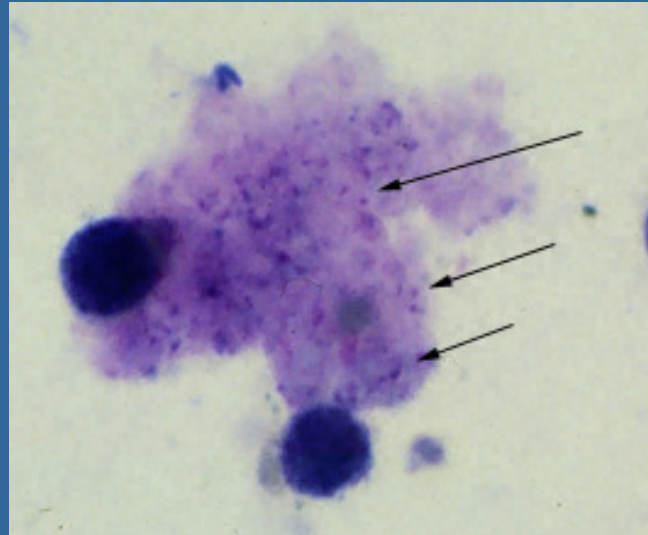
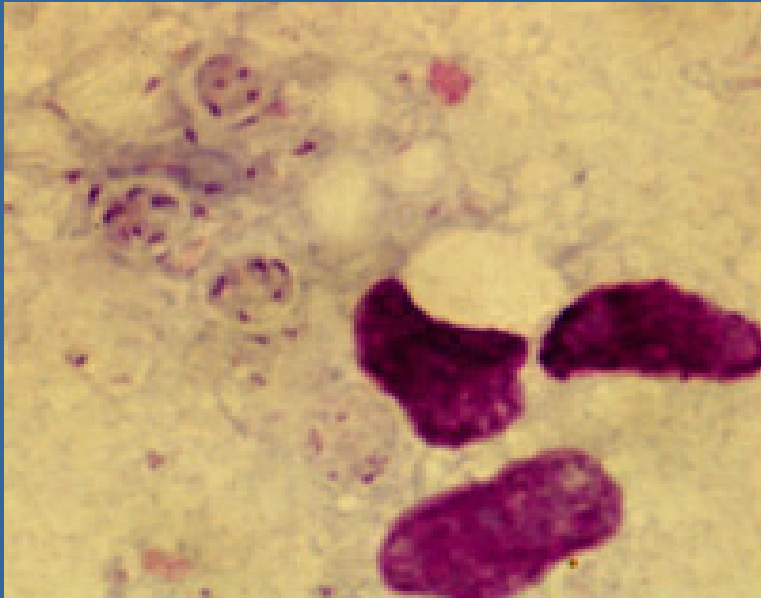
185 prélèvements :

