

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**  
*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*  
pour obtenir le titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**  
*Mention : Biologie-Santé*  
**École Doctorale SICMA**

présentée par

**Solène Le Gal**

Laboratoire de Parasitologie et Mycologie  
Laboratoire Universitaire de Biodiversité et  
Ecologie Microbienne – EA 3882

**Réservoir humain et  
pneumocystose nosocomiale.  
Approche des concepts par la  
détection, l'identification et  
l'étude de la diversité de  
*Pneumocystis jirovecii.***

**Thèse soutenue le 4 juin 2013**  
devant le jury composé de :

**Gilles NEVEZ**

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / Directeur de thèse

**Georges BARBIER**

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / Examinateur

**Yannick LE MEUR**

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / Examinateur

**Anne TOTET**

Professeur, Université de Picardie Jules Verne / Examinateur

**Florence ROBERT-GANGNEUX**

Docteur, Université de Rennes 1 / Rapporteur

**Philippe HAUSER**

Docteur, Université de Lausanne / Rapporteur

**Laurent MISERY**

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / Invité

**UNIVERSITE EUROPEENNE DE BRETAGNE  
UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

Ecole doctorale Santé, Information-Communications, Mathématiques, Matières  
E.A. 3882 – Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Bretagne Occidentale**

**Mention Biologie-Santé**

Présentée et soutenue par

**Solène LE GAL**

Le 4 juin 2013

**Réservoir humain et pneumocystose nosocomiale.  
Approche des concepts par la détection, l'identification et l'étude  
de la diversité de *Pneumocystis jirovecii*.**

**JURY**

Pr Gilles Nevez, Université de Bretagne Occidentale, Brest	Directeur de thèse
Pr Georges Barbier, Université de Bretagne Occidentale, Brest	Examinateur
Pr Yannick le Meur, Université de Bretagne Occidentale, Brest	Examinateur
Pr Anne Totet, Université Picardie – Jules Verne, Amiens	Examinateur
Dr Florence Robert-Gangneux, Université Rennes 1, Rennes	Rapporteur
Dr Philippe Hauser, Université de Lausanne, Lausanne	Rapporteur
Pr Laurent Misery, Université de Bretagne Occidentale, Brest	Membre invité

## **Remerciements**

Cette thèse a été réalisée au sein du laboratoire de Parasitologie et Mycologie de l'EA 3882 "Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne".

Monsieur le Professeur Georges Barbier,

Pour l'honneur que vous me faites en participant à ce jury de thèse et pour le soutien que vous m'avez apporté depuis mon arrivée au LUBEM, je vous prie de trouver ici l'expression de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Yannick Le Meur,

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury. Soyez assuré de ma respectueuse considération.

Madame le Professeur Anne Totet,

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury et vous m'accordez votre confiance pour un post-doctorat. Soyez assurée de ma gratitude.

Monsieur le Professeur Laurent Misery,

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury. Soyez assuré de ma respectueuse considération.

Madame le Docteur Florence Robert-Gangneux,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur Philippe Hauser,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Gilles Nevez,

Après m'avoir encadrée pour le DES de biologie médicale et le master 2, vous m'avez renouvelé votre confiance pour la thèse. Je ne saurais assez vous remercier pour votre bienveillance, vos précieux conseils, votre disponibilité et surtout votre soutien sans faille, contre vents et marées. Soyez assuré de mon respect et de ma gratitude.

Je remercie vivement Michèle Virmaux pour son aide inestimable, son oreille attentive, son optimisme et son soutien dans les bons et les mauvais moments.

Un grand merci à Amélie, Maëla pour leur participation à ce travail, leur amitié, leur bonne humeur et les débriefings entre filles.

Un grand merci également à Céline pour sa contribution à ce travail. A notre future collaboration à Amiens.

Merci à toute l'équipe du Département de Bactériologie-Virologie, Hygiène hospitalière, Parasitologie-Mycologie du CHRU de Brest, techniciennes, cadre, secrétaires, biologistes, internes, ainsi qu'aux membres de l'EA 3882, pour votre soutien et vos encouragements.

Une mention spéciale bien sûr à la "dream team de Parasito", Chantal, Danièle, Dorothée, Elodie, Patricia. Je ne saurais assez vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté humainement et professionnellement. Ces 4 années passées trop vite resteront gravées dans ma mémoire.

Merci à toute ma famille et en particulier à ma mère qui m'a toujours soutenue, encouragée et réconfortée dans les moments de doutes.

Merci à tous mes amis de Brest et d'ailleurs.

## Résumé

Le genre *Pneumocystis* désigne un groupe de champignons opportunistes présentant une étroite spécificité d'hôte. Il détermine lors d'immunodépression sévère une infection pulmonaire grave, la pneumonie à *Pneumocystis* (PPC). La transmission de *Pneumocystis* par voie aérienne d'un hôte développant une PPC à un hôte susceptible a été démontrée à l'aide des modèles murins. Les travaux menés chez la souris ont montré également que des sujets immunocompétents colonisés par *Pneumocystis murina* peuvent transmettre le champignon à des souris immunodéprimées qui développeront une PPC ultérieurement. Les individus colonisés par *Pneumocystis* sp., ainsi que ceux développant une PPC, participeraient au réservoir du champignon. La survenue de cas groupés de PPC en milieu hospitalier est en faveur de la transmission interindividuelle de *Pneumocystis jirovecii* (*P.jirovecii*) chez l'homme. La détection de l'ADN de *P.jirovecii* dans l'air exhalé par les patients développant une PPC suggère que cette transmission se fait par voie aérienne.

La caractérisation des populations infectées par *P.jirovecii* et la caractérisation génotypique du champignon au sein de son réservoir humain constituent la base de ce travail de recherche. Nous avons montré que la prévalence de la colonisation par *P.jirovecii* est faible chez les patients atteints de mucoviscidose et suivis dans notre CHU. La participation de ces patients au réservoir de *P.jirovecii* à Brest serait donc marginale. Cette faible prévalence pourrait être le reflet d'une faible circulation du champignon dans les communautés humaines dans notre région. Nous avons évalué le dosage du  $\beta$ -1,3-D glucane sérique pour dépister les populations infectées. Ce dosage couplé à la détection de *P.jirovecii* dans les prélèvements respiratoires par la microscopie et la PCR, permet de différencier les patients développant une PPC et les patients présentant une colonisation pulmonaire par *P.jirovecii*. De plus, les premières données sur le  $\beta$ -1,3-D glucane au cours de la primo-infection chez le nourrisson ont été obtenues.

En termes de caractérisation de *P.jirovecii* dans notre région, l'analyse du locus dihydropteroate synthase (DHPS) a montré que: *i)* le lieu habituel de résidence plutôt que le lieu de diagnostic de l'infection à *P.jirovecii* serait un facteur prédictif d'infection par un mutant, *ii)* *P.jirovecii* pourrait circuler en France d'une région à une autre via des voyageurs infectés, *iii)* la prévalence de mutants potentiellement résistants chez les patients vivant effectivement à Brest était de 0%. L'analyse des séquences des "internal transcribed spacers" (ITS) 1 et 2 de *P.jirovecii* conforte l'hypothèse que les patients développant une PPC et les patients colonisés sont infectés par des populations fongiques présentant des caractéristiques

identiques. Tous les patients, quelle que soit la présentation clinique de leur infection, constituerait un réservoir unique et commun de *P.jirovecii*. Les travaux de génotypage ont constitué l'étape préalable nécessaire à l'analyse de cas groupés d'infections à *P.jirovecii* survenus chez des patients transplantés rénaux au CHU de Brest. Nous avons apporté des données originales sur le rôle des patients colonisés en tant que source potentielle de *P.jirovecii* dans un contexte d'acquisition et de transmission nosocomiales du champignon. Par ailleurs, la concordance partielle ou complète des génotypes ITS et DHPS dans les couples "prélèvements d'air–LBA" réalisés chez des patients développant une PPC est compatible avec l'exhalation du champignon et sa diffusion aérienne dans l'environnement hospitalier. Ces données apportent des arguments pour l'application de mesures de prévention des infections nosocomiales à *P.jirovecii*. Les précautions "gouttelettes" recommandées par la Société Française d'Hygiène Hospitalière devraient être appliquées *a minima* aux patients développant une PPC. Nous proposons leur extension aux patients colonisés par le champignon.

**Mots clés :** *Pneumocystis jirovecii*, réservoir, colonisation, PPC,  $\beta$ -1,3-D glucane, génotypage, ITS1 et 2, DHPS, infections nosocomiales, précautions "gouttelettes"

## **Summary**

The genus *Pneumocystis* represents a group of opportunistic fungi that show strong host specificity. It is the cause of severe pneumonia (*Pneumocystis* Pneumonia [PCP]) in immunocompromised subjects. *Pneumocystis* transmission from a host with PCP to another susceptible host via the airborne route has been demonstrated in rodent models. Moreover, it has been established that *Pneumocystis murina* can be transmitted from immunocompetent mice, transiently colonized by the fungus, to immunocompromised susceptible mice that subsequently develop PCP. Colonized subjects and those developing PCP may be part of the fungus reservoir. Reports of PCP case cluster in hospital strongly suggest that *Pneumocystis jirovecii* (*P.jirovecii*) transmission in humans may also occur. *P.jirovecii* DNA detection in the air surrounding PCP patients is consistent with the transmission of *P.jirovecii* via the airborne route.

Our goals were to characterize human populations infected with *P.jirovecii* and to characterize *P.jirovecii* within its human reservoir. We showed that *P.jirovecii* was rarely involved in pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis monitored in the Brest Hospital. Thus this patient population was not part of the human reservoir of the fungus in our region (Brittany, Western France). This low prevalence of colonization may reflect a low level of *P.jirovecii* circulation within human communities in Brittany. In order to improve the identification of patients infected with *P.jirovecii*, we evaluated  $\beta$ -1,3-D glucan detection in serum samples. We showed that serum  $\beta$ -1,3-D glucan levels combined with *P.jirovecii* detection in pulmonary samples using microscopic examination and a PCR assay make it possible to distinguish between PCP and pulmonary colonization. Moreover the first data on  $\beta$ -1,3-D glucan levels during primary infection were obtained.

In order to characterize *P.jirovecii* in our region, we performed the typing of *P.jirovecii* isolates from infected patients monitored at Brest hospital, using the dihydropteroate synthase (DHPS) and the internal transcribed spacer (ITS) 1 and 2 locus analysis. DHPS typing showed that *i*) the usual city of patient residence rather than the city in which the diagnosis of *P.jirovecii* infection has been made is a predictor of mutants, *ii*) mutants can be imported from one region to another through infected visitors, *iii*) the prevalence of mutants potentially resistant to sulfonamides was 0% in patients who effectively lived in the Brest geographic area. Results of ITS analysis in PCP patients and colonized patients are consistent with the hypothesis that these 2 patient groups are infected with similar *P.jirovecii* populations. All

infected patients, whatever their clinical presentation, may be part of a common and unique reservoir of the fungus.

We investigated an outbreak of *P.jirovecii* infections in 18 renal transplant recipients using the same typing method combined with patient encounter analysis. The results provided evidence of the role of colonized patients as potential sources of *P.jirovecii*. The same typing method was applied to pairs of pulmonary samples and room air samples of PCP patients. Full or partial matches of *P.jirovecii* types in pulmonary and air sample pairs were observed. These results are consistent with *P.jirovecii* exhalation by PCP patients in their close environment. These data support arguments for applying droplet precautions, at least to PCP patients, to prevent *P.jirovecii* transmission, as recommended by the "Société française d'hygiène hospitalière". We suggest extending droplet precautions to colonized patients to achieve the prevention of *P.jirovecii* nosocomial infections.

