



HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ

ARGUMENTAIRE

Évaluation des actes de diagnostic biologique de la pneumocystose (*Pneumocystis jirovecii*)

Septembre 2017

Cet argumentaire, réalisé en vue d'une prise en charge par l'assurance maladie obligatoire, est téléchargeable sur
www.has-sante.fr

Haute Autorité de santé

Service communication - information

5, avenue du Stade de France – F 93218 Saint-Denis La Plaine Cedex
Tél. : +33 (0)1 55 93 70 00 – Fax : +33 (0)1 55 93 74 00

Résumé

Objectif

L'objectif de ce travail est d'évaluer les examens de biologie médicale permettant d'établir le diagnostic biologique de pneumocystose, pneumopathie interstitielle bilatérale dont l'agent pathogène est un champignon, *Pneumocystis jirovecii*, spécifique de l'espèce humaine. Il cible plus particulièrement la recherche directe de l'agent infectieux par les techniques microscopiques (colorations, immunofluorescence) ainsi que la recherche d'ADN via les techniques d'amplification génique. Il évalue également le dosage sérique de l'antigène soluble β -(1-3)-D-glucane (BG), présent dans la paroi cellulaire du microorganisme. Ce travail est mené, en vue d'inscriptions à la liste des actes de biologie médicale, pris en charge par le système national d'assurance maladie en France, à la demande de ce système.

Méthode

La méthode retenue est une procédure d'évaluation qui comprend :

- la réalisation d'une analyse critique de la littérature synthétique (recommandations de bonne pratique, revues systématiques avec méta-analyse, rapport d'évaluation technologique) identifiée par une recherche documentaire systématique, puis une sélection sur des critères explicites, dont certains de qualité méthodologique ;
- le recueil de la position argumentée des organismes des professionnels concernés (biologie médicale, infectiologie, hématologie, pneumologie) et du Centre national de référence (CNR) des mycoses invasives et antifongiques.

Ces éléments sont synthétisés dans un argumentaire court, soumis au Collège de la HAS pour validation.

Conclusion

Les données ainsi analysées (méta-analyses, recommandations de bonne pratique, rapport d'évaluation technologique ; position de quatre organismes professionnels) permettent de conclure que :

- l'examen direct au microscope sur le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) est actuellement l'examen de première intention pour établir le diagnostic de pneumocystose ; l'association de deux techniques complémentaires est nécessaire pour détecter les diverses formes fongiques caractéristiques (asques/ascospores et formes trophiques dites végétatives) et augmenter la sensibilité de l'examen, soit par deux colorations, soit par une coloration et une recherche en immunofluorescence (plus sensible). Il peut permettre par coloration d'identifier d'autres agents infectieux responsables d'infections opportunistes chez ces patients immunodéprimés ;
- la recherche d'ADN de *P. jirovecii* par amplification génique en temps réel (qPCR), sur le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA), est indiquée lorsque l'examen microscopique n'a pas permis d'établir un diagnostic, en cas de forte suspicion de pneumocystose sur les critères clinico-radiologiques. Son utilisation sur des prélèvements respiratoires non invasifs (expectorations, aspirations, rinçages) est possible mais, moins sensible que dans le LBA, elle ne permet pas d'écarter une pneumopathie à *P. jirovecii* (PPJ) en cas de résultat négatif ;
- la recherche de l'antigène soluble BG dans le sang par technique colorimétrique (test basé sur une modification du mécanisme du lysat d'amœbocyte de limule) est indiquée :
 - dans la stratégie diagnostique des cas de pneumopathie fébrile chez une personne immunodéprimée de diagnostic différentiel difficile ; le BG est intéressant car il est réalisable en l'absence de prélèvement pulmonaire et qu'un résultat négatif permet d'exclure une pathologie fongique invasive. En cas de positivité, les autres éléments diagnostiques sont indispensables pour identifier l'infection fongique invasive,
 - cette recherche de BG n'est pas indiquée dans le suivi thérapeutique.

Sommaire

Résumé	3
Abréviations et acronymes	5
Introduction	6
1. Contexte	7
1.1 Source d'information.....	7
1.2 La pneumocystose	7
1.3 Diagnostic de la pneumocystose.....	15
1.4 Conditions actuelles de prise en charge par l'Assurance maladie	20
1.5 Synthèse des données de contexte	21
2. Méthode d'évaluation	22
2.1 Champ et méthode d'évaluation.....	22
2.2 Recherche documentaire, sélection et analyse	22
2.3 Recueil du point de vue des professionnels	25
3. Résultats de l'évaluation	27
3.1 Analyse de la littérature	27
3.2 Synthèse des réponses des organismes professionnels.....	42
Conclusion	45
Annexe 1. Recherche documentaire.....	47
Annexe 2. Liste des tableaux et figures	50
Annexe 3. Grilles d'évaluation	51
Annexe 4. Grille d'évaluation AMSTAR des méta-analyses portant sur le diagnostic de PPJ sélectionnées	53
Annexe 5. Présentation des recommandations de bonne pratique analysées dans l'argumentaire.....	54
Annexe 6. Grille pour l'élaboration et la lecture des rapports d'évaluation des technologies HTA INAHTA	59
Annexe 7. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse du Conseil national professionnel d'hématologie (CNPH)	60
Annexe 8. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse du Conseil national professionnel d'inféctiologie via la Société française de lutte contre le Sida (SFLS).....	64
Annexe 9. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse du Conseil national professionnel de biologie des agents infectieux - hygiène hospitalière (CNPBAIHH)	69
Annexe 10. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse du Centre national de référence des mycoses invasives et antifongiques	76
Références	86
Fiche descriptive	89

Abréviations et acronymes

Ag	antigène
AGREE	<i>Appraisal of Guidelines for Research and Evaluation</i>
AMSTAR	<i>Assessment of Multiple Systematic Reviews</i>
BG	β -(1-3)- D - glucane
CD4	<i>cluster of differentiation</i> (lymphocytes T CD4+)
cf.	confer
CNAMTS	Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés
CNP	Conseil national professionnel
CNRMA	Centre national de référence des mycoses invasives et antifongiques
CSH	cellules souches hématopoïétiques
ECIL	<i>European Conference on Infections in Leukemia</i>
EIA	<i>enzyme immunoassay</i> (méthode immunoenzymatique)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
HAS	Haute Autorité de santé
HTA	<i>Health Technology Assessment</i> (rapport d'évaluation technologique)
INAHTA	<i>International Network of Agencies for Health Technology Assessment</i>
IF	immunofluorescence
IFI	infections fongiques invasives
InVS	Institut de veille sanitaire (intégré le 27 avril 2016 dans l'Agence nationale de santé publique)
LAMP	<i>Loop mediated isothermal amplification</i>
LBA	liquide broncho-alvéolaire
LPS	lipopolysaccharides
MA	méta-analyse
NABM	nomenclature des actes de biologie médicale
OP	organisme professionnel
PCR	de l'anglais : <i>Polymerase Chain Reaction</i> ; amplification en chaîne par polymérase
qPCR	PCR quantitative
PP	partie prenante
PPJ	pneumopathie à <i>Pneumocystis jirovecii</i>
PVVIH	personne vivant avec le VIH
RBP	recommandation de bonne pratique
RIHN	référentiel des actes innovants hors nomenclature
Sida	syndrome de l'immunodéficience humaine
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VIH+	porteur du VIH
VPN	valeur prédictive négative
VPP	valeur prédictive positive

Introduction

Dans le cadre de l'article L. 162-1-7 du code de la sécurité sociale, la Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés (CNAMTS) a sollicité, en septembre 2015, l'avis de la HAS sur la révision de la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) concernant le diagnostic de plus de vingt infections en parasitologie et en mycologie. Cet argumentaire traite des actes relatifs au diagnostic biologique de la pneumocystose (infection par *Pneumocystis jirovecii*).

Comme décrit dans la feuille de route de cette évaluation (1), l'objectif de ce travail est d'évaluer les techniques biologiques proposées pour le diagnostic de pneumocystose : examen direct de prélèvements au microscope par immunofluorescence et par colorations, technique d'amplification génique de *Pneumocystis jirovecii* sur prélèvements d'origine respiratoire ainsi que le dosage du β -(1-3)-D-glucane (BG) sérique, et leur place respective dans ce diagnostic.

Dans le contexte actuel de l'évolution de ce diagnostic, en matière de fréquence de prescription et de techniques employées, le demandeur propose la suppression à la NABM de l'acte 5291 non spécifique de *P. jirovecii* et l'inscription de deux actes spécifiques du diagnostic de ce champignon.

La méthode choisie pour mener à bien ce travail consiste à réaliser une analyse de cohérence entre d'une part, la demande, et d'autre part, les données issues de l'analyse critique de la littérature synthétique disponible et sélectionnée sur des critères de qualité, ajustées par la position argumentée des organismes des professionnels de santé concernés par la pneumocystose.

1. Contexte

1.1 Source d'information

Ce chapitre de contexte a été rédigé à partir d'une revue non systématique de la littérature ayant inclus :

- pour la littérature : revues générales, recommandations de bonne pratique, articles originaux, ouvrages didactiques ;
- pour les données épidémiologiques : Scansanté, le Centre national de référence mycoses invasives et antifongiques (CNRMA) et l'InVS.

1.2 La pneumocystose

La pneumocystose humaine est une mycose profonde due à un champignon, *Pneumocystis jirovecii*, à comportement opportuniste (2) responsable de pneumopathies interstitielles. L'expression pathologique de cette anthroponose¹ est le signe d'une dégradation de l'état immunitaire de l'hôte (3), en particulier de l'action des lymphocytes T (4). Elle fait partie des infections fongiques invasives (IFI) et survient chez des patients immunodéprimés et en particulier ceux infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dont le taux de lymphocytes CD4 est inférieur à 200/mm³. Au niveau alvéolaire, une diminution du nombre de T CD4 et de l'activité de phagocytose par les macrophages permettrait l'implantation du champignon (5).

Chez les personnes vivant avec le VIH (PVVIH), la pneumocystose est l'infection opportuniste la plus fréquente mais sa fréquence a fortement décru depuis l'introduction en 1996 des traitements par antiprotéases dans les thérapies antirétrovirales et l'instauration du traitement prophylactique d'une pneumopathie à *Pneumocystis jirovecii* (PPJ). En revanche, la fréquence de la pneumocystose est croissante dans d'autres déficits immunitaires (6) et de nouvelles populations de patients à risque sont apparues : patients transplantés ou greffés de cellules souches hématopoïétiques (CSH), souffrant de maladies inflammatoires ou auto-immunes, d'hémopathies malignes avec corticothérapie au long cours et plus rarement de cancers solides (5). Ces derniers groupes constituent à l'heure actuelle, la population la plus à risque d'évolution péjorative d'une PPJ (7). L'extension extra-pulmonaire avec dissémination est rare, signe d'une profonde immunosuppression (8).

1.2.1 *Pneumocystis jirovecii*

P. jirovecii est un microorganisme unicellulaire eucaryote atypique, dont le genre, après avoir longtemps été considéré comme un parasite protozoaire, a été récemment classé parmi les champignons ascomycètes (*Ascomycota*, spores formées à l'intérieur d'asque) suite à l'analyse en biologie moléculaire de l'ARN ribosomal (9). L'espèce *P. jirovecii*² est commensale de l'espèce humaine au niveau de l'arbre respiratoire et sa transmission serait interhumaine, très vraisemblablement par voie aérienne puis localisation préférentielle sur la membrane externe des alvéoles pulmonaires³. Toutefois, les modalités de transmission et la (les) forme(s) transmise(s) ne sont pas formellement identifiées (10), les stades inhalés du micromycète restant inconnus (11).

Le cycle de *P. jirovecii* n'est pas complètement élucidé, mais en cas de pathologie, *P. jirovecii* est présent sous diverses formes dans l'organisme humain, selon un cycle biphasique issu des hypothèses suivantes (11, 12) (cf. Figure 1).

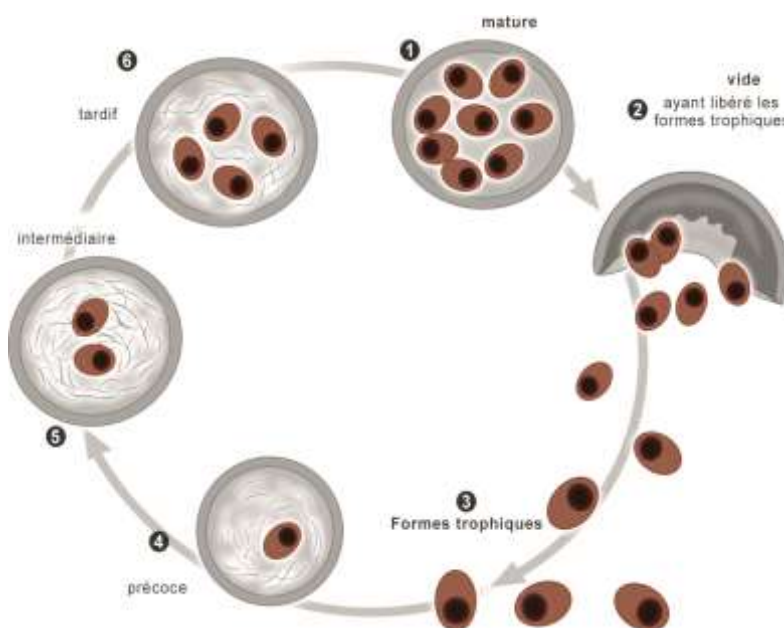
¹ Maladie propre à l'homme, sans transmission par un animal.

² L'espèce *Pneumocystis carinii*, anciennement considérée pour l'infection humaine, identifie maintenant l'espèce qui infecte les rongeurs (rat).

³ http://unt-ori2.crihan.fr/unsfp/2010_Paris_Simon_Mycologie_Medicale/co/101_champignons_dimorphiques.html

- Les kystes matures (asques) [❶], éléments sphériques ou lancéolés, dont la membrane cytoplasmique rigide mesure de 4 à 8 micromètres (µm) de diamètre (13, 14), contenant huit corps intrakystiques (ascospores ou sporozoïtes) qui se transforment rapidement en formes trophiques lorsqu'ils sont libérés *in situ* par éclatement de la membrane externe (15) ; la morphologie de l'asque mature permet le diagnostic direct, en particulier lorsqu'il s'est vidé car il a un aspect de ballon dégonflé [❷] (11). L'asque pourrait être l'élément de transmission de la pathologie (13, 16).
- Les formes trophiques ou trophozoïtes [❸] : formes végétatives (équivalents des spores) qui présentent des formes et des tailles (2 à 5 µm) très variables. Elles sont mononucléées, haploïdes, et capables de se fixer chez l'hôte dans les espaces alvéolaires en adhérant au revêtement extracellulaire par liaisons aux protéines, notamment la fibronectine, sans pénétration dans les pneumocytes (15). À ce stade, existe une phase de reproduction sexuée par conjugaison de grands trophozoïtes donnant un zygote diploïde qui subit méiose puis mitose et la transformation en une nouvelle forme constituée par les prékystes. Une autre forme de reproduction, asexuée, est probable par simple scission binaire de formes trophiques et duplication du contenu du noyau pour donner deux formes trophiques (4).
- Les prékystes de forme ovoïde mesurent 3,5 à 6 µm (14). D'abord mononuclés, ils deviennent multinuclés avec trois stades de maturation : précoce [❹], intermédiaire [❺] et asque tardif [❻] en fonction du nombre de noyaux (un à huit) et des membranes cellulaires.

Figure 1. Cycle hypothétique de *Pneumocystis jirovecii* dans l'alvéole pulmonaire.



« Extrait de : Association française des enseignants de parasitologie et mycologie (ANOFEL) « Parasitoses et Mycoses des Régions Tempérées et Tropicales » chapitre « Pneumocystose » page 328. Copyright © 2016 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés ».

1.2.2 Épidémiologie

Le nombre de cas annuels de PPJ dans le monde est actuellement évalué à 500 000 cas par an (17) : 400 000 chez les PVVIH et 100 000 chez les personnes non VIH⁴, alors que la mortalité imputée à cette pathologie est d'environ 15 % chez les PVVIH mais de 50 % chez les personnes non VIH.

⁴ Source : <http://www.gaffi.org/why/fungal-disease-frequency/>

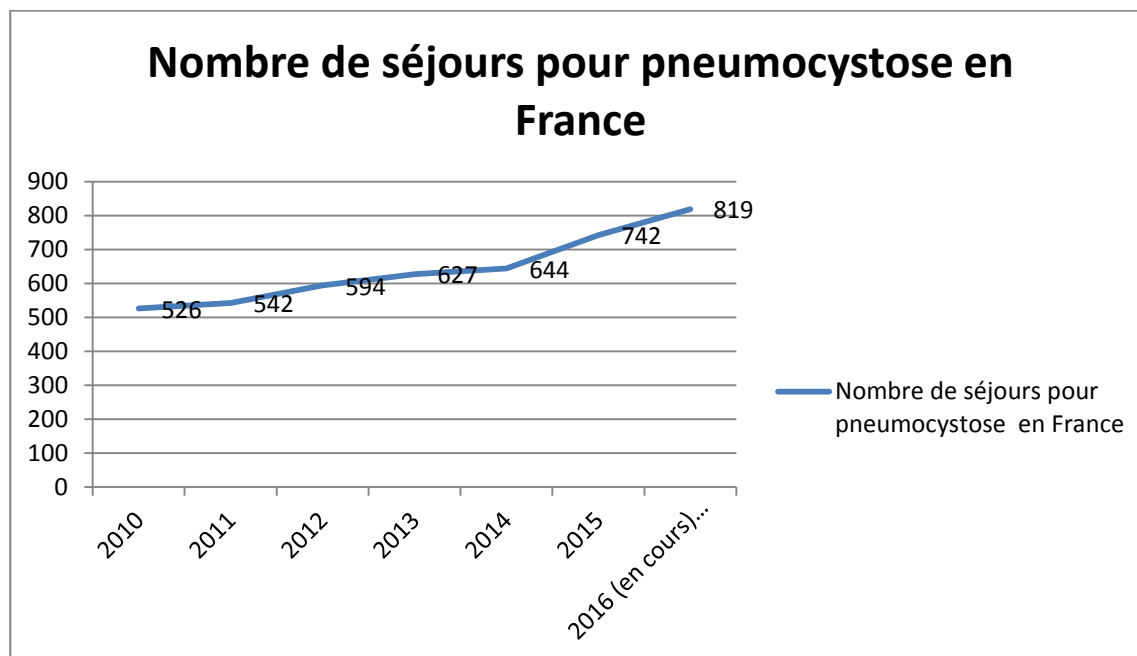
► Estimation du nombre de cas de PPJ en France

Si l'incidence de la PPJ a diminué de 14 % par an chez les PVVIH grâce aux trithérapies, elle a augmenté en parallèle de 13 % par an chez les sujets séronégatifs pour le VIH (18), du fait notamment des nouvelles thérapeutiques en onco-hématologie et dans les pathologies inflammatoires chroniques (19). D'après une étude en population, menée par le Centre national de référence des mycoses invasives et antifongiques (CNRMA) et l'Institut de veille sanitaire (InVS) à partir des données de la base hospitalière PMSI⁵, afin d'étudier l'épidémiologie et les tendances évolutives des infections fongiques invasives (IFI), 35 876 cas d'IFI ont été identifiés entre 2001 et 2010. L'incidence globale des IFI était alors de 5,9/100 000 patients-années et les PPJ représentaient 26 % des cas d'IFI, soit environ 9 360 cas sur cette période. Pour la période 2012-2015, sur la base des premières données prospectives sur la PPJ en France issues de déclarations de centres collaborant avec le CNRMA⁶, les PPJ représentent 19,5 % des IFI (768 cas en trois ans dont 24 % de VIH+).

Une estimation du poids épidémiologique des infections fongiques graves en France publiée en décembre 2016 (20) indique que 1,5 % de la population souffrirait annuellement d'une maladie fongique grave. De façon plus précise, ces auteurs fournissent l'estimation de 1 cas / 100 000 habitants (n = 658/an) pour les PPJ, en indiquant qu'il s'agit probablement d'une sous-estimation imputable aux méthodes de diagnostic, qui n'incluaient pas en routine en 2014 les techniques d'amplification génique récentes, quantitatives et plus sensibles.

D'après la base nationale de données du PMSI MCO constituée de l'agrégation des fichiers de RSA (résumé de sortie anonyme) transmis et validés par les établissements de santé ayant une activité d'hospitalisation en médecine, chirurgie, obstétrique (MCO), le nombre de séjours pour pneumocystose a augmenté de près de 40 % entre 2010 et 2016, passant de 526 à 819. Ces données par année civile⁷ sont présentées dans le graphique suivant (Figure 2).

Figure 2. Évolution du nombre de séjours en établissements de santé pour pneumocystose.



Données ScanSanté ; mention du diagnostic CIM10 B59, cause initiale.

⁵ PMSI : programme de médicalisation des systèmes d'information.

⁶ Via le ReSSIF, RESeau de surveillance des Infections Fongiques invasives en France : réseau de 25 laboratoires qui déclarent tous les cas d'infections fongiques prouvées et probables diagnostiqués dans leur centre.

⁷ <http://www.scansante.fr/applications/statistiques-activite-MCO-par-diagnostic-et-actes>, consulté le 17/05/2017.

► Populations concernées et facteurs de risques

Selon les données recueillies par l'InVS à partir des notifications obligatoires (21), la pneumocystose était en 2014 en France la pathologie inaugurale isolée révélant un syndrome de l'immunodéficience humaine (Sida) la plus fréquente, retrouvée dans 28 % des cas, place restant stable dans cette population depuis plusieurs années.

En dehors de l'infection VIH, la pneumocystose survient surtout lorsque les facteurs sont cumulatifs en risque avec un terrain fragilisé et une thérapeutique immunosuppressive (5, 11) et les populations les plus à risque de pneumocystose sont :

- les patients présentant des hémopathies malignes de type lymphoprolifératif : myélome multiple, macroglobulinémies de Waldenström, leucémies lymphoïdes aiguës (9) ;
- les transplantés d'organes et en premier lieu après greffe de rein (greffe la plus fréquente), dans les quatre premiers mois, les greffés de CSH allogéniques (la plupart dans les six mois suivant la greffe) et plus rarement, les patients traités avec des chimiothérapies [cyclophosphamide, analogues de la purine (fludarabine, azathioprine), cytarabine, méthotrexate) pour des tumeurs solides] (15) ;
- les patients souffrant de maladies inflammatoires et/ou auto-immunes [vascularites des petits et moyens vaisseaux, dermatomyosites ou polymyosites, maladie de Wegener (granulomatose avec polyangéite GPA), maladie de Crohn, etc.] et recevant certains traitements pour ces pathologies comme des Ac monoclonaux (rituximab, alemtuzumab) ou des anti-TNF α (15, 22) ;
- les patients recevant un traitement au long cours par corticoïdes ou ciclosporine (15). L'utilisation de corticoïdes dans le mois précédant le diagnostic de PPJ a été retrouvée en service d'hématologie chez 90 % des patients non VIH (9, 23).

► Portage transitoire

Selon la littérature, 90 % des enfants ont rencontré *P. jirovecii* avant l'âge de cinq ans (24) et ont synthétisé des anticorps spécifiques (5). Chez un sujet immunocompétent, *P. jirovecii* est rapidement éliminé par les réponses immunitaires innée, humorale et médiée par les cellules T avec destruction faisant intervenir les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes CD4 et surtout les macrophages. À l'âge adulte, le portage de *P. jirovecii* est transitoire chez les immunocompétents, le champignon étant éliminé en quelques jours à quelques semaines (24). Ce portage asymptomatique chez des sujets immunocompétents joue probablement un rôle épidémiologique, ces individus « réservoirs » permettant par excrétion/exhalation de formes de *Pneumocystis* dans l'environnement proche, une circulation de formes infectantes du champignon dans la population générale (13, 25, 26) et cette contamination interhumaine affecterait les personnes immunodéprimées (16).

► Colonisation

La connaissance de la colonisation de l'homme par *P. jirovecii* est récente, après constat de la positivité de résultats par techniques d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) sur prélèvements respiratoires, alors que l'examen microscopique sur ces prélèvements était négatif, et en l'absence de signes clinico-radiologiques de pneumocystose (10). Ainsi, dans une population de sujets immunodéprimés présentant une pneumonie d'étiologie indéterminée à faible probabilité de pneumocystose, une étude française utilisant une PCR quantitative a détecté *P. jirovecii* chez 15 % de PVVIH et 13 % de patients non porteurs du VIH, avec une quantité d'ADN détectée au regard des seuils établis conduisant à les considérer comme simplement colonisés et non infectés (27). Les conséquences d'une colonisation en matière de pathogénicité, de risque évolutif ainsi que la pertinence d'un éventuel traitement ne sont pas connues.

Les patients immunodéprimés ou traités par corticoïdes pour maladie systémique, les nourrissons (primo-infection), les femmes enceintes, les patients souffrant de maladies broncho-pulmonaires chroniques, de mucoviscidose et les sujets âgés (10) sont considérés comme des sujets exposés à la colonisation, avec risque de passage au stade pathologique de pneumocystose en cas

d'immunodépression ou d'aggravation d'une pathologie pulmonaire existante (5). Les personnels des hôpitaux colonisés par *P. jirovecii* (5, 19) ou les contacts entre patients immunodéprimés (dont certains atteints de PPJ) dans les lieux de soins (13, 28) pourraient contribuer aux transmissions aéroportées nosocomiales. L'isolement des personnes malades de PPJ en service hospitalier (3, 29) ainsi que le port de masques pour les patients hospitalisés dans les services d'hématologie ont été évoqués pour éviter les PPJ nosocomiales (28).

1.2.3 Formes cliniques de la pneumocystose à *P. jirovecii*

Les connaissances actuelles ne déterminent pas si la survenue d'une PPJ est le résultat d'une réactivation d'une infection latente et/ou d'une colonisation ou celui d'une contamination *de novo* (19) bien que l'hypothèse d'infection *de novo* par des souches différentes soit récemment privilégiée (3, 29). Selon une étude épidémiologique menée récemment dans douze pays européens sur la répartition de plusieurs génotypes du microorganisme, l'histoire naturelle de la maladie pourrait être différente suivant le terrain et la cause de l'immunodépression (17). De surcroît, le rôle physiopathologique et clinique du ratio asques/formes trophiques n'est pas non plus connu (4).

La symptomatologie diffère selon le contexte clinique et il est habituel de distinguer la pathologie chez les PVVIH et les autres sujets immunodéprimés (2, 30). Toutefois, le développement fongique dans les espaces alvéolaires entraîne généralement une forte réaction inflammatoire responsable des lésions de l'épithélium alvéolaire dont les cloisons s'épaississent, conduisant à l'hypoxémie et l'insuffisance respiratoire (2). L'évolution spontanée se fait par pneumopathie infiltrante diffuse aiguë avec dyspnée et polypnée, voire syndrome de détresse respiratoire aiguë (5, 6) souvent fatal.

Les localisations extra-pulmonaires de la PPJ sont exceptionnelles (< 1 % des pneumocystoses), survenant le plus souvent lors de dissémination.

► Personne immunodéprimée infectée par le VIH

- Chez le nourrisson et l'enfant, le risque de développement d'une PPJ est le plus élevé avant la mise sous traitement antirétroviral. La mortalité en l'absence de traitement est de 100 %. Les manifestations les plus fréquentes sont une pneumonie, avec syndrome grippal (fièvre, dyspnée, toux) et perte de poids. L'hypoxie est souvent importante ($\text{PaO}_2 < 70 \text{ mm Hg}$) (31).
- Chez l'adulte : les signes cliniques sont peu spécifiques et se développent sous une forme subaiguë, parfois sur plusieurs semaines. La triade classique fièvre, toux sèche, dyspnée d'intensité croissante est évocatrice mais inconstante (environ 50 % des cas) (5). Il peut exister des formes fébriles pures. Au début de l'infection, l'auscultation pulmonaire est souvent normale, les signes cliniques peuvent être absents - notamment les signes respiratoires - et la radiographie pulmonaire être normale. À l'inverse, lorsque le diagnostic est tardif, les patients se présentent dans un tableau d'insuffisance respiratoire aiguë avec pneumothorax.
- Des localisations isolées extra-pulmonaires ont été décrites (5), notamment chez l'enfant au stade Sida, rétinites, thyroïdites, lésions osseuses ou des pneumocystoses cérébrales, hépatiques ou rénales (32).

► Personne immunodéprimée non infectée par le VIH

- Chez le nourrisson : la pneumocystose survient au décours de déficits immunitaires congénitaux ou de leucémies aiguës lymphoblastiques. Le début est brutal avec dyspnée, toux sèche et fièvre. La mortalité en l'absence de traitement est forte. L'infection par PPJ pourrait aussi être une des causes de mort subite du nouveau-né (3).
- Chez l'enfant : les hémopathies malignes lymphoïdes sont le premier facteur de risque, augmenté par les traitements curatifs de type corticoïdes (pendant au moins un mois), la fludarabine, les anti-TNF- α et les anticorps monoclonaux (9).
- Chez l'adulte : la PPJ est d'apparition aiguë, parfois d'évolution rapidement défavorable sans un diagnostic précoce (cinq à sept jours). La symptomatologie est voisine de celle du patient VIH+ mais le début est plus brutal, l'évolution souvent plus rapide et fonction de l'immunodépression

sous-jacente (2). Chez les patients d'onco-hématologie, la fièvre est fréquente et présente dans 90 % des cas (9). Dans les maladies systémiques, la PPJ survient souvent au début de la forte période d'immunosuppression induite par les traitements. Dans 50 % des cas, il existe une co-infection : virale, surtout par le cytomégalo virus (CMV) ou des *Herpes viridae* (22), plus rarement fongique (*Candida*) ou bactérienne (*Mycobacterium tuberculosis*) (33). L'examen clinique révèle une hyperthermie, une dyspnée/tachypnée et de la toux avec râles crépitants à l'auscultation (19). Par rapport aux PVVIH, les sujets non infectés par le VIH qui développent une PPJ sont souvent plus âgés, présentent plus de comorbidités, sont plus fréquemment oxygène-dépendants et nécessitent plus souvent une ventilation mécanique lors de cette infection (19, 34). Une PPJ non traitée aura une évolution sévère avec hypoxémie, emphysème, pneumothorax et risque de décès. Le transfert en réanimation est nécessaire dans 30 à 50 % des cas selon les publications (22). L'initiation d'un traitement anti-infectieux dans les sept jours suivant le début des symptômes est donc importante car elle permet pour un certain nombre de cas d'éviter l'intubation ou la ventilation mécanique.

► Charge fongique selon l'immunodépression sous-jacente

Il existe une différence de charge fongique chez les patients avec une PPJ, selon qu'ils sont ou pas infectés par le VIH. En effet, cette charge mesurée en densité d'ascospores ou de formes trophiques dans les alvéoles pulmonaires est faible chez les patients non VIH comparée à celle des patients VIH+ (22, 35). Une étude (36) a montré que les patients non VIH (quelle que soit la cause de leur immunosuppression) avaient significativement moins d'ascospores ou de formes trophiques de *Pneumocystis*, mais plus d'inflammation (estimée par le nombre élevé de polynucléaires neutrophiles) (9). Cette différence de charge fongique entre les deux populations se retrouve dans les résultats en technique PCR en temps réel, quantitative (27).

► Létalité

La mortalité de la PPJ est actuellement plus élevée dans les populations non porteuses du VIH car l'évolution clinique est plus rapide et brutale, globalement estimée entre 30 et 60 % selon les données de la littérature (9, 11, 19, 34) mais elle varie selon le profil d'immunodépression, avec un pronostic plus sombre dans les hémopathies malignes (18), avec un taux de mortalité évalué entre 48 et 70 % chez les receveurs d'une allogreffe de CSH (9). La mortalité est très élevée chez les patients atteints de cancer solide tandis que celle des transplantés rénaux avec des taux de 17 à 30 % (34) est globalement similaire à la mortalité des PVVIH (9). Une étude indique que le taux de mortalité chez les patients non VIH en détresse respiratoire aiguë, nécessitant une ventilation mécanique invasive, peut atteindre 75 % (25).

► Diagnostic différentiel

Chez une PVVIH avec un taux de T CD4 bas ($< 200/\text{mm}^3$), le diagnostic de pneumocystose est souvent envisagé. Lorsque le taux de CD4 est inférieur à $100/\text{mm}^3$, d'autres infections opportunistes peuvent être évoquées devant une pneumopathie interstitielle. Elle peut être d'origine parasitaire ou fongique (toxoplasmose, cryptococcose, histoplasmoses et plus exceptionnellement en France coccidioïdomycose et pénicilliose), d'origine bactérienne (pneumocoque, *Haemophilus*, *Mycobacterium*). Un sarcome de Kaposi ou une pneumopathie interstitielle lymphoïde peuvent également être discutés (11, 37). Concernant les examens complémentaires, la pneumocystose s'accompagne en début d'infection d'une radiographie thoracique normale dans une proportion non négligeable de cas (8 à 39 % selon certains auteurs (6)) puis rapidement chez 60 à 80 % des patients non porteurs du VIH, la radiographie pulmonaire objective un infiltrat interstitiel diffus uni- ou bilatéral à prédominance hilare et généralement symétrique (9, 15) ou une opacification en verre dépoli qui augmente avec l'aggravation de la pathologie (38). Il existe cependant des présentations trompeuses sous la forme de nodules, de pneumothorax (favorisé par la rupture d'un asque dans la plèvre (6)) ou d'adénopathies médiastinales (9, 33).

