 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ENREGISTREMENT QUALITE	EQ/PMT/606
CBP-Institut de Microbiologie Laboratoire de Parasitologie Mycologie UF Pathologies Fongiques	VERIFICATION DE METHODE Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel Méthode quantitative (Portée A)	V : 01 Date : 01/10/2013 Page 1 sur 14

Note : le laboratoire se référera au tableau du § 9.2.1 du Document Cofrac SH GTA 04 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B¹) et complètera **une fiche par examen de biologie médicale**


EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :
Détection d'ADN de *Pneumocystis jirovecii* par PCR en temps réel

La détection de *Pneumocystis jirovecii* par PCR en temps réel est réalisée systématiquement pour les liquides de lavage broncho-alvéolaire réceptionnés au laboratoire provenant des services cliniques du CHR de Lille, en parallèle avec les techniques microscopiques (colorations de Giemsa et BTO, et en cas de discordance, IFI).


Les techniques microscopiques ne sont pas réalisées pour les autres prélèvements (LROP, crachats, aspiration bronchique,...).

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande :	Gène codant pour la grande sous-unité de l'ADN ribosomal mitochondrial (mtLSU) de <i>Pneumocystis jirovecii</i>
Principe de la Mesure :	PCR en temps réel avec sonde d'hydrolyse Taqman MGB. Utilise un couple d'amorces et une sonde spécifiques de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .
Méthode de mesure :	Obtention d'une courbe d'amplification dont la valeur du Ct est proportionnelle à la quantité d'ADN fongique présent initialement dans la prise d'essai.
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) :	Prélèvements respiratoires et pulmonaires (LBA, LROP, crachats induits, crachats, aspirations bronchiques, liquide pleural, biopsies).
Type de récipient, Additifs (tubes, ...) :	Pot stérile
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	LBA, LROP : centrifugation 4000 rpm 10 min
Unités :	Cp / nombre de copies du gène mtLSU/µl
Intervalles de référence² :	Tout échantillon pour lequel un signal est détecté est considéré comme positif avec l'interprétation suivant (cf évaluation des performances de la méthode) : <ul style="list-style-type: none"> • Cp ≤ 41 : Positif • Cp > 41 et ≤ 43 : Faiblement positif • Cp > 43 : Très faiblement positif
Marquage CE (Oui/Non) :	Non
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA
Instrument (analyseur automatique, etc.) :	7500 Fast Real-Time PCR System [®] - Applied Biosystems
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :	Méthode publiée (Alanio et al. Clin Microbiol Infect 2011) Réactifs :

² Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...


	ENREGISTREMENT QUALITE	EQ/PMT/606
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	VERIFICATION DE METHODE Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel Méthode quantitative (Portée A)	V : 01
CBP-Institut de Microbiologie		Date : 01/10/2013
Laboratoire de Parasitologie Mycologie <i>UF Pathologies Fongiques</i>		Page 2 sur 14

	<ul style="list-style-type: none"> - QiaAmp DNA Tissue minikit[®], ref 51304 – Qiagen, Version Juin 2012 - TaqMan[®] Universal PCR Master Mix[®], ref 4304437- Applied Biosystems, Version juillet 2010 - TaqMan Exogenous Internal Positive Control reagents[®], ref 4308323- Applied Biosystems <p><u>Sonde Taqman MGB</u> : PjSL Réf 4316034 - Applied Biosystems</p> <p><u>Amorces</u> : fournisseur selon le marché PjF1/PjR1</p>
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique :	NA
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Gamme d'ADN plasmidique contenant 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ copies du gène mtLSU/μl


 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ENREGISTREMENT QUALITE	EQ/PMT/606
CBP-Institut de Microbiologie Laboratoire de Parasitologie Mycologie <i>UF Pathologies Fongiques</i>	VERIFICATION DE METHODE Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel Méthode quantitative (Portée A)	V : 01 Date : 01/10/2013 Page 3 sur 14

MISE EN OEUVRE	
Opérateurs (Habilitation) :	Filomena NAJI, Michèle WAUQUIER (Techniciennes), Drs Emilie FREALLE, Isabelle JOLY et Eduardo DEI-CAS (biologistes)
Procédure de validation :	PG/CBP/020 Vérification / Validation d'une méthode en biologie médicale
Procédure de gestion de la portée flexible :	PG/QRE/004 Gestion des portées d'accréditation PG/CBP/023 Mise œuvre d'un examen de biologie médicale
Période d'évaluation :	Avril-juillet 2012
Date de mise en service :	Octobre 2012
Autorisation par :	Dr Emilie FREALLE (PH)