**Key words:** *Pneumocystis jirovecii*, reservoir, colonization, PCP,  $\beta$ -1,3-D glucan, typing, ITS1 and 2, DHPS, nosocomial infections, droplet precautions

## Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>13</b>
<b>Généralités sur <i>Pneumocystis jirovecii</i></b>	<b>18</b>
<b>Chapitre 1. Dépistage et caractérisation des populations infectées par <i>P.jirovecii</i></b>	<b>38</b>
<b>1.Détection de <i>Pneumocystis jirovecii</i> chez les patients atteints de mucoviscidose</b>	<b>39</b>
Article 1. <i>Pneumocystis jirovecii</i> and cystic fibrosis in France	40
<b>2.Amélioration des techniques de diagnostic et de dépistage des populations infectées</b>	<b>44</b>
Article 2. Serum (1-->3) β-D-Glucan levels in primary infection and pulmonary colonization with <i>Pneumocystis jirovecii</i>	47
<b>Chapitre 2. Caractérisation de <i>Pneumocystis jirovecii</i> dans les populations infectées</b>	<b>51</b>
<b>1.Prévalence des mutants DHPS à Brest</b>	<b>52</b>
Article 3. Circulation of <i>Pneumocystis jirovecii</i> dihydropteroate synthase mutants in France	56
<b>2.Diversité des haplotypes ITS de <i>Pneumocystis jirovecii</i></b>	<b>63</b>
Article 4. <i>Pneumocystis jirovecii</i> Haplotypes at the Internal Transcribed Spacers of the Nuclear rRNA operon in French HIV-negative patients with Diverse Clinical Presentations of <i>Pneumocystis</i> infections	66
<b>Chapitre 3. Cas groupés d'infections à <i>Pneumocystis jirovecii</i> en milieu hospitalier et infections nosocomiales</b>	<b>97</b>
<b>1.Cas groupés d'infections à <i>P.jirovecii</i> chez des transplantés de reins au CHRU de Brest et rôle potentiel des patients colonisés en tant que source infectieuse</b>	<b>98</b>
Article 5. A cluster of <i>Pneumocystis</i> infections among renal transplant recipients : molecular evidence of colonized patients as potential infectious sources of <i>Pneumocystis jirovecii</i>	100

<b>2.Comparaison des génotypes de <i>P.jirovecii</i> identifiés chez des patients développant une PPC et dans des échantillons d'air prélevés dans leur environnement proche</b>	<b>111</b>
Article 6. Possible nosocomial transmission of <i>Pneumocystis jirovecii</i>	113
<b>Discussion générale</b>	<b>116</b>
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>128</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>132</b>
<b>Annexes</b>	<b>160</b>

## **Liste des figures**

<b>Figure 1.</b> Voies d'activation du lysat d'amœbocytes de Limule.	<b>44</b>
<b>Figure 2.</b> Représentation des quatre domaines du polypeptide Fas d'après Volpe et al., 1993.	<b>52</b>
<b>Figure 3.</b> Voie de synthèse des folates.	<b>53</b>
<b>Figure 4.</b> Position des ITS 1 et ITS 2 sur l'opéron ARN ribosomique nucléaire de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .	<b>63</b>

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau 1.</b> Trousses de dosage du β-1,3-D glucane commercialisées.	<b>45</b>
<b>Tableau 2.</b> Recommandations pour la chimioprophylaxie de la pneumonie à <i>Pneumocystis</i> .	<b>126</b>

## Liste des abréviations

- ADN : acide désoxyribonucléique  
ARN : acide ribonucléique  
CDC : "Centers for Disease Control and prevention"  
CHRU : Centre Hospitalier Régional Universitaire  
CRCM : Centre de Ressources et de Compétence pour la Mucoviscidose  
DHPS : dihydroptéroate synthase  
DHFR : dihydrofolate réductase  
*E. coli* : *Escherichia coli*  
Fas : "folic acid synthesis" ou synthèse de l'acide folique  
InVS : Institut de Veille Sanitaire  
ITS : "internal transcribed spacer" ou espaceur transcrit interne  
LBA: lavage broncho-alvéolaire  
LAL : "Limulus Amoebocyte Lysate" ou lysat d'amoebocytes de limule  
MGG : May-Grünwald-Giemsa  
MSG : "major surface glycoprotein" ou protéine majeure de surface  
mtLSUrRNA : ARN de la grande sous-unité du ribosome de la mitochondrie  
pb : paire de bases  
*P.carinii* : *Pneumocystis carinii*  
*P.jirovecii* : *Pneumocystis jirovecii*  
*P.murina*: *Pneumocystis murina*  
*P.oryctolagi* : *Pneumocystis oryctolagi*  
*P.wakefieldiae* : *Pneumocystis wakefieldiae*  
PCR : "Polymerase Chain Reaction" ou réaction de polymérisation en chaîne  
*P.falciparum* : *Plasmodium falciparum*  
PPC : pneumonie à *Pneumocystis*  
RFLP : "restriction fragment length polymorphism" ou analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction de l'ADN  
SSCP : "single strand conformation polymorphism" ou analyse du polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin  
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine



## **Introduction**

Le genre *Pneumocystis* regroupe plusieurs espèces de micromycètes atypiques répandus chez les mammifères [63, 65, 77, 235, 236]. Cinq espèces sont dénommées au sein de ce genre en fonction de leur espèce de mammifère hôte, selon la nomenclature binomiale. *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) et *P. wakefieldiae* sont les espèces retrouvées chez le rat (*Rattus norvegicus*) [44, 55, 208]. *P. murina* et *P. oryctolagi* sont les espèces décrites chez la souris (*Mus musculus*) et le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) respectivement [51, 118, 208]. L'espèce spécifique de l'homme est dénommée *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) [72, 73, 182, 208, 234]. Le concept de spécificité d'hôte repose essentiellement sur l'existence d'une hétérogénéité génétique entre les espèces de *Pneumocystis* isolées de mammifères d'espèces différentes d'une part [77], et sur l'échec de tentatives d'infections croisées de *Pneumocystis* sp. entre deux hôtes d'espèces différentes d'autre part [61, 75].

*P. jirovecii* se multiplie dans les alvéoles pulmonaires en contact étroit avec les pneumocytes de type I mais reste extracellulaire [132]. Il est responsable chez les patients immunodéprimés d'infections pulmonaires, plus rarement d'infections disséminées [103, 187, 275]. La présentation clinique la plus grave de ces infections est la pneumonie à *Pneumocystis* (PPC) dont l'évolution spontanée est fatale en l'absence de traitement [103, 275]. La PPC reste la première infection opportuniste classant les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) au stade de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) [22, 27, 69, 133]. En 2009, 32% des cas de SIDA déclarés auprès de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) se rapportaient à une PPC [27]. Ce pourcentage reste stable depuis les années 1980 malgré la baisse de l'incidence du SIDA liée à l'amélioration de la prise en charge des patients infectés par le VIH dans les pays développés [133, 209]. La PPC touche également des individus non infectés par le VIH et dont l'immunodépression est consécutive à un déficit immunitaire congénital ou à un traitement immunosuppresseur [104, 169, 221, 240]. Les patients transplantés et les patients atteints de cancer, d'hémopathie maligne ou d'une maladie de système peuvent ainsi développer une PPC [104, 169, 221, 240].

En l'absence de système de culture, le diagnostic des infections à *P. jirovecii* repose sur la détection du champignon par microscopie et PCR dans des prélèvements pulmonaires [214, 244, 274]. Des faibles charges fongiques non détectables par l'examen microscopique ont été retrouvées à l'aide de la PCR chez des individus présentant un diagnostic alternatif à la PPC [129, 184, 274]. Ces individus présentant des infections peu sévères à *P. jirovecii* sont colonisés par le champignon [129, 184]. La colonisation pulmonaire par *P. jirovecii* concerne des patients présentant des affections pulmonaires aiguës ou chroniques telles que les

bronchopneumopathies chroniques obstructives, associées ou non à des états d'immunodépression modérée, des nourrissons non immunodéprimés développant une primo-infection à *P.jirovecii*, des femmes enceintes, des personnes âgées et des personnels hospitaliers en contact direct ou non avec des patients développant une PPC [24, 25, 62, 80, 157, 183, 185, 201, 228, 246, 248, 250, 264-267]. Toutefois, l'identification des populations humaines colonisées par le champignon mérite d'être poursuivie. D'autant qu'en l'état actuel de nos connaissances, les patients colonisés pourraient représenter une source de *P.jirovecii* pour les individus susceptibles au même titre que les patients présentant une PPC [170, 185].

En effet, aucun biotope environnemental n'a pour le moment été identifié même si l'ADN de *Pneumocystis* a été détecté par PCR dans des prélèvements d'air de la campagne anglaise et dans l'eau d'un étang du New Jersey [26, 271]. L'absence de réservoir environnemental prouvé et l'étroite spécificité d'hôte justifient de considérer les mammifères comme leur propre réservoir de champignons. Selon cette hypothèse, le réservoir de *P.jirovecii* serait représenté par les populations humaines infectées.

La transmission de *Pneumocystis* par voie aérienne d'un hôte développant une PPC à un hôte susceptible a été démontrée à l'aide de modèles murins [102, 232]. De plus, il a été démontré que des souris immunodéprimées présentant une PPC pouvaient transmettre *P.murina* à des souris immunocompétentes. Ces souris transitoirement colonisées par *P.murina* sont ensuite capables de transmettre le champignon à des souris immunodéprimées qui à leur tour développent une PPC [31, 60]. Ces études soulignent le rôle potentiel des individus développant une PPC mais aussi celui des individus colonisés en tant que part constitutive du réservoir de champignon et source de *Pneumocystis* sp. pour des individus susceptibles. En ce sens, l'ADN de *P.jirovecii* a été détecté dans des échantillons d'air prélevés à proximité de patients présentant une PPC suggérant que le champignon peut être exhalé par ces patients [14, 32, 195]. Ces données sont compatibles avec la transmission par voie aérienne de *P.jirovecii* chez l'homme.

La survenue de cas groupés de PPC depuis 5 décennies a permis de poser l'hypothèse d'une acquisition et d'une transmission interhumaine de *P.jirovecii* en milieu hospitalier [47, 181]. Plus précisément, les publications les plus récentes qui rapportent l'analyse des rencontres entre les patients concernés par ces cas groupés et l'identification génotypique des souches de *P.jirovecii* isolées chez ces patients, plaident en faveur de l'acquisition et de la transmission nosocomiale du champignon [74, 96, 202, 207, 218, 279]. Le rôle des patients développant

une PPC est fortement suspecté alors que celui des patients colonisés par *P.jirovecii* dans ce contexte de cas groupés reste à définir.

Les principaux loci analysés pour le génotypage de *Pneumocystis* sont ceux codant pour l'ARN de la grande sous-unité du ribosome de la mitochondrie (mtLSUrRNA) [74, 87, 124, 128, 152, 202, 218, 272, 273], la dihydrofolate réductase (DHFR) [39, 67, 174, 212, 238], la glycoprotéine majeure de surface (MSG) [138, 211, 216], l'intron du gène codant pour l'ARN de la sous-unité 26S du ribosome [74, 87, 202, 218], la βtubuline [74, 87, 202, 218], les « internal transcribed spacers » (ITS) 1 et 2 [18, 78, 98, 127, 131, 148, 185, 189, 213, 231, 249, 253, 254, 260] et la dihydroptéroate synthase (DHPS) [122, 147]. L'analyse du locus de la DHPS occupe une place particulière dans les techniques de génotypage. En effet, la DHPS est l'enzyme cible des sulfamides, principales molécules utilisées dans le traitement des infections à *Pneumocystis* [122, 145]. Deux mutations non synonymes ont été principalement décrites sur ce locus en positions 165 et 171 [122, 147]. Les facteurs de risque de développer une infection par un mutant sont les antécédents de traitement par les sulfamides et le lieu de résidence des patients [15, 99, 101, 115]. Ainsi, la forte prévalence de mutants chez des patients sans antécédent de traitement par sulfamides a été expliquée par la possible transmission du champignon de patients infectés traités à des patients susceptibles non traités, soit directement, soit via une hypothétique source environnementale [15, 40, 88, 99, 101, 115, 176, 247, 259]. Pour ces raisons, l'analyse du locus de la DHPS peut servir de marqueur de circulation de *P.jirovecii* au sein du réservoir humain [15, 88, 99, 101, 247].