La tomodynamométrie (scanner) thoracique plus sensible retrouve une opacité bilatérale en verre dépoli surtout dans les régions péri-hilaires (14, 38) alors que des nodules pulmonaires, des lé-

sions kystiques (dans environ 10 % des cas) localisés essentiellement dans les lobes supérieurs ou un pneumothorax peuvent être visualisés (22). À noter que les fréquentes co-infections peuvent modifier les éléments radiologiques. L'utilisation de la tomographie à émission de positons ou de la scintigraphie (TEP-scan au 18-FDG) n'est pas recommandée dans la stratégie diagnostique (9, 15). Au total, aucun élément obtenu par l'imagerie n'est pathognomonique d'une PPJ.

1.2.4 Traitement

► Personne infectée par le VIH

Le traitement de référence est le cotrimoxazole (triméthoprim/sulfaméthoxazole ou TMP-SMZ) pendant trois semaines sous forme intraveineuse (IV), parfois orale dans les formes modérées. Cette molécule détruit les formes protozoaires de parasites et autres microorganismes et serait active sur les trophozoïtes de *P. jirovecii*. En cas de contre-indication ou d'intolérance au cotrimoxazole, les alternatives principales sont l'atovaquone ou la dapson (+/- triméthoprim) dans les formes légères à modérées et l'association clindamycine-primaquine ou la pentamidine IV dans les formes modérées à sévères (23, 32, 39). L'association d'une corticothérapie au plus tard 72 heures après l'initiation du traitement de la PPJ est recommandée lorsqu'il existe une hypoxémie inférieure à 70 mm Hg en air ambiant (32). Toutefois, chez les patients très immunodéprimés, il convient de rechercher au préalable la coexistence d'une infection à CMV ou à mycobactéries qui pourrait être aggravée par la corticothérapie (39).

La surveillance biologique de l'efficacité des traitements antifongiques est réalisée par les gaz du sang artériel et non par des tests spécifiques.

► Personne non infectée par le VIH

Le traitement curatif de première intention d'une pneumocystose est également le cotrimoxazole, en traitement de deux à trois semaines (19, 22, 34), y compris chez les transplantés (23) et les patients adultes ou enfants en onco-hématologie (40). La corticothérapie systémique est controversée chez les patients non VIH (19, 23, 34). En cas d'intolérance grave ou de contre-indication au cotrimoxazole, les autres molécules actives sont administrées (pentamidine par voie intraveineuse en cas de forme grave (40), atovaquone, dapson (+/- triméthoprim) et l'association clindamycine-primaquine (19)).

Le champignon serait non détectable dans l'organisme dans un délai moyen de quatre semaines après un traitement adéquat (5).

1.2.5 Prophylaxie anti-pneumocystose

Personne vivant avec le VIH

En France, la prévention de la pneumocystose préconisée par les recommandations françaises de 2013 (39), intitulées « Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH », n'a pas été modifiée lors de la dernière révision de janvier 2017⁸. Cette prophylaxie vise aussi à prévenir la toxoplasmose. Elle est résumée dans le Tableau 1 ci-dessous.

⁸ <http://cns.sante.fr/actualites/prise-en-charge-du-vih-recommandations-du-groupe-dexperts/>

Tableau 1. Traitements prophylactiques de la pneumocystose chez le patient VIH en France (39).

Prophylaxie primaire (préventive sans infection manifeste)	Prophylaxie secondaire (thérapie suppressive après une infection manifeste)	Indications des prophylaxies primaires et secondaires	Interruption des prophylaxies primaires et secondaires
• TMP-SMZ (80/400) : 1 cp/j ou (160/800) : 1 cp x 3/sem. • Aérosols de pentamidine 300 mg x 1/mois • Dapsone (50 à 100 mg/j) • Atovaquone 1 500 mg/j)	Idem prophylaxie primaire.	CD4 < 200/mm³ et CD4 < 15 % (y compris pendant grossesse et chez l'enfant). Traitement carcinologique d'une infection maligne : prophylaxie à maintenir durant tout le traitement antinéoplasique.	CD4 > 200/mm³ et > 15 % à 2 reprises ≥ 3 mois d'intervalle Si contrôle virologique parfait et > 3 mois cART⁹ et 101 < CD4 < 200/mm³ Reprise de la prophylaxie si CD4 < 100-200/mm³ Prophylaxie interrompue lorsque CD4 > 200/mm³ et >15 % depuis au moins 6 mois.

Ainsi, une prophylaxie est préconisée si le taux de CD4 est inférieur à 200/mm³ ou si le pourcentage de CD4 est inférieur à 15 % de l'ensemble des lymphocytes et chez les patients avec un antécédent d'infection opportuniste. Cette prophylaxie est préférentiellement du cotrimoxazole. En cas d'intolérance au cotrimoxazole, les traitements alternatifs sont la dapsone (+/- pyriméthamine et leucovérine), les aérosols de pentamidine et l'atovaquone. Les recommandations sont similaires dans d'autres pays (32).

Lors de la survenue d'une affection maligne chez une PVVIH, une prophylaxie vis-à-vis de la pneumocystose doit être initiée indépendamment du taux de CD4, et cette attitude est recommandée lors d'une corticothérapie au long cours (à partir d'une dose équivalente à 20 mg/j prednisone pendant un mois).

Une prophylaxie secondaire est aussi instaurée, interrompue après remontée des CD4 au-dessus de 200/mm³ pendant plus de trois mois et charge virale basse.

Personne non infectée par le VIH

La littérature fait apparaître un manque de consensus en matière de patients cibles pour la prophylaxie primaire et la durée du traitement prophylactique pour les patients non VIH (19, 22, 23). Toutefois, l'*European Conference on Infections in Leukaemia* (ECIL-5) a publié en 2016 des recommandations pour les patients d'hématologie, adultes et enfants (non porteurs du VIH), en fonction de leur niveau estimé de risque de PPJ (41). Ainsi, le cotrimoxazole est recommandé chez l'adulte pendant toute la période de risque, sur les bases d'une méta-analyse (MA) de la *Cochrane*, comprenant la population des transplantés d'organe, des greffés de cellules souches hématologiques autologues et des patients atteints de leucémies aiguës, qui montre une forte baisse de la mortalité par pneumocystose par l'instauration de la prophylaxie primaire. Chez l'enfant, cette même prophylaxie nécessite des adaptations posologiques. Les alternatives possibles en cas d'intolérance ou de contre-indication sont l'atovaquone, la dapsone ou les aérosols de pentamidine. En France, le traitement préventif de première intention de la pneumocystose chez les patients non VIH est également le cotrimoxazole, prescrit en fonction du risque attribué à la pathologie sous-jacente (22) et/ou aux traitements immunosuppresseurs du patient (34).

⁹ Traitement antirétroviral combiné.

1.3 Diagnostic de la pneumocystose

Chez les sujets immunodéprimés, une dyspnée ou une pneumonie nécessite rapidement une exploration diagnostique (15). Étant donné le manque de spécificité du tableau clinico-radiologique de la PPJ, le diagnostic de certitude nécessite la réalisation de recherches microbiologiques visant à mettre en évidence *P. jirovecii* dans les tissus ou les sécrétions pulmonaires (19, 31).

1.3.1 Prélèvements

La recherche de *P. jirovecii* se fait sur liquides biologiques, tissus et sécrétions broncho-pulmonaires. Plusieurs procédés sont possibles, certains sont plus difficiles à exécuter chez l'enfant (31).

► Expectoration simple et induite, rinçage oro-pharyngé

L'intérêt de tels prélèvements est qu'il s'agit d'actes non invasifs, faciles à réaliser :

- pour l'expectoration simple, il est procédé au recueil de l'expectoration au réveil matinal, fraction la plus chargée en agents pathogènes, dans un récipient stérile après rinçage bucco-dentaire à l'eau distillée stérile et lors d'un effort de toux (11). C'est un liquide de faible sensibilité pour *P. jirovecii* (32) ;
- le rinçage oro-pharyngé est obtenu par gargarisme et rinçage avec sérum physiologique mais il est très faible en charge fongique, ce qui limite les performances des techniques de recherche directes au microscope ;
- l'expectoration induite est réalisée après nébulisation pendant 20 minutes de sérum salé hypertonique (3 %) et accélération du flux bronchique par kinésithérapie respiratoire qui peut être répétée pour en augmenter la sensibilité, qui demeure modérée (19). Cet examen, préconisé depuis quelques années, est à privilégier chez l'enfant (40) mais en dessous de l'âge de deux ans ; l'élévation des voies respiratoires et la faible capacité à expectorer, associées à un risque de vomissements et de bronchospasme rendent la manœuvre délicate (31). À noter qu'une prophylaxie par aérosol de pentamidine est susceptible d'abaisser la sensibilité d'une recherche de *P. jirovecii* à partir d'un tel prélèvement (29).

► Aspiration naso-pharyngée (ANP), naso-gastrique (ANG) et endotrachéale (AET)

L'aspiration naso-pharyngée (ANP) est peu invasive, effectuée par une sonde introduite dans le nasopharynx par une des deux narines, reliée pour réaliser l'aspiration des mucosités à une seringue ou un appareil à succion. Elle est utile dans la stratégie diagnostique des situations d'urgence médicale comme les pneumopathies fébriles chez les adultes fortement immunodéprimés (42). Les aspirations nasogastriques sont réalisables chez les nouveau-nés et les jeunes enfants (réalisation pendant trois matins consécutifs) et permettraient de retrouver le microorganisme chez 49 % des enfants infectés par le VIH (31).

L'utilisation d'une sonde d'intubation endotrachéale pour recueillir des sécrétions broncho-pulmonaires est la méthode la plus adaptée pour un patient en réanimation, ou alternative lorsque les méthodes invasives sont contre-indiquées à cause d'une trop profonde thrombocytopénie ou impossibles à réaliser. Le risque de contamination par la flore oro-pharyngée est important.

► Lavage broncho-alvéolaire (LBA)

Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) est réalisé lors d'une fibroscopie bronchique et permet un prélèvement dirigé au niveau du foyer infectieux et protégé. Il se fait en deux étapes : recueil d'une fraction bronchique et d'une fraction alvéolaire. Le bronchofibroscope est bloqué dans une bronche sous-segmentaire (choix orienté selon les images radiologiques anormales le cas échéant) et quatre à six échantillons successifs de 50 ml de sérum physiologique à 37°C sont instillés, puis le liquide de lavage est recueilli par aspiration douce. Une proportion variable de la quantité injectée (20 à 70 %) est ainsi collectée (8, 43). Le LBA est une procédure qui nécessite une sédation chez les nouveau-nés et la plupart des enfants (31).

Une cytocentrifugation permet de recueillir le culot cellulaire issu du LBA (5).

► Ponction-biopsie pulmonaire transbronchique ou chirurgicale

Dans le cas de masse pulmonaire suspecte, pour laquelle les techniques non invasives n'ont pas permis le diagnostic, la ponction-biopsie transbronchique est réalisée avec une pince glissée dans un bronchoscope pour prélever du parenchyme pulmonaire ou pratiquée par chirurgie guidée par vidéoscopie, voire à thorax ouvert dans quelques pays, hors la France (11, 31). Toutefois, comme le risque hémorragique ou de pneumothorax est élevé, la biopsie transpariétale est très rarement usitée en France.

► Ponction veineuse

Le prélèvement de sang va permettre de rechercher la présence du champignon de façon indirecte à travers le relargage de composants pariétaux antigéniques ou d'ADN dans la circulation sanguine.

1.3.2 Techniques diagnostiques

À ce jour, il n'est toujours pas possible de cultiver ce champignon en pratique courante : le diagnostic repose donc sur la mise en évidence de *P. jirovecii* au microscope dans les prélèvements liquides ou les tissus pulmonaires par méthodes histopathologiques ou cytopathologiques (15, 22). Si le microorganisme est retrouvé dans ces prélèvements, le diagnostic de PPJ est posé (31).

► Examens au microscope

Après coloration

Le choix des colorations pour l'examen microscopique d'un prélèvement est important car tous les stades du cycle de *P. jirovecii* peuvent ne pas être visibles selon la nature du colorant. Les deux formes identifiables pendant l'infection pulmonaire cliniquement active sont les asques/ascospores et les formes trophiques, avec une dominante pour les formes trophiques plus nombreuses (13). On associe classiquement deux types de coloration :

- la coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG), très couramment faite en infectiologie, permettant de visualiser la totalité des formes attribuées à *P. jirovecii* : les formes trophiques, les asques immatures et matures, et souvent en amas de couleur violette avec les ascospores repartis en rosette (2) ;
- une deuxième coloration ne révélant que les asques soit au Gomori-Grocott (GG), technique d'imprégnation argentique (asques colorés en brun-noir sur fond vert), soit au bleu de toluidine (ortho) (5, 14). La technique argentique rapide de Musto dérivée du GG, permet également de colorer la paroi des ascospores regroupés en amas (2). D'autres colorations recherchant les asques/ascospores sont possibles avec le blanc de calcofluor ou le cresyl violet (13, 15).

Par immunofluorescence (IF)

P. jirovecii est recherché au microscope à fluorescence avec des anticorps (Ac) monoclonaux spécifiques de ce champignon conjugués à la fluorescéine (méthode directe) ou révélés par des Ac anti-Ig couplés eux à la fluorescéine (méthode indirecte) (27). Les anticorps de détection utilisés peuvent être spécifiques ou non d'un stade parasitaire (2, 26). Pendant l'infection, s'ils sont dix fois moins nombreux au niveau alvéolaire que les formes trophiques, les asques plus gros sont plus facilement identifiables en IF (13). Le résultat d'une IF est exprimé de façon semi-quantitative.

Avantages et inconvénients

L'examen direct après coloration est rapide (20 minutes pour un MGG) (26). La recherche par microscopie sur un prélèvement issu d'un LBA reste la référence, en particulier chez les patients d'hématologie, par rapport aux prélèvements obtenus au niveau des voies respiratoires supé-

rieures car l'échantillon de LBA est plus riche en cellules de *P. jirovecii*. L'examen par coloration fait par un microscopiste expérimenté permet également les diagnostics différentiels entre genres fongiques (15) et l'identification des co-infections (9, 34).

La recherche du champignon par IF est une technique plus longue qui doit être réalisée par un lecteur expérimenté capable de discerner les formes trophiques de *P. jirovecii*, très polymorphes, avant l'extinction de la fluorescence (14, 26). La limitation à des Ac spécifiques des ascospores permet d'obtenir une meilleure visualisation en IF, en réduisant fortement les bruits de fond (14).

La sensibilité de l'examen direct dépend de la méthode utilisée (colorations spécifiques ou immunofluorescence), de l'origine, de la qualité des prélèvements et du type de patients (VIH+ ou non VIH). En effet, au regard de la charge fongique plus faible, l'examen direct microscopique est moins sensible chez les patients immunodéprimés non VIH que chez les VIH+ (22, 25, 35).

► Techniques d'amplification génique

Plusieurs techniques de PCR sont disponibles pour amplifier l'ADN de *P. jirovecii* : certaines font appel à la PCR conventionnelle (en une étape), nichée, semi-nichée et plus récemment, sont apparues des techniques quantitatives. La méthode de PCR en temps réel (qPCR), quantitative, utilise un marqueur fluorescent : la production d'ADN polymérisé est mesurée tout au long des cycles d'amplification et la connaissance de la quantité de séquence cible permet une évaluation quantitative (23, 44).

- Il existe plusieurs cibles génomiques pour *P. jirovecii* : le gène de la *heat shock protein* (HSP70), le gène de la *dihydrofolate réductase* (DHFR), le gène de la *dihydroptéroate synthétase* (DHPS), le gène d'une protéine fonctionnelle du cycle de division cellulaire (Cdc2) et le gène codant le complexe de la glycoprotéine majeure de surface (MSG) (14, 23, 29).
- D'autres tests de qPCR visent l'ARN ribosomique ; les principaux locus retenus, notamment dans des kits commerciaux sont le gène de la petite sous-unité (mtSSUrRNA) ou de la grande sous-unité de l'ARN ribosomal mitochondrial (mtLSU rRNA), gènes multi-copies induisant une sensibilité importante (14, 45, 46).

Récemment des techniques d'amplification isotherme de l'ADN facilitée par boucle (*Loop mediated isothermal amplification* ou LAMP) ont été développées (47, 48).

Avantages et inconvénients

Les techniques d'amplification génique sont reconnues pour leur sensibilité (grâce à l'amplification) et leur spécificité (grâce à la séquence ciblée) importantes. Elles amélioreraient la sensibilité de détection de *P. jirovecii* notamment sur les prélèvements respiratoires non invasifs (expectorations ou lavages oro-pharyngés) (13, 49). En cas de suspicion de PPJ, la PCR serait particulièrement utile chez le sujet immunodéprimé non VIH avec pauci-infestation (charge fongique faible) (25). Ainsi, la valeur prédictive négative de la PCR excellente dans le LBA autoriserait d'éliminer l'éventualité de pneumocystose d'un diagnostic en cas de résultat négatif (14, 23, 25). Cependant, les PCR conventionnelles présentent des risques de faux positifs par contamination de matériel (amplicon) lors des étapes entre les cycles. Non quantitatives, elles ne permettent pas de différencier une pneumopathie à PPJ d'une colonisation (23, 29, 35, 49).

La PCR en temps réel présente l'avantage d'une rapidité d'exécution (moins de trois heures de réalisation) (23) et, comme elle est réalisée en circuit fermé, d'une réduction drastique des risques de contamination des méthodes plus anciennes (50). Une standardisation globale des modalités de réalisation des qPCR ainsi que de l'interprétation des résultats quantitatifs a été proposée en 2009 sous l'appellation « MIQE » (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR Experiments*) par un groupe de chercheurs afin de normaliser les termes utilisés, d'augmenter la qualité des résultats et leur reproductibilité entre laboratoires (51).

Les techniques de PCR ont mis au jour l'existence de colonisation par *P. jirovecii* sans qu'à l'heure actuelle, la distinction entre colonisation et PPJ ne soit précise du fait de l'absence de standardisa-

tion dans les déterminations quantitatives (25, 52). Les limites actuelles à la généralisation de la qPCR sont principalement :

- la préparation des échantillons pulmonaires n'a pas fait l'objet de standardisation dans le cadre des qPCR (nombre de cellules, volume...) et la constitution du prélèvement influe probablement sur les résultats et la qualité de l'information obtenus (14, 45) ;
- la comparabilité entre les seuils de techniques « maison » et de différents kits dont les cibles sont des gènes simple copie ou bien multi-copies n'est pas possible, en l'absence de courbe standard (3, 45) ;
- l'établissement de seuils (en nombre de copies d'ADN) n'est pas unifié par des critères validés : dans chaque étude, les auteurs établissent un seuil inférieur ainsi qu'un seuil supérieur dans l'interprétation des valeurs et une zone dite grise entre les deux, dans laquelle la distinction colonisation/infection ne peut être réalisée. Il n'y a pas consensus sur ces valeurs (27, 45) ; toutefois, le statut vis-à-vis du VIH serait d'emblée déterminant pour l'établissement des seuils selon certains auteurs (53). Une standardisation dans la pratique des qPCR pour *P. jirovecii* serait en cours, notamment en France (45).

Enfin, les résultats d'une qPCR doivent être discutés pour chaque patient par les cliniciens à la lumière des données clinico-radiologiques, du statut immunitaire et de la pathologie sous-jacente ainsi que des traitements en cours.

Diffusion de la technique

Selon le demandeur, en France, au moins 30 laboratoires de centres hospitalo-universitaires pratiquent à ce jour la PCR pour la recherche de *P. jirovecii*.

► Dosage de l'antigène β -(1-3)- D - glucane sérique

Le β -(1-3)- D - glucane (BG) est un des polysaccharides multimères de glucose de la paroi fongique. La molécule, non spécifique du genre *Pneumocystis*, est exprimée en quantité mesurable par plusieurs genres de champignons et de levures, *Fusarium*, *Exserohilum*, *Aspergillus* et *Candida* notamment, alors que d'autres genres (*Cryptococcus*, *Rhizopus*...) en produisent des quantités très faibles, habituellement non détectées par les tests existants.

Le BG circulant (soluble) peut être dosé dans le sérum et plusieurs trousse de détection ont été mises au point par des industriels. La plus retrouvée dans la littérature¹⁰, commercialisée en France sous la dénomination Fungitell® (Cape Cod Inc. USA), est basée sur le principe modifié du test au limulus¹¹ : le BG active un facteur zymogène de la protéase serine, le facteur G (alors que les endotoxines recherchées dans le test au limulus activent la voie par le facteur C, éliminé dans le kit Fungitell®) avec activation en cascade des facteurs de coagulation du lysat d'amœbocyte de limule qui est révélée par la création d'un chromophore absorbant la lumière à 405 nm (durée de la manipulation : une heure). L'augmentation du taux de densité optique (DO) induite est mesurée par colorimétrie au regard d'une courbe standard interne qui permet d'estimer la concentration de BG dans l'échantillon testé (54, 55). Le fabricant indique dans sa notice d'utilisation (56) que chaque échantillon de sérum doit être analysé en double dans une manipulation et, a défini les valeurs seuils pour l'interprétation [valeurs < 60 pg/ml négatives ; 60 à 79 pg/ml possible infection fongique ; ≥ 80 pg/ml positives]. Dans la pneumocystose, des valeurs de BG élevées, supérieures à 500 pg/ml, sont fréquemment retrouvées, y compris chez des patients non porteurs du VIH (57, 58). De ce fait, des auteurs questionnent les valeurs de seuils à considérer pour ce test dans la population des patients VIH+, proposant la valeur de 300 pg/ml au lieu des 80 pg/ml du

¹⁰ D'autres kits commerciaux sont disponibles notamment au Japon dont l'évaluation est retrouvée dans les revues systématiques et les méta-analyses : le test Wako®, le Fungitec G test MK® et le test Muraka®. Ils présentent des caractéristiques techniques diverses dont la mesure par turbidimétrie (cinétique de variation du taux de densité optique).

¹¹ Le lysat d'amœbocyte de limule est un extrait aqueux de cellules sanguines (amœbocyte) de la limule *Limulus polyphemus*, petit arthropode marin des eaux chaudes en forme de fer à cheval. Dans le test dit test au limulus, cet extrait permet de détecter l'éventuelle présence d'endotoxines (LPS) pyrogènes dans des médicaments ou dispositifs à usage humain.

fabricant (59). Bien que ce dernier ne commercialise ce kit que pour un usage dans le sérum¹², ces auteurs ont également recherché avec ce kit la présence de BG dans le LBA (59).

Avantages et inconvénients

Ce test est réalisé à partir d'un prélèvement facilement accessible, le sang veineux et, il est décrit comme ayant une très bonne valeur prédictive négative (VPN) de 98 % permettant d'éliminer une infection fongique, en cas d'impossibilité de réaliser un LBA (29, 60). Pour les pneumocystoses, surtout pour les PVVIH chez qui des études indiquent retrouver des taux élevés de BG (15), sa détection pourrait alors être plus sensible que la recherche visuelle du champignon dans les expectorations induites (50). De plus, le BG pourrait être un marqueur précoce de pneumopathie à *P. jirovecii*, des auteurs avançant, sur la base de données rétrospectives, qu'un taux de BG peut être détecté positif un à sept jours avant le diagnostic microscopique (57, 60).

Cette technique présente des limites bien identifiées et sa place dans la stratégie diagnostique est à consolider :

- son caractère quasi-ubiquitaire chez les champignons pathogènes de l'appareil respiratoire de l'homme avec absence de spécificité de genre est un frein à une utilisation en première intention dans les pathologies sévères rapidement évolutives ;
- de plus, dans la technique à l'amœbocyte, le risque est élevé de conclure à une infection fongique (faux positif) du fait de l'intercurrence des lipopolysaccharides (LPS) présents au cours de maladies bactériennes à bactéries Gram négatives, après utilisation de matériel médical (dont les gazes, les éponges chirurgicales et les membranes de cellulose d'hémodialyse) ou suite à l'administration d'immunoglobulines et de certains antibiotiques comme l'amoxicilline-acide clavulanique (13, 29). De surcroît, les risques de contamination pré-analytique sont à prévenir en n'utilisant pour réaliser le test au BG que des tubes plastiques certifiés exempts de glucanes et des pipettes de manipulation sans coton (56) ;
- sa pertinence serait discutable pour les patients sous prophylaxie par cotrimoxazole qui inhiberait le relargage du BG dans le sang (57) ;
- il est important de noter que les techniques de dosage du BG commercialisées dans le monde ne reposent pas sur les mêmes principes et sont exprimées avec des unités différentes et des seuils de détection distincts (61), ce qui limite fortement la réalisation de méta-analyse ou leur interprétation en présence de forte hétérogénéité dans les données (29) ;
- les valeurs de BG seraient significativement plus élevées chez les patients atteints d'une PPJ que chez ceux uniquement colonisés par le champignon (52, 61) mais les valeurs seuils permettant de distinguer l'infection de la colonisation restent à déterminer (5) ;
- son rôle en tant que facteur pronostique d'évolution de la pathologie et de survie, sur la base du taux initial mesuré, est contesté au vu des résultats contradictoires entre études (60) ;
- enfin, la possibilité que le dosage (quantitatif) du BG puisse servir à suivre l'efficacité d'un traitement par cotrimoxazole est avancée par certains (58) mais controversée en l'absence d'études prospectives (62).

Face au problème de discordance de résultats diagnostiques d'une PPJ entre les méthodes standard de diagnostic (coloration ou IF) et ceux de l'amplification génique en temps réel, des auteurs (46) ont pointé que dans les populations non VIH, la faible charge fongique observée était un obstacle à toute corrélation entre méthodes de sensibilités différentes. Ils proposent - sur le modèle établi en onco-hématologie par l'EORTC/MGS pour les infections fongiques invasives (aspergillose, candidoses) chez les patients neutropéniques (63) - un algorithme de diagnostic décisionnel multicritères (cliniques, radiologiques et microbiologiques) classant chaque cas en PPJ prouvée, probable et possible, ce qui légitimerait l'éventualité d'un traitement prophylactique spécifique et optimiserait la précocité d'une prise en charge curative de PPJ. Le dosage sanguin de BG pourrait être inclus dans la stratégie diagnostique comme aide à l'interprétation des résultats d'une qPCR et aux décisions thérapeutiques (45).

¹² <http://www.acciusa.com/clinical/technical/index.html>

► Diagnostic biologique indirect

La recherche et le titrage des anticorps (Ac) sériques spécifiques n'a pas d'intérêt au plan individuel, utile uniquement en enquêtes épidémiologiques (11).

1.4 Conditions actuelles de prise en charge par l'Assurance maladie

Un seul acte est actuellement inscrit à la NABM pouvant servir dans le diagnostic d'une pneumocystose : il s'agit d'un examen direct par technique d'immunofluorescence. Cet acte n'est pas spécifique de *P. jirovecii* :

Examen diagnostique à la NABM (sous chapitre 6-02 : actes isolés, examens divers, examens microscopiques)	Code des examens
Recherche d'une espèce microbienne par immunofluorescence sur prescription explicite (<i>Pneumocystis</i> , <i>Treponema</i> , <i>Legionella</i> , ...) (quel que soit le nombre de sérums utilisés)	5291

L'examen direct de recherche spécifique après coloration, l'amplification génique (PCR), ainsi que le dosage du BG sérique ne sont pas inscrits à la NABM. Parmi ces trois actes, deux sont inscrits au « Référentiel des actes innovants hors nomenclature » (RIHN), et un inscrit sur la « liste complémentaire (LC) d'actes de biologie médicale et d'anatomopathologie » du RIHN, ce qui permet leur prise en charge financière s'ils sont réalisés en établissement *via* la Mission d'enseignement, de recherche, de référence et d'innovation (MERRI). Le code et le libellé de ces tests figurent comme suit au RIHN et à la LC :

Examen diagnostique au RIHN	Code des examens
Détection par PCR classique ou temps réel simplex de champignons ou parasites (hors diagnostic prénatal de la toxoplasmose et hors les microorganismes inscrits à la NABM) (BHN 480)	N151
Infections fongiques invasives (IFI) : recherche de bêta-glucanes circulants (BHN 100)	G215

Examen diagnostique sur la liste complémentaire au RIHN (chapitre 06-04, Mycologie)	Code des examens
Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> (BHN30), accompagné de la note de commentaire : « par 1 coloration, maximum 2 cotations. Dans le cas d'un examen mycologique d'un LBA, sur demande ou après accord avec le clinicien, le biologiste peut effectuer la recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> (importance clinique du dépistage de <i>Pneumocystis</i> à l'examen direct) ».	F029

Les seules données chiffrées disponibles concernant l'activité des laboratoires de biologie médicale pour la recherche de PPJ sont celles obtenues par le financement du RIHN qui sont pour l'année 2015 :

Nature de l'acte	Nombre d'actes facturés en 2015
F029 (liste complémentaire) : recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par 1 coloration, maximum 2 cotations.	25 396
G215 (RIHN) : IFI ; recherche de bêta-glucanes circulants	11 977

1.5 Synthèse des données de contexte

Les éléments de contexte recueillis dans la littérature générale pointent l'existence de deux populations différentes souffrant de pneumocystose, distinctes tant au niveau du diagnostic clinico-radiologique que biologique.

La survenue d'une PPJ peut être l'événement qui révèle la pathologie VIH+. Lorsque le statut VIH+ est connu, le risque de survenue est surveillé. Ainsi, les recommandations, notamment françaises, sont de débiter une prophylaxie médicamenteuse lorsque l'immunosuppression en cellules T CD4 atteint 200/mm³ ou quel que soit le taux, lors de la survenue d'une affection maligne chez une PVVIH (39). Une PPJ est identifiable chez une PVVIH en règle générale par des symptômes cliniques francs et une charge fongique élevée dans les liquides biologiques autorisant une identification par les techniques classiquement utilisées en mycologie et conduisant à un diagnostic de certitude.

La population de patients immunodéprimés non VIH atteinte de PPJ est en augmentation ces dernières années et devient prépondérante en matière d'incidence par rapport à la population VIH+, alors même qu'elle recouvre des situations physiopathologiques nombreuses et plus hétérogènes. La littérature souligne que le diagnostic ne peut se baser uniquement sur les signes cliniques ou radiologiques non révélateurs à eux seuls de l'agent pathogène et que la présence du champignon doit être recherchée par des méthodes microbiologiques sensibles. Pour ces patients non VIH, pouvant s'aggraver très rapidement, le recours aux techniques PCR peut être nécessaire. Pour ces techniques en constante évolution, toutes les problématiques n'ont pas encore été résolues en matière de standardisation de la quantification et par conséquent, celles relatives à la colonisation. Cette dernière peut se définir comme un portage chronique de *P. jirovecii* sans signe clinique de PPJ et avec une charge fongique moindre. Elle est retrouvée chez des sujets en immunodépression, porteurs d'une autre pathologie pulmonaire ou chez des porteurs sains. Des auteurs font l'hypothèse d'un continuum plutôt qu'à une dichotomie stricte - colonisation *versus* infection - dans le statut vis-à-vis de *P. jirovecii* chez l'homme (23).

Le dosage sérique de l'antigène BG, rapporté fréquemment dans la littérature, est intéressant par son caractère non invasif chez des patients très jeunes et/ou fragiles pour la détection des IFI.

2. Méthode d'évaluation

2.1 Champ et méthode d'évaluation

Conformément à la feuille de route adoptée par le Collège de la HAS en octobre 2016 (1), la procédure d'évaluation consiste pour ce sujet, en :

- la réalisation d'une analyse critique de la littérature synthétique (recommandations de bonne pratique, rapports d'évaluation technologique, méta-analyses et revues systématiques) identifiée par une recherche documentaire systématique puis sélectionnée sur des critères de qualité ;
- le recueil du point de vue des professionnels concernés par le sujet, *via* l'envoi d'un questionnaire à leurs différents organismes professionnels :
 - Conseil national professionnel - Fédération française de pneumologie (CNPP),
 - Conseil national professionnel d'hématologie (CNPH),
 - Conseil national professionnel de biologie des agents infectieux-hygiène hospitalière (CNPBAIHH),
 - CNP d'infectiologie - Fédération française d'infectiologie et Société française de lutte contre le Sida (SFLS),
 - Centre national de référence des mycoses invasives et antifongiques (CNRMA).

Les conclusions de l'argumentaire sont fondées sur l'ensemble des données ainsi recueillies.

L'évaluation porte sur les trois types d'exams suivants et leur place dans le diagnostic de la pneumocystose :

- recherche directe de *P. jirovecii* par immunofluorescence ou après colorations ;
- amplification génique par techniques PCR ;
- dosage du β -(1-3)-D-glucane (BG) sérique.