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	LROP : prélèvement à jeun ou à distance d'un repas, acheminement dans la glace dans l'heure au laboratoire.	Catalogue CIRUS (services de soins du CHRU de Lille) Catalogue des analyses du Centre de Biologie Pathologie http://biologiepathologie.chru-lille.fr/ (demandeurs extérieurs) Maîtrise du préanalytique (personnel habilité, modes opératoires,...) PR/PMT/802 Gestion et traçabilité des non-conformités à la réception des prélèvements
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	LBA, LROP : centrifugation 4000 rpm 10 min	MO/PMT/605 Préparation des échantillons pour la détection d'ADN fongique par PCR ou PCR en temps réel Maintenance de sécurité des centrifugeuses


 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ENREGISTREMENT QUALITE	EQ/PMT/606
CBP-Institut de Microbiologie Laboratoire de Parasitologie Mycologie <i>UF Pathologies Fongiques</i>	VERIFICATION DE METHODE Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel Méthode quantitative (Portée A)	V : 01 Date : 01/10/2013 Page 4 sur 14

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Habilitation du personnel technique et des biologistes	FE/PMT/806 Habilitation Technicien(ne) Biologie Moléculaire EQ/PMT/803 Habilitation des praticiens en Parasitologie-Mycologie
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :	Contamination des échantillons par de l'ADN de <i>P. jirovecii</i> présent dans l'air	Locaux aménagés et circuit à sens unique : - Pièce de réception et enregistrement des échantillons - Pièce d'extraction d'ADN - Pièce de préparation du Mix (sans ADN) - Pièce post-amplification Extraction d'ADN sous PSM Nettoyage des surfaces Inclusion d'une étape de prétraitement des échantillons par l'UNG dans le cycle de PCR temps réel.
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	<u>Réactifs :</u> - QiaAmp DNA Tissue minikit [®] , ref 51304 – Qiagen - TaqMan [®] Universal PCR Master Mix [®] , ref 4304437- Applied Biosystems - TaqMan Exogenous Internal Positive Control reagents [®] , ref 4308323- Applied Biosystems <u>Sonde Taqman MGB :</u> PjSL Réf 4316034 - Applied Biosystems <u>Amorces :</u> fournisseur selon le marché PjF1/PjR1	PR/PMT/803 Gestion des commandes et des stocks A chaque changement de lot vérifier la version de la notice LG/PMT/610 Notices de réactifs, contrôles, calibrateurs et kits en biologie moléculaire Suivi de la stabilité des CIQ dans BioRad URT à chaque changement de lot de sonde ou d'amorces
Matériau de références (témoins) :		PR/PMT/805 Gestion des Contrôles internes de qualité (CIQ) et des Evaluations externes de la qualité (EEQ)

 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ENREGISTREMENT QUALITE	EQ/PMT/606
CBP-Institut de Microbiologie Laboratoire de Parasitologie Mycologie UF Pathologies Fongiques	VERIFICATION DE METHODE Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel Méthode quantitative (Portée A)	V : 01 Date : 01/10/2013 Page 5 sur 14

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
	<p>CIQ négatifs : 1 témoin d'extraction d'ADN et 1 témoin Mix</p> <p>CIQ positifs préparé au laboratoire : gamme d'ADN plasmidique contenant 10⁵, 10⁴, 10³ copies du gène mtLSU/μl</p> <p style="text-align: center;">Inhibiteurs de PCR</p> <p style="text-align: center;">EEQ QCMD (depuis 2012) et CTCB (à partir de 2014)</p>	<p>CIQ négatifs et positifs passés à chaque série et suivi du Cp des CIQ positifs dans BioRad URT</p> <p>Echantillons passés en triplicat : au pur, au ½ et au pur avec recherche d'inhibiteurs par kit « TaqMan Exogenous Internal Positive Control reagents »</p> <p>EQ/PMT/806 Exploitation des EEQ du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie</p>
<p>Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques</p>	<p>7500 Fast Real-Time PCR System®- Applied Biosystems</p> <p>Pipettes</p> <p>Réfrigérateurs, congélateurs</p>	<p>Maintenance annuelle du fabricant</p> <p>Vérification 1x/an par les référents métrologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Contrôle des températures sur centrale de température - Cartographie des réfrigérateurs et des congélateurs - Surveillance des sondes avec étalonnage tous les 18 mois