## Problématique

Le concept de réservoir humain de *P.jirovecii* est la base de notre travail de recherche. Nos objectifs ont été de poursuivre le dépistage et la caractérisation des populations humaines infectées et de caractériser le champignon chez ces populations.

La prévalence de la colonisation par *P.jirovecii* chez les patients atteints de mucoviscidose a été évaluée en Allemagne à 7,4% et en Espagne à 21,6% [210, 227]. La forte prévalence de *P.jirovecii* chez les patients mucoviscidosques en Espagne a conduit à poser l'hypothèse que ceux-ci pourraient représenter une part du réservoir humain du champignon. En revanche, aucune donnée n'était disponible concernant la prévalence de *P.jirovecii* chez les patients atteints de mucoviscidose en France et en particulier en Bretagne, région où l'incidence de la mucoviscidose est plus élevée qu'au niveau national. En effet, des incidences de 1 cas pour 2630 naissances [219], voire 1 cas pour 1600 naissances dans des cantons du Finistère et du

Morbihan [219], ont été rapportées alors que l'incidence moyenne nationale est de 1 cas pour 4366 naissances [84]. Nous avons étudié une population de patients suivis au centre de ressources et de compétences pour la mucoviscidose (CRCM) de Roscoff dans le but de déterminer la prévalence de la colonisation de *P.jirovecii* chez les patients mucoviscidosiques dans le Finistère.

Par ailleurs, nous avons évalué une technique de diagnostic de l'infection à *P.jirovecii* reposant sur le dosage sérique du  $\beta$ -1,3-D glucane. Plus précisément, nous avons évalué l'intérêt de ce dosage pour discriminer les patients développant diverses présentations cliniques de l'infection à *P.jirovecii*.

Des variations géographiques de la prévalence des infections à *P.jirovecii* et des caractéristiques génotypiques du champignon ont été rapportées [15, 25, 147, 160, 168, 170, 183, 241, 242, 261]. Afin de caractériser *P.jirovecii* dans notre région, nous avons analysé les isolats fongiques provenant d'un groupe de 85 patients suivis au centre hospitalier régional universitaire (CHRU) de Brest. L'analyse a été focalisée sur le locus de la DHPS d'une part, et sur le locus des ITS d'autre part.

Ce travail de caractérisation génotypique a constitué l'étape préalable indispensable pour explorer des cas groupés d'infections à *P.jirovecii* survenus chez des transplantés de rein dans notre centre hospitalier. Nous avons analysé les rencontres entre patients concernés par ces cas groupés et couplé cette analyse avec l'identification des génotypes de *P.jirovecii* chez les patients présentant une PPC mais également chez ceux colonisés par le champignon.

Au cours d'un autre travail, nous avons comparé les génotypes identifiés dans les prélèvements pulmonaires de patients développant une PPC avec les génotypes identifiés dans des échantillons d'air prélevés dans l'air environnant ces patients, dans le but d'étayer l'hypothèse de la transmission aérienne de *P.jirovecii* en milieu hospitalier. Nous avons postulé que l'identité des génotypes dans les couples échantillons d'air/ échantillons pulmonaires serait compatible avec l'exhalation et la diffusion environnementale du champignon à partir de sujets infectés.

Ces travaux ont permis d'apporter des données originales supplémentaires sur l'acquisition, la circulation et la transmission de *P.jirovecii* et de discuter des mesures de prévention des infections à *P.jirovecii* en milieu hospitalier.

## Généralités sur *Pneumocystis jirovecii*

Les généralités sur *P.jirovecii* sont présentées sous la forme d'un chapitre publié dans l'ouvrage "Actualités en microbiologie clinique : *Pneumocystis jirovecii*". Le Gal S, Damiani C, Totet A, Nevez G. 2011. Actualités en microbiologie clinique. Paris : éditions Eska. Section XII chapitre 9, 18p".

### **Erratum**

Page 2/18 (page 21 du manuscrit), partie 2. Classification : *Taphrinomycotina*

Page 16/18 (page 35 du manuscrit), Bibliographie :

**Rabodonirina M., C. Pariset, and J. Fabry.** 1997. Connaissances actuelles sur l'épidémiologie de la pneumocystose et propositions pour une limitation du risque de transmission nosocomiale. Hygiènes 5:260-2.

**PNEUMOCYSTIS JIROVECII****N° 9**

Solène LE GAL, Céline DAMIANI, Anne TOTET, Gilles NEVEZ

*Pneumocystis jirovecii* est un champignon opportuniste transmissible, spécifique de l'homme, responsable, chez les sujets présentant une immunodépression sévère, d'infections graves essentiellement pulmonaires, plus rarement disséminées, dont l'évolution spontanée est fatale (Hughes, 2005). La pneumonie à *Pneumocystis* [acronyme : PPC, Stringer *et al.* 2002] reste dans les pays développés la plus fréquente des infections opportunistes classant les patients infectés par le VIH au stade de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Dans ce contexte, on note 253 cas de PPC inaugurales du SIDA sur les 1146 cas de SIDA déclarés à l'institut de veille sanitaire (InVS) en France en 2006 (Institut de veille sanitaire, 2006). La PPC concerne également les patients présentant d'autres déficits immunitaires en particulier en rapport avec des traitements cytostatiques et immunomodulateurs (Sepkowitz, 2002). Les cas diagnostiqués dans ce contexte ne bénéficient pas d'un système national de déclaration mais si l'on projette les données fournies par le réseau *Pneumocystis* de l'assistance publique-hôpitaux de Paris, leur nombre pourrait s'élever à 40% du nombre de cas déclarés à l'InVS (Magne *et al.*, 2007). Pour ces raisons, la PPC représente un problème d'actualité en santé publique.

**1. HISTORIQUE**

L'histoire moderne de *Pneumocystis* débute en 1909 lorsque Chagas décrit de façon erronée des stades kystiques de trypanosomes dans des poumons de cobayes et d'un enfant développant une trypanosomiase (Chagas, 1909 ; Chagas, 1911). À la demande de Carini, les Delanoë réévaluent l'interprétation de Chagas et identifient ces stades kystiques comme ceux d'un microorganisme sans lien avec les trypanosomes et pour lequel ils proposent le nom *Pneumocystis carinii* (Delanoë et Delanoë, 1912).

Les premiers cas d'infection par *Pneumocystis* décrits chez l'homme en tant que tels sont rapportés en 1942 par van der Meer et Brug, deux praticiens hollandais (van der Meer et Brug, 1942). Ces cas concernaient deux nourrissons et un adulte. Toutefois, les cas de pneumonies dites « plasmacytaires » mortelles sévissant chez les nourrissons, décrites par Ammich dans les années 30 (Ammich, 1938) et le cas rapporté par Chagas ont été *a posteriori* reconnus comme des PPC. Dans les années 40 et 50, ces pneumonies ont sévi sur le mode épidémique dans des communautés de nourrissons et d'enfants dénutris (Vanek et Jirovec, 1952). Puis la PPC est rapportée comme une infection frappant sur un mode sporadique des nourrissons prématurés (Gajdusek, 1957) et des patients soumis à des traitements immuno-supresseurs (Hamperl, 1956). En 1981, Gottlieb et collaborateurs à Los Angeles, et Masur et collaborateurs à New York publient leurs observations de PPC survenues dans un contexte de lymphopénie sanguine respectivement chez 4 et 11 adultes homosexuels et/ou héroïnomanes. Le SIDA est alors défini sur la base de ces 15 observations (Gottlieb *et al.*, 1981; Masur *et al.*, 1981). Durant les années 80 et jusqu'au milieu des années 90, la PPC a été étroitement liée à l'extension de la pandémie d'infection par le VIH. Près de 20000 et 1500 cas de PPC étaient déclarés chaque année aux Etats Unis et en France respectivement. La PPC représentait la plus fréquente des infections opportunistes classant les patients infectés par le VIH au stade de SIDA, soit 25-30% des cas (Masur *et al.*, 1989a ; Centers for Disease Control and Prevention, 1993 ; Réseau national de santé publique, 1995 ; Réseau national de santé publique, 1997). Ce pourcentage reste stable malgré la diminution de l'incidence du SIDA et de la PPC résultant de l'amélioration de la prise en charge des patients infectés par le VIH dans les pays développés à l'aide des thérapies antirétrovirales disponibles depuis 1995 (Institut de veille sanitaire, 2007).

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

## 2. CLASSIFICATION

Le genre *Pneumocystis* désigne des micromycètes qui se positionnent dans l'embranchement des *Ascomycota*, le sous-embranchement des *Taphrinamycotina*, la classe des *Pneumocystomycetes*, l'ordre des *Pneumocystidales* et la famille des *Pneumocystidaeae* (Edman *et al.*, 1988 ; Stringer *et al.*, 1989 ; Ypma-Wong *et al.*, 1992 ; Eriksson, 1994 ; Stringer *et al.*, 1997). Cinq espèces sont actuellement dénommées selon une nomenclature binominale et en fonction de leur espèce de mammifère hôte. Il s'agit de *Pcarinii* et *Pwakefieldiae* chez le rat, *Pmurina* chez la souris, *Poryctolagi* chez le lapin et *Pjirovecii* chez l'homme (Redhead *et al.*, 2006). En 2001, il avait été proposé de retenir l'appellation *Pneumocystis jiroveci* (*Pjiroveci*) déjà proposée en 1976 par Frenkel pour désigner l'espèce retrouvée chez l'homme (Frenkel, 1976 ; Frenkel, 1999 ; Stringer *et al.*, 2001). Ce nom *Pjiroveci* qui a été à l'origine publié sous une forme correcte avec un seul ‘i’ selon le code international de nomenclature zoologique mais incorrecte selon le code international de nomenclature botanique a été corrigé et remplacé par *Pjirovecii* avec deux ‘i’ terminaux (Stringer *et al.*, 2002 ; Nevez *et al.*, 2006a ; Stringer *et al.*, 2009).

## 3. HABITAT

*Pneumocystis* se développe dans les alvéoles pulmonaires en contact étroit avec les pneumocytes de type I mais reste extracellulaire. Les organes des mammifères infectés et en particulier les alvéoles pulmonaires sont les seuls lieux de multiplication connus au sein desquels le champignon peut être visualisé. Bien que de l'ADN spécifique de *Pneumocystis* ait été détecté dans l'eau de bassin et que de l'ADN spécifique de *Pcarinii* et de *Pjirovecii* ait été détecté dans l'air dans un verger de l'Oxfordshire (Wakefield, 1996 ; Casanova-Cardiel *et al.*, 1997) aucun biotope n'a été identifié dans le milieu extérieur pour les espèces du genre *Pneumocystis*. En fait, les mammifères hôtes infectés constituent pour l'instant les seuls réservoirs formellement caractérisés. En même temps, l'étoile spécificité d'hôte retrouvée chez les espèces de *Pneumocystis* justifie d'écartier les animaux comme sources infectieuses potentielles de *Pjirovecii* et de considérer l'infection chez l'homme comme une anthroponose avec l'homme infecté comme source essentielle de *Pjirovecii*.

## 4. IDENTIFICATION

Deux formes de *Pneumocystis* ont été principalement identifiées. Il s'agit des formes trophiques et des formes kystiques. Les kystes matures contien-

tent huit corps intra-kystiques qui donneront de petites formes trophiques, de plus grandes formes trophiques polymorphes, des prékystes précoces, intermédiaires et tardifs, et de nouveaux kystes. Les corps intra-kystiques et les petites formes trophiques sont sphériques et ont une taille de 1 à 2 µm. Des corps intra-kystiques falciformes ou dits « en banane » de plus grande taille, de 2 à 3 µm sont plus rarement observés. Les plus grandes formes trophiques apparaissent très irrégulières et ont une taille de 4 à 8 µm. Les formes trophiques sont très adhérentes entre elles ainsi qu'à la surface de pneumocytes de type I dans l'alvéole. Les prékystes sont ovoïdes et présentent une taille de 3,5 à 6 µm. Les kystes matures sont ovoïdes ou sphériques et présentent une taille de 4 à 7 µm, la taille moyenne usuellement observée étant 5 µm. La paroi des prékystes intermédiaires, tardifs et kystes matures apparaît comme une couche dense en microscopie électronique et contient des β-1,3-D-glucanes (Deicas *et al.*, 2005). Ces stades sont détectables par les colorations à l'argent et au bleu de toluidine (cf. infra, paragraphe 8.2).