2.2 Recherche documentaire, sélection et analyse

2.2.1 Stratégie de recherche bibliographique et résultats

Conformément à la méthode d'évaluation retenue, seule la littérature synthétique [recommandations de bonne pratique (RBP), rapports d'évaluation technologique (HTA), méta-analyses et revues systématiques] a été recherchée. La recherche documentaire a été conduite de la manière suivante (cf. Tableau 2).

Tableau 2. Stratégie d'interrogation documentaire dans les bases de données.

Sources interrogées	<i>Medline, Embase</i>
Recherches complémentaires	Sites internet d'agences d'évaluation de technologies de santé ; sites internet d'organismes professionnels français et étrangers ; références bibliographiques des publications lues <i>in extenso</i>
Période de recherche	Recherche initiale sur la période de janvier 2005 à avril 2017 puis veille réalisée jusqu'à la validation du document par le Collège de la HAS (septembre 2017)
Langues	Français ou anglais

Les équations de recherche, les mots-clés utilisés et la liste des sites internet consultés figurent en Annexe 1.

Cette recherche documentaire a permis d'identifier 275 documents (271 provenant des bases de données et quatre des recherches complémentaires).

2.2.2 Sélection et méthode d'analyse de la littérature

► Critères et résultats de la sélection

Une analyse des titres et résumés a permis la réalisation d'une première sélection qui a consisté à exclure les documents sur les critères suivants :

- publications sans lien avec le sujet ;
- doublons, version(s) antérieure(s) devenue(s) obsolète(s) de recommandations ou de rapport d'évaluation lorsqu'il existe une version plus récente ;
- publications non disponibles en français ou anglais ;
- publications relatant les résultats d'une étude originale ne faisant pas partie de la littérature synthétique.

Ont ainsi été écartés 247 documents.

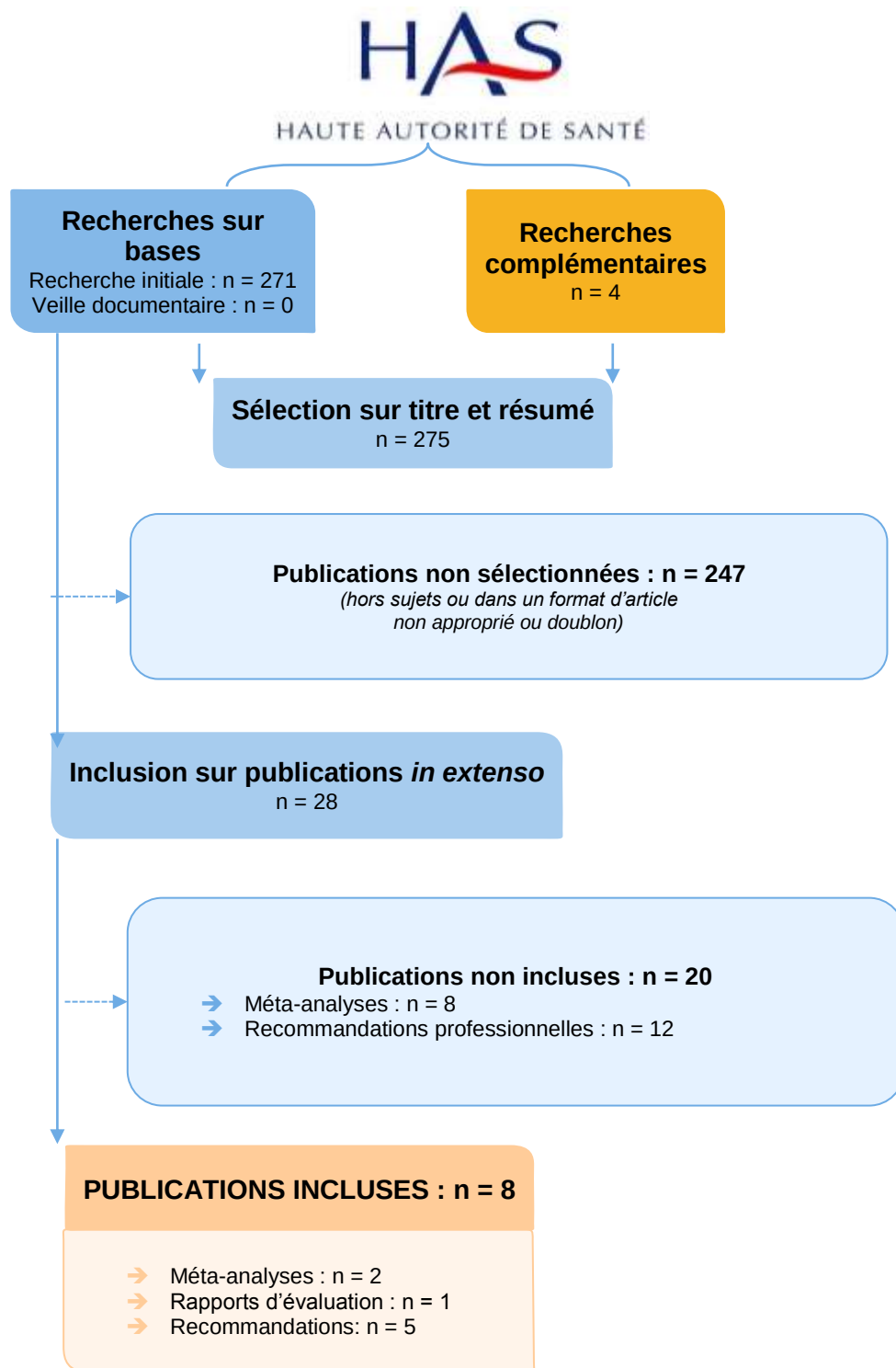
Une deuxième sélection a été faite sur lecture *in extenso* des 28 publications restantes, qui ont fait l'objet d'une critique méthodologique. Cette analyse n'a pas retenu 20 documents (RBP, méta-analyses) pour les raisons suivantes :

- objectif se situant hors des sujets de l'évaluation ;
- méta-analyses ou recommandations traitant du diagnostic des infections fongiques invasives chez les patients immunodéprimés; ne traitant pas *in fine* de la recherche de *P. jirovecii* pour les tests évalués (test du BG en particulier) ;
- document sans qualité méthodologique minimale : sans information sur les modalités d'élaboration et/ou sur les critères de jugement, sans garantie sur l'exhaustivité de la recherche bibliographique et sans système de gradation de la force de la recommandation/niveau de preuve ; c'est le cas de la RBP américaine publiée conjointement par les *Centers for Disease Control and Prevention*, le *National Institutes of Health* et la *HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America*, en 2016 et intitulée « *Guidelines for Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents* » (32) qui ne présente ni gradation pour la partie concernant le diagnostic, ni préconisations détaillées et claires pour le diagnostic de PPJ ;
- méta-analyses traitant des performances diagnostiques des dosages de l'antigène BG dans le sérum ou des techniques PCR mais dont les données font partie du corpus de l'argumentaire de trois RBP sélectionnées et analysées pour la population adulte (4, 38, 64). Les données de ces MA (65, 66) sont prises en considération *via* les RBP.

Cette seconde sélection a abouti *in fine* à retenir huit documents : cinq RBP, deux MA et un rapport d'HTA.

Les résultats de la recherche documentaire et du processus de sélection sont présentés dans le schéma ci-dessous (Figure 3).

Figure 3. Diagramme de sélection des références bibliographiques analysées.



► Analyse de la qualité méthodologique de la littérature sélectionnée

Les cinq RBP, les deux MA et le rapport d'HTA analysés ont fait l'objet d'une critique méthodologique qui s'est appuyée sur des grilles internationales systématisées :

- pour les méta-analyses, la grille AMSTAR (cf. Annexe 3) (67) ;
- pour les RBP, les items du « Guide d'analyse de la littérature et gradation des recommandations » en ligne sur le site de la HAS¹³, et sur la grille globale « grille AGREE II - GRS », limitée à quatre items, développée par le consortium international AGREE (68) et dédiée aux évaluations rapides, traduite librement en français. La grille AGREE II-GRS et ses items sont présentés en Annexe 3 ;
- pour le rapport d'HTA, la grille INAHTA (*International Network of Agencies for Health Technology Assessment*) pour l'élaboration et la lecture des rapports d'évaluation technologique (HTA) (cf. Annexe 6).

2.3 Recueil du point de vue des professionnels

2.3.1 Organismes professionnels consultés

Les professionnels sollicités sont ceux impliqués dans la réalisation ou la prescription de la détection de *P. jirovecii* (par examen direct par immunofluorescence ou colorations et par amplification génique) ainsi qu'éventuellement le dosage du BG sérique pour le diagnostic d'une PPJ. Leur point de vue a été recueilli via leurs conseils nationaux professionnels (CNP) :

- Conseil national professionnel - Fédération française de pneumologie (CNPP) ;
- Conseil national professionnel d'hématologie (CNPH) ;
- Conseil national professionnel d'infectiologie - Fédération française d'infectiologie (CNP-FFI) [et Société française de lutte contre le Sida (SFLS)] ;
- Conseil national professionnel de biologie des agents infectieux-hygiène hospitalière (CNPBAIHH).

Le Centre national de référence des mycoses invasives et antifongiques (CNRMA) a également été consulté par la HAS.

2.3.2 Modalité de consultation des parties prenantes

Ces organismes ont été sollicités en tant que parties prenantes au sens du décret n°2013-413 du 21 mai 2013¹⁴, dans le cas présent comme groupes professionnels concernés en pratique par les conséquences de ce rapport, c'est-à-dire par la réalisation ou la prescription de ces trois actes de biologie médicale (examen direct au microscope par immunofluorescence ou colorations, amplification génique de *P. jirovecii* et dosage du BG sérique). Ils devaient à ce titre représenter et exprimer l'intérêt général de leurs membres. Cette sollicitation a été menée conformément à la procédure de consultation des parties prenantes mise en place par la HAS¹⁵.

En pratique, le président de chacun des organismes concernés a été directement sollicité afin que l'organisme professionnel (OP) qu'il représente exprime son point de vue argumenté. Il lui a été adressé à cette fin un questionnaire ouvert, standardisé, rédigé par la HAS, ainsi qu'un exemplaire du document de travail de la HAS (argumentaire provisoire) contenant une présentation du contexte et l'analyse bibliographique réalisés conformément à la méthode décrite au chapitre 2.2.

¹³ <http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/analiterat.pdf>.

¹⁴ Décret n°2013-413 du 21 mai 2013. Le quatrième alinéa de ce décret dispose que : « La décision peut s'appuyer, si l'objet de l'expertise le justifie, sur la prise en compte des points de vue des « parties prenantes » (ou « parties intéressées »), c'est-à-dire des personnes ou groupes concernés ou susceptibles de l'être, directement ou indirectement, par les conséquences de cette décision, notamment des milieux associatifs et des acteurs économiques ou professionnels, ou qui représentent l'intérêt général de groupes concernés par ces conséquences. ».

<http://legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027434015&categorieLien=id>

¹⁵ Procédure de consultation des parties prenantes de la HAS, juin 2014.

Cette sollicitation a été envoyée entre le 20 et le 22 juin 2017. Les retours des parties prenantes ont eu lieu du 12 juillet 2017 au 11 septembre 2017. Le Conseil national professionnel - Fédération française de pneumologie n'a finalement pas répondu aux questions de la HAS. Le même questionnaire étant envoyé à tous les OP, ces derniers ont apporté des réponses uniquement aux questions les concernant.

Les points de vue émis par les quatre OP qui ont répondu à la sollicitation de la HAS sont présentés *in extenso* en annexe (Annexe 7 à Annexe 10). Ces différents points de vue sont synthétisés par la HAS dans le chapitre suivant de cet argumentaire.

3. Résultats de l'évaluation

3.1 Analyse de la littérature

Suite à la recherche bibliographique et à la sélection de la littérature ainsi identifiée, deux méta-analyses, cinq recommandations de bonne pratique (RBP) et un rapport d'évaluation technologique (HTA pour *Health Technology Assessment*) ont été analysés.

- les cinq RBP abordent la stratégie diagnostique de recherche d'infections fongiques invasives à manifestation pulmonaire chez des patients immunodéprimés mais une seule cible spécifiquement la recherche de *P. jirovecii* (4) ;
- concernant les deux méta-analyses, ce sont les plus récentes retrouvées dans la littérature sur les sujets de cette évaluation : une porte sur les études évaluant les performances du test du β -(1-3)-D-glucane (BG) dans le sang (69), et l'autre, sur les études évaluant les performances de la technique d'amplification génique en temps réel, quantitative (qPCR), de recherche de *P. jirovecii* (70). Aucune méta-analyse n'a été retrouvée pour l'évaluation des tests microscopiques de recherche de *P. jirovecii* ;
- le rapport de l'Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS), l'agence québécoise d'évaluation en santé, porte sur le dosage du BG sérique (71).

3.1.1 Présentation des publications sélectionnées

► Méta-analyses

La méta-analyse (MA) de Li *et al.* (69) a évalué les valeurs de performances diagnostiques du BG à partir de 13 études sur échantillons sanguins de patients en situation d'immunodépression, souffrant de pneumopathie. Cette méta-analyse, publiée en 2015, n'est pas incluse dans la littérature support des trois RBP relatives au diagnostic de PPJ ou d'IFI chez les patients immunodéprimés d'onco-hématologie sélectionnées pour la présente évaluation.

La MA de Summah *et al.* (70), ayant comme objectif d'évaluer les performances des techniques de PCR quantitative en temps réel (qPCR), a sélectionné au final dix études publiées jusqu'en mai 2010. Cette méta-analyse publiée en 2013 n'est pas incluse dans la littérature support des RBP retenues dans l'évaluation.

La qualité méthodologique de ces MA, établie à l'aide de la grille AMSTAR, est rapportée en Annexe 4, page 53. Les deux MA sont classées de méthodologie intermédiaire à bonne.

► Recommandations de bonne pratique (RBP)

Propos liminaire

Il est à noter que la place de la PPJ parmi les IFI n'est pas fixée de façon homogène et argumentée dans la littérature. Selon les publications, la PPJ est :

- soit considérée parmi les IFI à risque de survenue dans la population immunodéprimée non VIH, en onco-hématologie, après greffe de CSH, chimiothérapie intensive pour leucémie ou autre cancer hématologique, thérapie ciblée par Ac monoclonal, lors de corticothérapie au long cours ;
- soit exclue d'autres publications du même domaine portant sur les IFI (RBP, méta-analyses).

Ainsi, l'*European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC-MSG) n'a pas intégré la PPJ parmi les IFI chez les patients immunodéprimés en onco-hématologie dans sa classification établie afin d'harmoniser les critères de diagnostic d'IFI en recherche clinique (63), classification reprise dans la littérature et notamment les RBP. Par voie de conséquence, l'*European Conference on Infections in Leukemia* (ECIL) a établi en 2016 une RBP spécifique sur le diagnostic de PPJ qui était exclue de sa précédente RBP de 2015 sur les IFI.

Présentation générale des RBP

Les cinq RBP sélectionnées abordant la stratégie diagnostique de la pneumocystose sont les suivantes (Tableau 3) :

Tableau 3. Recommandations de bonne pratique (RBP) sélectionnées pour *P. jirovecii*.

Société(s) savante(s)	Pays, année, référence	Titre de la RBP
<i>Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health, HIV Medicine Association of the Infectious Society of America, Pediatric Infectious Diseases Society et American Academy of Pediatrics</i>	USA, 2013, (31)	<i>Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections Among HIV-Exposed and HIV-Infected Children</i>
Société française de pédiatrie et Société pédiatrique de pneumologie et d'allergologie (SP2A)	France, 2014, (72)	Recommandations sur l'utilisation des nouveaux outils diagnostiques étiologiques des infections respiratoires basses de l'enfant de plus de trois mois
<i>British Society for Medical Mycology (BSMM)</i>	UK, 2015, (38)	<i>Best practice recommendations for the diagnosis of serious fungal diseases</i>
<i>Infectious Diseases Working Party (AGIHO) de la German Society of Hematology and Medical Oncology (DGHO)</i>	Allemagne, 2015, (64)	<i>Diagnosis and antimicrobial therapy of lung infiltrates in febrile neutropenic patients (allogeneic SCT excluded)</i>
<i>European Conference on Infections in Leukemia (ECIL)</i>	Europe, 2016, (4)	<i>Guidelines for the diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients</i>

Les cinq recommandations traitent des modalités de prélèvement et d'examen direct de ces prélèvements, des techniques d'amplification génique (PCR) de recherche de *P. jirovecii*, ainsi que du dosage du BG sérique pour quatre d'entre elles (4, 38, 64, 72).

La population cible devant faire l'objet d'une recherche de *P. jirovecii* est renseignée dans une recommandation de façon détaillée (72) mais de façon moins explicite dans les autres RBP.

Si dans toutes les publications, le risque de PPJ est reconnu sans équivoque chez les PVVIH, la population non VIH décrite est plus hétérogène entre publications, et parfois, elle est très spécifique d'un contexte pathologique comme dans la RBP du groupe *Infectious Diseases Working Party* (AGIHO) de la DGHO (64). Les RBP précisent que cet agent infectieux atteint une population affectée par une immunosuppression touchant les lymphocytes T (4, 72) :

- soit innée (immunodépressions congénitales) ;
- soit acquise et induite par une dénutrition sévère chez l'enfant, des chimiothérapies dans les leucémies ou cancers solides (cyclophosphamide, analogues de la purine,...), les immunosuppresseurs tels les corticoïdes, le méthotrexate, après greffe d'organe ou greffe allogénique de CSH.

Ces cinq recommandations portent sur des populations différentes de patients :

- deux considèrent la population pédiatrique immunodéprimée, une spécifiquement celle infectée par le VIH (31) alors que l'autre traite des deux populations, VIH+ et non VIH (72) ;
- trois traitent des personnes adultes immunodéprimées, considérées à risque de développer une infection fongique invasive :
 - une est relative au diagnostic des infections fongiques graves et invasives (38),

- deux concernent les populations adultes souffrant d'une hémopathie maligne, mais l'une y inclut les receveurs de greffe allogénique de CSH (4), alors que l'autre se focalise sur les patients neutropéniques fébriles présentant des infiltrats pulmonaires, à l'exclusion des receveurs de greffe allogénique de CSH (64).

Qualité méthodologique

L'analyse de la qualité des recommandations évaluées selon la grille AGREE II-GRS figure en Annexe 5. De façon globale, la qualité des RBP, évaluée avec cette grille est assez satisfaisante, liée notamment à une présentation des modalités d'élaboration de ces publications comme suit :

- les modalités d'élaboration des préconisations sont présentées de façon détaillée, fondées sur avis de groupe de travail d'experts argumenté par des résultats d'études cliniques et de méta-analyses. Néanmoins, pour les RBP issues d'un processus de consensus, la quantification du consensus n'est pas chiffrée. Seule une RBP explique que si le consensus n'est pas obtenu, la décision est prise à la majorité des votants (64) ;
- les méthodes de recherche bibliographique garantissant l'exhaustivité des données collectées lors de l'élaboration de la RBP sont abordées : les auteurs relatent s'être basés sur une revue systématique de la littérature de preuve pour actualiser les données, mais tous ne précisent pas les bases de données qui ont été interrogées (31) et/ou la période de recherche retenue (64, 72). Aucune des recommandations analysées n'a défini de critères de sélection de la littérature identifiée (hormis la langue), ni les critères de jugement (performances diagnostiques, utilité clinique...) ;
- un système de gradations de niveau de preuve et/ou de force de recommandation est exposé dans ces RBP. Cependant, pour les aspects relatifs au diagnostic, trois recommandations ne sont pas gradées (31) ou ne renseignent pas le niveau de preuve (38), ne l'appliquant qu'aux préconisations sur la prise en charge thérapeutique. L'argument exposé par les auteurs de la recommandation de la « *German Society of Hematology and Medical Oncology* (DGHO) est : « le grade du niveau de preuve n'a pas été établi en l'absence de données issues d'essais cliniques prospectifs randomisés pour les points relatifs au diagnostic » ;
- seule une recommandation, spécifique de la PPJ, présente un algorithme de stratégie diagnostique détaillé en cas de suspicion de PPJ (4) ;
- la gestion des liens d'intérêts et les sources de financement sont décrites dans les cinq RBP.

► Rapport d'HTA

La dernière version du rapport de l'INESSS sur le dosage du BG sérique (71) date du 17 février 2017 et constitue une actualisation d'un rapport précédent en date du 22 février 2016. L'actualisation bibliographique faite a enrichi l'évaluation de nouvelles données issues d'une méta-analyse récente et a pris en compte de nouvelles RBP. L'analyse par la grille INAHTA a permis de conclure que ce rapport est de bonne qualité rédactionnelle et méthodologique (cf. Annexe 6).

3.1.2 Prélèvements à réaliser pour la recherche directe de *P. jirovecii*

Selon les cinq recommandations sélectionnées (cf. Tableau 3), les différents prélèvements sur lesquels la recherche de *P. jirovecii* doit être réalisée sont choisis en prenant en compte l'état clinique du patient conditionnant les possibilités d'effectuer chacun des actes appropriés :

- chez les enfants, les techniques de prélèvement les moins invasives sont proposées en première intention, les plus invasives n'étant effectuées que si les expectorations induites ou les aspirations naso-pharyngées n'ont pas permis d'établir de diagnostic :
 - pour les enfants VIH+, les deux RBP retenues relatent que l'expectoration induite (si enfant de plus de deux ans) (31) ou l'aspiration naso-pharyngée permettent en règle générale d'identifier le champignon au microscope étant donné la plus forte charge fongique dans cette population (72). La recommandation américaine précise par contre que l'examen direct ne devrait pas être réalisé sur expectoration spontanée (crachats) en raison de sa trop faible sensibilité (32) et la recom-

mandation française précise que la recherche de *P. jirovecii* par biologie moléculaire reste à valider sur écouvillons naso-pharyngés et rinçages oro-pharyngés,

- le LBA reste le prélèvement de choix, en particulier chez l'enfant non VIH, au regard de ses performances diagnostiques ; mais il est assez souvent non réalisable en pédiatrie (72),
- enfin, la biopsie transbronchique sous bronchoscopie n'est réalisée qu'en dernier recours, si la suspicion de PPJ perdure malgré un liquide de LBA négatif, sachant qu'elle est contre-indiquée en cas de thrombocytopénie. La biopsie chirurgicale à poumon ouvert, technique la plus sensible et la plus spécifique, est très lourde et susceptible de provoquer des complications graves, hémorragiques ou un pneumothorax, et d'indication très réduite (31) ;
- concernant les patients adultes, le LBA est le liquide biologique à privilégier pour la recherche de *P. jirovecii* selon les trois RBP car il montre une valeur prédictive négative élevée, en cas de suspicion d'infection fongique grave (38), invasive au décours d'hémopathie maligne ou de greffe allogénique de CSH (4), et chez les patients neutropéniques fébriles avec infiltrat pulmonaire à l'imagerie (64) :
 - chez l'adulte VIH+, une RBP (38) estime par contre qu'une expectoration induite ou même simple pourrait être aussi sensible que le LBA pour détecter une PPJ,
 - bien que la localisation privilégiée du champignon se situe à la surface des cellules alvéolaires, une de ces RBP considère néanmoins que les prélèvements non invasifs de sécrétions du tractus respiratoire (expectoration induite, aspiration nasale ou naso-pharyngée, voire crachats) peuvent être une alternative possible au LBA - mais avec un niveau de recommandation moins important (modéré) - chez les adultes non VIH, souffrant d'hémopathie maligne et chez les receveurs de greffe allogénique de CSH (4). Cette position est partagée par une autre recommandation qui relève que le LBA n'est pas toujours possible et contre-indiqué en cas d'hypoxémie critique chez les patients neutropéniques fébriles (64),
 - les RBP indiquent que le recours aux prélèvements invasifs par biopsies, responsables d'éventuelles complications sévères, est justifié pour identification histologique si le LBA est négatif malgré des symptômes évocateurs (infiltrats pulmonaires) et si l'état clinique du sujet est dégradé (64).

Au total, selon les cinq recommandations sélectionnées, le LBA est le prélèvement à privilégier par ses performances diagnostiques pour la recherche microscopique de *P. jirovecii*.

Nonobstant, chez les PVVIH dont la charge fongique est généralement plus importante, l'examen direct peut être réalisé sur des prélèvements moins invasifs (expectorations induites, rinçages oro ou naso-pharyngés), attitude à privilégier en particulier chez l'enfant.

Lorsque l'exécution d'un LBA est impossible, si nécessaire, les prélèvements invasifs peuvent être réalisés dans le tractus respiratoire profond car ils offrent la meilleure sensibilité pour la recherche de *P. jirovecii*.

3.1.3 Techniques de recherche directe au microscope (colorations, IF)

Dans les cinq RBP sélectionnées (4, 31, 38, 64, 72), l'examen direct microscopique, par colorations ou immunofluorescence, est présenté dans la stratégie diagnostique pour la recherche de *P. jirovecii* chez des patients à risque de PPJ comme l'examen biologique posant un diagnostic de certitude avec l'identification de formes caractéristiques du champignon (kystes et/ou trophozoïtes).

Plus précisément, ces RBP observent que la sensibilité de ces tests dépend de la technique utilisée - sachant que le ratio entre kystes et trophozoïtes est de un pour dix - et du prélèvement biologique sur lequel le test est réalisé, le LBA étant comme dit précédemment à privilégier. Il en ressort que :

- les techniques d'IF, directe ou indirecte, sont des techniques plus sensibles que les colorations pour identifier les formes kystiques. Ainsi, une RBP rapporte chez des patients d'onco-hématologie avec suspicion d'IFI que l'IF directe a une sensibilité de 86 - 97 % dans le LBA et l'expectoration induite, supérieure à celle de deux colorations (38) ;
- la complémentarité des propriétés des colorants ou des Ac utilisés en IF doit être mise en œuvre afin de mettre en évidence, dans l'examen direct au microscope focal, les kystes (coloration de la paroi ou des ascospores) et les formes trophiques.

L'agrégation de ces éléments (formes trophiques majoritaires, meilleure sensibilité de l'IF avec Ac monoclonal colorant les kystes) conduit les cinq RBP à préconiser l'utilisation complémentaire de deux techniques pour augmenter la sensibilité par la détection des différentes formes fongiques.

Toutefois, des différences apparaissent dans les stratégies d'association comme suit :

- la RBP allemande classe le blanc de calcofluor (niveau de recommandation A) en priorité sur le May-Grünwald-Giemsa (MGG) (niveau de recommandation B) car il permet d'évaluer la présence de *P. jirovecii* mais aussi d'autres champignons dans un contexte de suspicion d'IFI. Elle considère l'IF indirecte comme technique confirmatoire (niveau de recommandation A) pour *P. jirovecii* (64) ;
- la RBP anglaise propose l'utilisation de deux colorations, parmi calcofluor, bleu de toluidine et Gomori Grocott (GG), les considérant néanmoins moins sensibles que l'IF (38) ;
- la RBP européenne préconise d'associer l'IF identifiant les kystes, plus sensible, et une coloration des trophozoïtes avec le Giemsa (4) ;
- la RBP pédiatrique française indique la coloration au MGG (et sa variante en kit) pour mettre en évidence les formes trophiques et les kystes, ainsi que la coloration argentique de GG et le bleu de toluidine pour colorer les kystes. Elle rapporte que la sensibilité du diagnostic microscopique conventionnel sur LBA est supérieure à 75 % chez les patients VIH+ mais souvent inférieure à 50 % chez les patients non VIH (72), performance plus faible que celle de l'IF pour la mise en évidence des kystes ;
- la RBP américaine (31) préconise d'associer deux colorations complémentaires et l'IF directe utilisant des Ac monoclonaux, plus sensible et plus spécifique que les colorations. Pour rappel, cette RBP concerne la population pédiatrique VIH+ dans laquelle l'examen direct sur prélèvements superficiels suffit généralement à détecter le micromycète, la mise en œuvre de trois colorations garantissant d'objectiver les formes fongiques si elles sont présentes.

Au total, les cinq RBP retiennent l'examen direct au microscope comme un examen majeur dans l'identification de *P. jirovecii*.

En ce qui concerne les techniques de révélation, les cinq recommandations présentent l'immunofluorescence (directe ou indirecte) comme plus sensible que toutes les colorations. Quatre RBP sur cinq se positionnent cependant sur l'association complémentaire de deux techniques afin de détecter les deux formes colorables de *P. jirovecii* (asques/ascospores et formes trophiques), soit deux techniques de coloration, soit l'IF couplée à une (voire deux) coloration(s) conventionnelle(s).

3.1.4 Techniques d'amplification génique

► Méta-analyse

La méta-analyse publiée en 2013 par Summah *et al.*, visant à évaluer les performances des techniques de PCR quantitatives spécifiques de *P. jirovecii*, a été retenue. Datant de 2013, elle n'a pas été prise en compte dans la dernière recommandation de l'ECIL qui s'est basée sur deux méta-analyses antérieures (73, 74).

La méta-analyse porte sur dix études sélectionnées pour avoir évalué une technique qPCR : la qPCR a été effectuée dans huit études sur le liquide issu d'un LBA, dans une sur expectoration induite et dans la dernière sur expectoration induite et rinçage buccal : le nombre d'échantillons analysés dans la méta-analyse était au total de 2 330 dont 2 058 sur le LBA (cf. Tableau 4).

Tableau 4. Analyse de la méta-analyse de Summah et al. (70), portant sur la recherche de *P. jirovecii* par PCR quantitatives.

Éléments analysés	Données de la méta-analyse (70)
Nombre d'études incluses dans la méta-analyse	Dix études (trois prospectives, quatre rétrospectives, trois de type inconnu)
Nombre total d'échantillons inclus dans la méta-analyse	2 058 LBA/2 330 prélèvements respiratoires
Objectifs de la méta-analyse	Déterminer la différence de performance globale des techniques PCR en temps réel pour le diagnostic de la PPJ chez les patients immunodéprimés VIH+ et non VIH
Tests PCR évalués	PCR en temps réel (six études), TaqMan quantitative (trois études), quantitative <i>touch-down</i> (une étude)
Test de référence	Variable et multifactoriel : microscopie (quatre études), microscopie + IF (une étude), IF (une étude), signes cliniques + radiologiques + réponse au traitement (quatre études)
Type de patients inclus dans la méta-analyse	Patients en situation d'immunodépression, VIH+ et non VIH, sous corticothérapie, avec syndrome d'immunodéficit congénital, pathologie hématologique, cancer solide, après greffe d'organes ou de cellules souches, avec maladies inflammatoires rhumatoïdes, maladie auto-immune, maladie systémique (sarcoïdose) à symptomatologie pulmonaire chronique ou aiguë (asthme,...), patients intubés en soins intensifs
Type d'études incluses dans la méta-analyse	Études prospectives et rétrospectives, tout design sauf études de cas
Analyse critique des études originales par les auteurs	Critères QUADAS-2 (10 items sur 14)
Critères d'évaluation en vue de la méta-analyse	Sensibilité, spécificité combinées, rapport de vraisemblance positif, rapport de vraisemblance négatif, hétérogénéité (I^2), méta-régression en analyse bivariée HSROC (modèle hiérarchique), AUC
Résultats des méta-analyses	Performance diagnostique du test : ▸ sensibilité = 0,97 [IC95 % : 0,93-0,99] ; $I^2 = 68,64$ ▸ spécificité = 0,94 [IC95 % : 0,90-0,96] ; $I^2 = 83,54$ AUC HSROC = 0,99 [0,97-0,99]. Analyses en sous-groupes : • Études avec patients VIH+ et non VIH (huit études) : ▸ sensibilité = 0,97 [IC95 % : 0,93-0,99] ▸ spécificité = 0,93 [IC95 % : 0,89-0,96] • Test réalisé sur échantillon de LBA (huit études) : ▸ sensibilité = 0,98 [IC95 % : 0,94-0,99] ▸ spécificité = 0,93 [IC95 % : 0,89-0,96] • Microscopie comme test de référence (six études) : ▸ sensibilité = 0,97 [IC95 % : 0,92-0,99] ▸ spécificité = 0,93 [IC95 % : 0,88-0,96]

Éléments analysés	Données de la méta-analyse (70)
Grille AMSTAR	Méta-analyse classée intermédiaire à bonne (analyse en Annexe 4). Cette méta-analyse a respecté les méthodes statistiques à appliquer à la réalisation d'une analyse de ce type, en procédant à : • une évaluation des facteurs de performance combinés avec analyse par régression bivariée ; • un calcul de l'hétérogénéité et des analyses en sous-groupes pour des facteurs connus comme déterminants dans les performances des tests diagnostiques de la pneumocystose [choix du standard de référence (unique (microscopie) ou multiple), statut des patients vis-à-vis du VIH, liquide biologique servant à cette détection (LBA ou autre)]. Ses principales limites sont : • les techniques de biologie moléculaire utilisées dans les études sélectionnées sont des techniques dites PCR en temps réel, mais de technicité différente (système Taqman ou PCR par essais, avec des gènes cibles de l'amplification variable (huit différents dans les dix études, certaines ayant ciblé plusieurs gènes MSG pour quatre) ; • l'hétérogénéité forte du type des études évaluées (série de cas consécutifs ou non, prospective ou rétrospective,...) associée à un nombre faible d'études sélectionnées ce qui diminue la puissance des tests statistiques ; • la multiplicité des tests de référence (examen microscopique et/ou radiologique, clinique ...) ; • l'insuffisance des critères de définition et de sélection des populations étudiées ; • la conduite de six des dix études : test index non réalisé en insu des résultats du test de référence ; • l'absence de seuil établi dans l'interprétation des résultats pour deux études ; • l'inclusion d'études avec populations VIH+ ou non VIH, alors que la charge fongique est plus élevée chez les personnes VIH+ influant sur la sensibilité du test microscopique de comparaison ; • l'impossibilité d'évaluer le poids de prophylaxie de PPJ sur les performances calculées.
Remarques des auteurs	Le standard de détection actuel de PPJ, la microscopie, a une sensibilité faible. L'hétérogénéité élevée retrouvée dans la méta-analyse peut s'expliquer par : • le choix d'unités de mesure différentes, de seuils différents dans les études ou l'absence de seuils dans d'autres ; • le fait qu'il n'y ait pas de standard unique, c'est-à-dire la microscopie, pour l'ensemble des études ; • le fait que des techniques différentes avec des gènes cibles différents soient utilisées. Il existe une limitation à la portée des résultats obtenus du fait de la non connaissance : • des possibles traitements prophylactiques dans les études qui impactent les performances du test ; • du rendu des résultats du test index en insu ou non de ceux du test standard ; • du risque que des études aient pu classer des colonisations comme des infections (faux positifs) ; • la proportion d'études avec des patients VIH+, à charge fongique élevée, a pu surestimer les performances du test PCR (sensibilité) ; • un biais de publication a été détecté.