* item à renseigner si nécessaire

 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ENREGISTREMENT QUALITE	EQ/PMT/606
CBP-Institut de Microbiologie Laboratoire de Parasitologie Mycologie UF Pathologies Fongiques	VERIFICATION DE METHODE Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel Méthode quantitative (Portée A)	V : 01 Date : 01/10/2013 Page 6 sur 14

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

REPETABILITE

La répétabilité a été étudiée sur :

- un échantillon de patient fortement positif (Cp~27)
- un échantillon de patient faiblement positif (Cp~40)

Les résultats sont les suivants :

Pour le Cp :

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne ³	Ecart-type	CV (%)
Echantillon patient fortement positif (Cp~27)	6	26,82	0,28	1,03%
Echantillon patient faiblement positif (Cp~40)	6	40,95	0,75	1,83%

Pour les quantités mesurées en copies/µl :

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)
Echantillon patient fortement positif (Cp~27)	6	4,11 ^E 04	0,70 ^E 04	17,11%
Echantillon patient faiblement positif (Cp~40)	6	7,66	3,20	41,74%

Conclusions :

Pour le Cp : Des CV faibles sont obtenus pour les Cp. Ces derniers sont utilisés pour l'interprétation des résultats (positif, faiblement positif, très faiblement positif). La répétabilité est satisfaisante.

Pour les quantités mesurées en copies/µl : Des CV plus importants sont observés. Ces résultats sont donnés à titre indicatif. Ils ne sont pas rendus au clinicien.

A noter qu'un écart-type et CV plus importants sont observés pour l'échantillon contenant des quantités plus faibles d'ADN.


FIDELITE INTERMEDIAIRE

La fidélité intermédiaire a été étudiée sur le suivi des Cp des 3 points de la gamme d'ADN plasmidique passés dans chaque série. Les résultats sont les suivants :

Résumé des statistiques	Mois	Cumulatif	Mois	Cumulatif	Mois	Cumulatif
30/09/2013 15:26:46						
Moyenne	25,31	25,45	29,06	29,18	32,54	32,83
ET	0,21	0,34	0,25	0,37	0,26	0,46
CV	0,82	1,32	0,85	1,27	0,81	1,39
Pts	5	21	5	21	5	21


Conclusions : Des CV faibles sont obtenus. La fidélité intermédiaire est satisfaisante.

³ Nombre de chiffres significatifs

 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ENREGISTREMENT QUALITE	EQ/PMT/606
CBP-Institut de Microbiologie Laboratoire de Parasitologie Mycologie UF Pathologies Fongiques	VERIFICATION DE METHODE Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel Méthode quantitative (Portée A)	V : 01 Date : 01/10/2013 Page 7 sur 14