107 prélèvements invasifs

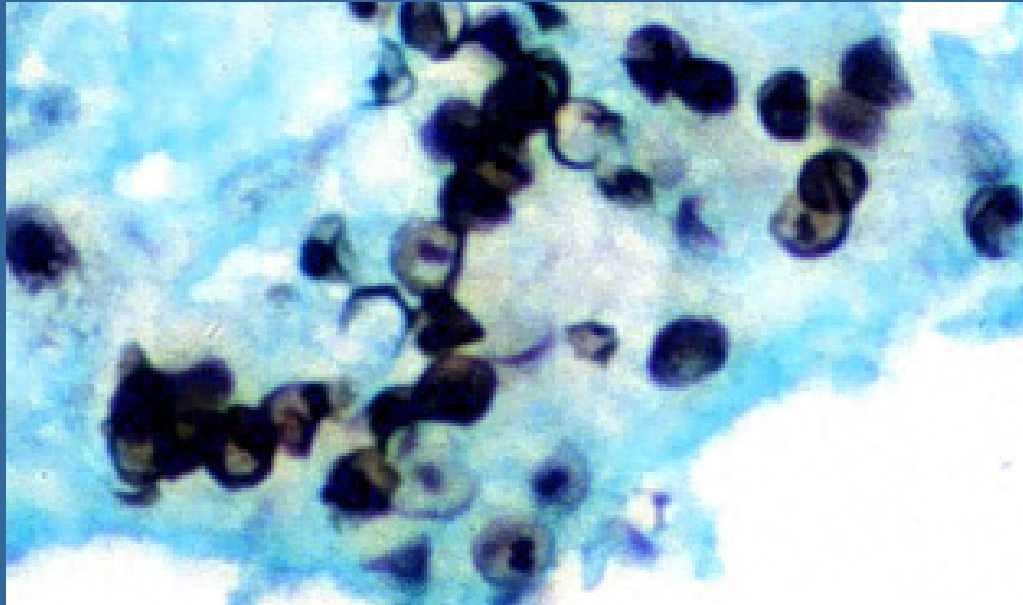
78 prélèvements non invasifs

Les techniques de coloration

La coloration au May Grünwald Giemsa



La coloration au Gomori-Grocott



La PCR en point final

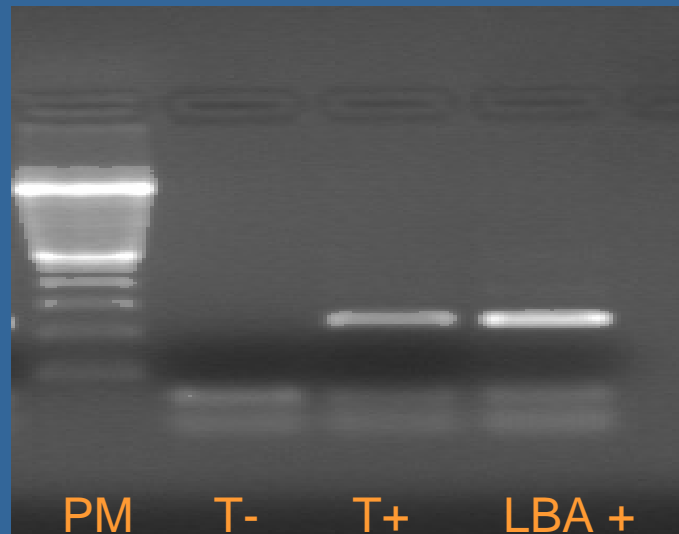
Extraction de l'ADN

QIA Amp DNA Blood Mini kit QIAGEN

PCR

Amorces décrites par Mei et coll.
Protocole de base décrit par Huang et coll.

Bande de 249 pb →



Mei et coll. *Infect. Immun.* 1998; 66, 4268-4273.

Huang et coll. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1999 ; 35, 27-32.

Pneumocystose

**des résultats positifs des
techniques**

un aspect radiologique évocateur

**la décision thérapeutique de mise du patient
sous Triméthoprime- Sulfaméthoxazole**

Résultats

168 patients

**22 patients
atteints de
Pneumocystose**

**146 patients
indemnes**

**17 VIH+, les autres
(un déficit immunitaire
congénital, une cirrhose
post-hépatite C,
lymphome et 2
hémopathies malignes)**

**22 patients
atteints de
Pneumocystose**



**30 prélèvements
broncho-
pulmonaires**

18 prélèvements invasifs

(17 LBA et un liquide
pleural)

12 prélèvements non invasifs

(8 crachats, 2 liquides
bronchiques et 2 PTP)

Résultats globaux

30 prélèvements broncho-pulmonaires

Techniques de coloration

**5 prélèvements
positifs**

une sensibilité 16,7%

une spécificité 100%

PCR

**25 prélèvements
positifs**

une sensibilité 83,3%

une spécificité 97,2%

Résultats selon le site de prélèvement

**18 prélèvements
invasifs**

**Techniques de
coloration**
**5 prélèvements
positifs (5 LBA)**
une sensibilité 27,7%
une spécificité 100%

PCR
**16 prélèvements
positifs (15 LBA et
un LP)**
une sensibilité 88,8%
une spécificité 94,4%