Éléments analysés	Données de la méta-analyse (70)
Conclusion des auteurs	Les performances de la PCR en temps réel pour détecter une pneumocystose chez des patients immunodéprimés sont bonnes et cette PCR peut être un outil complémentaire utile au diagnostic de PPJ chez ces patients. Au vu des limites, des études doivent être menées dans des populations diverses rencontrées dans la pratique clinique, pour identifier les possibles différences de performances entre patients immunodéprimés VIH+ ou non VIH, ainsi que celles obtenues sur expectorations induites et rinçages oro-pharyngés. Il est nécessaire de définir des critères internationaux de diagnostic de PPJ.
Remarques et analyse critique de la méta-analyse (HAS)	Peu d'études incluses dans la méta-analyse, souvent de faibles effectifs : augmentation de l'hétérogénéité et perte de puissance statistique ; design des études incluses peu précis [rétrospectif [4], prospectif [3], inconnu [3]], possibilité qu'il y ait des études cas-témoins (de mauvaise qualité) non exclues <i>a priori</i>. La médiocre qualité méthodologique des études incluses (par exemple, on ne sait pas si ce sont des séries de cas consécutifs ou non) a pu engendrer une surestimation dans les performances calculées par la méta-analyse. Prévalence de la PPJ certainement variable selon les études car les critères d'inclusion de certaines populations, hors VIH, sont vagues. On ne sait pas si cette méta-analyse porte aussi sur la population pédiatrique car les études, sauf deux, n'ont pas renseigné cet item.

Les principaux résultats de cette MA sont une sensibilité combinée de 97 % [IC95 % : 93-99] et une spécificité combinée de 94 % [IC95 % : 90-96], résultats entachés d'une forte hétérogénéité. Ces valeurs, élevées, sont proches des résultats des précédentes méta-analyses disponibles (73, 74) portant sur l'ensemble des techniques PCR pour le diagnostic de PPJ, de méthodologie plus discutable, prises en compte par les sociétés savantes dans les recommandations.

Au vu des performances élevées calculées, les auteurs de la MA avancent une utilité clinique à la PCR quantitative dans le diagnostic en tant qu'outil complémentaire dans la recherche de l'étiologie d'une pathologie pulmonaire chez les personnes immunodéprimées mais ils font des conclusions et des propositions prudentes du fait de l'insuffisance de données probantes, notamment pour le groupe de sujets non VIH. Ainsi, ils ne positionnent pas la qPCR dans la stratégie diagnostique par rapport aux autres techniques existantes, en particulier la microscopie. Cette réserve peut s'expliquer par les limites nombreuses que l'on peut constater du fait d'une hétérogénéité importante des études, de qualité méthodologique médiocre, susceptible d'engendrer divers biais. Enfin, l'existence d'un biais de publication identifié par les auteurs rend probable une surestimation des performances de la qPCR établies par cette MA.

► RBP

La PCR et/ou la qPCR sont examinées dans les cinq recommandations retenues : quatre d'entre elles (4, 38, 64, 72) préconisent le recours à cet examen dans les conditions détaillées ci-dessous, alors que la recommandation américaine portant sur les enfants VIH+ (31) ne se positionne pas sur leur utilisation. Dans les quatre autres RBP, ces techniques PCR font l'objet de discussions sur plusieurs points techniques qui sont :

- l'absence de standardisation (72) : une RBP insiste sur l'importance du respect des normes d'assurance qualité et celle des contrôles internes pour dépister les faux négatifs et déplore l'absence de standardisation dans la détermination de seuils pour la qPCR (4) ;
- la colonisation par *P. jirovecii* : la sensibilité élevée des techniques PCR et en particulier de la qPCR entraîne une détection de *P. jirovecii* chez des personnes asymptomatiques. Ainsi, une RBP rapporte que sur échantillons d'autopsie, *P. jirovecii* a été détecté par technique PCR spécifique chez la moitié des personnes, représentatives de la population générale selon les au-

teurs, signe d'une colonisation asymptomatique fréquente (64), alors qu'une autre RBP donne le chiffre de 18 % de détection dans le LBA de patients asymptomatiques (31). Dans l'utilisation actuelle non standardisée des techniques en qPCR, la RBP de l'ECIL pointe cet écueil ne permettant pas d'établir une distinction précise entre colonisation et infection par des valeurs seuils ; cette problématique de différenciation n'est pas essentielle pour les immunodéprimés en onco-hématologie non VIH symptomatiques d'une pneumonie (4) ;

- les performances de ces méthodes d'amplification génique ne sont pas validées dans les prélèvements sanguins ou superficiels (expectoration) de populations présentant un moindre risque de PPJ, adultes (38) ou enfants (72).

Au global, tenant compte de ces questions encore en suspens, les avis actuels des RBP sur la place des techniques PCR pour *P. jirovecii* sont les suivants :

- sur le LBA, préconisé comme étant le meilleur prélèvement (4), la qPCR est préconisée **chez les patients adultes d'onco-hématologie** suspectés de PPJ avec un niveau de recommandation fort, identique à celui de l'IF directe, mais en indiquant que la PCR est plus sensible, possédant une meilleure VPN (4, 38, 64). Ces trois RBP relatent que le recul sur les performances de la qPCR dans les échantillons respiratoires profonds (LBA) serait suffisant pour confirmer ou exclure le diagnostic de PPJ chez les patients à risque élevé et symptomatiques. Elles se basent sur deux MA plutôt récentes pour affirmer que la qPCR a de meilleures performances diagnostiques (sensibilité de 82 à 100 %, spécificité de 83 à 100 %) que la PCR conventionnelle, parce qu'entre autre sa technicité en système fermé élimine les fréquents faux positifs résultant d'une contamination par amplicons entre les cycles. La recommandation de l'ECIL indique également que les performances sont meilleures chez les patients VIH+ car la charge fongique est plus élevée. La RBP concernant les patients neutropéniques fébriles (64) considère qu'une qPCR négative sur le LBA (sensibilité et spécificité élevées) permet d'arrêter une thérapie contre la pneumocystose et qu'à l'inverse, une qPCR fournissant plus de 1 450 copies/ml sur le LBA est positive et permet d'initier une thérapie ciblée chez ces patients à risque. Dans la stratégie que la recommandation européenne (ECIL) propose, la qPCR est un examen confirmatoire sur LBA ou expectoration induite après une IF positive, excluant les faux positifs possibles d'une IF car elle présente une meilleure sensibilité. Toutefois, pour la qPCR, l'absence de standardisation d'un seuil de positivité minimal, qui puisse être mis en correspondance avec une positivité en IF, est la raison pour laquelle l'ECIL ne recommande pas à ce jour le remplacement définitif de l'examen microscopique par la qPCR, y compris pour le LBA. Si les deux tests (qPCR et IF) sont négatifs dans le LBA, une PPJ est définitivement exclue ;
- lorsque la réalisation d'un LBA n'est pas possible et que le test sérique du BG est positif, témoignant de la présence d'une IFI, pour l'ECIL, l'IF et la qPCR sur prélèvements non invasifs sont une alternative possible (force de recommandation intermédiaire et niveau de preuve modéré), mais dans cette configuration sur prélèvements moins sensibles, la PPJ ne peut être écartée en cas de résultats négatifs des deux techniques (force de recommandation forte et niveau de preuve modéré) (4).

Chez l'enfant, les positions des deux recommandations ne sont pas totalement concordantes :

- chez l'enfant non VIH, en cas de résultat négatif de l'examen direct malgré un contexte clinique de forte suspicion, la recommandation française de 2014 (72) préconise l'utilisation de la PCR en seconde intention, plus sensible quel que soit le type de recueil (mais sur écouvillons nasopharyngés et rinçages oro-pharyngés, la technique PCR reste à valider) ;
- chez l'enfant VIH+, cette RBP considère que le diagnostic microscopique par IF sur le liquide de LBA seul suffit en général (grade B) ; si nécessaire, la PCR est effectuée en seconde intention, sensible aussi sur les prélèvements d'aspirations naso-pharyngées et d'expectoration induite. Les auteurs précisent que la PCR conventionnelle ne permet pas de différencier la colonisation de l'infection contrairement à la qPCR mais que cette dernière n'est pas validée chez l'enfant en raison d'une absence de standardisation des seuils et de la méthode réalisée sur le liquide de LBA. Cette position rejoint sur ce point l'autre RBP pédiatrique, américaine (31), qui tout en constatant que les techniques PCR sont plus sensibles que les méthodes microscopiques, in-

dique qu'elles sont moins spécifiques, ni standardisées, ni disponibles dans tous les laboratoires, et ne prend donc pas position sur leur utilisation.

Sur la question d'une indication éventuelle de la qPCR pour le suivi thérapeutique, deux RBP rapportent que la sensibilité du test par PCR serait maintenue (positivité) sur le LBA après l'instauration d'un traitement par triméthoprim-sulfaméthoxazole, plus de 72 heures pour l'une (64) ou, pendant les sept premiers jours d'une thérapie pour l'autre, selon des résultats préliminaires (38), obérant la possibilité de suivre une cinétique de réponse par cette technique.

Quatre des cinq recommandations examinées rapportent que la recherche d'ADN par amplification en chaîne par polymérase (PCR) peut être réalisée pour le diagnostic de PPJ et que la technique à privilégier est la PCR quantitative (qPCR) qui permet d'identifier des cas de pneumocystose non détectés par les autres techniques (examen microscopique par colorations ou IF, autres techniques PCR). Cette technique présente en effet de meilleures performances diagnostiques dans le LBA et les expectorations, des valeurs élevées étant retrouvées par méta-analyse.

De sensibilité très élevée, la technique qPCR se heurte dans le diagnostic d'une PPJ à l'absence de standardisation en matière d'unités et de seuils, ce qui ne permet pas de différencier une colonisation d'une infection chez certains patients, en particulier non VIH, et limite son utilité clinique.

Chez l'adulte non VIH, ni la MA, ni les trois RBP sélectionnées ne proposent de remplacer en première ligne l'examen direct (IF) par la qPCR sur liquide de LBA mais les RBP recommandent d'utiliser les deux techniques en routine, la qPCR étant un acte confirmatoire après l'IF.

L'utilisation de la qPCR sur des prélèvements non invasifs (expectorations, rinçages) est possible mais, moins sensible que dans le LBA, elle ne permet pas d'écarter une PPJ en cas de résultat négatif.

Chez l'enfant, l'intérêt de la qPCR est souligné dans les deux RBP sélectionnées. Toutefois, en l'absence de standardisation, une RBP ne se positionne pas et l'autre ne la classe qu'en deuxième intention après l'IF chez l'enfant non VIH, quel que soit le prélèvement. Elle considère que la microscopie suffit généralement chez l'enfant VIH+.

Les RBP indiquent que la place de la qPCR dans la stratégie diagnostique est susceptible d'évoluer rapidement si une standardisation de cette technique quantitative est obtenue. La littérature sélectionnée ne retient pas le suivi de traitement comme indication de la recherche d'ADN par amplification génique.

3.1.5 Dosage de l'antigène β -(1-3)- D - glucane (BG)

► Méta-analyse

La méta-analyse de Li *et al.* (69), publiée en 2015, a pour objectif de rechercher la différence des performances du dosage du β -(1-3)- D - glucane sérique pour le diagnostic de la PPJ chez les patients immunodéprimés porteurs du VIH ou non VIH. Elle a inclus 13 études pour un total de 2 233 sujets (69) (cf. Tableau 5 ci-dessous).

Tableau 5. Analyse de la méta-analyse de Li et al., 2015 (69), portant sur le dosage du β -(1,3)- D - glucane sérique.

Éléments analysés	Données de la méta-analyse (69)
Nombre d'études incluses dans la méta-analyse	13 études (trois prospectives, dix rétrospectives)
Nombre total d'échantillons inclus dans la méta-analyse	2 195 prélèvements/2 233 patients selon les résultats de test renseignés
Objectifs de la méta-analyse	Déterminer la différence de performances du dosage du β -(1,3)- D - glucane sérique (BG) pour le diagnostic de la PPJ chez les patients immunodéprimés VIH+ et non VIH
Tests BG évalués	WAKO® (deux études), Fungitell® (cinq études), Fungitec® (quatre études), GKT25M (une étude)
Test de référence	Multifactoriel : signes cliniques (13 études) + examen radiologique (12 études) + cytologie par coloration (neuf études), autopsie (quatre études), PCR (quatre études)
Type de patients inclus dans la méta-analyse	Patients à risque avec pathologie pulmonaire et immunodépression, VIH+ et non VIH (VIH+ : trois études, non VIH : cinq études, patients immunodéprimés incluant le VIH : quatre études, présence de patients VIH+ non renseignée : une étude)
Type d'études incluses (ECR ¹⁶ , ...) dans la méta-analyse	Études prospectives (n = 3) et rétrospectives (n = 10) ayant inclus les patients de façon consécutive ou études randomisées Études avec un effectif d'au moins dix patients
Analyse critique des études originales par les auteurs	Critères QUADAS-2
Critères d'évaluation en vue de la méta-analyse	Diagnostic prouvé : par microscopie conventionnelle Diagnostic probable : facteurs de l'hôte, critères cliniques et radiologiques compatibles et PCR+ Sensibilité, spécificité, rapport de vraisemblance positif, rapport de vraisemblance négatif, HSROC (prise en compte de seuils différents)
Résultats des méta-analyses	Performance diagnostique du test : • sensibilité = 0,91 [IC95 % : 0,88-0,93] ; $I^2 = 0$ • spécificité = 0,75 [IC95 % : 0,68-0,81] ; $I^2 = 78,17$ PLR = 3,60 [2,78-4,65] ; $I^2 = 53,80$ NLR = 0,12 [0,09-0,17] ; $I^2 = 0$ SROC = 0,91 [0,88-0,93] Analyses en sous-groupes : • Patients VIH+ (trois études) : ▶ sensibilité = 0,92 [IC95 % : 0,88-0,95] ▶ spécificité = 0,78 [IC95 % : 0,64-0,92] • Patients non VIH (six études) : ▶ sensibilité = 0,85 [IC95 % : 0,77-0,94] ▶ spécificité = 0,73 [IC95 % : 0,61-0,85]

¹⁶ Essai contrôlé randomisé.

Éléments analysés	Données de la méta-analyse (69)
Grille AMSTAR	Méta-analyse classée intermédiaire à bonne (analyse en Annexe 4). Elle respecte les standards établis sur le plan statistique pour la réalisation d'une méta-analyse, en particulier par la <i>Cochrane</i>¹⁷ : inclusion uniquement d'études avec des sujets consécutifs de plus de dix sujets, calcul des sensibilité et spécificité combinées, estimation de l'hétérogénéité, méta-régression bivariée, analyse en sous-groupes préétablis, utilisation d'une SROC hiérarchique pour prendre en considération l'existence de seuils multiples. Ces études présentent une forte hétérogénéité entre elles quant à la taille de l'effectif, aux critères de diagnostic d'une PPJ (selon les études, au moins deux critères parmi des critères cliniques, radiologiques, biopsiques, microscopiques, de PCR et une réponse au traitement), sur la méthode de dosage du BG utilisée (quatre différentes), ainsi que les types d'études incluses (trois études prospectives et dix études rétrospectives). Des données étaient trop imprécises dans ces études : nombre de patients sous traitement prophylactique, âge des patients ; éléments susceptibles d'avoir influencé les performances du test du BG dans de telles études. Pour prendre en compte l'hétérogénéité des études entre elles, une procédure par stratification/exclusion des études à plus fort risque de biais était envisageable mais le faible nombre d'études incluses compromettait cette option.
Remarques des auteurs	Toute ou partie des patients ont reçu un traitement prophylactique (11 études) sans qu'il soit possible de l'évaluer. L'hétérogénéité subsistante peut être due à des différences de populations des études, de caractéristiques des divers tests et des comparateurs différents. La sensibilité varie selon la pathologie recherchée, si uniquement la PPJ (bonne) ou toutes les IFI (abaissée), alors qu'elle n'est pas affectée par le design prospectif ou rétrospectif. Un biais de publication a été détecté. Les études prenant la PCR comme test standard ont pu classer des colonisations comme des infections (faux positifs).
Conclusion des auteurs	L'étude suggère que le dosage du BG : - chez les patients VIH+, peut être utilisé comme un test de screening (dépistage) pour exclure une PPJ (sensibilité élevée et spécificité modérée) ; - chez les patients non VIH, les résultats devraient être interprétés en parallèle de la clinique, des examens radiologiques et autres données diagnostiques. En matière de stratégie, il pourrait être intéressant que la décision d'utiliser le BG soit dictée par les résultats du scanner. Au vu des limites observées à cette méta-analyse, des études de meilleure qualité méthodologique, prospectives avec des échantillons de grande taille sont nécessaires pour confirmer la place de la détection du BG dans la stratégie diagnostique d'une PPJ.

¹⁷ M. M. Leeflang : *Systematic reviews and meta-analyses of diagnostic test accuracy*.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1469-0691.12474/full>

Éléments analysés	Données de la méta-analyse (69)
Remarques et analyse critique HAS	Hétérogénéité des 13 études entre elles sur : • les populations incluses (suspicion de PPJ ou suspicion de maladie fongique invasive incluant la PPJ) ; certaines études ont été réalisées dans un contexte de dépistage, d'autres pour un diagnostic confirmatoire ce qui impacte la sensibilité du test, sur le nombre de sujets inclus ; • les contextes cliniques divers de populations (transplantés hépatiques, patients atteints de cancer, patients symptomatiques d'une pneumonie ; • prévalence de la PPJ variable selon le contexte des études [comprise entre 1,1 % (utilisation en dépistage itératif chez des transplantés) et 81 % chez des patients avec symptômes de pneumonie] ; • les critères de diagnostic d'une PPJ (comparateur variable : autopsie, coloration ou PCR) ; • la méthode de dosage du BG utilisée (quatre différentes avec des seuils différents), mais pas d'analyse par type de kit ; • différents designs d'études incluses ; • la qualité de report des études dans les publications paraît médiocre puisque dans 11 études, il n'a pas été possible à Li <i>et al.</i> de savoir si des prophylaxies de PPJ ont été prescrites et de vérifier l'impact éventuel de ce facteur sur les performances du test ; • l'analyse en sous-groupes pour les populations VIH+ et non VIH n'inclut plus que neuf études (sur les 13) réparties en trois sur population VIH+ et six sur population non VIH. Malgré ces insuffisances, les valeurs de performances retrouvées sont cohérentes avec les connaissances sur les limites détectées dans le test : • la sensibilité est relativement élevée mais la spécificité est plus faible car le BG est panfongique et de nombreux faux positifs exogènes (alimentation médicaments et dispositifs,...) sont possibles. • le test présente de meilleures performances dans le sous-groupe de patients VIH+, ce qui cohérent avec la charge fongique plus importante dans cette population particulière. Les trois études les plus récentes sélectionnées à effectifs de plus de 100 sujets ont été réalisées dans la population VIH+ et ont un poids important dans la méta-analyse.

Pour conclure sur cette MA, il apparaît que ces résultats montrent une sensibilité poolée de 0,91 [IC95 % : 0,88-0,93] et une spécificité poolée de 0,75 [IC95 % : 0,68-0,81], valeur entachée d'une forte hétérogénéité. Les analyses en sous-groupes dévoilent une différence significative concernant la sensibilité du test entre les patients VIH+ et non VIH, respectivement de 0,92 [IC95 % : 0,88-0,95] (trois études) et de 0,85 [IC95 % : 0,77-0,94] (six études). Au vu de ces données de sensibilité, les auteurs considèrent que l'utilité clinique du BG pour exclure une pneumocystose en dépistage peut être avancée, mais uniquement chez les patients VIH+ pour qui, il peut également éviter des prophylaxies coûteuses. Les valeurs de spécificité ne varient pas de façon significative dans les deux populations, à 73 et 78 %. Chez les patients non VIH, ils indiquent que le résultat du test du BG doit être analysé dans le contexte clinique et avec les autres données diagnostiques/radiologiques.

Cette MA porte sur peu d'études, à faibles effectifs avec une forte variabilité des études entre elles sur plusieurs critères, ce qui limite la puissance statistique et la précision des estimations. Un biais de publication a été identifié par les auteurs, faisant craindre une surestimation des effets retrouvés dans la méta-analyse et obère son niveau de preuve. Il peut être ajouté que l'influence des données des trois études les plus récentes, focalisées sur la population VIH+, est forte dans ce travail, susceptible d'obérer les conclusions plus générales des auteurs.

Les auteurs concluent d'ailleurs que des nouvelles études prospectives, avec effectifs importants et bien conduites, sont attendues pour confirmer la place du BG dans la stratégie diagnostique des patients non VIH.

► RBP

Le dosage de l'antigène soluble BG au niveau sérique n'est pas évoqué dans la recommandation sur la population pédiatrique VIH+ (31). Les quatre autres recommandations sont convergentes quant à l'utilité clinique de ce test sérique pour exclure une PPJ en cas de négativité, par sa très bonne sensibilité (96 % selon les données rapportées d'une méta-analyse (38)) d'autant plus que la prévalence de la pathologie est importante dans la population auquel le patient appartient et que la VPN est élevée (4). Seule la recommandation de l'ECIL est gradée pour ce test (force de recommandation forte et niveau de preuve modéré) (4). Aucun élément relatif à la fréquence de réalisation du test lors d'une suspicion de PPJ n'est fourni dans ces RBP.

De façon plus précise, les éléments suivants sont présents dans ces RBP :

- en cas de positivité, comme ce test du BG ne fournit pas le genre fongique pathogène qui peut dans ce contexte pathologique être un *Aspergillus* ou un *Candida* notamment, une recherche complémentaire sera nécessaire, par IF voire qPCR ;
- la place du dosage sérique du BG dans la stratégie thérapeutique n'est pas précisée dans deux recommandations par manque de données robustes tant chez l'adulte (64) que chez l'enfant (72) ;
- le risque assez élevé de faux positifs est pointé par l'interférence de dispositifs médicaux ou de bactéries qui contiennent des LPS positivant le test (38) ;
- deux de ces RBP considèrent ce test utile lorsqu'un échantillon de LBA ne peut être obtenu chez les patients adultes en onco-hématologie (4, 38) ;
- dans le schéma de stratégie diagnostique¹⁸ présenté dans la RBP européenne de l'ECIL, le BG sanguin peut aussi être utile en cas de divergence de résultats sur le LBA entre qPCR et IF (qPCR+ et IF négative) pour consolider la décision diagnostique lorsque la charge fongique est faible (patients non VIH) ;
- l'ECIL complète ses recommandations en indiquant que le dosage du BG ne peut servir à un suivi thérapeutique (force de recommandation forte et niveau de preuve modéré) et que son utilisation sur le liquide de LBA n'est pas validée. Elle pointe que des essais randomisés doivent être réalisés pour avoir des éléments de réponse.

► Rapport d'HTA

L'actualisation récente (février 2017) du rapport d'évaluation de l'INESSS, par la prise en compte des dernières publications, porte sur l'utilisation de ce test sérique dans le diagnostic des infections fongiques invasives dans un contexte hospitalier, en considérant les trois plus fréquentes : candidose, aspergillose et pneumocystose pour confirmation ou infirmation d'un diagnostic suspecté. Dans l'indication du diagnostic de la pneumocystose, ce rapport se base sur une analyse comparative des données et des conclusions de trois méta-analyses, ayant ajouté la méta-analyse de Li *et al.* de 2015 (69) aux deux plus anciennes de Karageorgopoulos *et al.* (66) et de Onishi *et al.* (65). Il constate une homogénéité dans les valeurs des performances obtenues, bien que les valeurs de sensibilité et spécificité analytiques retrouvées par Li *et al.* soient moins élevées du fait d'une sélection plus stricte des études introduites dans la MA par rapport aux deux précédentes. Le test sérique est proposé à l'inscription au répertoire hospitalier des analyses médicales avec pour la pneumocystose la mention « complément au diagnostic présumé de pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* », soit une indication de deuxième ligne après l'examen microscopique du LBA. L'INESSS indique aussi pour ce test l'absence d'indication à visée pronostique et dans le suivi thérapeutique. Il pointe également la nécessité d'obtenir les résultats de ce test panfongique à la

¹⁸ Disponible sur <https://academic.oup.com/jac/article/71/9/2386/2237807/ECIL-guidelines-for-the-diagnosis-of-Pneumocystis>

fréquence de deux fois par semaine dans le contexte hospitalier examiné en proposant son utilisation en surveillance dans les services de greffe, rénale en particulier, pour contrôler les contaminations nosocomiales. Les conclusions des RBP les plus récentes, les incertitudes possibles liées aux faux positifs, les exigences d'assurance qualité et les données de reproductibilité sont examinées. La conclusion positive du rapport d'HTA (inscription du test du BG au répertoire) souligne le caractère non invasif du prélèvement utilisé pour le test et les rapidités de réalisation et d'obtention des résultats de ce test, dont l'automatisation est envisagée.

Selon quatre sur cinq des recommandations sélectionnées, le dosage dans le sérum du β -(1-3)- D - glucane, antigène panfongique, est un acte de diagnostic retenu en cas de suspicion de PPJ.

- Ces RBP considèrent en effet qu'il est utile pour exclure précocement une PPJ chez l'adulte à risque élevé d'IFI (fréquence de réalisation non précisée). Selon la méta-analyse sélectionnée, il permettrait grâce à sa grande sensibilité chez les PVVIH de limiter l'usage de la prophylaxie anti-pneumocystose dans cette population et dans la population non VIH ; il s'inscrit donc dans une stratégie diagnostique globale. Son utilité clinique est avancée par le rapport d'HTA en complément au diagnostic présumé de PPJ (acte confirmatoire après la microscopie). En cas d'impossibilité d'obtenir un échantillon respiratoire ou de LBA pour réaliser une recherche par microscope, le dosage du BG sanguin est contributif au diagnostic mais il nécessite en cas de positivité, des examens supplémentaires pour déterminer le genre fongique incriminé. Son utilisation sur d'autres liquides biologiques que le sang n'est pas validée dans la pneumocystose.
- Chez l'enfant, la littérature sélectionnée conclut que les données sont trop rares pour établir la place du BG sérique dans la stratégie diagnostique.

Cette littérature précise enfin qu'il n'est pas pertinent de doser le BG sérique pour suivre l'efficacité du traitement de la pneumocystose.

Nota bene : plus globalement, la RBP de l'ECIL publiée en 2016 conclut que des essais cliniques prospectifs randomisés sont nécessaires pour déterminer l'utilité clinique des techniques biologiques de diagnostic précoce pour la prise en charge des infections à *P. jirovecii* (4).

3.2 Synthèse des réponses des organismes professionnels

Quatre des cinq organisations sollicitées par écrit ont répondu au questionnaire de la HAS : le CNP de biologie des agents infectieux-hygiène hospitalière (CNPBAIHH), le CNP d'infectiologie - Fédération française d'infectiologie (CNP-FFI) via la Société française de lutte contre le Sida (SFLS), le CNP d'hématologie (CNPH) et le Centre national de référence des mycoses invasives et antifongiques (CNRMA).

L'argumentaire de la HAS daté du 20 juin 2017 n'a pas fait l'objet de remarques engendrant des modifications de son contenu quant à l'analyse de la littérature synthétique qui est considérée comme complète et cohérente par les organismes professionnels (OP). Des modifications légères de forme ont été souhaitées dans la partie de rappel du contexte et elles ont été effectuées. Certaines parties prenantes ont cité des publications dans leur réponse mais qui correspondent à des études originales non analysées dans ce travail d'évaluation court. Les éléments argumentés apportés par les quatre organismes professionnels ayant fait part de leur position sur les problématiques du diagnostic biologique de la pneumocystose sont synthétisés ci-dessous. Les questionnaires complétés par les organismes professionnels sont reproduits *in extenso* en annexe (Annexe 7 à Annexe 10).

3.2.1 Recherche d'une infection à *Pneumocystis jirovecii*

► Indications

La recherche d'une infection fongique par *P. jirovecii* est justifiée chez un patient en situation d'immunodépression, quel que soit son âge (y compris la prématurité), fébrile, avec symptômes respiratoires. Une OP considère qu'elle occupe une place particulière au regard des autres infections fongiques invasives (IFI) de par les conditions physiopathologiques de sa survenue, les modalités de son diagnostic et les traitements prophylactiques ou curatifs qui ne font pas appel aux antifongiques mais aux anti-infectieux, mais deux autres sont moins catégoriques dans sa classification. Le CNPH précise qu'en hématologie, elle touche les patients ayant reçu « une allogreffe ou une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques ou les patients atteints de leucémie lymphoblastique sous corticothérapie à haute dose ».

Dans le contexte des PVVIH, la SFLS confirme les trois situations de forte suspicion de PPJ : pneumopathie interstitielle bilatérale (toux non expectorante, fièvre et dyspnée d'aggravation progressive) avec un déficit en lymphocytes CD4 ($n < 200/\text{mm}^3$) en l'absence ou en cas de non observance d'une prophylaxie ciblée ; chez une personne non diagnostiquée VIH+ (PPJ révélant le statut VIH+) ; en cas de traitement immunosuppresseur.

► Prélèvements

Les OP s'accordent sur le fait que la recherche de l'agent infectieux est prioritairement effectuée dans le liquide issu d'un lavage broncho-alvéolaire (LBA), réalisé avec fibroscopie bronchique. Le recours à des prélèvements moins invasifs qu'un LBA est préconisé en première intention, chez les enfants pour des questions éthiques, et/ou chez les PVVIH qui ont en règle générale une charge fongique élevée en *P. jirovecii*. D'autres types de prélèvements respiratoires sont possibles comme l'expectoration induite, l'aspiration ou le lavage naso-pharyngés ou en réanimation, l'aspiration trachéale, mais les performances des examens, notamment microscopiques, peuvent être altérées dans ces liquides épais (CNPBAIHH), également moins fournis en formes fongiques (CNRMA).

3.2.2 Examens diagnostiques

► Recherche directe par techniques microscopiques

Pour les OP, elles demeurent importantes surtout pour obtenir rapidement un diagnostic (CNPH). Elles permettent de plus la recherche simultanée de plusieurs champignons ou protozoaires opportunistes selon le profil d'immunodépression des patients concernés, notamment les colorations de type May-Grünwald-Giemsa (MGG) faciles de réalisation (CNPBAIHH). Les inconvénients associés sont la faible sensibilité, la nécessaire mobilisation en personnel possédant cette expertise (CNRMA) et l'impossibilité d'une quantification précise. Les techniques d'immunofluorescence (IF) ont une sensibilité supérieure aux méthodes par coloration. Pour les OP interrogées, un diagnostic microscopique de PPJ doit se baser sur les résultats de deux techniques différentes pour augmenter la sensibilité analytique, soit deux colorations (pour identifier les ascospores et les formes trophiques), soit une coloration et une IF (technique la plus sensible pour détecter les ascospores).

► Recherche d'ADN par amplification génique

Pour le CNRMA et le CNPBAIHH, seules les techniques de PCR quantitatives en temps réel (qPCR) sont appropriées dans le cadre du diagnostic de PPJ. Les autres techniques classiques de PCR ne sont plus acceptables au regard de leurs performances (faux positifs par contamination analytique). Le procédé en système fermé, l'utilisation de gènes cibles répétés et spécifiques de *P. jirovecii* (tels MSG, mtLSU rRNA) et le respect des précautions de réalisation dont le contrôle interne garantissent l'absence de faux positif analytique dans une qPCR.