COMPARAISON DE METHODES

Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	En fonction du type d'échantillon (LROP, crachat, crachat induit, LBA) : <ul style="list-style-type: none"> - PCR en temps réel : sensibilité de la de 89 à 99% ; spécificité de 80 à 94% - Coloration Giemsa : sensibilité de la de 30 à 82% ; spécificité de 98 à 100% - Coloration BTO : sensibilité de la de 30 à 80% ; spécificité de 100% (cf Annexe 2, Harris et al. 2011)																														
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :	PCR en temps réel sur LightCycler 1.0 (MO/PMT/904 Détection d'ADN de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel sur LightCycler 1.0) Interprétation en fonction des résultats de l'examen microscopique (coloration Giemsa, BTO, Immunofluorescence indirecte)																														
Nombre de mesures :	Analyse prospective en 2012 : 153 échantillons,																														
Descriptif de l'échantillon étudié :	140 LBA, 4 crachats, 4 aspirations bronchiques/trachéales, 4 LROP, 1 liquide pleural																														
Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :	Etude des concordances																														
Résultats et interprétations des discordances :	<p><u>LBA (n=140) :</u> Prélèvements positifs en microscopie (n=7) : 100% de positifs pour les 2 techniques. Des Cp plus faibles sont obtenus pour la technique Applied 7500 (cf résultats détaillés en Annexe 2). Le Cp moyen est de 31,43 pour la méthode Applied 7500 lorsque l'examen direct est positif. Hormis 1 échantillon pour lequel un Cp de 36,07, le C_pmax est de 33,27.</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th></th> <th>Nombre d'échantillons</th> <th>Cp moyen</th> <th>Cp Min</th> <th>Cp Max</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PCR Applied 7500</td> <td style="text-align: center;">7</td> <td style="text-align: center;">31,43</td> <td style="text-align: center;">25,39</td> <td style="text-align: center;">36,07</td> </tr> <tr> <td>PCR LightCycler 1.0</td> <td style="text-align: center;">7</td> <td style="text-align: center;">39,34</td> <td style="text-align: center;">32,82</td> <td style="text-align: center;">>41</td> </tr> </tbody> </table> <p>Prélèvements négatifs en microscopie (n=133) : La technique Applied 7500 est beaucoup plus sensible que la technique LightCycler : 5 échantillons sont positifs pour les 2 techniques ; 19 positifs supplémentaires sont détectés par la technique Applied 7500.</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th colspan="2"></th> <th colspan="2">PCR LightCycler 1.0</th> </tr> <tr> <th colspan="2"></th> <th>Négatif</th> <th>Positif</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th rowspan="2">PCR Applied 7500</th> <th>Négatif</th> <td style="text-align: center;">109</td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> <tr> <th>Positif</th> <td style="text-align: center;">19</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> </tbody> </table> <p>Comparaison des Cp : Comme précédemment, des Cp plus faibles sont obtenus pour la technique Applied 7500 (cf résultats détaillés en Annexe 2). Pour la méthode Applied 7500 : <ul style="list-style-type: none"> - Le Cp moyen est de 38,45 lorsque l'examen direct est négatif. - Hormis 1 échantillon pour lequel un Cp de 26,13 est retrouvé, le C_pmin est de 33,32. </p>		Nombre d'échantillons	Cp moyen	Cp Min	Cp Max	PCR Applied 7500	7	31,43	25,39	36,07	PCR LightCycler 1.0	7	39,34	32,82	>41			PCR LightCycler 1.0				Négatif	Positif	PCR Applied 7500	Négatif	109	0	Positif	19	5
	Nombre d'échantillons	Cp moyen	Cp Min	Cp Max																											
PCR Applied 7500	7	31,43	25,39	36,07																											
PCR LightCycler 1.0	7	39,34	32,82	>41																											
		PCR LightCycler 1.0																													
		Négatif	Positif																												
PCR Applied 7500	Négatif	109	0																												
	Positif	19	5																												

 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ENREGISTREMENT QUALITE	EQ/PMT/606
CBP-Institut de Microbiologie Laboratoire de Parasitologie Mycologie UF Pathologies Fongiques	VERIFICATION DE METHODE Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel Méthode quantitative (Portée A)	V : 01 Date : 01/10/2013 Page 8 sur 14

		Nombre d'échantillons	Cp moyen	Cp Min	Cp Max
PCR LightCycler 1.0		5	40,16	36,94	>41
PCR Applied 7500	Tous les échantillons	24	38,45	26,13	43,06
	Echantillons positifs par PCR LightCycler 1.0	5	32,10	26,13	34,12
	Echantillons négatifs par PCR LightCycler 1.0	19	40,12	33,99	43,06

La spécificité de l'amplification pour les échantillons avec Cp>41 a été vérifiée par PCR nichée sur 2 échantillons.

Crachats (n=4) : 2 échantillons sur 4 sont positifs pour les 2 techniques (100% de concordance)

		PCR LightCycler 1.0	
		Négatif	Positif
PCR Applied 7500	Négatif	2	0
	Positif	0	2

LROP (n=4) : 1 échantillon sur 4 est positif pour la technique Applied 7500 uniquement.

		PCR LightCycler 1.0	
		Négatif	Positif
PCR Applied 7500	Négatif	3	0
	Positif	1	0

Conclusions et dispositions⁴ :

Les 2 techniques permettent la confirmation de pneumocystose en cas d'examen microscopique positif, mais la PCR Taqman sur Applied 7500 est nettement plus sensible que la PCR sur LightCycler 1.0.