L'hypothèse d'un cycle décrivant une multiplication via une reproduction sexuée (Figure 1) a été basée sur la mise en évidence en microscopie élec-

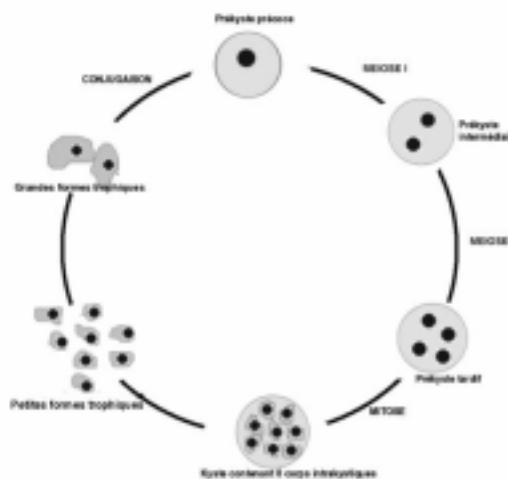


Figure 1. Cycle hypothétique de *Pneumocystis jirovecii* dans l'alvéole pulmonaire.

Les kystes matures contiennent huit corps intra-kystiques. Après libération et selon un cycle hypothétique ces corps intra-kystiques donnent de petites formes trophiques puis de plus grandes formes trophiques polymorphes. La conjugaison de ces grandes formes trophiques aboutit à la formation des prékystes précoces, intermédiaires et tardifs, et de nouveaux kystes. En considérant *P. jirovecii* comme un ascomycète, les kystes correspondent à des asques et les corps intra-kystiques à des ascospores.

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

tronique de complexes synaptonémaux (Matsumoto *et al.*, 1984). Les complexes synaptonémaux sont caractéristiques de la prophase de la première méiose chez les eucaryotes. Cette observation est en faveur d'une reproduction résultant d'une conjugaison des formes trophiques pour former des kystes. Selon ce cycle et en tenant compte du fait que *Pneumocystis* est un ascomycète, il est légitime de proposer une nomenclature adaptée pour désigner les kystes comme des asques et les corps intra-kystiques comme des ascospores. Quoiqu'il en soit, ce cycle hypothétique a l'avantage de situer dans un ordre logique les différentes formes qui sont effectivement détectées dans les prélèvements pulmonaires lors de la réalisation du diagnostic de routine au laboratoire.

La forme naturellement infectante n'est pas identifiée. Toutefois, il faut noter que les corps intra-kystiques nouvellement libérés par les kystes matures et qui évolueront en petites formes trophiques présentent la même taille (1 à 3 µm) que d'autres pathogènes tels que *Mycobacterium tuberculosis* dont la taille est compatible avec une diffusion jusqu'aux alvéoles pulmonaires (Ng *et al.*, 1997).

## ■ 5. ACQUISITION ET TRANSMISSION

### 5.1. Acquisition et transmission par voie aérienne

L'acquisition de *Pneumocystis* par voie aérienne a été démontrée chez les modèles murins (Hughes, 1982, Walzer *et al.*, 1977a). La transmission par voie aérienne de *Pcarinii* entre deux rats et de *Pmurina* entre deux souris a été également démontrée à l'aide de modèles (Hughes *et al.*, 1983, Soulez *et al.*, 1991). *Pmurina* est un microorganisme particulièrement contagieux puisque sa transmission peut survenir même après un contact d'un seul jour entre souris immunodéprimées développant une PPC et souris SCID susceptibles (Soulez *et al.*, 1991). Plus récemment, la transmission de *Pmurina* par voie aérienne entre souris SCID développant une PPC et souris immunocompétentes a été démontrée. Ces souris immunocompétentes sont transitoirement colonisées par le champignon et sont capables de le transmettre à d'autres souris SCID susceptibles qui vont alors développer une PPC (Dumoulin *et al.*, 2000 ; Chabé *et al.*, 2004).

En raison de ces données expérimentales, du tropisme de *Pjirovecii* pour le poumon humain, et des observations cliniques, il est admis que l'acquisition aérienne de *Pjirovecii* par inhalation survient également chez l'homme. Toutefois, le processus d'inhalation et de circulation du champignon dans les voies aériennes reste mal connu (Tasci *et al.*, 2003).

Le mécanisme de dispersion de *Pjirovecii* à partir des poumons infectés pourrait être son exhalation par les malades au cours de la ventilation. En effet de l'ADN de *Pjirovecii* a été détecté par PCR dans le filtre d'un système d'intubation d'un patient développant une PPC (Sing *et al.*, 1999). L'ADN de *Pjirovecii* a été également détecté par PCR dans des échantillons d'air provenant des chambres de patients développant une PPC avec concordance partielle des génotypes de *Pjirovecii* identifiés dans l'air avec ceux identifiés chez les patients (Bartlett *et al.*, 1997 ; Olsson *et al.*, 1998). De l'ARN de *Pjirovecii* a été également détecté par RT-PCR dans des échantillons d'air filtré provenant des chambres de patients développant une PPC. Le champignon serait donc *a priori* viable et par conséquent potentiellement infectieux dans l'environnement aérien des patients infectés (Latouche *et al.*, 2001 ; Maher *et al.*, 2001). De l'ADN de *Pjirovecii* a été détecté dans des écouvillonnages nasaux du personnel soignant qui avait inhalé de l'air exhalé par un patient développant une PPC (Vargas *et al.*, 2000). Récemment, de l'ADN de *Pjirovecii* a été détecté et quantifié dans l'air exhalé par des patients développant une PPC. La charge fongique aérienne diminue quand la distance entre le patient et le lieu du prélèvement d'air augmente (Choukri *et al.*, 2010). Ces observations sont compatibles avec la circulation et la transmission aériennes de *Pjirovecii* chez l'homme.

### 5.2. Acquisition et transmission nosocomiales

Dans les années 50 et 60, Reisetbauer et collaborateurs (Reitsetbauer *et al.*, 1956) ainsi que Harnak (Harnak, 1960) isolait lors de leur admission à l'hôpital les enfants suspects de développer une PPC dans le but de prévenir les infections nosocomiales à *Pjirovecii*. Depuis 40 ans, l'acquisition et la transmission interhumaine de *Pjirovecii* en milieu hospitalier ont été évoquées dans un contexte de cas groupés de PPC. Ces cas groupés ont été décrits dans des services de pédiatrie, d'hématologie et oncologie, dans des unités de réanimation et de transplantation rénale, des services d'infectiologie spécialisés pour la prise en charge des malades sidéens (Nevez *et al.*, 2008). Les premiers travaux de génotypage de *Pjirovecii* effectués dans le cadre de cas groupés n'ont pas permis de soutenir l'hypothèse de transmission interhumaine en raison de l'absence d'identité génotypique entre les isolats de *Pjirovecii* provenant des patients supposés sources et ceux retrouvés chez les patients nouvellement infectés (Helweg-Larsen *et al.*, 1998, Olsson *et al.*, 2001). En revanche, l'analyse des rencontres entre patients concernés par les récents cas groupés de PPC chez des transplantés rénaux combinée avec l'identification génotypique de *Pjirovecii* provenant

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

de ces patients plaident en faveur d'une acquisition et d'une transmission nosocomiale du champignon (Rabodonirina *et al.*, 2004 ; Hocker *et al.*, 2005; de Boer *et al.*, 2007 ; Schmodt *et al.*, 2008 ; Gianella *et al.*, 2010 ; Yazaki *et al.*, 2009).

### 5.3. Acquisition et transmission en milieu domestique

La transmission de *Pjirovecii* à domicile a été évoquée au sein de couples de patients cancéreux ou sidéens ayant développé une PPC et aussi entre des grands-parents et leur petit-fils, les premiers étant colonisés par le champignon, le second ayant développé une primo-infection à *Pjirovecii*, (Watanabe *et al.*, 1965 ; Latouche *et al.*, 1997a ; Rivero *et al.*, 2008). La transmission interhumaine ne peut toutefois être retenue en raison soit de l'absence de chronologie cohérente dans la survenue des infections à *Pjirovecii* chez le couple de patients (Watanabe *et al.*, 1965), soit de la non concordance des génotypes de *Pjirovecii* identifiés chez les patients (Latouche *et al.*, 1997a), soit de la faible discrimination de la méthode de génotypage retenue (Rivero *et al.*, 2008). En revanche, l'observation de Miller et collaborateurs concernant un couple mère – enfant infecté par le VIH développant de façon contemporaine une PPC est en faveur d'une transmission interhumaine du champignon (Miller *et al.*, 2002).

### 5.4. Acquisition et transmission verticales

La transmission verticale par voie transplacentaire et sanguine serait possible chez le lapin (Cere *et al.*, 1997), discutée chez le rat et absente chez la souris (Pifer *et al.*, 1984; Ito *et al.*, 1991 ; Chabe *et al.*, 2004). Ce mode de transmission a été récemment évoqué chez l'homme car de l'ADN de *Pjirovecii* a été détecté par PCR dans un placenta et six foetus avortés (Montes-Cano *et al.*, 2009). Toutefois, ces observations de pathologie humaine ne permettent pas de déterminer que ce mode de transmission entre la mère et l'enfant est usuel, encore moins que celui-ci revêt une importance en terme de fréquence d'acquisition du champignon par les populations humaines.

## 6. PHYSIOPATHOLOGIE

### 6.1. Mécanismes de défense de l'hôte

Dans l'alvéole, les macrophages se lient à *Pneumocystis*, le phagocytent puis le dégradent (Limper *et al.*, 1997a). La liaison avec le macrophage se fait par l'intermédiaire de la glycoprotéine majeure de surface (MSG) et du  $\beta$ -1,3-D-glucane

(Ezekowitz *et al.*, 1991 ; Hoffman *et al.*, 1993). La MSG peut également se lier à la vitronectine, la fibronectine et la protéine A du surfactant (SP-A) qui agissent comme des opsonines facilitant l'adhésion aux macrophages (Linke *et al.*, 2009). Le  $\beta$ -1,3-D-glucane, également lié à la vitronectine et la fibronectine, active les macrophages qui produisent le « tumor necrosis factor » (TNF)- $\alpha$ . Le TNF- $\alpha$  joue un rôle essentiel dans la clairance de l'infection (Limper *et al.*, 1997b) en favorisant le recrutement des polynucléaires neutrophiles, des lymphocytes et des monocytes (Thomas et Limper, 2007; Lu et Lee, 2008).

Les lymphocytes CD4 $^{+}$  activés sécrètent de l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et de l'interleukine 4 qui activent respectivement les macrophages et les lymphocytes B. D'autre part, l'IFN- $\gamma$  augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, et diminue l'expression des intégrines sur les cellules épithéliales alvéolaires réduisant ainsi l'adhésion de *Pneumocystis* (Pottratz *et al.*, 1997 ; Downing *et al.*, 1999). La baisse de production de l'IFN- $\gamma$  lors des déficits en lymphocytes CD4 $^{+}$  serait une des causes de la réceptivité à *Pneumocystis* (Garvy *et al.*, 1997).

Les lymphocytes B, par leur production d'anticorps spécifiques, facilitent la phagocytose par les macrophages alvéolaires (Taylor *et al.*, 1992). Leur rôle serait également d'activer les lymphocytes CD4 $^{+}$  (Lund *et al.*, 2003). Ceci explique la réceptivité pour *Pneumocystis* des patients présentant une agammaglobulinémie ou une hypoglobulinémie sans déficit de l'immunité cellulaire associé (Saulsbury *et al.*, 1979 ; Rao et Gelfand, 1983 ; Alibrahim *et al.*, 1998).