Les OP consultées considèrent que la qPCR est une méthode à utiliser particulièrement chez les patients non VIH ou sous prophylaxie imparfaite de pneumocystose car les méthodes microscopiques ne sont pas assez sensibles (charge fongique plus basse). La réalisation de ce test ne nécessite pas d'apporter une attention spécifique aux transports des prélèvements : la réfrigération est nécessaire si cette étape excède une journée (CNPBAIHH). Par ordre décroissant de choix de prélèvement au regard de la sensibilité analytique de la PCR, les OP indiquent le LBA, l'expectoration induite qui doit être réalisée par kinésithérapie (CNPBAIHH), l'aspiration nasopharyngée et le lavage oro-pharyngé. Chez les PVVIH, les expectorations suffisent généralement (CNRMA). Le rendu « quantitatif » du résultat de cet examen par qPCR est accompagné des seuils d'interprétation (distinction entre absence, colonisation et infection aiguë) permettant de guider le clinicien dans sa décision thérapeutique dans le contexte clinico-radiologique de chaque patient (CNRMA, CNPBAIHH). Le CNPBAIHH précise que les éléments de seuils de positivité (nombre de cycles d'amplification nécessaires) sont établis par chaque laboratoire pour sa technique sur la base d'une cohorte clinique suffisante. Le CNRMA énonce que la réalisation d'une méthode de qPCR et le compte-rendu de ses résultats notamment dans les publications doit répondre à des standards de qualité tels que définis dans le guide MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative real-time PCR Experiments*) élaboré en 2009. Chez un patient asymptomatique, bien qu'il n'y ait pas d'indication pour cette recherche *a priori*, si une qPCR détecte la présence de *P. jirovecii* (colonisation), elle fournit des arguments pour des mesures prophylactiques pour le patient et l'évitement d'infections nosocomiales pour les autres personnes (CNRMA, CNPBAIHH).

► Test de détection et de mesure du β -(1-3)-D - glucane (BG) dans le sang

L'intérêt de ce dosage sanguin est rapporté dans les situations complexes d'incertitude diagnostique (CNPH) en association à une qPCR ou lorsque le LBA n'est pas réalisable (CNRMA). Il a une valeur prédictive négative élevée selon les OP et sa place est identique quel que soit le statut du patient vis-à-vis du VIH. Une seule méthode de dosage du BG, colorimétrique et basée sur une modification du mécanisme du lysat d'amœbocyte de limule, est commercialisée à l'heure actuelle en France. Le CNRMA pointe que l'intérêt spécifique du BG sérique dans la stratégie diagnostique de la pneumocystose reste à préciser et il rappelle que, dans le cadre de son inscription dans le RIHN, des évaluations sont en cours afin de préciser l'utilité clinique de ce test. Pour toutes les

OP, il n'y a pas lieu de procéder à un dépistage par un test du BG de façon itérative chez des patients à haut risque de PPJ, contrairement à d'autres mycoses invasives puisque la prophylaxie anti-pneumocystose (bien standardisée en France pour les PVVIH) est primordiale chez ces patients.

► **Stratégie diagnostique de la pneumocystose**

Les OP s'accordent pour considérer que la recherche directe associant deux techniques microscopiques ne suffit pas dans une stratégie diagnostique. Cette stratégie associe une détection microscopique et une par PCR en temps réel, sur LBA ou expectoration induite (CNPBAIHH). Le diagnostic par PCR en temps réel est particulièrement indispensable chez les patients immunodéprimés non VIH chez lesquels la sensibilité de l'examen microscopique est souvent insuffisante et certains (CNRMA) pensent qu'elle remplacera à court terme les techniques microscopiques qui n'auront alors plus de pertinence pour *P. jirovecii*. Chez les PVVIH, devant une situation d'examens microscopiques négatifs mais un contexte clinique évocateur, le recours à l'amplification génique, si possible par qPCR et un test du BG, est la règle ; *a contrario*, un seul examen au microscope révélant le champignon (asques notamment) suffit pour confirmer une PPJ (SFLS). La stratégie reste identique pour un patient sous traitement prophylactique, surtout si la prophylaxie repose sur l'atovaquone (CNRMA), mais sur indication clinique.

► **Recherche d'Ac spécifiques de *P. jirovecii***

Les OP ont confirmé que la recherche d'Ac spécifiques de *P. jirovecii* n'est pas un acte réalisé dans le cadre du diagnostic d'une pneumopathie fébrile ; elle est seulement utile dans les enquêtes épidémiologiques.

Conclusion

Dans le cadre de l'article L. 162-1-7 du code de la sécurité sociale, la Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés (CNAMTS) a sollicité, en septembre 2015, l'avis de la HAS sur la révision de la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) concernant les actes de diagnostic biologique de la pneumocystose dont l'agent infectieux est un champignon ascomycète de l'espèce *Pneumocystis jirovecii*. Le demandeur souhaite introduire deux actes spécifiques, l'examen direct par technique microscopique et la recherche d'ADN par amplification génique, pour la recherche de cet agent pathogène dans la NABM qui n'en contient aucun actuellement.

L'évaluation réalisée par la HAS est fondée sur la littérature synthétique identifiée suite à une recherche systématique, puis sélectionnée sur des critères explicites, ainsi qu'au recueil de la position argumentée des organismes professionnels, interrogés en tant que parties prenantes. En l'espèce, la littérature retenue a consisté en cinq RBP de qualité méthodologique assez satisfaisante, deux méta-analyses et un rapport d'évaluation technologique ; la position professionnelle est celle de trois organismes de biologie médicale, d'hématologie, et d'infectiologie ainsi que celle du CNRMA. L'évaluation a également porté sur un autre examen : la recherche de β -(1-3)-D-glucane (BG) sérique.

Pour rappel, la pneumocystose est une pneumopathie interstitielle souvent bilatérale due à un agent fongique opportuniste *Pneumocystis jirovecii* qui affecte les personnes immunodéprimées de tout âge dont le déficit immunitaire est la conséquence d'une infection, en particulier par le virus du Sida ou d'un traitement pharmacologique. Actuellement, la pneumocystose survient plus fréquemment en France chez des personnes souffrant d'affections onco-hématologiques après chimiothérapie, greffes de cellules souches ou d'organes, ou chez celles traitées par des immunosuppresseurs (dont les corticoïdes) pour des pathologies chroniques.

Au total, l'évaluation de la HAS ainsi conduite permet d'énoncer les points conclusifs suivants sur le diagnostic biologique de pneumocystose :

L'évaluation est en faveur de la création d'un libellé de recherche directe de *Pneumocystis jirovecii* au microscope dans les sécrétions respiratoires.

Parmi les prélèvements, le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) est à privilégier (meilleures performances diagnostiques) pour la recherche de *P. jirovecii*, à défaut l'expectoration induite. Les autres types de prélèvements, aspiration naso-pharyngée ou trachéale, rinçages rhino-pharyngés sont possibles (en particulier chez l'enfant) mais sont liés à une sensibilité analytique faible (charge fongique moindre).

En ce qui concerne les techniques de révélation, l'immunofluorescence utilisant des anticorps (directe ou indirecte) apparaît plus sensible que les méthodes par coloration. Afin de détecter les deux formes colorables de *P. jirovecii* (asques/ascospores et formes trophiques) et d'augmenter la sensibilité de l'examen, l'association de deux techniques complémentaires est préconisée : soit deux techniques de coloration, soit l'IF couplée à une coloration.

L'examen direct au microscope est actuellement considéré comme l'examen de première intention dans l'identification de *P. jirovecii*. Il peut permettre par coloration d'identifier d'autres agents infectieux responsables d'infections opportunistes chez ces patients immunodéprimés.

L'évaluation est en faveur de la création d'un libellé de recherche de l'ADN de *Pneumocystis jirovecii* par amplification génique avec une technique de PCR en temps réel dans les sécrétions respiratoires.

Cette méthode est indiquée lorsque l'examen microscopique n'a pas permis d'établir un diagnostic, en cas de forte suspicion de pneumocystose sur les critères clinico-radiologiques, notamment chez les patients non VIH ou un patient sous prophylaxie imparfaite de pneumocystose. Elle doit être

réalisée si possible dans le LBA ou à défaut sur expectorations induites. Sur les prélèvements respiratoires non invasifs, contenant moins de *P. jirovecii*, elle ne permet pas d'écarter une pneumopathie à *P. jirovecii* en cas de résultat négatif, contrairement à un résultat sur LBA. Le gène ciblé doit être spécifique de *P. jirovecii* et, en l'absence de standardisation de la technique, le rendu du résultat doit fournir au clinicien les éléments chiffrés de la méthode utilisée discriminant la positivité, la colonisation et l'infection aiguë afin de le guider dans la décision thérapeutique. Cette technique n'est pas indiquée à ce jour dans le suivi thérapeutique d'une PPJ.

L'évaluation est aussi en faveur de la création à la NABM d'un acte de recherche de la présence de l'Ag soluble β -(1-3)-D-glucane (BG) dans le sang.

La recherche de l'antigène BG sérique par technique colorimétrique (test basé sur une modification du mécanisme du lysat d'amœbocyte de limule) est indiquée dans les cas de pneumopathie fébrile chez une personne immunodéprimée de diagnostic différentiel difficile. Le BG est intéressant car il est réalisable en l'absence de prélèvement pulmonaire et qu'un résultat négatif permet d'exclure une pathologie fongique invasive. En cas de positivité, les autres éléments diagnostiques sont indispensables pour identifier l'infection fongique responsable de la pneumopathie (le BG est un marqueur panfongique). Cette recherche de BG n'est pas indiquée dans le suivi thérapeutique.

À noter que chez l'enfant, les données d'évaluation clinique des techniques de qPCR et du test du BG sérique sont insuffisantes pour conclure dans cette population.

Annexe 1. Recherche documentaire

Bases de données bibliographiques automatisées

- Medline (National Library of Medicine, États-Unis)
- Embase (Elsevier)
- The Cochrane Library (Wiley Interscience, États-Unis)
- BDSP Banque de données en santé publique
- Science Direct (Elsevier)
- National Guideline Clearinghouse (Agency for Healthcare Research and Quality, États-Unis)
- HTA Database (International Network of Agencies for Health Technology Assessment)

Tableau 6. Stratégie de recherche documentaire et résultats.

Type d'étude / sujet		Période de recherche	Nombre de références
Termes utilisés			
Recommandations sur la prise en charge de la pneumocystose			
Etape 1	"Pneumocystis jirovecii"[Mesh] OR "Pneumocystis"[Mesh] OR "Pneumocystis carinii"[Mesh] OR "Pneumonia, Pneumocystis"[Mesh] OR "Pneumonia, Pneumocystis"[Mesh] OR "Pneumocystis Infections"[Mesh] OR pneumocystis [title]	01/2005-04/2017	
ET			
Etape 2	Consensus OR guideline* OR recommend* or guidance [title]		31
Recommandations sur la prise en charge des infections fongiques invasives			
Etape 3	"Invasive Fungal Infections"[Majr:NoExp] OR [("Mycoses"[Majr:NoExp] OR fungal disease* or mycose*[title]) AND (invasive OR serious [title])]	01/2005-01/2017	
ET			
Etape 4	Consensus OR guideline* OR recommend* or guidance [title]		24
Méta-analyses, revues systématiques			
Etape 5	"Pneumocystis jirovecii/diagnosis"[Mesh] OR "Pneumocystis/diagnosis"[Mesh] OR "Pneumocystis carinii/diagnosis"[Mesh] OR "Pneumonia, Pneumocystis/diagnosis"[Mesh] OR "Pneumonia, Pneumocystis/diagnosis"[Mesh] OR "Pneumocystis Infections/diagnosis"[Mesh] OR [("Pneumocystis jirovecii"[Mesh] OR "Pneumocystis"[Mesh] OR "Pneumocystis carinii"[Mesh] OR "Pneumonia, Pneumocystis"[Mesh] OR "Pneumonia, Pneumocystis"[Mesh] OR "Pneumocystis Infections"[Mesh] OR pneumocystis OR PCP OR PJP [title]) AND ("Bronchoalveolar Lavage Fluid"[Mesh] OR "Diagnosis"[Mesh] OR "Polymerase Chain Reaction"[Mesh] OR "beta-Glucans"[Mesh] OR "beta-1,3-D-glucan" [Supplementary Concept] OR "(1-3)-beta-D-glucan phosphate" [Supplementary Concept] OR Polymerase Chain Reaction OR PCR OR bronchoalveolar lavage fluid OR BALF OR diagno* OR (1-3) beta d glucan OR (1-->3) beta d glucan pneumocystis [title])]	01/2005-03/2017	
ET			
Etape 6	"Meta-Analysis as Topic"[Mesh] OR "Meta-Analysis "[Publication Type] OR "Review Literature as Topic"[Mesh] OR "Meta Analysis" OR "systematic Review" OR "Literature review" Or "Quantitative Review" OR "pooled analysis" Field: Title/Abstract		157

Type d'étude / sujet		Période de recherche	Nombre de références
Termes utilisés			
PCR quantitative dans le diagnostic de la pneumocystose			
Etape 1		01/2005-07/2016	
ET			
Etape 6	(quantitative pcr or quantitative polymerase chain Field: Title/Abstract)		41
Diagnostic de la pneumocystose : Études prospectives			
Etape 7	"Pneumocystis jirovecii/diagnosis"[Mesh] OR "Pneumocystis/diagnosis"[Mesh] OR "Pneumocystis carinii/diagnosis"[Mesh] OR "Pneumonia, Pneumocystis/diagnosis"[Mesh] OR "Pneumonia, Pneumocystis/diagnosis"[Mesh] OR "Pneumocystis Infections/diagnosis"[Mesh] OR [("Pneumocystis jirovecii"[Mesh] OR "Pneumocystis"[Mesh] OR "Pneumocystis carinii"[Mesh] OR "Pneumonia, Pneumocystis"[Mesh] OR "Pneumonia, Pneumocystis"[Mesh] OR "Pneumocystis Infections"[Mesh] OR pneumocystis OR PCP OR PJP [title]) AND ("Bronchoalveolar Lavage Fluid"[Mesh] OR "Diagnosis"[Mesh] OR "Polymerase Chain Reaction"[Mesh] OR "beta-Glucans"[Mesh] OR "beta-1,3-D-glucan" [Supplementary Concept] OR "(1-3)-beta-D-glucan phosphate" [Supplementary Concept] OR Polymerase Chain Reaction OR PCR OR bronchoalveolar lavage fluid OR BALF OR diagno* OR (1-3) beta d glucan OR (1-->3) beta d glucan pneumocystis [title])]	01/2007-03/2017	
ET			
Etape 8	"Prospective Studies"[Mesh]OR prospective study OR prospectives studies Field: Title		18
Nombre total de références obtenues			271

En complément, les sommaires des revues suivantes ont été dépouillés tout au long du projet : *Annals of Internal Medicine*, *Archives of Internal Medicine*, *British Medical Journal*, *JAMA*, *Lancet*, *New England Journal of Medicine*, *La Presse Médicale*.

Les sites Internet internationaux des sociétés pertinentes cités ci-dessous ont été explorés en complément des sources interrogées systématiquement :

- *Adelaide Health Technology Assessment*
- *Agencia de Evaluación de Tecnología e Investigación Médicas de Cataluña*
- *Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Galicia*
- *Agency for Healthcare Research and Quality*
- *Agency for Healthcare Research and Quality /National Quality Measures Clearinghouse*
- *Agency for Healthcare Research and Quality /Patient Safety Network*
- *Alberta Heritage Foundation for Medical Research*
- *American College of Physicians*
- *American Medical Association*
- *Association française des enseignants de parasitologie et mycologie*
- *Australian Government - Department of Health and Ageing*
- *Bibliothèque médicale Lemanissier*
- *British HIV Association*

- *British Infection Association*
- *Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health*
- *Centers for Disease Control and Prevention*
- *California Technology Assessment Forum*
- *Centre fédéral d'expertise des soins de santé*
- *Centre national de référence des mycoses invasives et antifongiques*
- *CISMeF*
- *CMAInfobase*
- *Collège des médecins du Québec*
- *Cochrane Library Database*
- *Centre for Review and Dissemination databases*
- *Department of Health (UK)*
- *ECRI Institute*
- *Évaluation des technologies de santé pour l'aide à la décision*
- *Euroscan*
- *European Conference on Infections in Leukemia*
- *European Group for Blood and Marrow Transplantation*
- *European Organization for Research and Treatment of Cancer*
- *Immunocompromised Host Society*
- *European LeukemiaNet*
- *GIN (Guidelines International Network)*
- *Haute Autorité de santé*
- *Horizon Scanning*
- *Institute for Clinical Systems Improvement*
- *Institut national d'excellence en santé et en services sociaux*
- *Instituto de Salud Carlos III / Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias*
- *Iowa Healthcare collaborative*
- *National Coordinating Centre for Health Technology Assessment*
- *National Horizon Scanning Centre*
- *National Health and Medical Research Council*
- *National Health committee*
- *National Institute for Health and Clinical Excellence*
- *National Institutes of Health*
- *New Zealand Guidelines Group*
- *Servicio de Evaluación de Tecnologías Sanitarias OSTEBA*
- *Ontario Health Technology Advisory Committee*
- *Scottish Intercollegiate Guidelines Network*
- *Singapore Ministry of Health*
- *West Midlands Health Technology Assessment Collaboration*
- *World Health Organization*

Une veille bibliographique a été maintenue sur le sujet jusqu'en septembre 2017.

Annexe 2. Liste des tableaux et figures

Figure 1. Cycle hypothétique de <i>Pneumocystis jirovecii</i> dans l'alvéole pulmonaire.	8
Figure 2. Évolution du nombre de séjours en établissements de santé pour pneumocystose.	9
Figure 3. Diagramme de sélection des références bibliographiques analysées.	24
Tableau 1. Traitements prophylactiques de la pneumocystose chez le patient VIH en France (39).	14
Tableau 2. Stratégie d'interrogation documentaire dans les bases de données.	22
Tableau 3. Recommandations de bonne pratique (RBP) sélectionnées pour <i>P. jirovecii</i>	28
Tableau 4. Analyse de la méta-analyse de Summah <i>et al.</i> (70), portant sur la recherche de <i>P. jirovecii</i> par PCR quantitatives.	32
Tableau 5. Analyse de la méta-analyse de Li <i>et al.</i> , 2015 (69), portant sur le dosage du β -(1-3)- D - glucane sérique.	37
Tableau 6. Stratégie de recherche documentaire et résultats.	47

Annexe 3. Grilles d'évaluation

Grille AGREE II-GRS (68)

Méthode d'élaboration des recommandations*
Domaines de spécialité des auteurs et compétence méthodologique du groupe de travail ? Recherche bibliographique systématique et exhaustive bien décrite ? Pertinence des grilles d'évaluation utilisées pour estimer le corpus d'évidences scientifiques du document (niveau de preuve formulé par question clinique et non par étude originale) ? Adéquation du corpus d'évidences avec le grade de recommandation retenu ? Exhaustivité des critères de jugement retenus ?
Clarté de compréhension des recommandations
Compréhension rapide du lecteur concernant l'information utile du document ? Hiérarchisation évidente des stratégies pour le lecteur ?
Qualité de l'argumentaire scientifique
Transparence et reproductibilité du travail et de ses conclusions ? Prise en compte de la position de l'ensemble des parties prenantes concernées ?
Pertinence et applicabilité des recommandations pour la pratique
Démonstration évidente de son utilité en vie réelle ? La population cible est-elle pertinente ?

* traduction libre de l'anglais

Grille AMSTAR¹⁹ (67)

	Questions	Réponses
1	A-t-on fourni un plan « a priori » ? La question à l'étude et les critères d'inclusion devraient être établis avant l'exécution de l'examen systématique.	Oui Non Ne peut répondre Sans objet
2	Existait-il un double moyen de choisir le sujet d'analyse et d'extraire les données ? Il devrait exister au moins deux extracteurs de données indépendants et un mécanisme pour arriver à un consensus dans les cas de divergences.	Oui Non Ne peut répondre Sans objet
3	A-t-on effectué une recherche complète dans la littérature ? La recherche devrait porter sur au moins deux sources électroniques. Le rapport doit inclure les années et les bases de données utilisées (exemple : Central, EMBASE et MEDLINE). Les auteurs doivent fournir les mots clés et/ou les termes de la chaîne utilisés et, lorsque cela est possible, la stratégie de recherche. Toutes les recherches doivent être complétées par une consultation des contenus courants, des revues, des manuels, de registres spécialisés ou de spécialistes du domaine à l'étude, et par une revue des références contenues dans les études.	Oui Non Ne peut répondre Sans objet

¹⁹ <http://bmcmedresmethodol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2288-7-10>, (Shea BJ et al. BMC Med Res Methodol. 2007 Feb 15; 7:10).

	Questions	Réponses
4	La nature d'une publication (exemple : littérature grise) a-t-elle servi de critère d'inclusion ? Les auteurs devraient déclarer qu'ils ont cherché des rapports d'études sans égard au type de publication. Ils devraient aussi dire s'ils ont exclu des rapports à cause de la nature de la publication, de sa langue, etc.	Oui Non Ne peut répondre Sans objet
5	Les auteurs devraient fournir la liste des études incluses et des études exclues. Les auteurs devraient fournir la liste des études incluses et des études exclues.	Oui Non Ne peut répondre Sans objet
6	Les auteurs ont-ils fourni une description des caractéristiques des études incluses ? Présentées sous une forme condensée comme un tableau, les données de l'étude originale devraient inclure les participants, les interventions et les résultats. L'étude devrait rendre compte des différentes caractéristiques de toutes les études analysées (exemple : âge, race, sexe, données socio-économiques pertinentes, état de la maladie, durée, sévérité ou autres maladies).	Oui Non Ne peut répondre Sans objet
7	La qualité scientifique des études incluses dans l'examen a-t-elle été analysée et documentée ? Les méthodes d'évaluation <i>a priori</i> devraient être fournies (pour les études d'efficacité si l'auteur a choisi de n'inclure que les études aléatoires, les essais à double insu, les essais comparatifs avec placebo, ou l'allocation dissimulée utilisée comme critère d'inclusion) ; pour d'autres types d'études, des éléments différents pourront être pertinents.	Oui Non Ne peut répondre Sans objet
8	La qualité scientifique des études incluses a-t-elle été utilisée de façon appropriée dans la formulation des conclusions ? Les résultats au chapitre de la rigueur méthodologique et de la qualité scientifique devraient être pris en compte dans l'analyse et les conclusions de l'examen systématique, et devraient être mentionnés explicitement dans la formulation des recommandations.	Oui Non Ne peut répondre Sans objet
9	Les méthodes de groupement des résultats des études étaient-elles appropriées ? Lorsqu'on regroupe des résultats, on devrait d'abord vérifier si les études sont combinables en appliquant un test d'homogénéité (par exemple, le test I^2 qui détermine l'homogénéité des données). S'il existe de l'hétérogénéité, on devrait utiliser un modèle d'analyse des effets aléatoires et/ou considérer la pertinence de regrouper les résultats des études (est-il approprié de les regrouper ?).	Oui Non Ne peut répondre Sans objet
10	A-t-on analysé la possibilité d'un biais de publication ? L'analyse d'un biais de publication devrait inclure des représentations graphiques (par exemple, graphique en entonnoir ou autres tests disponibles) et/ou des analyses statistiques (par exemple : le test de régression d'Egger).	Oui Non Ne peut répondre Sans objet
11	A-t-on déclaré les conflits d'intérêts ? Les sources potentielles de soutien devraient être clairement reconnues dans les examens systématiques et dans les études incluses dans ces examens.	Oui Non Ne peut répondre Sans objet

D'après la grille publiée par le CCNMO (Centre de collaboration nationale des méthodes et outils), dernière mise à jour le 27 mars 2012.
<http://www.nccmt.ca/index-fra.html>

Annexe 4. Grille d'évaluation AMSTAR des méta-analyses portant sur le diagnostic de PPJ sélectionnées

Références	Li et al., 2015 (69)	Summah et al., 2013 (70)
A-t-on fourni un plan « a priori » ?	Oui	Oui
Existait-il un double moyen de choisir le sujet d'analyse et d'extraire les données ?	Oui (deux investigateurs + un 3 ^{ème} pour l'arbitrage des résultats)	Oui (deux investigateurs)
A-t-on effectué une recherche complète dans la littérature ?	Oui (deux bases interrogées + liste biblio des études incluses + termes de recherche)	Partiellement (seulement deux bases interrogées, termes de recherche), restriction aux études en anglais, contact auprès d'auteurs pris
La nature d'une publication (exemple : littérature grise) a-t-elle servi de critère d'inclusion ?	Partiellement (résumé de congrès non pris en considération, limitation à l'anglais)	Partiellement (résumé de congrès non pris en considération)
Liste des études incluses et des études exclues.	Partiellement : liste des études incluses et <i>flow chart</i> de la sélection bibliographique	Partiellement : <i>flow chart</i> de la sélection bibliographique
Les auteurs ont-ils fourni une description des caractéristiques des études incluses ?	Oui	Oui
La qualité scientifique des études incluses dans l'examen a-t-elle été analysée et documentée ?	Oui (analysée (outil QUADAS-2) et renseignée dans un tableau)	Oui (analysée (outil QUADAS-2 : 10 items) et renseignée dans un tableau)
La qualité scientifique des études incluses a-t-elle été utilisée de façon appropriée dans la formulation des conclusions ?	Oui : conclusions et propositions prudentes du fait de l'insuffisance de données probantes, notamment pour le groupe de sujets non VIH	Oui : des éléments pouvant expliquer la variabilité ont été décrits, les conclusions sont équilibrées au regard des limites constatées (distinction entre non VIH et VIH+ non possible)
Les méthodes de groupement des résultats des études étaient-elles appropriées ?	Oui (modèle de régression bivariée à effet aléatoire, estimation hétérogénéité, analyses en sous-groupe pour tenir compte de l'hétérogénéité inter-études), mais non prise en compte de tous les facteurs de confusion potentiels (traitement prophylactique par exemple dans 11 études, type de kit et seuil)	Oui (modèle de régression bivariée à effet aléatoire, estimation hétérogénéité, analyses en sous-groupes pour tenir compte de l'hétérogénéité inter-études (statut VIH, milieu testé)). Impossibilité de certaines analyses par effectif faible et données non fournies dans les publications
A-t-on analysé la possibilité d'un biais de publication ?	Oui (<i>Deeks' funnel plot asymmetry test</i>)	Oui (test Egger)
A-t-on déclaré les conflits d'intérêts ?	Déclaration d'absence de conflits d'intérêts	Déclaration d'absence de conflits d'intérêts
Qualité méthodologique globale	Intermédiaire à bonne	Intermédiaire à bonne

Annexe 5. Présentation des recommandations de bonne pratique analysées dans l'argumentaire

Concernant les abréviations utilisées, se reporter à la partie « Abréviations et acronymes » en début d'argumentaire.

Qualité méthodologique du document	Conclusions principales des auteurs	Commentaires HAS
Patients immunodéprimés VIH+ et VIH -		
<i>British Society for Medical Mycology best practice recommendations for the diagnosis of serious fungal diseases, UK, 2015 (38)</i>		
Méthode d'élaboration des recommandations : Recherche non systématique de la littérature (une base de données : <i>Pubmed</i>), période de recherche entre janvier 1971 et août 2014, pas de critères de jugements ni de critères de sélection de la littérature. Gestion des conflits d'intérêts : six auteurs sur sept déclarent des liens d'intérêts avec des laboratoires pharmaceutiques, méthode de travail transparente. Peu de précisions sur la méthode de consensus entre experts et les critères de jugement. Clarté de présentation des recommandations : Pas d'algorithme de stratégie diagnostique présenté. Existence et qualité de l'argumentaire scientifique : Gradation par méthode GRADE mais pas de gradation pour <i>P. jirovecii</i>, résumé des argumentaires menant aux recommandations. Pertinence et applicabilité des recommandations pour la pratique : Population cible non explicitement renseignée, uniquement adulte ou non, les auteurs ne proposent pas une réelle stratégie diagnostique.	Recommandations pour le diagnostic des infections fongiques sévères chez les patients immunodéprimés. Populations à risque fongique sévère : HIV+, immunodéficit congénital, leucémie, chimiothérapie, transplantation de CSH et d'organes, corticothérapie, immunomodulateurs, anti-TNF, méthotrexate,...). Recommandations en microbiologie : - chez les patients non VIH : le LBA est le prélèvement à privilégier pour l'examen microscopique de <i>P. jirovecii</i> (couplé au scanner thoracique pour diagnostic différentiel) ; - chez les patients VIH+ : une expectoration induite ou non peut être aussi sensible que le LBA. Les échantillons respiratoires devraient être liquéfiés, en particulier pour la détection de <i>P. jirovecii</i>. L'examen direct par coloration (deux colorants) : pour la détection de <i>P. jirovecii</i>, il est moins sensible que l'IF directe (86-97 %) (mais utilisable) sachant que le blanc de calcofluor est équivalent en termes de sensibilité à l'imprégnation argentique de Gomori-Grocott. <u>L'examen par IF directe avec anticorps, la PCR ou les deux méthodes sont recommandés chez les patients suspectés de PPJ.</u> La PCR : plus sensible que les méthodes de colorations et sur des échantillons respiratoires profonds, a une excellente valeur diagnostique négative, suffisante pour confirmer ou exclure le diagnostic de PPJ chez les patients à risque élevé. Nécessité de plus de données sur ses performances sur d'autres prélèvements (expectoration ou sang) et sur différentes populations. La sensibilité de la PCR dans le LBA ne semble pas être diminuée dans les sept premiers jours d'une thérapie antifongique bien que davantage de données soient nécessaires. Le dépistage (<i>screening</i>) du β-(1-3)-D - glucane sérique chez les patients à risque élevé d'infection fongique invasive doit être considéré : un résultat négatif a une VPN élevée, permettant l'exclusion d'une IFI ; utile pour le diagnostic de <i>P. jirovecii</i>, particulièrement lorsqu'un échantillon respiratoire ne peut être obtenu. Recommandations en histopathologie : Colorations préconisées pour recherche de champignons : coloration de Gram et Grocott argentique ainsi que Schiff acide : une triple coloration histochimique devrait être faite en routine dans les populations à risque définies au-dessus.	Pas de paragraphe spécifique au diagnostic de <i>P. jirovecii</i>. Les auteurs ne mentionnent pas la PCR quantitative, ni les problèmes de faux positifs avec la PCR dû au portage asymptomatique (patients colonisés).