Hormis les cas particuliers d'un échantillon avec un Cp à 26,13 négatif en microscopie et d'un échantillon avec un Cp à 36,07 positif en microscopie, le Cp seuil en-dessous duquel la détection microscopique de *Pneumocystis* est positive peut être estimé à environ 33.

Même si des Cp plus faibles sont en faveur d'une pneumocystose ($\leq 36,07$) et des Cp plus élevés (≥ 40) sont plus fréquemment associés à un portage, le Cp ne permet pas de différencier pneumocystose et portage (cf résultats détaillés en Annexe 2).

Ces résultats confirment les données publiées par Alanio et al. (Alanio et al. 2011).


Les seuils suivants sont proposés pour l'interprétation des résultats (rendu qualitatif sur le compte-rendu) :

- **Cp ≤ 41 :** Positif
- **Cp > 41 et ≤ 43 :** Faiblement positif
- **Cp > 43 :** Très faiblement positif

Le commentaire suivant est imprimé sur chaque compte-rendu :

- 1 - Un résultat de PCR-*Pneumocystis* négatif rend improbable le diagnostic de pneumocystose.
- 2 - Un résultat de PCR-*Pneumocystis* positif associé à un examen microscopique négatif :

⁴ Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation **transitoire et documentée** d'un facteur de correction).

 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ENREGISTREMENT QUALITE	EQ/PMT/606
CBP-Institut de Microbiologie Laboratoire de Parasitologie Mycologie UF Pathologies Fongiques	VERIFICATION DE METHODE Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel Méthode quantitative (Portée A)	V : 01 Date : 01/10/2013 Page 9 sur 14


	<p>a. en présence de symptômes évocateurs, rend probable le diagnostic de pneumocystose. b. en absence de symptômes évocateurs, indique que votre patient est un porteur de <i>Pneumocystis jirovecii</i>.</p> <p>3 - La conduite tenir face à un patient porteur ou colonisé par <i>Pneumocystis</i> est fonction du contexte clinique et radiologique.</p>
--	---

INTERVALLE DE MESURE (indispensable en portée B) (si possible et pertinent, ex : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH) :	
Mode de détermination :	Gamme de dilution d'ADN plasmidique de <i>Pneumocystis</i> 10 ⁵ à 10 ⁻¹ copies/µl du gène mtLSU
Limite inférieure de linéarité (de quantification)/ Profil de fidélité :	1 copie/µl
Limite supérieure de linéarité :	10 ⁵ copies/µl

INTERFERENCES (ex : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) :	
Vérification bibliographique :	Inhibition possible de la réaction de PCR, notamment en présence de sang (hémoglobine)
Vérification :	Recherche d'inhibiteurs de PCR sur chaque échantillon

CONTAMINATION	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles :	OUI (risque de contamination inter-échantillons lors de la distribution des ADN sur la microplaque)
Inter réactif si nécessaire :	NON
Vérification bibliographique :	NA
Vérification sur site :	Distribution de 6 échantillons fortement positifs, 6 témoins négatifs et 6 échantillons faiblement positifs sur 3 lignes de la microplaques : Absence de contamination inter-échantillons.


<p>Commentaires éventuels :</p> <p>Aptitude de la PCR en temps réel Taqman mtLSU sur Applied 7500 pour la détection de <i>Pneumocystis jirovecii</i> dans les prélèvements respiratoires et pulmonaires.</p>
--

	ENREGISTREMENT QUALITE	EQ/PMT/606
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	VERIFICATION DE METHODE Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel Méthode quantitative (Portée A)	V : 01
CBP-Institut de Microbiologie		Date : 01/10/2013
Laboratoire de Parasitologie Mycologie <i>UF Pathologies Fongiques</i>		Page 10 sur 14

Date de mise en application : 01/10/2013

Responsable : Dr Emilie FREALLE

Utilisation sous accréditation à partir du :

	ENREGISTREMENT QUALITE	EQ/PMT/606
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	VERIFICATION DE METHODE Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel Méthode quantitative (Portée A)	V : 01
CBP-Institut de Microbiologie		Date : 01/10/2013
Laboratoire de Parasitologie Mycologie UF Pathologies Fongiques		Page 11 sur 14


Références

ALANIO A, DESOUBEUX G, SARFATI C, HAMANE S, BERGERON A, AZOULAY E, MOLINA JM, DEROUIN F, MENOTTI J. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. Clin Microbiol Infect. 2011. 17:1531-7.