### 6.2. Mécanismes d'échappement de *Pneumocystis*

*Pneumocystis* peut limiter sa phagocytose par les macrophages en sécrétant de la MSG libre qui va entrer en compétition avec la MSG membranaire (Pop *et al.*, 2006). Le champignon sécrète des polyamines qui pourraient induire l'apoptose des macrophages (Lu et Lee, 2008). La liaison étroite avec les pneumocytes de type I conduit à terme à la dégradation de ces cellules épithéliales. La modification du surfactant au cours de la PPC (Prevost *et al.*, 1998; Atochina *et al.*, 2000) est à l'origine de l'augmentation de la tension superficielle et de la diminution de la compliance pulmonaire (Wright *et al.*, 2001). La formation d'un œdème pulmonaire est due à l'excédent des protéines plasmatiques en raison de l'augmentation de la perméabilité endothéliale. Ceci est favorisé par une sécrétion trop importante de TNF- $\alpha$ . L'augmentation de la SP-D du surfactant entraîne l'agrégation de *Pneumocystis* empêchant sa phagocytose par les macrophages

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

alvéolaires (Yong *et al.*, 2003). Ces phénomènes associés à la multiplication du champignon dans l'alvéole pulmonaire entraînent la modification des échanges gazeux et l'hypoxie retrouvée au cours de la PPC.

### 6.3. Ancien concept de portage chronique et de réactivation

Longtemps, il a été admis que la PPC chez l'immunodéprimé résultait de la réactivation de formes quiescentes, en particulier des kystes portés de façon chronique et initialement acquis durant l'enfance. Ceci reposait d'une part, sur des enquêtes de séroprévalence montrant que des séroconversions vis-à-vis d'antigènes de *Pneumocystis* sont observées chez l'enfant dès les premières années et que les anticorps acquis persistent chez les adultes (Meuwissen *et al.*, 1977; Pifer *et al.*, 1978) et d'autre part, sur le fait qu'il était admis que des kystes de *Pjirovecii* pouvait être détectés dans des prélèvements pulmonaires d'individus « sains », le champignon étant un « saprophyte » des poumons humains. Ce postulat reposait sur des observations et des enquêtes des années 50 et 70 fréquemment citées en références (Walzer *et al.*, 1977b). Ainsi, Sheldon a retrouvé le champignon dans des prélèvements pulmonaires nécropsiques de trois nourrissons décédés de mort subite et d'un enfant de 10 ans dont la mort était due à une insuffisance rénale aiguë. L'absence de "pneumopathie interstitielle plasmocytaire", seule forme clinique et anatomopathologique connue à l'époque et considérée comme nécessaire pour retenir le diagnostic, a conduit l'auteur à évoquer des infections "asymptomatiques" et la latence de *Pjirovecii* (Sheldon, 1959). Sedaghatian et Singer ont examiné 267 nécropsies d'enfants cancéreux et ont retrouvé le champignon chez 15 patients (5,6%). Ces résultats ont été interprétés comme la démonstration du saprophytisme de *Pjirovecii* (Sedaghatian et Singer, 1972). Hamlin a examiné 655 nécropsies et retrouvé des kystes de *Pjirovecii* chez 15/300 (5%) patients leucémiques ou atteints de lymphomes, chez 1/110 (0.9%) nourrissons prématurés ou mort-nés et chez aucun des 245 autres patients (Hamlin, 1968). Cette étude a été fréquemment et de façon erronée citée comme un argument en faveur du saprophytisme et du concept de porteurs sains alors que l'auteur lui-même avait considéré que ces rares cas de détection de *Pjirovecii* correspondaient à de réelles PPC dont le diagnostic avait été occulté. Il apparaît évident aujourd'hui que les concepts de saprophytisme et de porteurs sains, dont la démonstration imposait la détection du champignon chez des personnes immunocompétentes et asymptomatiques, ne pouvaient être réellement supportés par ces observations décrites dans leur ensemble chez des patients symptomatiques présentant des facteurs de risque d'infections par *Pjirovecii*.

### 6.4. Nouveau concept d'acquisition *de novo* et de colonisation occasionnelle

Depuis l'avènement des techniques de PCR, l'hypothèse de portage chronique de *Pjirovecii* chez le sujet sain et de la survenue de PPC chez le patient immunodéprimé comme résultant d'une réactivation à partir de ce portage a été réévaluée. En effet, malgré l'utilisation de cette technique sensible, le champignon n'a pas été détecté dans des prélèvements pulmonaires nécropsiques de patients *a priori* immunocompétents et sans maladie pulmonaire (Peters *et al.*, 1992). Des génotypes de *Pjirovecii* différents ont été identifiés au cours d'épisodes récurrents de PPC (Keely *et al.*, 1996 ; Tsolaki *et al.*, 1996 ; Latouche *et al.*, 1997b). De plus, il a été établi chez les modèles animaux qu'après un épisode de PPC, l'élimination du champignon pouvait être complète et que l'état d'immunosuppression seul pouvait être insuffisant pour que survienne l'infection (Chen *et al.*, 1993 ; Vargas *et al.*, 1995). Ces données montrent que la PPC chez l'immunodéprimé peut résulter de l'acquisition *de novo* du champignon.

De façon contemporaine, alors que le portage chronique était récusé, des populations colonisées par *Pjirovecii* de façon transitoire et casuelle ont été identifiées. En effet, de faibles charges fongiques non détectables par microscopie ont été détectées par PCR dans des prélèvements pulmonaires chez des patients présentant des maladies pulmonaires aiguës ou chroniques associées ou non à des états d'immunodépression, des nourrissons sans déficit immunitaire mais naïfs vis-à-vis du champignon et développant une primo-infection à *Pneumocystis*, des femmes enceintes soumises à des modifications physiologiques de l'immunité, des personnels des hôpitaux en contact ou non avec des patients développant une PPC (Peterson et Cushion, 2005). En somme, des contacts fréquents et récurrents avec *Pjirovecii* conduisant à des colonisations pulmonaires transitoires ou casuelles, plutôt qu'un portage chronique depuis l'enfance, pourraient expliquer la séroprévalence élevée dans les populations humaines.

En revanche, des données récentes concernant la présence de *Pjirovecii* chez les sujets sains apparaissent contradictoires. Le champignon n'a pas été détecté par PCR dans les expectorations de 50 sujets présentant des valeurs normales des épreuves fonctionnelles respiratoires et des lymphocytes CD4<sup>+</sup> sanguins (Nevez *et al.*, 2006b). Ponce et collaborateurs ont détecté le champignon par PCR et immunofluorescence chez 34/55 (62%) patients décédés de mort violente (Ponce *et al.*, 2010). Ces résultats sont en opposition avec ceux observés en Grande Bretagne (Peters *et al.*, 1992). Ces pourcentages élevés (62%) ne sont pas

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

compatibles avec les faibles pourcentages usuels (15%) de détection de *P.jirovecii* par microscopie et PCR dans les échantillons de lavage broncho-alvéolaire lors du diagnostic de routine (Nevez *et al.*, 1999).

Quoiqu'il en soit, c'est la réactivation de stades quiescents portés de façon chronique depuis l'enfance qui est actuellement récusée. En fait, la PPC pourrait résulter, soit de l'acquisition *de novo* de *P.jirovecii*, soit de l'aggravation d'un état de colonisation qui pourrait correspondre alors à une phase d'incubation de l'infection.

## 7. PRÉSENTATIONS CLINIQUES

Les patients infectés par le VIH constituent la population la plus représentative des sujets à risque de développer une PPC. Le taux d'attaque était de 60 à 80 % en l'absence de prévention et de traitement antiviral (Centers for Disease Control and Prevention, 1993). Les patients immunodéprimés non infectés par le VIH constituent une population plus hétérogène avec des taux d'attaque variables en fonction de la maladie sous jacente et des traitements immunomodulateurs associés. Ces taux peuvent s'élever respectivement à 15%, 40%, 12%, 2 %, et 1% lors de transplantation de rein, de leucémie lymphoblastique, de maladie de Wegener, de collagénoses autres, et de cancers solides (Sepkowitz *et al.*, 2002). Les enfants présentant des déficits immunitaires combinés sévères et des agammaglobulinémies sont également à risque (Saulsbury *et al.*, 1979). Les taux d'attaques semblent élevés mais ceux-ci ne sont pas clairement renseignés pour ces maladies rares dont l'incidence est de 0,5 à 2 par million de naissances ([www.orpha.net](http://www.orpha.net)).

La PPC est une pneumonie alvéolo-interstitielle bilatérale se révélant au scanner thoracique par des images en verre dépoli (Huang, 2005). Les patients présentent une dyspnée rapidement progressive, associée à une toux et une fièvre. Cette triade est retrouvée dans près de 50% des cas alors que les signes d'examen sont pauvres. Il existe souvent une dissociation des signes fonctionnels et des signes physiques. D'autres formes cliniques pulmonaires sont décrites, telles que des pneumothorax, des pneumonies en foyer ou systématisées, et même des miliaires lors de PPC granulomateuses (Hartel *et al.*, 2010).

Les localisations extra pulmonaires sont exceptionnelles mais connues. Elles surviennent le plus souvent lors de dissémination au cours de PPC mais des localisations isolées extra pulmonaires ont été décrites (Ng *et al.*, 1997).

Les colonisations pulmonaires évoquées plus haut pourraient se rapporter à des formes d'infections pulmonaires plus torpides, en particulier chez des patients présentant des broncho-pneumopathies chroniques obstructives (Morris *et al.*, 2008), des sarcoïdoses (Nevez *et al.*, 2002), des mucoviscidoses (Le Gal *et al.*, 2010). Celles-ci sont encore mal caractérisées mais il est légitime de penser que le champignon puisse être un facteur aggravant la symptomatologie respiratoire chez ces patients.

## 8. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

### 8.1. Les prélèvements

Le diagnostic biologique des infections à *P.jirovecii* repose essentiellement sur la détection du champignon dans des prélèvements pulmonaires plus rarement dans d'autres échantillons biologiques lors de localisations extra pulmonaires. Ce diagnostic a été initialement posé par l'examen microscopique de tissus pulmonaires post-mortem (Chagas, 1911 ; Gajduzek, 1957) puis d'aspirations naso-pharyngées ou trachéales en particulier chez les nourrissons (Le Tan Vinh *et al.*, 1963, Kucera et Valouzek, 1966) et d'expectorations (Fortuny *et al.*, 1970 ; Smith et Wiggins, 1973). D'autres prélèvements tels que les biopsies pulmonaires trans-pariétales, trans-bronchiques et les brosses bronchiques ont été présentées comme des prélèvements permettant la détection microscopique du champignon (Jacobs *et al.*, 1969 ; Repsher *et al.*, 1972; Finley *et al.*, 1974). Cependant, le lavage broncho-alvéolaire (LBA) pratiqué au cours d'une fibroscopie broncho-pulmonaire est le prélèvement essentiel pour le diagnostic de PPC, en particulier chez les patients infectés par le VIH (Ognibene *et al.*, 1984 ; Hartman *et al.*, 1985). A la fin des années 80, l'augmentation de l'incidence du SIDA et des infections à *Pneumocystis* ainsi que la place prépondérante de *Pneumocystis* dans l'étiologie des pneumonies interstitielles chez les sidéens ont conduit à proposer l'expectoration induite comme alternative au LBA (Bigby *et al.*, 1986). Celle-ci doit être effectuée avec l'aide de kinésithérapie respiratoire après nébulisation d'un sérum hypertonique à 3% pendant 20 minutes. L'examen d'une expectoration induite peut constituer une première approche mais lorsqu'elle est négative, celle-ci doit être suivie d'un LBA pour confirmer l'absence de *Pneumocystis* et élargir le champ du diagnostic étiologique (Roux et Girard, 1990).

### 8.2. Les colorations

La cytocentrifugation des échantillons de LBA avant coloration a été proposée pour améliorer le confort et la rapidité de lecture des lames (Gill *et al.*,

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

1988). La coloration au May Grünwald Giemsa est une coloration panoptique largement utilisée en biologie médicale. Elle colore en bleu les composés basophiles tels que les cytoplasmes et en pourpre les composés acidophiles tels que les noyaux. Les amas de *P.jirovecii* constitués de formes trophiques et de kystes agglomérés sont aisément détectables à faible grossissement microscopique ( $20 \times 10$ ) (Figure 2).