**12 prélèvements non
invasifs**

**Techniques
de coloration**

**Aucun
prélèvement
positif**

PCR

**9 prélèvements positifs
(5 crachats, 2 LB et 2
PTP)**

une sensibilité 75%
une spécificité 100%

Discussion

- Jusqu'aux années 1980



biopsie pulmonaire avec empreintes sur lames ou coupes histologiques (Techniques de coloration)

- Années 1980 aux années 1990



lavages bronchiolo-alvéolaires (Techniques de coloration et PCR)

- Actuellement



expectorations induites, sécrétions bronchiques (Nested-PCR, PCR en point final , PCR en temps réel)

5 prélèvements positifs

Techniques de coloration
(16,7%)

25 prélèvements positifs

PCR
(83,3%)

Flori P et coll. *J. Med. Microbiol.* 2004; 53, 603-607.

Roux P et coll. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32, 2324-2326.

Sing A et coll. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38, 1461-1467.

Weig M et coll. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35,6, 1445-1449.



sensibilité: 25 à 67 %

sensibilité: 87 à 100 %

5 prélèvements invasifs positifs

Techniques de coloration



Lecture difficile des prélèvements pauci-parasités superficiels ou riches en artéfacts (mucus, germes, levures ou hématies)

Ziani-Yaker et coll. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 1997 ; 15, 2, 223-229.

16 prélèvements invasifs et 9 prélèvements non invasifs positifs

PCR



détection de faibles quantités d'ADN (0,5-1 ng/μl)

Extraction et purification concentrent l'échantillon jusqu'à 100 fois en ADN de *P. jiroveci*

Amorces ciblent un gène codant pour la glycoprotéine de surface de *P. jiroveci* présent à plus de 100 copies

Kovacs et coll. *J. Biol. Chem.* 1993; 268, 6034-6040.
Sunkin et coll. *J. Euk. Microbiol.* 1994; 41, 292-300.
Huang et coll. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1999 ; 35, 27-32.

prélèvements invasifs

PCR

une sensibilité 88,8%
une spécificité 94,4%

prélèvements non invasifs

PCR

une sensibilité 75%
une spécificité 100%

Latouche et coll. *Rev. Fr. labo.* 2000 ; 320, 63-69.

Durand et coll. *FEMS Immun. Microbiol.* 2005; 45, 405-410

Turner et coll. *Eur. Respir. J.* 2003, 21, 204-208.



sensibilité: 100%

sensibilité: 75 à 94%

prélèvements invasifs



Portage asymptomatique ou infra-clinique
annonçant la maladie ?



Présence d'un très faible nombre de trophozoïtes et/ou de
kystes de *P. jiroveci* qui pourraient être présents dans la
flore commensale normale

Ribes et coll. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35, 4, 830-835

Brancart et coll. *Journal of Microbiological Methods.* 2005; 61: 381-387.

prélèvements non invasifs



Facile à réaliser

Répéter les prélèvements
(contrôle après
traitement)

Absence de contre
indication



Volume recueilli

Parasitisme moins
intense

Latouche et coll. *Rev. Fr. labo.* 2000 ; 320, 63-69.

Durand et coll. *FEMS Immun. Microbiol.* 2005; 45, 405-410

Turner et coll. *Eur. Respir. J.* 2003, 21, 204-208.

Latouche et coll. *Rev. Fr. labo.* 2000 ; 320, 63-69.

Durand et coll. *FEMS Immun. Microbiol.* 2005; 45, 405-410

Turner et coll. *Eur. Respir. J.* 2003, 21, 204-208



Sécrétions nasales (sensibilité : 93%)

rinçages oropharyngés (sensibilité: 75 à 83%)

Conclusion

Devant une symptomatologie clinique évocatrice, la PCR conventionnelle, technique sensible et efficace, permet ainsi le diagnostic de la pneumocystose dans de tels prélèvements peu invasifs :

Les crachats

Les sécrétions nasales ou les rinçages oropharyngés?