Patients immunodéprimés non VIH

ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients, Europe, 2016 (4)

Méthode d'élaboration des recommandations : Recherche systématique de la littérature sur deux bases de données (<i>Pubmed</i>, <i>Scopus</i>) jusqu'à fin août 2013 faite par deux groupes de cliniciens et microbiologistes, 31 publications retenues, comparant les techniques microscopiques et de PCR, réunion d'experts (61 participants) organisée pour établir les recommandations. Gradation de la force des recommandations (A-C) et de la qualité des preuves (I-III). Gestion des conflits d'intérêts : méthode de travail transparente : réunion financée par quatre industriels du médicament, un auteur déclare avoir un lien d'intérêt avec un industriel du diagnostic Clarté de présentation des recommandations : Bonne. Algorithme de stratégie diagnostique présenté. Existence et qualité de l'argumentaire scientifique : Méthode de gradation adaptée, résumé des argumentaires menant aux recommandations, prise en compte des méta-analyses publiées. Toutefois, la différence des statuts VIH+ et non VIH dans les données disponibles et l'impact sur les propositions faites n'est pas clairement présentée. Pertinence et applicabilité des recommandations pour la pratique : Recommandations claires pour la pratique. Interprétation des différents résultats possibles des tests, population cible non explicitement renseignée. Stratégie diagnostique très claire proposée chez les patients non VIH.	Population : patients adultes immunodéprimés avec hémopathie maligne ou receveurs de greffe de cellules souches et non VIH. Pour investiguer l'étiologie d'une pneumonie, il n'est pas recommandé de baser le diagnostic uniquement sur la clinique ou l'imagerie. Le LBA est recommandé comme étant le meilleur prélèvement car il a une bonne VPN et permet la détection de multiples étiologies (A-II). Le diagnostic de PPJ peut être écarté si résultats négatifs sur LBA par deux méthodes (A-II). Les prélèvements non invasifs (expectoration induite, aspiration nasale, naso-pharyngée, crachats...) peuvent être une alternative possible (B-II). Les tests d'IF (technique directe ou indirecte) sont recommandés comme méthode microscopique la plus sensible (A-II) et si positive, pose l'indication de PPJ (A-II) quel que soit le prélèvement. Avec un ratio de 1/10 entre kystes et formes trophiques, l'utilisation d'une combinaison de deux colorations est recommandée : une pour détecter les kystes et une autre pour détecter les trophozoïtes (A-III). La PCR en temps réel - avec les contrôles adéquats - est recommandée pour le diagnostic en routine de la PPJ (A-II) : • dans le LBA, une qPCR négative permet d'exclure le diagnostic de PPJ (après contrôle des risques techniques de faux négatifs (A-II) ; • sur les autres prélèvements, ce diagnostic ne peut être écarté (A-II) (charge fongique faible). Dans le sérum, la détection du β -(1-3)- D - glucane peut contribuer au diagnostic de la PPJ (A-II) : • un résultat négatif du BG sérique peut exclure une PPJ chez un patient à risque (A-II), un résultat positif ne permet pas d'indiquer la nature de l'infection fongique et nécessite une autre technique de diagnostic de PPJ ; • le BG n'est pas recommandé pour le suivi d'un traitement (A-II). Il n'existe pas de données permettant d'énoncer des recommandations sur le BG dans le LBA. Dans le sérum, la recherche simultanée de BG et d'ADN augmenterait la spécificité. Remarques des auteurs : Il n'existe pas de standardisation de la quantification par qPCR : • tant que des seuils en qPCR permettant de distinguer la colonisation de l'infection n'ont pas été déterminés chez les patients non VIH, un remplacement définitif de l'examen microscopique par la qPCR ne peut être recommandé ;	Recommandations élaborées pour une population adulte. Hétérogénéité des études sélectionnées pour l'analyse des performances de la PCR (différents types de PCR, différents gènes cibles, différents tests de références (IF ou colorations). La sélection des études avec population VIH+ dans la recherche, puis la focalisation sur les patients non VIH dans les recommandations n'est pas argumentée. Risque de contamination interne des PCR classique par amplicons. Cas des patients négatifs en IF et positifs en PCR = colonisation ? Des essais prospectifs en population homogène sont nécessaires pour définir l'utilité clinique du BG ; citation des méta-analyses de Karageorgopoulos <i>et al.</i>, Onishi <i>et al.</i> pour faire les recommandations.
--	---	--

	• un consensus devra définir quel résultat le plus bas en qPCR correspond à un prélèvement positif en IF, permettant alors de proposer la qPCR seule pour le diagnostic de la PPJ ; • le dosage du BG sérique est particulièrement intéressant pour exclure une PPJ chez les patients pour qui un LBA n'est pas réalisable ; • l'utilité clinique de ces tests diagnostiques pour la prise en charge (traitement) précoce d'une PPJ devrait être davantage évaluée dans des études interventionnelles randomisées prospectives ; • pas de recommandation chez l'enfant : manque de données d'études (à initier).	Cette recommandation met bien en exergue les manquements dans les connaissances actuelles, et les insuffisances des techniques telles qu'utilisées À noter la présence de 6 experts français.
<i>Diagnosis and antimicrobial therapy of lung infiltrates in febrile neutropenic patients (allogeneic SCT excluded): updated guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Medical Oncology (DGHO), Allemagne, 2015 (64)</i>		
Méthode d'élaboration des recommandations : Groupe d'experts multidisciplinaire dans un processus de consensus par étape (si consensus non trouvé, vote à la majorité), recherche systématique de la littérature par tous les co-auteurs (base(s) de données interrogée(s) NR) sur une période NR, pas de critères de jugements ni de critères de sélection de la littérature, nombre de publications retenues NR, méthode de travail transparente. Méthode de gradation avec force de recommandation (I-III) et niveau de preuve (A-D). Financement interne à la société savante et liens d'intérêts (industriel) indiqués. Clarté de présentation des recommandations : Algorithme de stratégie diagnostique présenté pour l'ensemble des IFI. Existence et qualité de l'argumentaire scientifique : Argumentaire succinct, objectif déclaré de pragmatisme dans la prise en charge des patients, l'argumentaire est mis en annexe de la publication, tableaux des recommandations avec niveau de preuve pour le diagnostic des germes (dont <i>P. jirovecii</i>) en cause chez ces patients.	Patients neutropéniques fébriles (transplantations de cellules souches allogéniques exclues) avec infiltrat pulmonaire. Les preuves microbiologiques sont souvent manquantes chez ce type de patients et les procédures invasives comme le LBA n'ont pas amélioré le diagnostic car la sensibilité est de 25 - 50 %. La bronchoscopie et le LBA devraient être réalisés en utilisant un protocole standardisé (A-II). Ils devraient être disponibles dans les 24 h après le constat d'infiltrat (B-III). La bronchoscopie et le LBA devraient seulement être réalisés chez les patients sans hypoxémie critique (A-II). Le recours aux prélèvements invasifs avec risque de complications graves (biopsie à l'aiguille percutanée ou à poumon ouvert) pour identification histologique est possible en urgence si LBA négatif (B-II). La présence de <i>P. jirovecii</i> dans le LBA ou expectoration donne le diagnostic. Les biopsies transbronchiques ne sont pas recommandées chez les patients neutropéniques (et thrombocytopéniques) fébriles (D-II). PCR non quantitative potentiellement pertinente sur le LBA. Sur LBA : • PCR quantitative si possible pour <i>P. jirovecii</i> (niveau de preuve A) (qPCR >1 450 copies/ml considérée positive). Ce résultat conduit à débiter un traitement systémique (B-II) ; • calcofluor blanc ou équivalent (recherche des champignons et <i>P. jirovecii</i>) (niveau de preuve A) ; • IF directe pour <i>P. jirovecii</i> (en confirmation) (niveau de preuve A). PCR utile chez les patients sous traitement antifongique. Le dosage du β-(1-3)-D-glucane sérique peut compléter le diagnostic différentiel car un résultat négatif rend la PPJ fortement improbable (indication de causalité non gradée).	Les auteurs indiquent ne pas avoir gradé la force de la recommandation pour les aspects microbiologiques en l'absence d'essais cliniques randomisés. Les auteurs n'évoquent pas le problème de standardisation des seuils de la qPCR pour <i>P. jirovecii</i>. Problème de détection des patients colonisés avec la PCR (50 %) évoqué sans éléments complémentaires. Relatent les risques de faux positifs avec des médicaments pour chacun des Ag des champignons pathogènes et méta-analyses sur GM et BG pris en compte.

Pertinence et applicabilité des recommandations pour la pratique : Algorithme de stratégie diagnostique générale pour patient neutropénique fébrile fourni.	Une thérapie doit être débutée dès la confirmation sur LBA ou expectoration induite (B-II). Un besoin urgent de démarrer ou modifier une thérapie antimicrobienne ne doit pas être retardé par une bronchoscopie ou un LBA (A-II). Remarque dans l'introduction de la recommandation : la plupart des PCR ne sont pas encore standardisées et validées (remarque non spécifique à la qPCR pour le diagnostic de <i>P. jirovecii</i>). La PCR sur le LBA demeure positive plusieurs jours après l'instauration d'un traitement par trimethoprim-sulfamethoxazole.	
Population pédiatrique VIH+ et non VIH		
Recommandations sur l'utilisation des nouveaux outils diagnostiques étiologiques des infections respiratoires basses de l'enfant de plus de trois mois Société pédiatrique de pneumologie et d'allergologie - Société française de pédiatrie, 2014, France (72)		
Méthode d'élaboration des recommandations : Méthode du consensus formalisé. Revue systématique de la littérature par un groupe de pilotage. Cotation par un groupe de cotation indépendant. Les recommandations sont cotées (A-C) et le niveau de preuve est gradé (1-4). Financement non indiqué, absence de conflits d'intérêts indiquée. Recherche non systématique de la littérature sur deux bases de données (<i>Pubmed</i>, <i>Embase</i>) sur une période NR, nombre de publications retenues NR, pas de critères de jugements ni de critères de sélection de la littérature. Clarté de présentation des recommandations : Pas d'algorithme de stratégie diagnostique présenté. Existence et qualité de l'argumentaire scientifique : Assez bonne avec résumé des argumentaires menant aux recommandations, mais les positions ne sont pas toujours étoffées par des résultats précis et chiffrés (version longue des recommandations).	Population concernée : - la recherche de <i>P. jirovecii</i> doit être réalisée chez des enfants chez qui il existe des symptômes cliniques évocateurs de pneumocystose pulmonaire, et pour lesquels le terrain à risque est connu ou suspecté : déficit immunitaire inné, infection par le VIH, chimiothérapie immunosuppressive, traitement immunosuppresseur (ciclosporine, methotrexate, endoxan, analogues de purines, corticothérapie prolongée, greffes d'organes ou de moelle, dénutrition sévère (grade A) ; - pour l'enfant VIH+, risque lié au taux de lymphocytes T CD4 : si $CD4 < 500/mm^3$, déficit sévère et si $< 1\ 000/mm^3$, modéré. Prélèvements : Le LBA reste le prélèvement de choix pour le diagnostic de pneumocystose pulmonaire, mais l'aspiration naso-pharyngée et l'expectoration induite, si l'enfant est en âge de la réaliser, sont également possibles (grade C). Mise en évidence par trois <u>colorations</u> possibles : - Giemsa : formes trophiques et kystes ; - Gomori-Grocott argentique et Bleu de Toluidine : kystes. Méthodes moléculaires : Si suspicion de PPJ : - chez l'enfant non VIH, la biologie moléculaire sera réalisée systématiquement si le diagnostic microscopique est négatif, quel que soit le type de recueil (grade B) ; - chez l'enfant VIH+, le diagnostic microscopique seul par IF suffit sur le LBA (grade B). La PCR conventionnelle est sensible mais ne permet pas de différencier colonisation et infection. La recherche de <i>Pneumocystis</i> par diagnostic moléculaire effectuée sur écouvillons naso-pharyngés et rinçages oro-pharyngés reste à valider chez l'enfant en cas de suspicion de pneumocystose pulmonaire (Expert).	Remarque des auteurs : La PCR conventionnelle ne permet pas de différencier colonisation et infection. La PCR quantitative permet d'améliorer la sensibilité du diagnostic mais ne permet pas de différencier colonisation et infection. Le diagnostic microscopique à une sensibilité > 75 % si enfant VIH+ et < 50 % si VIH-. Méthode utilisée pour la conduite de ces recommandations inspirée du guide méthodologique « Bases méthodologiques pour l'élaboration de recommandations professionnelles par consensus formalisé » publié par la Haute Autorité de santé (HAS) en janvier 2006.

Pertinence et applicabilité des recommandations pour la pratique : Population cible décrite, recommandations claires pour la pratique.	La PCR quantitative est validée chez l'adulte mais pas chez l'enfant, et il n'existe pas actuellement de consensus sur les seuils, ni de méthode standardisée. Dans le sang, si <u>recherche de BG</u> : importance de sa VPN (pas de gradation).	
Population pédiatrique VIH+		
<i>Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections Among HIV-Exposed and HIV-Infected Children: Recommendations from CDC, the National Institutes of Health, the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the American Academy of Pediatrics, 2013, USA (31)</i>		
Méthode d'élaboration des recommandations : Mise à jour de précédentes recommandations, groupe de spécialistes en infection VIH pédiatrique et maladies infectieuses, réunion plénière, révision et approbation par groupe de travail et endossement par sociétés savantes, pas d'information sur la recherche de la littérature (NR si systématique), période approximative (depuis dernier rapport), pas de critères de jugements ni de critères de sélection de la littérature, nombre de publications retenues NR, gestion des conflits d'intérêts et sources de financement détaillées, méthode de travail transparente (mais non explicite pour la recherche de la littérature). Clarté de présentation des recommandations : Médiocre. Pas d'algorithme de stratégie diagnostique présenté. Existence et qualité de l'argumentaire scientifique : Pas de gradation, forces et limites des preuves scientifiques non décrites pour la partie diagnostic, résumé des argumentaires menant aux recommandations. Pertinence et applicabilité des recommandations pour la pratique : Les auteurs ne proposent pas une réelle stratégie diagnostique.	Recommandations pour la prévention et le traitement des infections opportunistes chez les enfants exposés et infectés par le VIH. En cas de pneumonie, examen direct par colorations ou IF sur tissus pulmonaires ou fluides (expectorations induites, LBA) : l'identification fournit un diagnostic de certitude. Trois types de coloration permettent d'identifier <i>Pneumocystis</i> : coloration de Gomori (kystes), bleu de toluidine (kyste), coloration de Giemsa et de Whright colorent les trophozoïtes et les sporozoïdes intracystiques mais pas la paroi du kyste : - recommandation : il est recommandé d'associer une méthode de coloration de la paroi du kyste, des trophozoïtes et une par anticorps immunofluorescents pour chaque échantillon étudié ; - les Ac monoclonaux immunofluorescents (MERIFLUOR®, Meridian Bioscience, Inc.) identifient la paroi kystique, peuvent aussi être utilisés pour le diagnostic et ont une spécificité et une sensibilité améliorées comparés aux méthodes de coloration. Après expectoration induite négative (sensibilité chez l'adulte : 25 à 90 %), un LBA peut être nécessaire pour un diagnostic définitif : la bronchoscopie couplée au LBA est la procédure diagnostique de choix. La bronchoscopie guidée pour biopsie transbronchique n'est réalisée qu'en cas de forte suspicion (contre-indiquée si thrombocytopénie) avec LBA négatif et sans diagnostic alternatif (les kystes sont identifiables sur les tissus jusqu'à dix jours après le début du traitement). La biopsie par chirurgie ouverte, la plus sensible et spécifique, n'est pas une technique de routine en raison des complications potentielles (hémorragies, pneumothorax). Un résultat positif sur aspirations nasogastriques a une valeur diagnostique. Environ 18 % de porteurs sains dans du liquide de LBA chez des patients non VIH asymptomatiques sont détectés par PCR : la méthode est plus sensible mais moins spécifique que les techniques microscopiques et non standardisée (pas de recommandation).	Pour la partie diagnostic, pas une vraie recommandation. Les procédures diagnostiques sont les mêmes que celles pour l'adulte suspecté de PPJ mais certaines peuvent être plus difficiles à réaliser chez l'enfant. Les auteurs ne se positionnent pas sur la PCR. Les auteurs font référence aux précédentes recommandations du <i>National Institute of Health</i> chez l'adulte pour la stratégie diagnostique de <i>P. jirovecii</i> qui selon les auteurs est similaire à celle de l'adulte et décrit précisément les techniques à utiliser.

Annexe 6. Grille pour l'élaboration et la lecture des rapports d'évaluation des technologies HTA INAHTA

Pour chaque question, réponse prévue selon 3 possibilités : oui, partiellement, non

Éléments	INESSS (Québec), 2017 (71)
Préliminaires	
1 Présence de coordonnées permettant d'obtenir des informations complémentaires ?	oui
2. Identification des auteurs ?	oui
3. Déclaration sur les conflits d'intérêts ?	oui
4 Indication d'une validation externe du rapport ?	oui
5. Bref résumé en langage non technique ?	non
Pourquoi ?	
6. Question posée et contexte de l'évaluation?	oui
7. Indication du champ de l'évaluation ?	oui
8. Description de la technologie de santé évaluée ?	oui
Comment ?	
9. Détails sur les sources d'information ?	partiellement
10. Informations sur le choix des éléments d'évaluation ?	oui
11. Informations sur l'interprétation des données recueillies ?	oui
Quoi ?	
12. Présentation des résultats de l'évaluation ?	oui
13. Interprétation des résultats de l'évaluation?	oui
Implications	
14. Présentation des conclusions de l'évaluation ?	oui
15. Énoncé des conséquences médico-légales?	oui
16. Énoncé clair des conclusions de l'évaluation ?	oui
17. Suggestions d'actions complémentaires ?	oui

Annexe 7. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse du Conseil national professionnel d'hématologie (CNPH)

A – Stratégie actuelle de prise en charge d'une suspicion de pneumocystose

A1 Selon votre organisme quelle(s) situation(s) clinique(s) doi(ven)t-elle(s) faire suspecter une pneumopathie à *P. jirovecii* (PPJ) ?

En hématologie, ceci concerne essentiellement les patients ayant reçu une allogreffe ou une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques ou les patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique sous corticothérapie à haute dose. Tous ces patients reçoivent une prophylaxie ciblée.

A2 Dans la littérature analysée, la pneumocystose est - soit considérée parmi les infections fongiques invasives (IFI) au même titre que les affections à *Aspergillus* ou à *Candida*, - soit à part. Comment votre organisme la classe-t-elle et pourquoi ?

Ceci relève des infectiologues.

A3 Quelle(s) est/sont la/les stratégie(s) diagnostique(s) actuellement mise(s) en œuvre pour détecter une PPJ utilisée(s) en France ? La stratégie est-elle la même selon le statut vis-à-vis du VIH du sujet ?

Ceci relève des infectiologues.

A4 Ces stratégies sont-elles identiques chez l'adulte et chez l'enfant ?

Ceci relève des infectiologues.

A5 La stratégie diagnostique pour un patient sous traitement prophylactique de PPJ²⁰ est-elle la même ?

Ceci relève des infectiologues.

A6 La recherche d'anticorps sériques spécifiques n'est pas présente dans la demande et la littérature sélectionnée concernant le diagnostic de PPJ. Selon votre organisme cet acte a-t-il une place dans la stratégie diagnostique ?

Non.

B – L'examen direct par microscopie

B1 Votre organisme considère-t-il encore pertinente la recherche de *P. jirovecii* par microscopie ?

Non, mais parfois l'examen microscopique des LBA par les hématologues biologistes ou les microbiologistes permet de poser rapidement le diagnostic.

B2

Dans la littérature analysée, le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) est le liquide biologique de choix de recherche de *P. jirovecii* par microscopie. Votre organisme est-il d'accord avec cette position ?

Oui.

B3

Sur quels types de prélèvements autres que le LBA peut-on réaliser un examen microscopique de recherche de *P. jirovecii* ? Ces prélèvements sont-ils les mêmes selon le statut VIH+ ou non VIH du sujet ?

Ceci relève des infectiologues.

B4

Existe-t-il des conditions de réalisation particulières pour l'examen direct par colorations, par immunofluorescence directe, indirecte ?

Ceci relève des infectiologues.

B5

Pour la recherche de *P. jirovecii*, votre organisme pense-t-il que deux techniques différentes de recherche au microscope soient actuellement indispensables ?

Ceci relève des infectiologues.

B6

Si oui, quelle serait selon votre organisme la stratégie de recherche à privilégier ? Deux colorations, une coloration et une IF,...

Ceci relève des infectiologues.

B7

Si non, quelle est selon votre organisme la stratégie de recherche à préconiser ?

Ceci relève des infectiologues.

C – L'amplification génique spécifique de *P. jirovecii*

C1

Dans la littérature analysée, les techniques PCR font partie de l'arsenal des techniques de recherche de *P. jirovecii*. Votre organisme est-il d'accord avec cette position ? Si oui, indiquez le(s) type(s) de techniques que vous considérez validées dans cette indication [PCR qualitative, PCR quantitative (qPCR), LAMP,...]

Oui, mais ceci relève essentiellement des infectiologues.

C2

La PCR non quantitative a-t-elle encore sa place dans le diagnostic de la pneumocystose ?

Ceci relève des infectiologues.

C3

Dans la littérature analysée, le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) est le liquide biologique de choix de recherche de *P. jirovecii* par PCR. Votre organisme est-il d'accord avec cette position ?

Oui.

C4

Sur quels prélèvements autres que le LBA peut-on réaliser un test d'amplification génique pour *P. jirovecii*? Ces prélèvements sont-ils les mêmes selon le statut VIH+ ou non VIH du sujet ?

Ceci relève des infectiologues.

- C5** | Quelle(s) est/sont la/les meilleure(s) cible(s) pour les tests d'amplification génique pour *P. jirovecii* ?
Ceci relève des infectiologues.
- C6** | Existe-t-il des conditions de réalisation spécifiques pour cette technique? (transport, conservation, réalisation du test en lui-même...)
Ceci relève des infectiologues.
- C7** | Que signifie selon votre organisme l'expression « une amplification génique qualitative avec estimation quantitative » (employée dans la demande) ?
Les hématologistes recherchent essentiellement une réponse qualitative.
- C8** | Selon votre organisme, quelle est la place de la PCR par rapport à l'examen microscopique dans le diagnostic biologique de PPJ ? Veuillez préciser par type de PCR et selon le statut vis-à-vis du VIH du sujet, si opportun.
Ceci relève des infectiologues.
- C9** | La PCR peut-elle détecter *P. jirovecii* chez des patients asymptomatiques ? À combien estimez-vous la part des patients colonisés parmi les patients positifs en qPCR? Quel est l'impact de ce résultat sur la prise en charge du patient ?
Ceci relève des infectiologues.
- C10** | Hormis les cas de patients colonisés par *P. jirovecii*, existe-t-il des faux positifs avec l'amplification génique ? Si oui, veuillez préciser.
Ceci relève des infectiologues.
- C11** | Votre organisme considère-t-il que la qPCR est une technique standardisée (unités, seuil,...) dont les résultats sont reproductibles quel que soit le lieu de réalisation. Sinon, quelle est l'échéance selon vous pour obtenir une harmonisation ?
Ceci relève des infectiologues.

D – Test de mesure du β -(1-3)- D - glucane (BG)

- D1** | Le dosage du β -(1-3)- D - glucane (BG) sérique peut-il trouver sa place dans la recherche d'une PPJ (stratégies diagnostiques évoquées au A) ? Laquelle ? Pourquoi ?
Ceci relève des infectiologues. Ce test n'est pas demandé par les hématologistes concernés.
- D2** | La place du test du BG sérique est-elle différente selon le statut VIH du patient ? Votre organisme pense-t-il notamment comme le proposent les auteurs de la méta-analyse examinée dans l'argumentaire (Li et al.) que le BG sanguin utilisé en dépistage permette de limiter chez les PVVIH²¹ l'utilisation de la prophylaxie de la pneumocystose ?
Ceci relève des infectiologues.

²¹ PVVIH : personne vivant avec le VIH.

D3

Plus globalement, quelles sont les conséquences des résultats d'un test de BG sérique en cas de suspicion de PPJ ? Veuillez préciser en cas de test positif et de test négatif.

Ceci relève des infectiologues.

D4

Quelle(s) est/sont la/les technique(s) validée(s) de dosage du BG en France ? Présente(nt)-elle(s) des problèmes de seuils pour le dosage sérique ?

Ceci relève des infectiologues.

D5

Quelle est selon votre organisme la modalité pratique de réalisation du dosage du BG sérique à adopter pour valider un résultat selon la technique ? Un seul prélèvement, deux successifs (confirmation en 48 à 72 heures) ?

Ceci relève des infectiologues.

E – Questions portant sur l'argumentaire de la HAS

E1

Auriez-vous connaissance de publications pertinentes non prises en compte ? Veuillez préciser les publications de nature synthétique non prises en compte et répondant aux critères de sélection énoncés page 22 de l'argumentaire provisoire.

Non.

E2

Avez-vous des observations sur la version intermédiaire (contexte et analyse de la littérature) de l'argumentaire de la HAS fourni avec ce questionnaire (lisibilité, omissions, erreur ou approximation, points à ajouter, autre...) ?

Veuillez préciser le cas échéant les éléments à clarifier.

Non, quelques fautes de frappe/grammaire bénignes.

E3

Souhaitez-vous émettre des commentaires complémentaires ?

Non.

Annexe 8. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse du Conseil national professionnel d'infectiologie *via* la Société française de lutte contre le Sida (SFLS)

A – Stratégie actuelle de prise en charge d'une suspicion de pneumocystose

Selon votre organisme quelle(s) situation(s) clinique(s) doi(ven)t-elle(s) faire suspecter une pneumopathie à *P. jirovecii* (PPJ) ?

Réponse argumentée :

Dans le contexte de l'infection par le VIH, une pneumopathie à *P. jirovecii* est suspectée en cas de tableau clinique de pneumopathie interstitielle bilatérale (toux sans expectoration, fièvre, dyspnée d'aggravation progressive), dans les situations suivantes :

A1

- personne infectée par le VIH connue, avec déficit immunitaire (lymphocytes CD4 < 200/mm³), et en l'absence de prophylaxie primaire ou secondaire de la pneumocystose, ou en cas de mauvaise observance à cette prévention ;
- personne non connue comme étant infecté par le VIH, mais n'ayant pas eu de dépistage VIH récent, et/ou ayant des comportements à risque (fréquence des pneumocystoses révélatrices de la séropositivité VIH) ;
- personne infectée par le VIH connue, n'ayant pas de prévention anti-infectieuse, quelle que soit l'immunité, mais en cas de traitement immunosuppresseur (radiothérapie, corticothérapie prolongée, traitement immunosuppresseur telle une chimiothérapie anti-cancéreuse, ou méthotrexate).

Dans la littérature analysée, la pneumocystose est - soit considérée parmi les infections fongiques invasives (IFI) au même titre que les affections à *Aspergillus* ou à *Candida*, - soit à part. Comment votre organisme la classe-t-elle et pourquoi ?

A2

Réponse argumentée :

Oui il s'agit d'une infection fongique invasive compte-tenu du tableau clinique, et du pronostic en l'absence de traitement spécifique.

Quelle(s) est/sont la/les stratégie(s) diagnostique(s) actuellement mise(s) en œuvre pour détecter une PPJ utilisée(s) en France ? La stratégie est-elle la même selon le statut vis-à-vis du VIH du sujet ?

A3

Réponse argumentée :

Fibroscopie bronchique avec lavage alvéolaire avant tout.

Expectoration induite en cas de contre-indication au LBA (lavage broncho-alvéolaire).

Aspirations trachéales chez un patient en réanimation, intubé, situation où le LBA est aussi contre indiqué.

Ces stratégies sont-elles identiques chez l'adulte et chez l'enfant ?

A4

Réponse argumentée :

Pas d'expérience de pratique pédiatrique.

La stratégie diagnostique pour un patient sous traitement prophylactique de PPJ²² est-elle la même ?

A5 Réponse argumentée :

Oui, incertitude sur l'observance au traitement prophylactique, efficacité pas de 100% surtout si déficit immunitaire profond et prolongé.

La recherche d'anticorps sériques spécifiques n'est pas présente dans la demande et la littérature sélectionnée concernant le diagnostic de PPJ. Selon votre organisme cet acte a-t-il une place dans la stratégie diagnostique ?

A6 Réponse argumentée :

Non pas de place, aucune étude n'a montré un intérêt, une fiabilité de cette sérologie.

B – L'examen direct par microscopie

Votre organisme considère-t-il encore pertinente la recherche de *P. jirovecii* par microscopie ?

B1 Réponse argumentée :

Oui, le diagnostic microbiologique doit être obtenu sauf contre-indication (l'absence de certitude diagnostique n'empêchant pas l'introduction d'un traitement spécifique en cas de forte suspicion de PCP, et d'impossibilité d'effectuer le LBA).

Dans la littérature analysée, le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) est le liquide biologique de choix de recherche de *P. jirovecii* par microscopie. Votre organisme est-il d'accord avec cette position ?

B2 Réponse argumentée :

Oui, c'est le prélèvement ayant la meilleure sensibilité.

Sur quels types de prélèvements autres que le LBA peut-on réaliser un examen microscopique de recherche de *P. jirovecii* ? Ces prélèvements sont-ils les mêmes selon le statut VIH+ ou non VIH du sujet ?

B3 Réponse argumentée :

Contexte VIH : expectoration induite, voire aspirations trachéales (cf A3). Idem en cas de statut VIH négatif.

Existe-t-il des conditions de réalisation particulières pour l'examen direct par colorations, par immunofluorescence directe, indirecte ?

B4 Réponse argumentée :

Question technique, pas de réponse...

Pour la recherche de *P. jirovecii*, votre organisme pense-t-il que deux techniques différentes de recherche au microscope soient actuellement indispensables ?

B5 Réponse argumentée :

Oui, ceci améliore la sensibilité, donc soit 2 colorations différentes, soit 1 coloration associée à immunofluorescence.

B6

Si oui, quelle serait selon votre organisme la stratégie de recherche à privilégier ? Deux colorations, une coloration et une IF,...

Réponse argumentée :

Même réponse que B5, soit 2 colorations (expérience à Strasbourg), soit 1 coloration + IF.

B7

Si non, quelle est selon votre organisme la stratégie de recherche à préconiser ?

Réponse argumentée :

C – L'amplification génique spécifique de *P. jirovecii*

C1

Dans la littérature analysée, les techniques PCR font partie de l'arsenal des techniques de recherche de *P. jirovecii*. Votre organisme est-il d'accord avec cette position ? Si oui, indiquez le(s) type(s) de techniques que vous considérez validées dans cette indication [PCR qualitative, PCR quantitative (qPCR), LAMP,...]

Réponse argumentée :

C2

La PCR non quantitative a-t-elle encore sa place dans le diagnostic de la pneumocystose ?

Réponse argumentée :

Oui, car il n'y a pas de seuil ayant clairement démontré qu'il permettait de différencier infection de colonisation, même si la PCR quantitative reste plus valable.

C3

Dans la littérature analysée, le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) est le liquide biologique de choix de recherche de *P. jirovecii* par PCR. Votre organisme est-il d'accord avec cette position ?

Réponse argumentée :

Oui, c'est le liquide biologique de choix.

A éventuellement une place aussi sur expectoration induite, ou aspiration trachéale, (voire biopsie tissulaire) mais uniquement dans les cas difficiles (LBA contre-indiqué).

C4

Sur quels prélèvements autres que le LBA peut-on réaliser un test d'amplification génique pour *P. jirovecii*? Ces prélèvements sont-ils les mêmes selon le statut VIH+ ou non VIH du sujet ?

Réponse argumentée :

Cf. C3.

C5

Quelle(s) est/sont la/les meilleure(s) cible(s) pour les tests d'amplification génique pour *P. jirovecii* ?

Réponse argumentée :

- C6** Existe-t-il des conditions de réalisation spécifiques pour cette technique? (transport, conservation, réalisation du test en lui-même...)
Réponse argumentée :
- C7** Que signifie selon votre organisme l'expression « une amplification génique qualitative avec estimation quantitative » (employée dans la demande) ?
Réponse argumentée :
- C8** Selon votre organisme, quelle est la place de la PCR par rapport à l'examen microscopique dans le diagnostic biologique de PPJ ? Veuillez préciser par type de PCR et selon le statut vis-à-vis du VIH du sujet, si opportun.
Réponse argumentée :
 - pas d'indication de PCR si les prélèvements respiratoires (LBA avant tout) sont positifs à au moins une coloration (kystes notamment).
 - En cas de prélèvements respiratoires négatifs, avec tableau clinique évocateur : la PCR a sa place, en particulier quantitative, et/ou associée au BG.
- C9** La PCR peut-elle détecter *P. jirovecii* chez des patients asymptomatiques ? À combien estimez-vous la part des patients colonisés parmi les patients positifs en qPCR? Quel est l'impact de ce résultat sur la prise en charge du patient ?
Réponse argumentée :
 - Oui la PCR peut être positive chez le patient asymptomatique (charge virale basse).
 - Pas de réponse sur % patients colonisés / infectés en cas de PCR+.
 - Si colonisation : pas de traitement curatif, mais maintien d'une prophylaxie.
 - Mais je pense qu'il n'y a pas lieu de faire une recherche de PCP chez un patient asymptomatique ...
- C10** Hormis les cas de patients colonisés par *P. jirovecii*, existe-t-il des faux positifs avec l'amplification génique ? Si oui, veuillez préciser.
Réponse argumentée :
- C11** Votre organisme considère-t-il que la qPCR est une technique standardisée (unités, seuil,...) dont les résultats sont reproductibles quel que soit le lieu de réalisation. Sinon, quelle est l'échéance selon vous pour obtenir une harmonisation ?
Réponse argumentée :

D – Test de mesure du β -(1-3)- D - glucane (BG)

- D1** Le dosage du β -(1-3)- D - glucane (BG) sérique peut-il trouver sa place dans la recherche d'une PPJ (stratégies diagnostiques évoquées au A) ? Laquelle ? Pourquoi ?
Réponse argumentée :
 Oui, associé à la PCR, en cas de doute diagnostique.

La place du test du BG sérique est-elle différente selon le statut VIH du patient ? Votre organisme pense-t-il notamment comme le proposent les auteurs de la méta-analyse examinée dans l'argumentaire (Li et al.) que le BG sanguin utilisé en dépistage permette de limiter chez les PVVIH²³ l'utilisation de la prophylaxie de la pneumocystose ?

D2

Réponse argumentée :

Non, le BG a un intérêt en cas de suspicion de PCP, et de doute diagnostic, ou difficulté diagnostique.

Les indications de prophylaxie (patient VIH) I ou II sont bien codifiées par les cohortes de suivi, le BG n'apporte rien de plus.

Plus globalement, quelles sont les conséquences des résultats d'un test de BG sérique en cas de suspicion de PPJ ? Veuillez préciser en cas de test positif et de test négatif.

D3

Réponse argumentée :

Le BG est non spécifique de PCP. S'intègre dans une démarche diagnostique globale en cas de suspicion de PCP, avec prélèvements respiratoires, et s'associe volontiers à une PCR si possible quantitative.

Quelle(s) est/sont la/les technique(s) validée(s) de dosage du BG en France ? Présente(nt)-elle(s) des problèmes de seuils pour le dosage sérique ?

D4

Réponse argumentée :

Quelle est selon votre organisme la modalité pratique de réalisation du dosage du BG sérique à adopter pour valider un résultat selon la technique ? Un seul prélèvement, deux successifs (confirmation en 48 à 72 heures) ?