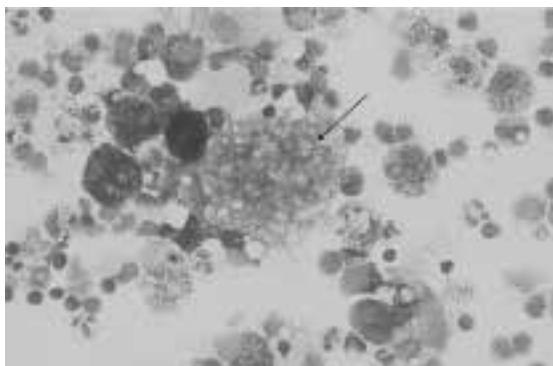


Figure 2. Amas de *P. jirovecii* constitué de formes trophiques et de kystes agglutinés (May Grünwald Giemsa,  $\times 200$ ).

Les formes trophiques isolées ainsi que les corps intra-kystiques peuvent être visualisés à plus fort grossissement ( $100 \times 10$ ) (Figures 3, 4 et 5). La coloration de Chalvardjian (Chalvardjian et Grawe, 1963) permet de détecter les kystes qui apparaissent colorés en violet par le bleu d'ortho toluidine (Figure 6). Les formes trophiques ne sont pas colorées par cette technique. Les mêmes stades sont colorés par la coloration de Grocott dérivée de celle de Gomori (Grocott, 1955) et sa variante d'exécution plus rapide décrite par Musto (Musto *et al.*, 1982). Ces colorations sont moins utilisées aujourd'hui en raison de leur potentiel toxicité. La coloration à l'acide périodique (PAS), celle de Papanicolaou et celle de Gram-Weigert permettent

respectivement de visualiser la paroi des kystes, les noyaux des corps intra-kystiques, la paroi des kystes et les noyaux des corps intra-kystiques (Marty *et al.*,

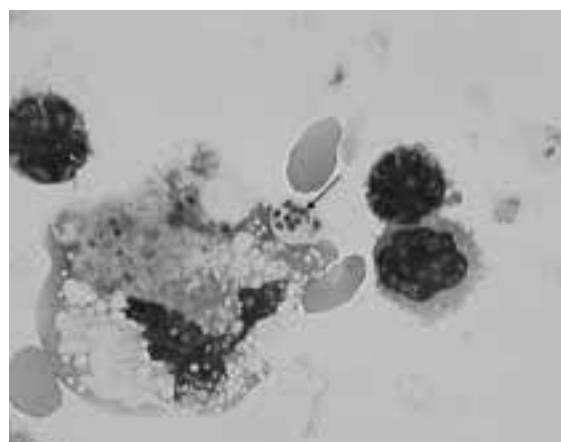


Figure 4. Kyste mature contenant huit corps intra-kystiques (flèche) (May Grünwald Giemsa,  $\times 1000$ )

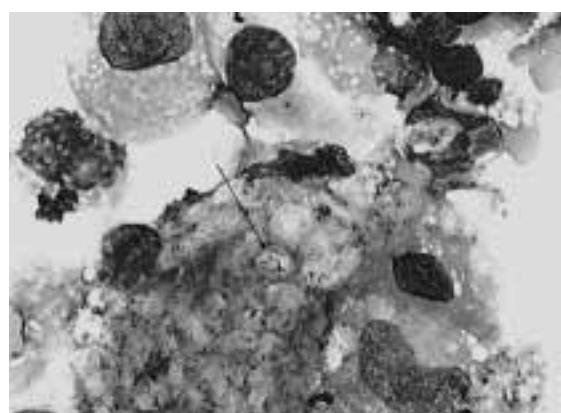


Figure 5. Corps intra-kystiques en forme de "banane" (flèche) (May Grünwald Giemsa,  $\times 1000$ )



Figure 3. Formes végétatives isolées (flèches) (May Grünwald Giemsa,  $\times 1000$ )

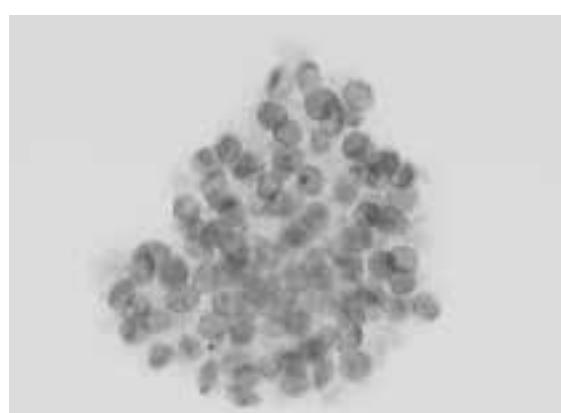


Figure 6. Amas de kystes dont la paroi est colorée en violet (Chalvardjian,  $\times 400$ )

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

1981). Celles-ci ne sont cependant pas utilisées couramment pour le diagnostic biologique des infections à *Pjirovecii*. En revanche, la coloration par l'hémalun éosine, qui reste une coloration de base pour les examens en anatomie pathologie permet de détecter les amas de *Pjirovecii* dont l'aspect en coupe est dit classiquement en « rayon de miel » (van der Meer et Brug, 1942). Le tableau I résume les résultats obtenus en microscopie en fonction des différentes colorations et des stades parasitaires observés.

Au milieu des années 80, la production d'anticorps monoclonaux spécifiques de *Pneumocystis* a permis de développer des techniques d'immuno-détection, en particulier l'immunofluorescence, qui sont applicables en routine. Ces techniques sont plus sensibles que les colorations pratiquées sur les LBA et les expectorations induites (Kovacs *et al.*, 1986 ; Kovacs *et al.*, 1988 ; Linder *et al.*, 1986 ; Dournon *et al.*, 1989). L'utilisation d'anticorps spécifiques de kystes permet d'obtenir des images de bonne qualité avec un bruit de fond limité (Figure 7) contrairement à l'utilisation d'anticorps spécifiques à la fois des formes trophiques et des kystes. En effet, les formes trophiques isolées qui sont très polymorphes doivent être rapidement distinguées du bruit de fond avant que l'extinction de fluorescence n'en limite l'observation. Cette observation rapide requiert une grande expérience.

Les colorations par des dérivés du stilbène révélant les copolymères de chitine-glucanes des champignons lors d'un examen microscopique en fluorescence ultraviolette ont été présentées comme



Figure 7. Amas de kystes (Immuno-fluorescence indirecte, anticorps anti kystes, x 250)

une alternative aux colorations classiques et aux immunodétections. Ces colorations sont répandues pour l'examen direct en mycologie mais sont en fait peu utilisées pour la détection particulière de *Pjirovecii* (Stratton *et al.*, 1991).

### 8.3. L'amplification d'ADN de *Pneumocystis* par PCR

Depuis la publication principe de Wakefield et collaborateurs (Wakefield *et al.*, 1990) des techniques de PCR manuelle en une étape, nichée, en temps réel ou quantitative avec des sondes d'hydrolyse ou d'hybridation ont été développées pour amplifier l'ADN de *Pjirovecii*. Les cibles retenues sont les gènes et loci codant pour l'ARN de la grande sous unité du ribosome de la mitochondrie

Tableau I. Colorations utilisées en microscopie pour la détection des stades de *Pneumocystis*

Coloration	Formes trophiques	Kystes	Corps intra-kystiques
<b>May Grünwald Giemsa</b>	+ Noyau pourpre Cytoplasme bleu	-	+ Noyau pourpre Cytoplasme bleu
<b>Chalvardjian</b>	-	+ Paroi colorée en violet	-
<b>Musto</b>	-	+ Paroi colorée en brun noir	-
<b>Periodic Acid Schiff (PAS)</b>	-	+ Paroi colorée en rouge	-
<b>Hémalun Eosine Safran</b>	+/-	-	+ Rose
<b>Gram-Weigert</b>	+/- Rose	+ Paroi colorée en violet	+ Rose
<b>Papanicolaou</b>	+/-	-	+ Pourpre

Notes, +, coloré ; -, non coloré ; +/-, faible affinité pour la coloration

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

(mtLSUrRNA) (Wakefield *et al.*, 1990 ; Méliani *et al.*, 2003 ; Alanio *et al.*, 2010), l'ARN de la petite sous unité du ribosome de la mitochondrie (Tsolaki *et al.*, 1998), la « major surface glycoprotein » (MSG) (Kovacs *et al.*, 1993 ; Larsen *et al.*, 2002), la thymidilate synthétase (TS) (Olsson *et al.*, 1993), la dihydroptéroate synthétase (DHPS) (Lane *et al.*, 1997 ; Ndam *et al.*, 2003, Alvarez-Martinez *et al.*, 2006), la dihydrofolate réductase (Schluger *et al.*, 1992 ; Bandt *et al.*, 2007), les ARN ribosomiques 18 S (ARNr 18S) (Lu *et al.*, 1995), et 5 S (Kitada *et al.*, 1991 ; Palladino *et al.*, 2001), la tubuline (Edlind *et al.*, 1992 ; Brancart *et al.*, 2005), les « internal transcribed spacers » (ITS) 1 et 2 de l'opéron nucléaire de l'ARN ribosomal (Lu *et al.*, 1994 ; Tsolaki *et al.*, 1996 ; Lee *et al.*, 1998), une protéine fonctionnelle du cycle de division cellulaire (Cdc2) (Kaiser *et al.*, 2001), la « heat shock protein (HSP) 70 (Hugget *et al.*, 2008), une sérine endoprotéase (Rohner *et al.*, 2009). La cible la plus fréquemment choisie pour le diagnostic reste le gène de la mtLSUrRNA. Les techniques de PCR amplifiant cette cible sont décrites comme les plus sensibles et spécifiques (Lundgren et Wakefield, 1998 ; Robberts *et al.*, 2005). En revanche, des amorces décrites pour l'amplification du gène de la TS, de l'ARNr 18 S, des ITS 1 et 2 peuvent amplifier de l'ADN de *Candida* et de *Saccharomyces* (Lu *et al.* 1995; Lu *et al.* 1994).

La spécificité et la sensibilité d'une méthode de détection par PCR varient en fonction de la cible amplifiée, de la technique, ainsi que de la qualité des prélèvements analysés. Une mété-analyse des données publiées sur une période de dix ans permet de retrouver des valeurs de sensibilité et de spécificité de la PCR de 99,1% et 92,6% sur des LBA et de 87% et 96% sur des expectorations (Helweg-Larsen, 2004). En somme, c'est une valeur prédictive négative proche de 100% qui fait tout l'intérêt de la PCR sur LBA.

De manière générale, la PCR permet de détecter le champignon alors que celui-ci peut être occulté par les techniques microscopiques. Dans la mesure où il est admis que les infections à *P.jirovecii* résultent de l'acquisition *de novo* du champignon et non de la réactivation d'un portage chronique de stades quiescents, un résultat de PCR positif doit être *a priori* interprété comme le reflet d'une infection évolutive. Toutefois, de faibles charges fongiques peuvent être détectées chez des patients présentant un diagnostic alternatif à la PPC et une amélioration clinique malgré l'absence de traitement spécifique contre le champignon. Dans ce contexte, le terme de colonisation pulmonaire par *P.jirovecii* est souvent retenu *a posteriori*. La différenciation entre PPC et colonisation basée sur la quantification de la charge fongique présente dans les échantillons pul-

monaires à l'aide d'une PCR quantitative a été proposée (Larsen *et al.*, 2002 ; Flori *et al.*, 2004 ; Bandt *et al.*, 2007 ; Hugget *et al.*, 2008 ; Fujisawa *et al.*, 2009 ; Alanio *et al.*, 2010). Bien qu'il semble exister un lien entre la charge fongique et la gravité de l'infection, il reste difficile d'établir une telle corrélation puisqu'il n'est pas possible de standardiser l'échantillon pulmonaire initial faisant l'objet de la PCR quantitative.