DURAND-JOLY I, CHABE M, SOULA F, DELHAES L, CAMUS D, DEI-CAS E. Molecular diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. FEMS Immunol Med Microbiol 2005. 45, 405-10.

HARRIS JR, MARSTON BJ, SANGRUJEE N, DUPLESSIS D, PARK B. Cost-effectiveness analysis of diagnostic options for *Pneumocystis* pneumonia (PCP). PLoS One. 2011. 6(8):e23158.

WAKEFIELD AE, PIXLEY FJ, BANERJI S, SINCLAIR K, MILLER RF, MOXON ER, HOPKIN JM. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. Lancet. 1990. 336(8713):451-3.


 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ENREGISTREMENT QUALITE	EQ/PMT/606
CBP-Institut de Microbiologie Laboratoire de Parasitologie Mycologie <i>UF Pathologies Fongiques</i>	VERIFICATION DE METHODE Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel Méthode quantitative (Portée A)	V : 01 Date : 01/10/2013 Page 12 sur 14

Annexe 1 : Sensibilité et spécificité des méthodes pour le diagnostic des pneumocystoses (Harris et al. 2011)

Diagnostic	Specimen collection	Sensitivity	Specificity	Cost (USD)
CXR	None	0.86	0.40	\$40.00
DQ	Oral wash	0.30	1.00	\$2.32
	Expectorated sputum	0.60	1.00	\$2.22
	Induced sputum	0.75	1.00	\$8.72
	Bronchoalveolar lavage	0.75	1.00	\$77.12
GMS	Oral wash	0.30	1.00	\$4.21
	Expectorated sputum	0.52	0.95	\$4.11
	Induced sputum	0.70	0.96	\$10.61
	Bronchoalveolar lavage	0.82	0.98	\$79.01
TBO	Oral wash	0.30	1.00	\$0.93
	Expectorated sputum	0.71	1.00	\$0.83
	Induced sputum	0.75	1.00	\$7.33
	Bronchoalveolar lavage	0.80	1.00	\$75.73
CW	Oral wash	0.30	1.00	\$2.94
	Expectorated sputum	0.33	1.00	\$2.84
	Induced sputum	0.57	1.00	\$9.34
	Bronchoalveolar lavage	0.78	1.00	\$77.74
IFA	Oral wash	0.30	1.00	\$20.79
	Expectorated sputum	0.50	1.00	\$20.69
	Induced sputum	0.81	1.00	\$27.19
	Bronchoalveolar lavage	1.00	1.00	\$95.59
PCR	Oral wash	0.71	0.99	\$8.78
	Expectorated sputum	0.85	0.99	\$8.68
	Induced sputum	0.94	0.99	\$15.18
	Bronchoalveolar lavage	1.00	0.94	\$83.58
nPCR	Oral wash	0.83	1.00	\$10.32
	Expectorated sputum	0.91	1.00	\$10.22
	Induced sputum	1.00	1.00	\$16.72
	Bronchoalveolar lavage	1.00	0.89	\$85.12
rtPCR	Oral wash	0.89	0.94	\$13.84
	Expectorated sputum	0.92	0.94	\$13.74
	Induced sputum	0.95	0.90	\$20.24
	Bronchoalveolar lavage	0.99	0.80	\$88.64

CXR: Chest x-ray; DQ: Diff-Quick; GMS: Grocott's Methenamine Silver Stain; TBO: Toluidine Blue O; CW: Calcofluor white stain; IFA: Immunofluorescence; PCR: Polymerase chain reaction; nPCR: nested PCR; rtPCR: real-time (quantitative) PCR.

doi:10.1371/journal.pone.0023158.t001

 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ENREGISTREMENT QUALITE	EQ/PMT/606
CBP-Institut de Microbiologie Laboratoire de Parasitologie Mycologie <i>UF Pathologies Fongiques</i>	VERIFICATION DE METHODE Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel Méthode quantitative (Portée A)	V : 01 Date : 01/10/2013 Page 13 sur 14