D5

Réponse argumentée :

E – Questions portant sur l'argumentaire de la HAS

Auriez-vous connaissance de publications pertinentes non prises en compte ? Veuillez préciser les publications de nature synthétique non prises en compte et répondant aux critères de sélection énoncés page 22 de l'argumentaire provisoire.

E1

Réponse :

Non, pas de publication supplémentaire.

Avez-vous des observations sur la version intermédiaire (contexte et analyse de la littérature) de l'argumentaire de la HAS fourni avec ce questionnaire (lisibilité, omissions, erreur ou approximation, points à ajouter, autre...) ?

E2

Veuillez préciser le cas échéant les éléments à clarifier.

Réponse argumentée :

Souhaitez-vous émettre des commentaires complémentaires ?

E3

Réponse : Non.

²³ PVVIH : personne vivant avec le VIH.

Annexe 9. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse du Conseil national professionnel de biologie des agents infectieux - hygiène hospitalière (CNPBAIHH)

A – Stratégie actuelle de prise en charge d'une suspicion de pneumocystose

Selon votre organisme quelle(s) situation(s) clinique(s) doi(ven)t-elle(s) faire suspecter une pneumopathie à *P. jirovecii* (PPJ) ?

Réponse argumentée :

A1 *Toutes les situations d'immunodépression, incluant infection par le VIH, mais aussi corticothérapie depuis plus d'un mois, immunosuppresseurs, chimiothérapies, cancers solides, hémopathies malignes, greffes d'organes ou de cellules souches, maladies inflammatoires ou auto-immunes chroniques, auxquelles on peut ajouter cirrhose et broncho-pneumopathies chroniques obstructives, nourrissons ou prématurés*

Dans la littérature analysée, la pneumocystose est - soit considérée parmi les infections fongiques invasives (IFI) au même titre que les affections à *Aspergillus* ou à *Candida*, - soit à part. Comment votre organisme la classe-t-elle et pourquoi ?

Réponse argumentée :

A2 *La terminologie est difficile, car c'est essentiellement une infection pulmonaire, donc localisée. Toutefois, la détection de beta-1,3-D-glucane sérique au cours des pneumocystoses pulmonaires montre bien qu'il y a dissémination d'antigènes circulants, et conforte donc la classification dans les IFI.*

Quelle(s) est/sont la/les stratégie(s) diagnostique(s) actuellement mise(s) en œuvre pour détecter une PPJ utilisée(s) en France ? La stratégie est-elle la même selon le statut vis-à-vis du VIH du sujet ?

Réponse argumentée :

A3 *La stratégie diagnostique associe une détection microscopique et une détection par PCR quantitative sur LBA ou expectoration induite. Le diagnostic par PCR est particulièrement indispensable chez les patients immunodéprimés VIH- chez lesquels la sensibilité de l'examen microscopique est souvent insuffisante.*

Ces stratégies sont-elles identiques chez l'adulte et chez l'enfant ?

Réponse argumentée :

A4 *Oui sous réserve de la faisabilité des prélèvements respiratoires bas chez les très jeunes enfants (Houdouin et al., 2014).*

La stratégie diagnostique pour un patient sous traitement prophylactique de PPJ²⁴ est-elle la même ?

Réponse argumentée :

A5 *Même démarche, la PCR étant nécessaire pour compenser la probable diminution des charges fongiques, bien qu'aucune donnée concrète ne soit réellement disponible pour étayer cette hypothèse.*

A6

La recherche d'anticorps sériques spécifiques n'est pas présente dans la demande et la littérature sélectionnée concernant le diagnostic de PPJ. Selon votre organisme cet acte a-t-il une place dans la stratégie diagnostique ?

Réponse argumentée :

Non, la sérologie ne sert que dans des enquêtes épidémiologiques. Aucun test n'est commercialisé

B – L'examen direct par microscopie

B1

Votre organisme considère-t-il encore pertinente la recherche de *P. jirovecii* par microscopie ?

Réponse argumentée :

L'examen microscopique (coloration de MGG ou de Giemsa 10%) est toujours d'actualité, puisqu'il vise à rechercher simultanément d'autres champignons ou protozoaires responsables d'infections opportunistes chez des patients ayant le même profil.

B2

Dans la littérature analysée, le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) est le liquide biologique de choix de recherche de *P. jirovecii* par microscopie. Votre organisme est-il d'accord avec cette position ?

Réponse argumentée :

Le LBA est en effet le prélèvement de choix pour l'examen microscopique, dont les performances sont altérées sur des prélèvements plus épais, tels qu'aspiration bronchique ou expectoration, ne garantissant pas un résultat fiable.

B3

Sur quels types de prélèvements autres que le LBA peut-on réaliser un examen microscopique de recherche de *P. jirovecii* ? Ces prélèvements sont-ils les mêmes selon le statut VIH+ ou non VIH du sujet ?

Réponse argumentée :

Comme spécifié ci-dessus, les autres types de prélèvements ne permettent pas de rendre un résultat fiable s'il est basé uniquement sur la microscopie classique. Toutefois, une immunofluorescence positive sur une expectoration induite chez un patient VIH+ peut permettre d'éviter la réalisation d'un LBA. Chez un patient immunodéprimé VIH-, la sensibilité de l'examen microscopique du LBA est déjà faible ; a fortiori l'examen microscopique d'une expectoration induite présente une sensibilité très faible dans ce groupe de patients.

B4

Existe-t-il des conditions de réalisation particulières pour l'examen direct par colorations, par immunofluorescence directe, indirecte ?

Réponse argumentée :

L'examen direct par colorations ou par immunofluorescence directe ou indirecte sera réalisé après cytocentrifugation du LBA ou de l'expectoration induite, préalablement fluidifiés par Digest-EUR® si trop épais (indispensable pour l'expectoration).

Pour la recherche de *P. jirovecii*, votre organisme pense-t-il que deux techniques différentes de recherche au microscope soient actuellement indispensables ?

Réponse argumentée :

- B5** Parmi les techniques de recherche microscopique, l'immunofluorescence est à privilégier devant sa sensibilité supérieure à celles des diverses colorations comme démontré initialement par Kovacs et al. (Kovacs NEJM 1988). Cependant, une coloration de type MGG ou RAL est complémentaire en permettant une meilleure visualisation des formes trophiques et également une recherche d'autres champignons ou protozoaires responsables d'infections opportunistes.

Si oui, quelle serait selon votre organisme la stratégie de recherche à privilégier ? Deux colorations, une coloration et une IF,...

Réponse argumentée :

- B6** Pour les raisons énoncées ci-dessus, la meilleure stratégie est d'associer une coloration et une IF. Parmi les techniques de coloration, une coloration de type MGG ou sa variante RAL sont à privilégier, car elles sont de réalisation simple et permettent la visualisation d'autres pathogènes. Cependant, une stratégie diagnostique ne reposant que sur la microscopie présente une sensibilité insuffisante notamment chez les patients immunodéprimés VIH-.

Si non, quelle est selon votre organisme la stratégie de recherche à préconiser ?

Réponse argumentée :

- B7** Au vu de la sensibilité insuffisante des techniques microscopiques, en particulier chez les patients VIH- , une technique de PCR doit être associée de façon systématique.

C – L'amplification génique spécifique de *P. jirovecii*

Dans la littérature analysée, les techniques PCR font partie de l'arsenal des techniques de recherche de *P. jirovecii*. Votre organisme est-il d'accord avec cette position ? Si oui, indiquez le(s) type(s) de techniques que vous considérez validées dans cette indication [PCR qualitative, PCR quantitative (qPCR), LAMP,...]

Réponse argumentée :

- C1** Les techniques de PCR quantitative (= en temps-réel) sont validées dans cette indication par de nombreuses publications (Larsen et al., 2002 ; Flori et al., 2004 ; Bandt et al., 2007 ; Huggett et al., 2008 ; Alanio et al., 2011 ; Mühlethaler et al., 2011 ; Fillaux et al., 2013 ; Robert-Gangneux et al., 2014...).
- La PCR qualitative conventionnelle n'a plus sa place, car elle est sujette à des contaminations et ne permet pas l'appréciation des charges fongiques. La technique LAMP reste à évaluer en pratique clinique et devra apporter une réponse quantitative ; aucun test commercial n'est actuellement disponible.

La PCR non quantitative a-t-elle encore sa place dans le diagnostic de la pneumocystose ?*Réponse argumentée :***C2**

Il ne faut pas confondre PCR en temps-réel (qPCR) avec rendu de résultat qualitatif (non quantifié) et PCR qualitative (conventionnelle). Seules les techniques de qPCR doivent être utilisées car elles présentent l'avantage de réduire drastiquement les risques de contamination en évitant l'ouverture des tubes après la réaction de PCR et de permettre une quantification des charges fongiques.

*Actuellement, même si la quantification absolue en nombre de copies/mL est difficilement réalisable (voir plus loin), il est néanmoins nécessaire de rendre un résultat qualitatif (positif ou négatif) associé à un « Ct » d'amplification, afin d'interpréter au mieux le résultat avec la clinique, les Ct très élevés pouvant correspondre à une colonisation par *Pneumocystis*.*

Dans la littérature analysée, le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) est le liquide biologique de choix de recherche de *P. jirovecii* par PCR. Votre organisme est-il d'accord avec cette position ?**C3***Réponse argumentée :*

*Le LBA est en effet le prélèvement de choix pour la recherche de *P. jirovecii* par PCR. Il est généralement admis qu'un résultat négatif sur LBA élimine le diagnostic de PPJ. Cette information est très précieuse au clinicien pour la prise en charge du patient.*

Sur quels prélèvements autres que le LBA peut-on réaliser un test d'amplification génique pour *P. jirovecii*? Ces prélèvements sont-ils les mêmes selon le statut VIH+ ou non VIH du sujet ?**C4***Réponse argumentée :*

La recherche par PCR peut s'effectuer aspiration bronchique, sur expectoration induite à condition que l'expectoration soit bien induite par kinésithérapie (Alanio et al., 2011). La recherche par PCR peut aussi être effectuée sur lavage oro-pharyngé ou aspiration naso-pharyngée lorsque les prélèvements pulmonaires ne sont pas réalisables chez le patient, mais une PCR négative sur prélèvement respiratoire haut ne permet pas d'éliminer le diagnostic (Guigue et al., 2015). Toutefois, certaines études ont montré une sensibilité équivalente voire supérieure de la PCR sur expectoration par rapport au LBA (Azoulay et al. Chest 2009, Teh et al., Med Mycol 2014).

Quelle(s) est/sont la/les meilleure(s) cible(s) pour les tests d'amplification génique pour *P. jirovecii* ?**C5***Réponse argumentée :*

La plupart des PCR ont été développées sur des cibles répétées (gènes de l'ARNr, MSG...) qui présentent l'avantage d'une meilleure sensibilité.

Les cibles MSG et mtLSU rDNA ont fait l'objet de nombreuses évaluations publiées et sont donc à recommander en priorité.

Existe-t-il des conditions de réalisation spécifiques pour cette technique? (transport, conservation, réalisation du test en lui-même...)**C6**

Réponse argumentée : Transport dans la journée ou conservation à +4°C, comme pour les autres parasites/champignons.

Que signifie selon votre organisme l'expression « une amplification génique qualitative avec estimation quantitative » (employée dans la demande) ?

Réponse argumentée :

C7

Cette terminologie vient du fait qu'il n'est pas possible de quantifier en nombre absolu de pathogènes / mL. En effet, les kystes contiennent un nombre variable de noyaux, donc de copies de gènes. De plus, les gènes cibles sont eux-mêmes répétés (la cible mt-LSU est répétée une dizaine de fois). De ce fait, le rendu du résultat est fait en « Ct » le plus souvent, avec des seuils d'interprétation pour guider le clinicien. Le choix des seuils de Ct permettant de distinguer un état de colonisation d'une infection aiguë est effectivement difficile, avec une zone « grise » parfois étendue (Fillaux et al. J Microbial Meth 2008, Robert-Gangneux et al. JCM 2014), et ces seuils de Ct varient selon la technique et l'appareil de qPCR utilisé. Ils doivent donc être établis pour chaque laboratoire, d'après une cohorte clinique suffisante.

Selon votre organisme, quelle est la place de la PCR par rapport à l'examen microscopique dans le diagnostic biologique de PPJ ? Veuillez préciser par type de PCR et selon le statut vis-à-vis du VIH du sujet, si opportun.

C8

Réponse argumentée :

La PCR est indispensable pour faire un diagnostic de PPJ chez le sujet immunodéprimé VIH- pour lequel la sensibilité de l'examen microscopique est insuffisante. Elle est également utile au diagnostic de PPJ chez un patient VIH+ sous prophylaxie intermittente ou mal suivie, car il y a une diminution des charges fongiques.

La PCR peut-elle détecter *P. jirovecii* chez des patients asymptomatiques ? À combien estimez-vous la part des patients colonisés parmi les patients positifs en qPCR? Quel est l'impact de ce résultat sur la prise en charge du patient ?

Réponse argumentée :

C9

Parmi les patients symptomatiques positifs en qPCR et négatifs en microscopie, environ 2/3 sont considérés comme « colonisés » ; cette proportion est difficilement évaluable chez des patients asymptomatiques, chez qui on ne réalise pas systématiquement des PCR sur prélèvements respiratoires...

Quoiqu'il en soit, plusieurs études semblent montrer une pathogénicité de la colonisation par *Pneumocystis* sur les fonctions respiratoires (Morris et al., 2009 ; Shipley et al., 2010 ; Morris & Norris, 2012...). D'autre part, une association entre portage asymptomatique de *Pneumocystis* et développement d'une PPJ a été objectivée chez des patients présentant une polyarthrite rhumatoïde (Mori et al., 2008). Il semble donc que la mise en évidence d'une colonisation par *Pneumocystis* doive être prise en compte pour la prise en charge du patient. Par ailleurs, le fait que des patients colonisés soient capables d'excréter *Pneumocystis* dans l'air environnant incite également à traiter les patients colonisés pour diminuer le réservoir de *Pneumocystis* et éviter des transmissions nosocomiales (Le Gal et al., 2015 ; Fréalle et al., 2017).

Hormis les cas de patients colonisés par *P. jirovecii*, existe-t-il des faux positifs avec l'amplification génique ? Si oui, veuillez préciser.

C10

Réponse argumentée :

Non, dans la mesure où les amorces et sonde ont été dessinées pour être spécifiques et qu'une technique de PCR en temps réel avec UNG et les précautions habituelles est mise en œuvre.

Votre organisme considère-t-il que la qPCR est une technique standardisée (unités, seuil,...) dont les résultats sont reproductibles quel que soit le lieu de réalisation. Sinon, quelle est l'échéance selon vous pour obtenir une harmonisation ?

C11

Réponse argumentée :

*La qPCR *Pneumocystis* n'est pas standardisée ni reproductible quel que soit le lieu de réalisation. Une harmonisation sera longue à obtenir du fait de l'hétérogénéité des techniques et des gammes utilisées, mais aussi de l'hétérogénéité des prélèvements. C'est pourquoi, il est du ressort de chaque laboratoire d'établir ses seuils d'interprétation.*

D – Test de mesure du β -(1-3)- D - glucane (BG)

Le dosage du β -(1-3)- D - glucane (BG) sérique peut-il trouver sa place dans la recherche d'une PPJ (stratégies diagnostiques évoquées au A) ? Laquelle ? Pourquoi ?

D1

Réponse argumentée :

Le dosage de BG sérique peut trouver sa place pour distinguer un état de colonisation d'une infection, lorsque la PCR est positive et l'examen microscopique négatif, en particulier chez les patients VIH-. Un BG positif dans ce contexte permet de décider d'un traitement curatif lorsque le patient présente des signes cliniques compatibles (cf recommandations de l'ECIL 2016).

La place du test du BG sérique est-elle différente selon le statut VIH du patient ? Votre organisme pense-t-il notamment comme le proposent les auteurs de la méta-analyse examinée dans l'argumentaire (Li et al.) que le BG sanguin utilisé en dépistage permette de limiter chez les PVVIH²⁵ l'utilisation de la prophylaxie de la pneumocystose ?

D2

Réponse argumentée :

*Non, c'est le terrain du patient qui permet de décider de la nécessité d'une prophylaxie. Chez une PVVIH avec moins de 200 cellules T CD4+/mm³, le fait d'obtenir un résultat ponctuel négatif sur un test de BG sérique n'empêche pas d'être ultérieurement contaminé par un sujet excréteur *Pneumocystis* : une prophylaxie de la pneumocystose reste donc indispensable chez les patients à risque de développer une PPJ.*

Plus globalement, quelles sont les conséquences des résultats d'un test de BG sérique en cas de suspicion de PPJ ? Veuillez préciser en cas de test positif et de test négatif.

D3

Réponse argumentée :

Un test négatif peut a priori éliminer le diagnostic de PPJ. Encore que sa sensibilité peut légèrement varier en fonction du statut VIH : elle est proche de 100% chez les sujets VIH+ (Sax et al, CID 2011), et 86% dans l'étude de De Boer et al. (J Infect 2011), pour un seuil de positivité retenu de 80 pg/mL.

Par contre, un test positif ne peut à lui seul poser le diagnostic de PPJ, du fait de la non spécificité de la détection de BG (antigène commun à la plupart des champignons), et de la possibilité de résultats faussement positifs (réactions croisées

²⁵ PVVIH : personne vivant avec le VIH

avec des bactéries ou autres molécules). Il n'est interprétable qu'associé à une PCR Pneumocystis positive sur LBA ou autre prélèvement respiratoire. La spécificité dans les études citées plus haut était de 65% et 89% chez les patients VIH+ et VIH-, respectivement.

Quelle(s) est/sont la/les technique(s) validée(s) de dosage du BG en France ? Présente(nt)-elle(s) des problèmes de seuils pour le dosage sérique ?

D4

Réponse argumentée :

Le test Fungitell® (Cape Cod) est validé et utilisé en France par certains centres. Il a fait l'objet de quelques évaluations dans le cadre de la pneumocystose, et il a été montré que le seuil de détection classique devait être relevé à 100 pg/mL pour une meilleure spécificité (Damiani et al, JCM 2011 et 2013)

Quelle est selon votre organisme la modalité pratique de réalisation du dosage du BG sérique à adopter pour valider un résultat selon la technique ? Un seul prélèvement, deux successifs (confirmation en 48 à 72 heures) ?

D5

Réponse argumentée :

A priori un seul dosage sérique suffirait, puisque certains auteurs ont montré que la détection de BG était très précoce (Held et al., CMI 2011).

E – Questions portant sur l'argumentaire de la HAS

Auriez-vous connaissance de publications pertinentes non prises en compte ? Veuillez préciser les publications de nature synthétique non prises en compte et répondant aux critères de sélection énoncés page 22 de l'argumentaire provisoire.

E1

Réponse :

Avez-vous des observations sur la version intermédiaire (contexte et analyse de la littérature) de l'argumentaire de la HAS fourni avec ce questionnaire (lisibilité, omissions, erreur ou approximation, points à ajouter, autre...) ?

E2

Veuillez préciser le cas échéant les éléments à clarifier.

Réponse argumentée :

Présentation des méthodes de PCR un peu confuse (p.16 & 17) sur la description des cibles et méthodes et l'aspect de quantification.

Souhaitez-vous émettre des commentaires complémentaires ?

E3

Réponse :

Annexe 10. Consultation à distance à l'aide d'un questionnaire : réponse du Centre national de référence des mycoses invasives et antifongiques

A – Stratégie actuelle de prise en charge d'une suspicion de pneumocystose

Selon votre organisme quelle(s) situation(s) clinique(s) doi(ven)t-elle(s) faire suspecter une pneumopathie à *P. jirovecii* (PPJ) ?

A1

Réponse argumentée :

Pneumopathie fébrile chez l'immunodéprimé, historiquement le patient VIH, mais actuellement également dans d'autres populations d'immunodéprimés (hématologie, transplantation d'organe) (Cordonnier et al J Antimicrob Chemother 2016; 71: 2379–2385 doi:10.1093/jac/dkw155 Advance Access publication 12 May 2016). Les enfants sont également susceptibles de développer une pneumocystose mais celle-ci sera spontanément résolutive en l'absence de déficit immunitaire.

Dans la littérature analysée, la pneumocystose est - soit considérée parmi les infections fongiques invasives (IFI) au même titre que les affections à *Aspergillus* ou à *Candida*, - soit à part. Comment votre organisme la classe-t-elle et pourquoi ?

A2

Réponse argumentée :

La pneumocystose doit être classée à part car elle ne survient pas sur les mêmes terrains que l'aspergillose ou la candidose, le diagnostic ne peut se faire par culture, le traitement est basé sur le co-trimoxazole et non sur les antifongiques.

Quelle(s) est/sont la/les stratégie(s) diagnostique(s) actuellement mise(s) en œuvre pour détecter une PPJ utilisée(s) en France ? La stratégie est-elle la même selon le statut vis-à-vis du VIH du sujet ?

A3

Réponse argumentée :

Le diagnostic biologique repose sur la détection du pneumocystis dans les prélèvements respiratoires soit par microscopie après coloration tinctoriale ou par immunofluorescence, soit par PCR. Historiquement, l'association d'une coloration spécifique des « kystes » (maintenant ascospores) et une spécifiques des trophozoïtes (maintenant formes trophiques) était recommandée. L'immunofluorescence est plus sensible et doit remplacer ces colorations. La tendance actuelle est vers l'utilisation de tests PCR en raison de leur plus grande sensibilité et de leur meilleure reproductibilité en évitant la subjectivité des lectures au microscope. La quantification est un élément majeur de la PCR à utiliser (Alanio et al J Antimicrob Chemother doi:10.1093/jac/dkw156 ; https://www.ebmt.org/Contents/Resources/Library/ECIL/Documents/2014_ECIL5/ECIL_5_PjP_guidelines_-_Part_A_Biology.pdf).

Il n'y a pas de différence stratégique technique dans la démarche diagnostiques selon le statut HIV ou non du patient. Par contre, le patient HIV ayant en général des charges fongiques élevées, des prélèvements moins agressifs que le LBA peuvent être proposés en première intention (voir plus loin réponse B3).

Ces stratégies sont-elles identiques chez l'adulte et chez l'enfant ?

A4

Réponse argumentée :

Oui. Les différences se situent au niveau des prélèvements respiratoires sachant que le LBA, le prélèvement à privilégier chez l'adulte, est rarement pratiqué chez l'enfant.

La stratégie diagnostique pour un patient sous traitement prophylactique de PPJ²⁶ est-elle la même ?

Réponse argumentée :

A5

Oui sachant qu'en l'absence de problème d'observance ou d'absorption, il n'est pratiquement jamais rapporté de pneumocystose sous prophylaxie par le co-trimoxazole (ce qui n'est pas le cas de l'atovaquone en raison de problèmes pharmacocinétiques : Robin et al *J Antimicrob Chemother.* 2017 Jun 22. doi: 10.1093/jac/dkx198. [Epub ahead of print]).

La recherche d'anticorps sériques spécifiques n'est pas présente dans la demande et la littérature sélectionnée concernant le diagnostic de PPJ. Selon votre organisme cet acte a-t-il une place dans la stratégie diagnostique ?

A6

Réponse argumentée :

Aucune, son seul intérêt est épidémiologique.

B – L'examen direct par microscopie

Votre organisme considère-t-il encore pertinente la recherche de *P. jirovecii* par microscopie ?

Réponse argumentée :

B1

Quand elle est positive, cette recherche par microscopie permet d'affirmer le diagnostic et reste pratiquée par de nombreux laboratoires. Cependant sa sensibilité est faible et la quantification de la charge fongique seulement semi-quantitative au mieux. Elle nécessite de plus une expertise microbiologique avec la nécessité d'une accréditation spécifique et est consommatrice en temps technique. Elle est appelée à être remplacée par la PCR quantitative plus simple d'exécution et plus facile à accréditer (Alanio et al *J Antimicrob Chemother* doi:10.1093/jac/dkw156).

Dans la littérature analysée, le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) est le liquide biologique de choix de recherche de *P. jirovecii* par microscopie. Votre organisme est-il d'accord avec cette position ?

B2

Réponse argumentée :

Oui, en particulier chez les patients pour lesquels les charges attendues sont faibles, c.a.d., tous les patients autres que les patients VIH positifs.

Sur quels types de prélèvements autres que le LBA peut-on réaliser un examen microscopique de recherche de *P. jirovecii* ? Ces prélèvements sont-ils les mêmes selon le statut VIH+ ou non VIH du sujet ?

Réponse argumentée :

B3

Le prélèvement à privilégier en raison de sa sensibilité est le lavage bronchiolo-alvéolaire (LBA), mais en son absence des expectorations ou d'autres prélèvements respiratoires (aspirations naso-pharyngées, rinçage de bouche) peuvent être utilisés (Guigue et al, Utility of adding *Pneumocystis jirovecii* DNA detection in nasopharyngeal aspirates in immunocompromised adult patients with febrile pneumonia *Medical Mycology*, 2015, 53, 241–247 ; doi: 10.1093/mmy/myu087).

Plus les prélèvements sont distants par rapport à l'alvéole pulmonaire, le lieu de croissance de *Pneumocystis*, plus la charge attendue sera faible pour un patient donné.

Ainsi, chez le patient VIH dont les charges sont importantes lors de l'expression clinique de la pneumocystose, les expectorations sont souvent positives et donc proposées pour éviter le LBA qui reste une procédure à risque de complications. A l'inverse, chez un patient non VIH, la charge attendue est plus faible et la non détection de *Pneumocystis* (en particulier par microscopie) dans les prélèvements respiratoires autres que la LBA n'exclut pas le diagnostic. Chez ces patients VIH négatifs, le LBA est à privilégier en dehors de contre-indications (Alanio et al J Antimicrob Chemother doi:10.1093/jac/dkw156 ; https://www.ebmt.org/Contents/Resources/Library/ECIL/Documents/2014_ECIL5/ECIL_5_PjP_guidelines_-_Part_A_Biology.pdf).

Ces différences de charges attendues en fonction du statut du patient et du type de prélèvement respiratoire souligne la nécessité de la quantification du champignon dans le prélèvement pour une interprétation correcte.

Existe-t-il des conditions de réalisation particulières pour l'examen direct par colorations, par immunofluorescence directe, indirecte ?

B4 Réponse argumentée :

Non à partir du moment où les protocoles validés sont observés comme pour toute méthode microbiologique.

Pour la recherche de *P. jirovecii*, votre organisme pense-t-il que deux techniques différentes de recherche au microscope soient actuellement indispensables ?

B5 Réponse argumentée :

Voir commentaire réponse B6. Si la microscopie est la seule méthode utilisée, deux techniques différentes sont recommandées.

Si oui, quelle serait selon votre organisme la stratégie de recherche à privilégier ? Deux colorations, une coloration et une IF,...

Réponse argumentée :

B6 Si la microscopie avec colorations est réalisée, une coloration pour visualiser les formes trophiques et une pour les ascospores est souhaitable. Nous avons publié nos recommandations pour ce qui concerne les colorations et analyse par microscopie (Alanio et al J Antimicrob Chemother 2016; 71: 2386–2396 doi:10.1093/jac/dkw156) : « Since a 1:10 ratio exists between asci and trophic forms, we recommend the use of a combination of two stains, one to detect 'cysts' (anti-cyst IF assay is the most sensitive, compared with conventional staining using TBO, CW or GMS) and another to detect 'trophozoites' (GS) (A-III) ».

Si non, quelle est selon votre organisme la stratégie de recherche à préconiser ?

B7 Réponse argumentée :

La PCR quantitative est amenée à remplacer les colorations.

C – L'amplification génique spécifique de *P. jirovecii*

Dans la littérature analysée, les techniques PCR font partie de l'arsenal des techniques de recherche de *P. jirovecii*. Votre organisme est-il d'accord avec cette position ? Si oui, indiquez le(s) type(s) de techniques que vous considérez validées dans cette indication [PCR qualitative, PCR quantitative (qPCR), LAMP,...]

Réponse argumentée :

C1

Deux types d'arguments sont à retenir pour la PCR quantitative. Les premiers sont d'ordres techniques avec des avantages indéniables sur la prévention des faux positifs en raison du format clos (détection du produit de PCR sans ouvrir les tubes réactionnels), et des faux négatifs avec l'évaluation du rendement de l'amplification par un contrôle interne. Toutes les méthodes qui nécessitent l'ouverture des tubes avec plus ou moins migration des produits de PCR en gel sont à éviter (nested PCR, LAMP, PCR qualitative).

Le deuxième aspect majeur est la possibilité de quantifier la charge fongique, élément indispensable pour l'interprétation (voir plus haut commentaires sur les charges en fonction du statut VIH ou non). Cette quantification est au mieux réalisée avec une sonde spécifique (les agents intercalants pour révéler les produits amplifiés sont à éviter pour le diagnostic). Cette quantification ne peut être réalisée avec les autres méthodes (nested PCR, LAMP, PCR qualitative).

La PCR non quantitative a-t-elle encore sa place dans le diagnostic de la pneumocystose ?

C2

Réponse argumentée :

Non (voir réponse C1).

Dans la littérature analysée, le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) est le liquide biologique de choix de recherche de *P. jirovecii* par PCR. Votre organisme est-il d'accord avec cette position ?

C3

Réponse argumentée :

Oui. Voir réponse B3 et Alanio et al J Antimicrob Chemother doi:10.1093/jac/dkw156 ; et https://www.ebmt.org/Contents/Resources/Library/ECIL/Documents/2014_ECIL5/ECIL_5_PjP_guidelines_-_Part_A_Biology.pdf.

Sur quels prélèvements autres que le LBA peut-on réaliser un test d'amplification génique pour *P. jirovecii*? Ces prélèvements sont-ils les mêmes selon le statut VIH+ ou non VIH du sujet ?

C4

Réponse argumentée :

Voir réponse B3.

Quelle(s) est/sont la/les meilleure(s) cible(s) pour les tests d'amplification génique pour *P. jirovecii* ?

C5

Réponse argumentée :

Comme pour tout test PCR quantitatif pour un diagnostic biologique, les cibles qui permettent une meilleure sensibilité sont à privilégier. Il s'agit donc en général de gènes répétés.

L'ambiguïté pour le diagnostic de la pneumocystose est que certains auteurs préconisent des PCR moins sensibles (ciblant en particulier des gènes uniques ou peu répétés) pour s'affranchir des faibles charges qui posent des problèmes d'interprétation entre « pneumocystose » et « colonisation » (A. Alanio, S. Bretagne, *Pneumocystis jirovecii* detection in asymptomatic patients: what does its natural history tell us? doi:

10.12688/f1000research.10619.1). Nous pensons que cette stratégie est inappropriée car les patients avec charges faibles peuvent participer à la dissémination du champignon et/ou justifier d'une prophylaxie (voir Robin et al, Front. Microbiol., 24 April 2017, Molecular Demonstration of a Pneumocystis Outbreak in Stem Cell Transplant Patients: Evidence for Transmission in the Daycare Center; <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00700>). Nous argumentons depuis plusieurs années sur des seuils à définir (et donc une quantification) pour une interprétation correcte et une prise de décision thérapeutique documentée (Alanio, A., et al. (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. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03400.x ; Botterel, F., Cabaret, O., Foulet, F., Cordonnier, C., Costa, J. M., and Bretagne, S. (2012). Clinical significance of quantifying Pneumocystis jirovecii DNA by using real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients. J. Clin. Microbiol. 50, 227–231. doi: 10.1128/JCM.06036-11).

C6

Existe-t-il des conditions de réalisation spécifiques pour cette technique? (transport, conservation, réalisation du test en lui-même...)

Réponse argumentée :

Pas plus que pour les autres PCR diagnostiques.

C7

Que signifie selon votre organisme l'expression « une amplification génique qualitative avec estimation quantitative » (employée dans la demande) ?

Réponse argumentée :

Cette formulation n'a pas de sens analytique pour un test PCR. La PCR est soit qualitative avec une réponse oui/non, soit quantitative avec une réponse chiffrée.

C8

Selon votre organisme, quelle est la place de la PCR par rapport à l'examen microscopique dans le diagnostic biologique de PPJ ? Veuillez préciser par type de PCR et selon le statut vis-à-vis du VIH du sujet, si opportun.

Réponse argumentée :

Comme argumenté plus haut, le seul format de PCR doit être un format PCR quantitative, que le patient soit VIH ou non, et cet examen est amené à remplacer les colorations avec analyse au microscope. Il est probable que les laboratoires universitaires continueront pendant un certain temps à réaliser PCR et coloration, ou coloration puis PCR si coloration négative, mais certains centres européens ont déjà opté pour la PCR quantitative comme unique examen.

C9

La PCR peut-elle détecter *P. jirovecii* chez des patients asymptomatiques ? À combien estimez-vous la part des patients colonisés parmi les patients positifs en qPCR? Quel est l'impact de ce résultat sur la prise en charge du patient ?

Réponse argumentée :

La question n'a pas de réponse car on ne pratique pas de LBA à des personnes asymptomatiques. Tout au plus peut-on donner le pourcentage de LBA négatif en PCR quantitative chez des patients ayant eu une indication de LBA. Ce % chez l'adulte est d'environ 75-80% (doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03400.x ; doi: 10.1128/JCM.06036-11).