Un autre avantage de la PCR est de pouvoir détecter de faibles charges fongiques chez des patients développant des PPC granulomateuses pour lesquelles le diagnostic mycologique direct est généralement négatif (Wakefield *et al.*, 1994a.)

Des trousseaux diagnostiques prêtés à l'emploi seront prochainement commercialisées et pourront remplacer les techniques « faites maison » actuellement réalisées par les laboratoires spécialisés. Leur utilisation permettra de limiter les variations inter-laboratoires.

#### 8.4. Culture de *Pneumocystis*

La culture de *P.jirovecii* ne peut être réalisée en routine dans le cadre du diagnostic. *P.carinii* peut être cultivé sur des cellules épithéliales de poumons de rats pendant 7 à 10 jours (Aliouat *et al.*, 1995 ; Atzori *et al.*, 1998). Une équipe a obtenu expérimentalement la culture continue de *Pcarinii* en milieu liquide acellulaire mais ces résultats n'ont pu être reproduits (Merali *et al.*, 1999).

#### 8.5. Diagnostic sérologique et diagnostic biologique non spécifique

La détection des anticorps dirigés contre des fractions de la MSG pourrait représenter une approche pour le diagnostic sérologique de la PPC mais celle-ci n'a pas été développée pour une pratique de routine (Walzer *et al.*, 2009). La détection du β-1,3-D-glucane sérique pour le diagnostic des infections fongiques invasives a trouvé des applications pour celui de la PPC (Desmet *et al.*, 2009 ; Shimizu *et al.*, 2009). Cependant, ce test représente une méthode de diagnostic de deuxième intention car la mise en œuvre du diagnostic mycologique direct reste prioritaire.

La PaO<sub>2</sub> est abaissée. Une valeur inférieure à 70 mm Hg est un signe de gravité. Près de 80% des patients développant une PPC présentent une élévation des lactates déshydrogénases sériques (Huang, 2005). Toutefois, il est difficile d'utiliser l'élévation de ces enzymes sériques comme marqueur diagnostique de la PPC (Huang, 2005).

## ■ 9. IDENTIFICATION GÉNOTYPIQUE

Plusieurs approches ont été développées pour aborder l'identification génotypique de *P.jirovecii*. Il s'agit de méthodes basées sur l'analyse d'un ou plusieurs loci, avec ou sans séquençage (Hauser *et al.* 1998 ; Beard *et al.* 2004). Les loci les plus fréquemment retenus sont ceux codant la mtLSUrRNA (Lee *et al.*, 1993 ; Wakefield *et al.*, 1994b; Latouche *et al.*, 1997c ; Wakefield, 1998), les ITS1 et 2 (Tsolaki *et al.*, 1996 ; Lee *et al.*, 1998 ; Nevez *et al.*, 2003 ; Totet *et al.*, 2003), la DHPS (Lane *et al.*, 1997), la MSG (Ma *et al.*, 2002a ; Ripamonti *et al.*, 2009).

Le polymorphisme du locus de la mtLSUrRNA est limité aux mutations sur les quatre positions nucléotidiques 81, 85, 248, et 288, les positions 85 et 248 étant les plus fréquemment impliquées. Sept types ont été effectivement identifiés à partir du polymorphisme de ces positions (Wakefield, 1998 ; Latouche *et al.*, 1997c). Le polymorphisme des ITS1 et 2 est plus important. Un type ITS de *P.jirovecii* résulte de l'association d'un allèle ITS 1 et d'un allèle ITS 2. Environ soixante types ont été décrits mais les types Eg et Ne représentent près de 50% des types identifiés (Lee *et al.*, 1998 ; Beard *et al.*, 2004).

L'analyse du locus de la DHPS occupe une place singulière dans les techniques de génotypage puisque la DHPS est l'enzyme cible des sulfamides et des sulfones qui sont largement utilisés comme traitements préventifs et curatifs des infections à *P.jirovecii*. Le polymorphisme de ce locus est faible mais deux principales mutations non synonymes ont été détectées en positions 165 et 171 (Lane *et al.*, 1997 ; Ma *et al.*, 1999). L'analyse des séquences incluant ces positions permet d'identifier de simples mutants présentant une mutation sur une seule position et des doubles mutants présentant les deux mutations. Les facteurs de risques principaux pour développer une infection par des mutants sont les antécédents de traitement par sulfamides et le lieu de résidence des patients (Kazanjian *et al.* 1998 ; Beard *et al.* 2000; Huang *et al.* 2000 ; Huang *et al.* 2001). Ces deux facteurs sont compatibles avec l'hypothèse que le champignon est transmis des patients infectés traités à des patients susceptibles non traités, soit directement soit via une hypothétique source environnementale commune. Pour ces raisons, l'analyse du locus de la DHPS peut servir de marqueur de circulation de *P.jirovecii* (Totet *et al.*, 2004a ; Hauser *et al.*, 2010).

Une vingtaine de mutations non synonymes ont été décrites sur le gène de la DHFR, l'enzyme cible des pyrimidines (Costa *et al.*, 2006; Robberts *et al.*, 2005 ; Nahimana *et al.*, 2004 ; Takahashi *et al.*, 2002). Seize de ces mutations ont été détectées chez

une même cohorte de patients (Nahimana *et al.*, 2004). Le facteur de risque pour développer une infection par des mutants est représenté par les antécédents de traitement par pyriméthamine plutôt que par triméthoprime (Nahimana *et al.*, 2004 ; Ma *et al.*, 2002b).

Le cytochrome b est la cible de l'atovaquone qui est un traitement de deuxième intention. Neuf mutations non synonymes ont été décrites sur le gène du cytochrome b, dont sept concernent le site de fixation de l'ubiquinone/coenzyme Q (Walker *et al.*, 1998 ; Kazanjian *et al.*, 2001 ; Takahashi *et al.*, 2002 ; Esteves *et al.*, 2010). Le facteur de risque pour développer une infection par des mutants sur ce gène est représenté par les antécédents de traitement par atovaquone (Kazanjian *et al.*, 2001).

Le polymorphisme des gènes codant la TS et la superoxyde dismutase manganèse dépendante ainsi que celui du gène « arom » est limité. Il est rarement exploité en pratique pour l'identification génotypique de *P.jirovecii* (Latouche *et al.*, 1997c ; Wakefield, 1998 ; Miller *et al.*, 2005 ; Esteves *et al.*, 2010).

Des techniques de PCR-« restriction fragment length polymorphism » (RFLP) sur les loci de la DHPS et de la MSG ont été développées (Diop Santos *et al.*, 1999 ; Ripamonti *et al.*, 2009). Les avantages de ces techniques sont leur moindre coût et leur rapidité puisqu'elles s'affranchissent du séquençage. Hauser et collaborateurs (Hauser *et al.*, 1998) ont développé une technique de « single strand conformation polymorphism » (SSCP) sur les gènes de la mtLSUrRNA, de l'ARN de la grande sous unité du ribosome, la tubuline, et de l'ITS 1. Cette technique multilocus est considérée comme la technique la plus discriminante (Hauser *et al.*, 2001 ; Beard *et al.*, 2004). Elle est en revanche moins sensible que celle basée sur le séquençage des ITS1 et 2 pour le génotypage de *P.jirovecii* provenant de patients infectés par de faibles charges fongiques. Par ailleurs, les résultats de génotypage obtenus à l'aide des techniques de PCR-RFLP sur la MSG ou de SSCP par des équipes différentes sont difficilement comparables, contrairement aux résultats obtenus par séquençage.

L'apport du génotypage de *P.jirovecii* à l'épidémiologie de la pneumocystose est majeur. Il a été montré que des épisodes récurrents de PPC pouvaient se rapporter à des génotypes différents et donc résulter de réinfections à partir d'une source exogène plutôt que de réactivation à partir d'une source endogène (Keely *et al.*, 1996 ; Latouche *et al.*, 1997b). Les co-infections par des génotypes différents sont fréquentes (Tsolaki *et al.*, 1996) et peuvent représenter jusqu'à 80% des infections (Robberts *et al.*, 2004). Ceci indique que les infec-

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

tions à *Pjirovecii* ne sont pas nécessairement clonales mais résultent de l'acquisition et de la multiplication de plusieurs souches de *Pjirovecii*. Par ailleurs, des génotypes différents peuvent être compartimentés dans des territoires pulmonaires différents (Helweg-Larsen *et al.*, 2001). La PPC chez les immunodéprimés, qu'ils soient infectés ou non infectés par le VIH, la colonisation pulmonaire chez les patients présentant un diagnostic alternatif à la PPC, la primo-infection chez le nourrisson immuno-compétent, peuvent être dues aux mêmes génotypes fongiques (Nevez *et al.*, 2003 ; Totet *et al.*, 2003 ; Totet *et al.*, 2004b). Ceci suggère que ces diverses populations de patients aux présentations cliniques variées constituent un même réservoir humain de *Pjirovecii*. Par ailleurs, les travaux de génotypage combinés avec l'analyse des contages entre patients dans un contexte de cas groupés de PPC survenus dans les hôpitaux ont permis de soutenir l'hypothèse d'acquisition et de transmission nosocomiales de *Pjirovecii* (cf. paragraphe 5.2).

## ■ 10. TRAITEMENT, SENSIBILITÉ AUX ANTI-PNEUMOCYSTIQUES ET PRÉVENTION

Le traitement de première intention d'une infection par *Pjirovecii* reste le Bactrim®, (*i.e.* l'association sulfaméthoxazole (75 mg/kg/j) - triméthoprime (15 mg/kg/j), durant 21 jours. Par analogie avec d'autres microorganismes tels que *Plasmodium* (Brooks *et al.*, 1994) mais aussi en raison de résultats de tests *in vitro* (Iliades *et al.*, 2004), il est admis que les mutants DHPS présentent une moindre sensibilité aux sulfamides. Toutefois, la présence de mutants chez les patients développant une PPC ne semble pas conduire en pratique à des échecs thérapeutiques patents. Le traitement par Pentacarinat® (pentamidine) par voie intra veineuse (4mg/kg/j) durant 14 jours représente une alternative. La Wellvone® (atoovaquone) (1500mg/j) est réservée aux PPC moins sévères si le Bactrim® ne peut être utilisé. Les associations Dalacine® (clindamycine) (1800mg/j) - primaquine (15 mg/j) ou Disulone® (dapsone) (100mg/j) – triméthoprime (20 mg/kg) présentées aux Etats-Unis comme d'autres alternatives ne peuvent en pratique être prescrites en France en raison de l'absence de disponibilité du triméthoprime et de la disponibilité de la primaquine restreinte à une autorisation temporaire d'utilisation.

La chimioprophylaxie des infections à *Pjirovecii* doit reposer en première intention sur le Bactrim® Forte [(sulfaméthoxazole (800mg/kg/j) - triméthoprime (160 mg)], tous les deux jours] bien que la présence de mutants DHPS chez les patients infectés ait été corrélée aux échecs de prophylaxie par les

sulfamides (Kazanjian *et al.*, 1998). Les aérosols de Pentacarinat® (pentamidine) avec une fréquence mensuelle représentent une alternative. L'association Disulone® (dapsone) (50mg/j) - Malocide® (pyriméthamine) (50 mg/semaine) est une autre alternative, bien que la présence de mutants DHFR chez les patients infectés ait été corrélée à des échecs de prophylaxie par pyriméthamine (Nahimana *et al.*, 2004 ; Ma *et al.*, 2002b).

Les données de l'autorisation de la mise sur le marché (AMM) de la Wellvone® (atoovaquone) ne comprennent pas son utilisation pour la prophylaxie. De même, les données de l'AMM du Cancidas® (caspofungine), de l'Ecalta® (anidulafungine) et de la Mycamine® (micafungine) ne comprennent pas pour l'instant leur utilisation pour la prophylaxie ni pour le traitement de la PPC bien que ces trois échinocandines soient actives sur *Pjirovecii* en raison de leur action inhibitrice sur la synthèse du β-1,3-D-glucane (Schmatz *et al.*, 1991 ; Bartlett *et al.*, 1996 ; Powles *et al.*, 1998 ; Ito *et al.*, 2000 ; Hof *et al.*, 2008).