Annexe 2 : Comparaison des PCR en temps réel sur LightCycler 1.0 et sur Applied 7500 pour la détection de *P. jirovecii* : Résultats détaillés des prélèvements positifs

LBA positifs en microscopie (pneumocystose confirmée) :

		Examen microscopique (Giemsa, BTO, IFI)	LightCycler			Applied		
			Résultats (en Cp) PUR	Résultats (en Cp) 1/4	Inhibiteurs	Résultats (en Cp) PUR	Résultats (en Cp) PUR avec IPC	IPC (en Cp)
1	LBA	R kystes (atypiques)	15,51	38,79	+	30,95	32,11	32,72
2	LBA	TR kystes	33,81	32,82	-	25,39	26,1	35,83
3	LBA	R kystes	neg	39,79	-	32,21	32,03	31,48
4	LBA	R kystes en IFI	>41	>41	-	32,71	32,2	32,13
5	LBA	1 amas de kystes	>41	>41	-	36,07	41,31	32,56
6	LBA	R kystes	>41	>41	+	33,27	33,36	31,58
7	LBA	PN kystes en IFI	>41	>41	-	29,43	29,33	31,57

LBA négatifs en microscopie :

		Examen microscopique (Giemsa, BTO, IFI)	LightCycler			Applied		
			Résultats (en Cp) PUR	Résultats (en Cp) 1/4	Inhibiteurs	Résultats (en Cp) PUR	Résultats (en Cp) PUR avec IPC	IPC (en Cp)
1	LBA	neg	37,87	36,94	-	26,13	26,23	32,22
2	LBA	neg	>41	>41	-	33,46	35,02	32,1
3	LBA	neg	>41	>41	-	33,32	33,66	33,4
4	LBA	neg	40,85	>41	-	34,12	35,63	32,17
5	LBA	neg	>41	neg	+	33,45	34,22	31,77
6	LBA	neg	neg	neg	-	37,48	41,93	32,13
7	LBA	neg	neg	neg	+	33,99	33,21	33,34
8	LBA	neg	neg	neg	-	37,36	37,98	29,65
9	LBA	neg	neg	neg	-	39,11	>45	31,65
10	LBA	neg	neg	neg	-	36,98	40,7	31,75
11	LBA	neg	neg	neg	-	37,35	40,92	32,72
12	LBA	neg	neg	neg	-	39,9	neg	31,85
13	LBA	neg	neg	neg	-	40,82	42,63	32,47
14	LBA	neg	neg	neg	+	40,21	41,72	34,65
15	LBA	NR	neg	neg	-	42,08	neg	32,1
16	LBA	neg	neg	neg	-	41,6	neg	31,54
17	LBA	neg	neg	neg	-	42,63	neg	32,13
18	LBA	neg	neg	neg	-	42,12	neg	32,32
19	LBA	neg	neg	neg	+	41,26	neg	34,03
20	LBA	neg	neg	neg	-	43,06	neg	32,02
21	LBA	neg	neg	neg	-	40,79	neg	32,42
22	LBA	neg	neg	neg	-	neg	42,25	30,9
23	LBA	neg	neg	neg	-	41,53	neg	31,62
24	LBA	neg	neg	neg	-	41,7	neg	32,69

 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ENREGISTREMENT QUALITE	EQ/PMT/606
CBP-Institut de Microbiologie Laboratoire de Parasitologie Mycologie <i>UF Pathologies Fongiques</i>	VERIFICATION DE METHODE Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel Méthode quantitative (Portée A)	V : 01 Date : 01/10/2013 Page 14 sur 14

Autres échantillons :

		LightCycler			Applied		
		Résultats (en Cp) <i>PUR</i>	Résultats (en Cp) 1/4	Inhibiteurs	Résultats (en Cp) <i>PUR</i>	Résultats (en Cp) <i>PUR</i> avec <i>IPC</i>	IPC (en Cp)
1	CRACHAT	neg	36,4	+	29,1	29,05	33,37
2	CRACHAT	neg	37,78	+++	33,17	34,04	31,51
3	Asp bronchique	neg	37,78	+	32,29	33	29,7
4	Asp bronchique	neg	neg	+	39,93	neg	33,43
5	Asp bronchique	neg	neg	+	42,36	42,98	33,49
6	LROP	neg	neg	-	36,5	38,12	31,7