Voir réponse C5 pour l'interprétation « colonisés » et « pneumocystoses » et notre publication A. Alanio, S. Bretagne, Pneumocystis jirovecii detection in asymptomatic patients: what does its natural history tell us? doi: 10.12688/f1000research.10619.1. Si la détection de forte charges et/ou une forte symptomatologie clinique ne posent pas de problème sur l'initiation d'un traitement, les patients dits « colonisés » (faibles charges et/ou symptomatologie pulmonaires réduites) ne signifie pas qu'aucune décision thérapeutique ne doit être prise. En particulier, une PCR positive peut argumenter la mise en route d'une prophylaxie pour éviter une pneumocystose et des mesures pour prévenir des transmissions nosocomiales.

C10 Hormis les cas de patients colonisés par *P. jirovecii*, existe-t-il des faux positifs avec l'amplification génique ? Si oui, veuillez préciser.*Réponse argumentée :*

La question doit faire le distinguo entre « faux positifs analytiques » et les faux positifs « d'interprétation ».

Sur le plan analytique, la PCR quantitative met en principe à l'abri de tout faux positifs (voir réponse C1). Ceci est de la responsabilité du laboratoire qui doit bien entendu les éviter. Il ne devrait donc pas y avoir de faux positifs quel que soit le contexte de la demande, infection ou colonisation.

Cet aspect est à différencier complètement de l'interprétation du clinicien qui devant un résultat PCR positif décide de ne pas traiter et donc qualifie le résultat de faux positif. Le laboratoire ne peut être tenu responsable de cette interprétation.

La décision clinique est parfois encore plus ambiguë avec la classification comme faux positif d'un résultat car n'entraînant pas de prescription de co-trimoxazole pleine dose, alors que le résultat est néanmoins pris en compte avec la reprise d'une prophylaxie.

C11 Votre organisme considère-t-il que la qPCR est une technique standardisée (unités, seuil,...) dont les résultats sont reproductibles quel que soit le lieu de réalisation. Sinon, quelle est l'échéance selon vous pour obtenir une harmonisation ?*Réponse argumentée :*

La PCR quantitative est déjà en soi une harmonisation considérable des tests en supprimant le risque de faux positifs. Cependant, elle n'est pas l'apanage d'un seul fabricant de réactifs et il n'y a pas de perspectives d'un seul test appliqué par tous dans un avenir même lointain. L'uniformisation n'est d'ailleurs pour nous pas souhaitable car il faut laisser de la place pour l'innovation dans ce domaine. Des études montrent que certaines PCR quantitatives sont plus sensibles que d'autres.

La solution, comme pour beaucoup de tests avec de nombreux développeurs, est la participation à des contrôles de qualité externes. Cette exigence est maintenant la norme dans les laboratoires. Si ces contrôles ne sont pas satisfaisants, il est de la responsabilité du laboratoire de s'améliorer en testant d'autres kits.

D – Test de mesure du β -(1-3)- D - glucane (BG)**D1** Le dosage du β -(1-3)- D - glucane (BG) sérique peut-il trouver sa place dans la recherche d'une PPJ (stratégies diagnostiques évoquées au A) ? Laquelle ? Pourquoi ?*Réponse argumentée :*

La place du BG a été précisée dans nos recommandations de l'ECIL-5 (Alanio et al J Antimicrob Chemother doi:10.1093/jac/dkw156 ;

https://www.ebmt.org/Contents/Resources/Library/ECIL/Documents/2014_ECIL5/ECIL_5_PjP_guidelines_-_Part_A_Biology.pdf). Le BG peut intervenir si le LBA n'est pas réalisable et sa négativité est un argument fort pour l'absence de pneumocystose avérée. En cas de positivité, des investigations microbiologiques sont indispensables en raison du nombre de faux positifs et de la non-spécificité du test vis à vis des infections fongiques en général.

Il n'a cependant pas été proposé de supprimer les examens microbiologiques quand le BG est négatif car il existe la possibilité de charges faibles qui peuvent (i) être prédictives d'une pneumocystose (voir par exemple Mori S, Cho I, Sugimoto M: A followup study of asymptomatic carriers of *Pneumocystis jirovecii* during immunosuppressive therapy for rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2009; 36(8): 1600–5. DOI:

<https://doi.org/10.3899/jrheum.081270>) et (ii) participer à la propagation du champignon dans un service (Robin et al, Front. Microbiol., 24 April 2017, Molecular Demonstration of a Pneumocystis Outbreak in Stem Cell Transplant Patients: Evidence for Transmission in the Daycare Center; <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00700>).

La place du test du BG sérique est-elle différente selon le statut VIH du patient ? Votre organisme pense-t-il notamment comme le proposent les auteurs de la méta-analyse examinée dans l'argumentaire (Li et al.) que le BG sanguin utilisé en dépistage permette de limiter chez les PVVIH²⁷ l'utilisation de la prophylaxie de la pneumocystose ?

Réponse argumentée :

D2

Il n'y a pas d'argument pour penser que la place du BG soit différente entre VIH positifs et négatifs. Il est cependant attendu que le BG soit plus souvent positif à des taux élevés chez les patients VIH en raison de la charge fongique plus importante. Plus la charge fongique au niveau alvéolaire est importante, plus le taux de BG attendu est élevé (voir par exemple Costa et al, Association Between Circulating DNA, Serum (1→3)-β-D-Glucan, and Pulmonary Fungal Burden in Pneumocystis Pneumonia, Clinical Infectious Diseases 2012;55(2):e5–8 2012. DOI: 10.1093/cid/cis412

Si devant une suspicion clinique, le BG est négatif, il nous semble licite de sursoir à un traitement co-trimoxazole pleine dose en l'absence d'autres investigations microbiologiques (voir réponse D1).

La suspension proposée par la métaanalyse de supprimer la prophylaxie sur la négativité du BG à un moment donné semble particulièrement risquée si le patient a par ailleurs un taux de CD4<200, seuil consensuel pour l'instauration d'une prophylaxie chez le patient VIH. En l'absence d'une connaissance précise de la cinétique de la multiplication du champignon dans les alvéoles, se baser sur le BG sérique pose la question de la fréquence du prélèvement sanguin. Cette surveillance devrait être au moins mensuelle pour anticiper la survenue d'une pneumocystose. Le bénéfice d'une telle attitude est à évaluer en anticipant sur le surcoût en raison des consultations nécessaires et du coût du test. Cette hypothèse nous semble donc à exclure.

Plus globalement, quelles sont les conséquences des résultats d'un test de BG sérique en cas de suspicion de PPJ ? Veuillez préciser en cas de test positif et de test négatif.

Réponse argumentée :

D3

L'interprétation d'un résultat de BG est basée sur ses valeurs prédictives positives et négatives (Alanio et al J Antimicrob Chemother doi:10.1093/jac/dkw156). Un BG positif est très suggestif d'une pneumocystose en cours, sachant que le test n'est pas spécifique. Chez les patients immunodéprimés, en particulier les patients d'hématologie, il existe de nombreuses autres infections fongiques qui peuvent s'accompagner d'un BG positif. Il existe également une littérature nombreuses sur les faux positifs du test, particulièrement fréquent (sepsis, bactériens, antibiotiques, compresses ... tous des éléments particulièrement fréquents chez les patients à risque d'infections fongiques). Si la preuve microbiologique ne peut être faite, il semble cependant licite d'intégrer le BG positif comme un argument pour une pneumocystose plutôt que de s'abstenir. Quand le BG est négatif, voir réponse D1.

²⁷ PVVIH : personne vivant avec le VIH.

Quelle(s) est/sont la/les technique(s) validée(s) de dosage du BG en France ? Présente(nt)-elle(s) des problèmes de seuils pour le dosage sérique ?

Réponse argumentée :

D4

Il n'existe à notre connaissance qu'un seul test actuellement commercialisé en France pour le dosage du BG (Cape Cod). Ce dosage est très exigeant techniquement et cher car pour chaque demande des gammes complètes doivent être réalisées. La reproductibilité du test est par ailleurs à préciser en particulier pour les taux aux alentours des valeurs seuil. Ce test a un statut actuel de RIHN et des évaluations sont donc en cours.

Quelle est selon votre organisme la modalité pratique de réalisation du dosage du BG sérique à adopter pour valider un résultat selon la technique ? Un seul prélèvement, deux successifs (confirmation en 48 à 72 heures) ?

Réponse argumentée :

D5

Il n'a pas été montré d'intérêt majeur du BG pour le suivi thérapeutique, sachant de plus que le test n'est pas spécifique et qu'un patient immunodéprimé peut avoir plusieurs infections fongiques. Pour la réalisation pratique, le fabricant ne recommande pas de tester plusieurs fois le même échantillon ni de confirmer sur un nouveau prélèvement.

E – Questions portant sur l'argumentaire de la HAS

Auriez-vous connaissance de publications pertinentes non prises en compte ? Veuillez préciser les publications de nature synthétique non prises en compte et répondant aux critères de sélection énoncés page 22 de l'argumentaire provisoire.

E1

Réponse :

Publications notées dans les réponses.

Avez-vous des observations sur la version intermédiaire (contexte et analyse de la littérature) de l'argumentaire de la HAS fourni avec ce questionnaire (lisibilité, omissions, erreur ou approximation, points à ajouter, autre...) ?

Veuillez préciser le cas échéant les éléments à clarifier.

Réponse argumentée : Le document est conséquent avec beaucoup d'informations dont certaines reprennent des revues sans analyser les articles princeps et pourraient être soit reformulées, soit supprimées car non directement pertinentes pour la question posée.

E2

page 11 : « Des localisations isolées extra-pulmonaires ont été décrites (5), notamment chez l'enfant (29) : rétinites, thyroïdites, lésions osseuses ainsi que des pneumocystoses cérébrales, hépatiques ou rénales au stade Sida ou après utilisation prophylactique d'aérosol de pentamidine (15) ».

Les références sur cette phrase sont des généralités. Connaissant la biologie du pneumocystis qui vit sur les pneumocytes, les publications princeps pourraient être reprises avec un regard critique. Cependant, cela n'est pas l'objet de la demande et pourrait être retiré du document.

page 13 : « Le champignon disparaîtrait de l'organisme dans un délai moyen de quatre semaines après un traitement adéquat (5) ».

Comme la discussion persiste entre réactivation et inhalation de novo, cette phrase est ambiguë et pourrait être remplacée par « non détectable » ou supprimer car c'est en fait l'évolution favorable sous traitement qui importe, que le champignon disparaisse ou non.

page 14 : « L'intérêt de tels prélèvements est qu'il s'agit d'actes non invasifs, faciles à réaliser, mais ils sont associés à un risque de contamination par la flore oropharyngée, de plus de 50 %, même si un protocole rigoureux est respecté ».

Ceci est pertinent pour des recherches bactériologiques classiques mais peu relevant pour le pneumocystis qui ne cultive pas.

page 15 : « (LBA) L'examen qui a une sensibilité de 55 à 97% est une procédure de choix pour la plupart des nouveau-nés et enfants mais il nécessite alors une sédation (28) ».

Cette phrase sous-entend que le diagnostic de PCP peut se faire par d'autres moyens dans 3 à 45% des cas, moyens qui devraient être précisés.

page 15 : « Le temps écoulé entre le prélèvement et la préparation des examens d'identification doit être idéalement inférieur à une à deux heures. Une cytocentrifugation permet ensuite de recueillir le culot cellulaire issu du LBA (5) ».

Il n'existe pas à notre connaissance d'étude argumentant pour une durée particulière pour des raisons techniques. Le meilleur argument est la prise en charge du patient qui doit être la plus rapide possible. De plus ces contraintes techniques éventuelles ne s'appliquent pas à la PCR pour laquelle les prélèvements peuvent facilement être conservés.

page 15 : La ponction à thorax ouvert ne se pratique plus en France dans cette indication et ne devrait donc pas figurer ou alors simplement pour décrire des pratiques encore (rarement) réalisées dans d'autres pays.

pages 16-17 : Les commentaires sur les tests PCR laissent entendre qu'il y aurait des spécificités techniques propres à Pneumocystis, ce qui n'est pas le cas, et comportent plusieurs inexactitudes. Comme l'objet de la présente demande n'est pas sur la PCR quantitative elle-même, nous proposons de renvoyer les lecteurs sur les recommandations déjà anciennes de bonnes pratiques de la PCR quantitative (Bustin S et al, Clin Chem 2009, The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments ; DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797)

« Ces gènes sont détectés par une méthode de PCR quantitative dite en temps réel qui utilise un marqueur fluorescent dont la production est mesurée tout au long des cycles d'amplification et la connaissance de la quantité de matériel cible introduit permet une évaluation quantitative (21, 41) ».

Ce qui est recherché est ce qui est présent dans l'échantillon clinique, non ce qui est introduit. Par contre, il est fortement recommandé d'introduire un contrôle interne dans la réaction pour évaluer le rendement de l'amplification.

« Les PCR en temps réel ciblent un locus comme le gène codant le complexe MSG ou le gène de la DHPS ».

Toutes les ciblent peuvent faire l'objet d'un test PCR quantitative.

« Les limites actuelles sont principalement :

□ le rôle probable de la qualité du prélèvement dans les résultats obtenus avec la qPCR. Ainsi, il est souligné que l'échantillon pulmonaire initial servant pour les qPCR n'a pas fait l'objet de standardisation (nombre de cellules, volume...) (14, 42) ».

La qualité des prélèvements respiratoires est très aléatoire et fait donc partie des limites inhérentes à ces prélèvements et pas spécifiquement pour la pneumocystose. La qualification du prélèvement en virologie avec le calcul du nombre de cellules estimé par amplification d'un gène humain, en général l'albumine, est déjà utilisée et pourrait sans problème être étendue à la recherche de pneumocystis (Guigue et al, Utility of adding Pneumocystis jirovecii DNA detection in nasopharyngeal aspirates in immunocompromised adult patients with febrile pneumonia Medical Mycology, 2015, 53, 241–247 ; doi: 10.1093/mmy/myu087). La pertinence d'une telle démarche pour le pneumocystis se

discute cependant sachant que, à l'inverse des virus, pneumocystis vit sur et non dans les cellules et qu'il n'y pas de lien démontré entre nombre de pneumocystis et nombre de cellules à l'inverse des virus

« □ les résultats d'une qPCR doivent être discutés à la lumière des données clinico-radiologiques et de la pathologie sous-jacente, le statut vis-à-vis du VIH étant déterminant d'emblée pour l'établissement des seuils selon certains auteurs (48) ». Ce n'est pas à nos yeux une limite du test mais une constante pour tout examen microbiologique pratiqué pour la recherche d'infection opportuniste chez les patients immunodéprimés.

« □ la comparabilité entre des seuils de techniques « maison » et de kits différents utilisant des gènes cibles unique ou multi-copie est discutable (42) ».

Comme dit dans la réponse C11, la comparaison n'est pas « discutable » mais peut être appréhendée par des contrôles de qualité et corrigée.

Souhaitez-vous émettre des commentaires complémentaires ?

Réponse :

E3

En conclusion, la PCR quantitative va progressivement remplacer les colorations et le rendu quantitatif sera à discuter en fonction du dossier clinique. Pour le glucane, son intérêt spécifique pour le diagnostic de la pneumocystose est encore à préciser dans une stratégie diagnostique.

Références

1. Haute Autorité de Santé. Modification de la Nomenclature des actes de biologie médicale pour les actes de diagnostic biologique de la pneumocystose (*Pneumocystis jirovecii*). Feuille de route. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2016.
http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2016-10/feuille_de_route_pneumocystose.pdf
2. Association française des enseignants de parasitologie et mycologie. Pneumocystose : ANOFEL; 2014.
3. Sokulska M, Kicia M, Wesolowska M, Hendrich AB. *Pneumocystis jirovecii*—from a commensal to pathogen: clinical and diagnostic review. *Parasitol Res* 2015;114(10):3577-85.
4. European Conference on Infections in Leukemia, European Group for Blood and Marrow Transplantation, European Organization for Research and Treatment of Cancer, Immunocompromised Host Society, European LeukemiaNet, Alanio A, *et al.* ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 2016;1-11.
5. Damiani C, Le Gal S, Nevez G, Totet A. Infections à *Pneumocystis jirovecii* : biologie et clinique [8-590-A-10]. *Encycl Med Chir Maladie infectieuse* 2013;10(3).
6. Brauner M, Piver D, Ben Romdhane H, Brillet PY. Infections pulmonaires aiguës et subaiguës du sujet immunodéprimé [32-387-A-20]. *Encycl Med Chir Radiologie et imagerie médicale - cardiovasculaire - thoracique - cervicale* 2014;9(4).
7. Louis M, Guitard J, Jodar M, Ancelle T, Magne D, Lascols O, *et al.* Impact of HIV infection status on interpretation of quantitative PCR for detection of *Pneumocystis jirovecii*. *J Clin Microbiol* 2015;53(12):3870-5.
8. Dorfmueller P, Ghigna MR. Lavage bronchioalvéolaire [6-000-M-50]. *Encycl Med Chir Pneumologie* 2011.
9. Cordonnier C, Cesaro S, Maschmeyer G, Einsele H, Donnelly JP, Alanio A, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: still a concern in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 2016;71(9):2379-85.
10. Derouin F. Colonisation par *Pneumocystis*. *Anses Bulletin de veille scientifique* 2010;(13):50-2.
11. Association française des enseignants et praticiens hospitaliers de parasitologie et mycologie médicales. Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. Issy-les-Moulineaux: Elsevier-Masson; 2016.
12. Thomas CF, Jr., Limper AH. *Pneumocystis pneumonia*. *N Engl J Med* 2004;350(24):2487-98.
13. Goto N, Futamura K, Okada M, Yamamoto T, Tsujita M, Hiramitsu T, *et al.* Management of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in kidney transplantation to prevent further outbreak. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med* 2015;9(Suppl 1):81-90.
14. Le Gal S, Damiani C, Totet A, Nevez G. *Pneumocystis jirovecii* : diagnostic biologique des infections à *Pneumocystis jirovecii* [90-35-0098-A]. *Encycl Med Chir Biologie médicale* 2012;7(3).
15. Carmona EM, Limper AH. Update on the diagnosis and treatment of *Pneumocystis pneumonia*. *Ther Adv Respir Dis* 2011;5(1):41-59.
16. Alanio A, Bretagne S. *Pneumocystis jirovecii* detection in asymptomatic patients: what does its natural history tell us? *F1000Res* 2017;6:739.
17. Alanio A, Gits-Muselli M, Guigue N, Desnos-Ollivier M, Calderon EJ, Di Cave D, *et al.* Diversity of *Pneumocystis jirovecii* across Europe: a multicentre observational study. *EBioMedicine* 2017.
18. Centre national de référence mycoses invasives et antifongiques. Rapport annuel d'activité. Année d'exercice 2014. Paris: CNRMA; 2015.
https://www.pasteur.fr/sites/www.pasteur.fr/files/dromer_f_rap_act_2014_cnrma.pdf
19. Roux A, Gonzalez F, Roux M, Mehrad M, Menotti J, Zahar JR, *et al.* L'infection pulmonaire à *Pneumocystis jirovecii* chez les patients VIH négatifs : mise au point. *Med Mal Infect* 2014;44(5):185-98.
20. Gangneux JP, Bougnoux ME, Hennequin C, Godet C, Chandenier J, Denning DW, *et al.* An estimation of burden of serious fungal infections in France. *J Mycol Med* 2016;26(4):385-90.
21. Institut de veille sanitaire, Cazein F, Pillonel J, Le Strat Y, Pinget R, Le Vu S, *et al.* Découvertes de séropositivité VIH et de sida, France, 2003-2013. *Bull Epidemiol Hebdo* 2015;9-10:152-61.
22. Fillâtre P, Revest M, Belaz S, Robert-Gangneux F, Zahar JR, Roblot F, *et al.* Pneumocystose chez les patients immunodéprimés non infectés par le VIH. *Rev Med Interne* 2016;37(5):327-36.
23. Iriart X, Le Bouar M, Kamar N, Berry A. *Pneumocystis pneumonia* in solid-organ transplant recipients. *J Fungi* 2015;1:293-331.
24. Aubry P, Gaüzère BA. Mycoses profondes. Actualités 2015 [En ligne] 2015.
http://medecinetropicale.free.fr/cours/mycose_profonde.pdf
25. Roux A, Lemiale V, Kouatchet A, Vincent F, Bollée G, Roux P, *et al.* Pneumocystose pulmonaire en dehors de l'infection à VIH. *Réanimation* 2010;19:327-38.
26. Jarbouli MA, Mseddi F, Sellami H, Sellami A, Makni F, Ayadi A. *Pneumocystis* : épidémiologie et approches moléculaires. *Pathol Biol* 2013;61(6):239-44.
27. 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* 2011;17(10):1531-7.

28. Robin C, Alanio A, Gits-Muselli M, la Martire G, Schlemmer F, Botterel F, *et al.* Molecular demonstration of a *Pneumocystis* outbreak in stem cell transplant patients: evidence for transmission in the daycare center. *Front Microbiol* 2017;8:700.
29. Tasaka S. *Pneumocystis pneumonia* in human immunodeficiency virus-infected adults and adolescents: current concepts and future directions. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med* 2015;9(Suppl 1):19-28.
30. Société française de microbiologie. Référentiel en microbiologie médicale 5.1. Paris: SFM; 2015.
31. National Institutes of Health, Centers for Disease Control and Prevention, HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America, Pediatric Infectious Diseases Society, American Academy of Pediatrics, AIDS Action Committee. Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections among HIV-exposed and HIV-infected children. *Roxbury: AAC*; 2013.
32. Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health, HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents ; 2016.
https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/Adult_OI.pdf
33. Khellaf M, Godeau B. *Pneumocystose au cours des maladies systémiques*. *Presse Med* 2009;38:251-9.
34. Rouyer M, Stoclin A, Blanc FX. La pneumocystose chez le patient adulte non infecté par le VIH. *Rev Mal Respir* 2015;32(10):985-90.
35. Toper C, Rivaud E, Daniel C, Cerf C, Parquin F, Catherinot E, *et al.* *Pneumocystose pulmonaire chez des patients immunodéprimés non infectés par le VIH : étude de 41 cas*. *Rev Pneumol Clin* 2011;67(4):191-8.
36. Limper AH, Offord KP, Smith TF, Martin WJ, 2nd. *Pneumocystis carinii pneumonia*. Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. *Am Rev Respir Dis* 1989;140(5):1204-9.
37. Adle-Biasette H. Infections opportunistes chez le patient immunodéprimé. *Bulletin de la Division Française de l'AIP* 2007;(46):26-40.
38. British Society for Medical Mycology, Schelenz S, Barnes RA, Barton RC, Cleverley JR, Lucas SB, *et al.* British Society for Medical Mycology best practice recommendations for the diagnosis of serious fungal diseases. *Lancet Infect Dis* 2015;15(4):461-74.
39. Ministère des affaires sociales et de la santé, Conseil national du Sida, Agence nationale de recherches sur le sida et les hépatites virales, Morlat P. *Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH. Rapport 2013*. Paris: La Documentation Française; 2013.
40. Cooley L, Dendle C, Wolf J, Teh BW, Chen SC, Boutlis C, *et al.* Consensus guidelines for diagnosis, prophylaxis and management of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological and solid malignancies, 2014. *Intern Med J* 2014;44(12b):1350-63.
41. Maertens J, Cesaro S, Maschmeyer G, Einsele H, Donnelly JP, Alanio A, *et al.* ECIL guidelines for preventing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 2016;71(9):2397-404.
42. Guigue N, Alanio A, Menotti J, Castro ND, Hamane S, Peyrony O, *et al.* Utility of adding *Pneumocystis jirovecii* DNA detection in nasopharyngeal aspirates in immunocompromised adult patients with febrile pneumonia. *Med Mycol* 2015;53(3):241-7.
43. Botterel F, Lachaud L, Pozzetto B, Toro A, Wallet F. Infections broncho-pulmonaires (hors tuberculose et mucoviscidose). Dans: Société française de microbiologie, ed. Référentiel en microbiologie médicale 5.1. Paris: SFM; 2015.
44. Vassias I. Principe de l'amplification en chaîne par polymérase [90-60-0015-A]. *Encycl Med Chir Biologie médicale* 2012.
45. Sasso M, Chastang-Dumas E, Bastide S, Alonso S, Lechiche C, Bourgeois N, *et al.* Performances of four real-time PCR assays for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 2016;54(3):625-30.
46. Robert-Gangneux F, Belaz S, Revest M, Tattevin P, Jouneau S, Decaux O, *et al.* Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients by real-time PCR: a 4-year prospective study. *J Clin Microbiol* 2014;52(9):3370-6.
47. Singh P, Singh S, Mirdha BR, Guleria R, Agarwal SK, Mohan A. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in immunocompromised patients. *Mol Biol Int* 2015;2015:819091.
48. Nakashima K, Aoshima M, Ohkuni Y, Hoshino E, Hashimoto K, Otsuka Y. Loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia* in HIV-uninfected immunocompromised patients with pulmonary infiltrates. *J Infect Chemother* 2014;20(12):757-61.
49. Kaouech E, Kallel K, Anane S, Belhadj S, Abdellatif S, Mnif K, *et al.* *Pneumocystose à Pneumocystis jirovecii* : étude comparée de la PCR et des techniques de coloration. *Pathol Biol* 2009;57(5):373-7.
50. Alanio A, Bretagne S. Difficultés de diagnostic et d'expertise microbiologique des infections fongiques invasives. *Bull Epidemiol Hebdo* 2013;(12-13):115-7.
51. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55(4):611-22.
52. Matsumura Y, Ito Y, Iinuma Y, Yasuma K, Yamamoto M, Matsushima A, *et al.* Quantitative real-time PCR and the (1->3)-beta-D-glucan assay for differentiation between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(6):591-7.
53. Fauchier T, Hasseine L, Gari-Toussaint M, Casanova V, Marty PM, Pomares C. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by quantitative PCR to differentiate colonization and pneumonia in immunocompromised HIV-positive and HIV-negative patients. *J Clin Microbiol* 2016;54(6):1487-95.

54. Centre hospitalier régional universitaire de Lille, Sendid B. (1,3)- β -D Glucane. Intérêt dans le dépistage des infections fongiques invasives [En ligne]. <http://biologiepathologie.chru-lille.fr/catalogue-analyses/Beta-Glucane.pdf>
55. Institut national d'excellence en santé et en services sociaux. Dosage du (1-3)- β -D-glucane sérique (référence - 2015.02.04). Avis d'évaluation. Québec: INESSS; 2015. https://www.INESSS.gc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Fevrier_2016/INESSS-Avis_analyses_bm-fev16_Dosage_Glucane_Serique.pdf
56. Associates of Cape Cod Incorporated. Fungitell® mode d'emploi. Dosage de (1→3)- β -D-glucane sérique [En ligne] 2011. http://www.acciusa.com/pdfs/accProduct/Fungitell_multi_lang_pisheets/Fungitell%20Insert%20FR.pdf
57. Persat F, Ranque S, Derouin F, Michel-Nguyen A, Picot S, Sulahian A. Contribution of the (1→3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2008;46(3):1009-13.
58. Held J, Wagner D. Beta-d-Glucan kinetics for the assessment of treatment response in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(7):1118-22.
59. Salerno D, Mushatt D, Myers L, Zhuang Y, de la Rua N, Calderon EJ, *et al.* Serum and bal beta-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in HIV positive patients. *Respir Med* 2014;108(11):1688-95.
60. Held J, Koch MS, Reischl U, Danner T, Serr A. Serum (1 → 3)-beta-D-glucan measurement as an early indicator of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and evaluation of its prognostic value. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(4):595-602.
61. Tasaka S, Kobayashi S, Yagi K, Asami T, Namkoong H, Yamasawa W, *et al.* Serum (1 → 3) beta-D-glucan assay for discrimination between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization. *J Infect Chemother* 2014;20(11):678-81.
62. Koga M, Koibuchi T, Kikuchi T, Nakamura H, Miura T, Iwamoto A, *et al.* Kinetics of serum beta-D-glucan after *Pneumocystis pneumonia* treatment in patients with AIDS. *Intern Med* 2011;50(13):1397-401.
63. European Organization for Research and Treatment of Cancer, Invasive Fungal Infections Cooperative Group, National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group, de Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, *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. *Clin Infect Dis* 2008;46(12):1813-21.
64. German Society of Hematology and Medical Oncology, Maschmeyer G, Carratala J, Buchheidt D, Hamprecht A, Heussel CP, *et al.* Diagnosis and antimicrobial therapy of lung infiltrates in febrile neutropenic patients (allogeneic SCT excluded): updated guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Medical Oncology (DGHO). *Ann Oncol* 2015;26(1):21-33.
65. Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, *et al.* Diagnostic accuracy of serum 1,3-beta-D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2012;50(1):7-15.
66. Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP, Zhu YG, Vasileiou VA, Falagas ME. Accuracy of beta-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2013;19(1):39-49.
67. Shea BJ, Grimshaw JM, Wells GA, Boers M, Andersson N, Hamel C, *et al.* Development of AMSTAR: a measurement tool to assess the methodological quality of systematic reviews. *BMC Med Res Methodol* 2007;7:10.
68. AGREE Research Trust. AGREE II-Global rating scale (AGREE II-GRS) Instrument [En ligne] 2013. <http://www.agreetrust.org/wp-content/uploads/2013/12/AGREE-II-GRS-Instrument.pdf>
69. Li WJ, Guo YL, Liu TJ, Wang K, Kong JL. Diagnosis of pneumocystis pneumonia using serum (1-3)-beta-D-Glucan: a bivariate meta-analysis and systematic review. *J Thorac Dis* 2015;7(12):2214-25.
70. Summah H, Zhu YG, Falagas ME, Vouloumanou EK, Qu JM. Use of real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in immunocompromised patients: a meta-analysis. *Chin Med J* 2013;126(10):1965-73.
71. Institut national d'excellence en santé et en services sociaux. Dosage du (1-3)- β -D-glucane sérique (référence - 2015.02.004R). Avis de réévaluation. Québec: INESSS; 2017. https://www.INESSS.gc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Fevrier_2017/02-Dosage_du_1-3.pdf
72. Société pédiatrique de pneumologie et allergologie, Société française de pédiatrie, Houdoin V, Pouessel G, Angoulvant F, Brouard J, *et al.* Recommandations sur l'utilisation des nouveaux outils diagnostiques étiologiques des infections respiratoires basses de l'enfant de plus de trois mois. Paris: SP2A ; SFP; 2014.
73. Lu Y, Ling G, Qiang C, Ming Q, Wu C, Wang K, *et al.* PCR diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*: a bivariate meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2011;49(12):4361-3.
74. Fan LC, Lu HW, Cheng KB, Li HP, Xu JF. Evaluation of PCR in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a bivariate meta-analysis and systematic review. *PLoS One* 2013;8(9):e73099.

Fiche descriptive

Intitulé	Descriptif
Méthode de travail	Évaluation d'une technologie de santé
Date de mise en ligne	Octobre 2017
Date d'édition	Uniquement disponible sous format électronique sur www.has-sante.fr
Objectif(s)	L'objectif est d'évaluer si les données issues de l'analyse critique de la littérature synthétique et la position des professionnels de santé concernés sont cohérentes avec le contenu de la demande de modifications de la NABM émanant de la CNAMTS et de proposer un avis concernant ces propositions relatives au diagnostic biologique de la pneumocystose.
Professionnel(s) concerné(s)	Cf. chapitre 2.3
Demandeur	Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés (CNAMTS)
Promoteur	Haute Autorité de santé (HAS), service évaluation des actes professionnels (SEAP)
Pilotage du projet	Coordination : Alicia AMIGOU, Véronique DAURAT, chefs de projet, SEAP (chef de service : Cédric CABONNEIL), adjoint au chef de service : Denis-Jean DAVID. Secrétariat : Lina BISCOSI, assistante, SEAP
Participants	Expertise externe à la HAS, Cf. chapitre 2.3 : Conseil national professionnel de biologie des agents infectieux-hygiène hospitalière (CNPBAIHH) Conseil national professionnel d'hématologie (CNPH) Conseil national professionnel d'inféctiologie - Fédération française d'inféctiologie et Société française de lutte contre le Sida (SFLS) Centre national de référence mycoses invasives et antifongiques (CNRMA)
Recherche documentaire	De janvier 2005 à septembre 2017 (stratégie de recherche documentaire décrite en Annexe 1) Réalisée par Emmanuelle BLONDET, documentaliste, avec l'aide de Yasmine LOMBRY assistante documentaliste, sous la responsabilité de Frédérique PAGES, chef du service documentation - veille, et Christine DEVAUD, adjointe au chef de service
Auteurs de l'argumentaire	Véronique DAURAT, chef de projet, SEAP, sous la responsabilité de Denis-Jean DAVID, adjoint au chef de service, SEAP
Validation	Collège de la HAS : septembre 2017
Autres formats	Pas d'autre format que le format électronique disponible sur www.has-sante.fr
Documents d'accompagnement	Avis HAS (septembre 2017) disponible sur www.has-sante.fr

~



Toutes les publications de la HAS sont téléchargeables sur
www.has-sante.fr