Les patients infectés par le VIH doivent bénéficier d'une prophylaxie primaire ou secondaire s'ils présentent une valeur des lymphocytes CD4+ sanguins inférieure à 200 éléments par mm<sup>3</sup>, ou un taux inférieur à 15%, ou que le rapport des lymphocytes CD4+/CD8+ sanguins est inférieur à 0,2. (Masur *et al.*, 1989b, Yeni, 2010). Les critères biologiques sur lesquels reposent la décision d'instaurer une prophylaxie chez les patients immunodéprimés non infectés par le VIH sont moins définis. Si l'on s'appuie sur les lymphocytes CD4+ sanguins, il semble que dès 300 éléments par mm<sup>3</sup> une prévention pourrait être instaurée (Mansharamani *et al.*, 2000). Les patients transplantés rénaux reçoivent une prophylaxie durant au moins quatre mois après la transplantation (European Expert Group on Renal Transplantation, 2002).

La chimioprophylaxie reste l'approche primordiale pour la prévention des infections à *Pjirovecii*. Toutefois, elle pourrait s'avérer insuffisante. Ainsi les « centers for disease control and prevention » aux Etats-Unis recommandent d'éviter le partage de la chambre d'un patient développant une PPC avec un autre patient immunodéprimé susceptible (Siegel *et al.*, 2007). Compte tenu des données connues sur le mode de transmission des espèces de *Pneumocystis* et sur les cas groupés d'infections à *Pjirovecii* dans les hôpitaux, il est logique d'étendre ces recommandations à la prévention de type « gouttelettes » selon les propositions formulées par Rabodonirina et collaborateurs et appliquées à Lyon (Rabodonirina *et al.*, 1997). Toutefois, il n'existe pas de recommandations officielles nationales pour la prévention des infections nosocomiales à *Pjirovecii* en France.

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

## BIBLIOGRAPHIE

- Alanio, A., G. Desoubeaux, C. Sarfati, S. Hamane, A. Bergeron, E. Azoulay, J. M. Molina, F. Derouin, and J. Menotti. 2010. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. Clin Microbiol Infect. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03400.x.
- Alibrahim, A., M. Lepore, M. Lierl, A. Filipovich, and A. Assaad. 1998. *Pneumocystis carinii* pneumonia in an infant with X-linked agammaglobulinemia. J Allergy Clin Immunol 101:552-3.
- Aliouat, E. M., E. Dei-Cas, P. Billaut, L. Dujardin, and D. Camus. 1995. *Pneumocystis carinii* organisms from in vitro culture are highly infectious to the nude rat. Parasitol Res 81:82-5.
- Alvarez-Martinez, M. J., J. M. Miro, M. E. Valls, A. Moreno, P. V. Rivas, M. Sole, N. Benito, P. Domingo, C. Munoz, E. Rivera, H. J. Zar, G. Wissmann, A. R. Diehl, J. C. Prolla, M. T. de Anta, J. M. Gatell, P. E. Wilson, and S. R. Meshnick. 2006. Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 56:153-60.
- Amnich, O. 1938. Über die nichtsyphilitische interstitielle Pneumonie des ersten Kindesalters. Virchows Arch Path Anat 302:539-54.
- Atochina, E. N., M. F. Beers, S. T. Scanlon, A. M. Preston, and J. M. Beck. 2000. *P. carinii* induces selective alterations in component expression and biophysical activity of lung surfactant. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 278:L599-609.
- Atzori, C., E. M. Aliouat, M. S. Bartlett, L. Dujardin, A. Cargnel, and E. Dei-Cas. 1998. Current in vitro culture systems for *Pneumocystis*. FEMS Immunol Med Microbiol 22:169-72.
- Bandt, D., and S. Monecke. 2007. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii*. Transpl Infect Dis 9:196-202.
- Bartlett, M. S., W. L. Current, M. P. Goheen, C. J. Boylan, C. H. Lee, M. M. Shaw, S. F. Queener, and J. W. Smith. 1996. Semisynthetic echinocandins affect cell wall deposition of *Pneumocystis carinii* in vitro and in vivo. Antimicrob Agents Chemother 40:1811-6.
- Bartlett, M. S., S. H. Vermund, R. Jacobs, P. J. Durant, M. M. Shaw, J. W. Smith, X. Tang, J. J. Lu, B. Li, S. Jin, and C. H. Lee. 1997. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air samples: likely environmental risk to susceptible persons. J Clin Microbiol 35:2511-3.
- Beard, C. B., J. L. Carter, S. P. Keely, L. Huang, N. J. Pieniazek, I. N. Moura, J. M. Roberts, A. W. Hightower, M. S. Bens, A. R. Freeman, S. Lee, J. R. Stringer, J. S. Duchin, C. del Rio, D. Rimland, R. P. Baughman, D. A. Levy, V. J. Dietz, P. Simon, and T. R. Navin. 2000. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. Emerg Infect Dis 6:265-72.
- Beard, C. B., P. Roux, G. Nevez, P. M. Hauser, J. A. Kovacs, T. R. Unnasch, and B. Lundgren. 2004. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. Emerg Infect Dis 10:1729-35.
- Bigby, T. D., D. Margolskee, J. L. Curtis, P. F. Michael, D. Sheppard, W. K. Hadley, and P. C. Hopewell. 1986. The usefulness of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Am Rev Respir Dis 133:515-8.
- Brancart, F., H. Rodriguez-Villalobos, P.A. Fonteyne, D. Peres-Bota, and C. Liesnard. 2005. Quantitative TaqMan PCR for detection of *Pneumocystis jirovecii*. J Microbiol Methods 61:381-7.
- Brooks, D. R., P. Wang, M. Read, W. M. Watkins, P. F. Sims, and J. E. Hyde. 1994. Sequence variation of the hydroxymethylidihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. Eur J Biochem 224:397-405.
- Casanova-Cardiel, L., and M. J. Leibowitz. 1997. Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. J Eukaryot Microbiol 44(Suppl.):S28.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1993. HIV/AIDS surveillance report 1-23.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1997. HIV/AIDS surveillance report 9:1-37.
- Cere N, F. Drouet-Viard, E. Dei-Cas, N. Chanteloup, and P. Coudert. 1997. In utero transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. *oryctolagi*. Parasite 4:325-30.
- Chabe, M., E. Dei-Cas, C. Creusy, L. Fleurisse, N. Respaldiza, D. Camus, and I. Durand-Joly. 2004. Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: histological and RT-PCR data demonstrate active replication. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 23:89-97.
- Chagas C. 1909. Novo tripanosomazaea humana. Mem Inst Oswaldo Cruz 1:159-218.
- Chagas C. 1911. Nova entidade morbid do homem: regumo general de estudos etiologicos e clinicos. Mem Inst Oswaldo Cruz 3:219-75.
- Chalvardjian, A. M., and L. A. Grawe. 1963. A new procedure for the identification of *Pneumocystis carinii* cyst in tissue section and smears. Journal of clinical pathology 16:383-4.
- Chen, W., F. Gigliotti, and A. G. Harmsen. 1993. Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. Infect Immun 61:5406-9.
- Choukri, F., J. Menotti, C. Sarfati, J. C. Lucet, G. Nevez, Y. J. Garin, F. Derouin, and A. Totet. 2010. Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* pneumonia. Clin Infect Dis 51:259-65.
- Costa, M. C., F. Esteves, F. Antunes, and O. Matos. 2006. Genetic characterization of the dihydrofolate reductase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portugal. J Antimicrob Chemother 58:1246-9.
- de Boer, M. G., L. E. Bruijnestijn van Coppenraet, A. Gaasbeek, S. P. Berger, L. B. Gelinck, H. C. van Houwelingen, P. van den Broek, E. J. Kuijper, F. P. Kroon, and J. P. Vandebroucke. 2007. An outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia with 1 predominant genotype among renal transplant recipients: interhuman transmission or a common environmental source? Clin Infect Dis 44:1143-9.
- Dei-Cas, E., E. M. Aliouat, and J. C. Cailliez. 2005. *Pneumocystis* cellular structure, p. 61-94. In P. D. Walzer, and M. Cushion (ed.), *Pneumocystis* pneumonia, 3rd ed. Marcel Dekker, New York, NY.
- Delanoë, P., and M. Delanoë. 1912. Sur les rapports des kystes de Carini du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. C. R. Acad. Sci. (Paris) 155:658-60.
- Desmet, S., E. Van Wijngaerden, J. Maertens, J. Verhaegen, E. Verbeken, P. De Munter, W. Meersseman, B. Van Meensel, J. Van Eldere, and K. Lagrou. 2009. Serum (1-3)-beta-D-glucan as a tool for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection or hematological malignancy. J Clin Microbiol 47:3871-4.
- Diop Santos, L., P. Lacube, S. Latouche, G. Kac, C. Mayaud, M. Marteau, J. L. Poirot, E. Maury, J. Guillot, and P. Roux. 1999. Contribution of dihydropteroate synthase gene typing for *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis* epidemiology. J Eukaryot Microbiol 46(Suppl.):S133-4.

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

- Dournon, E., P. Rajagopalan, F. Albert, F. Camus, C. Marche, J. McLaughlin, D. Samuel, and A. G. Taylor. 1989. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by non-experts. Lancet 1:107-8.
- Downing, J. E., D. L. Kachel, R. Pasula, and W. J. Martin, 2nd. 1999. Gamma interferon stimulates rat alveolar macrophages to kill *Pneumocystis carinii* by L-arginine- and tumor necrosis factor-dependent mechanisms. Infect Immun 67:1347-52.
- Dumoulin, A., E. Mazars, N. Seguy, D. Gargallo-Viola, S. Vargas, J. C. Cailliez, E. M. Aliouat, A. E. Wakefield, and E. Dei-Cas. 2000. Transmission of *Pneumocystis carinii* disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 19:671-8.
- Edlind, T. D., M. S. Bartlett, G. A. Weinberg, G. N. Prah, and J. W. Smith. 1992. The beta-tubulin gene from rat and human isolates of *Pneumocystis carinii*. Mol Microbiol 6:3365-73.
- Edman, J. C., J. A. Kovacs, H. Masur, D. V. Santi, H. J. Elwood, and M. L. Sogin. 1988. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature 334:519-22.
- Eriksson, O. E. 1994. *Pneumocystis carinii*, a parasite in lungs of mammals, referred to a new family and order (Pneumocystidaceae, Pneumocystidales, Ascomycota). Systema Ascomycetum 13:165-180.
- Esteves, F., J. Gaspar, A. Tavares, I. Moser, F. Antunes, K. Mansinho, and O. Matos. 2010. Population structure of *Pneumocystis jirovecii* isolated from immunodeficiency virus-positive patients. Infect Genet Evol 10:192-9.
- EBPG Expert Group on Renal Transplantation. 2002. European best practice guidelines for renal transplantation. Section IV: Long-term management of the transplant recipient. IV.7.1 Late infections. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Nephrol Dial Transplant 17 Suppl 4:36-9.
- Ezekowitz, R. A., D. J. Williams, H. Koziel, M. Y. Armstrong, A. Warner, F. F. Richards, and R. M. Rose. 1991. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. Nature 351:155-8.
- Fillaux, J., S. Malvy, M. Alvarez, R. Fabre, S. Cassaing, B. Marchou, M. D. Linas, and A. Berry. 2008. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. J Microbiol Methods 75:258-61.
- Finley, R., E. Kieff, S. Thomsen, J. Fennessy, M. Beem, S. Lerner, and J. Morello. 1974. Bronchial brushing in the diagnosis of pulmonary disease in patients at risk for opportunistic infection. Am Rev Respir Dis 109:379-87.
- Flori, P., B. Bellete, F. Durand, H. Raberin, C. Cazorla, J. Hafid, F. Lucht, and R. T. Sung. 2004. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. J Med Microbiol 53:603-7.
- Fortuny, I. E., K. F. Tempero, and T. W. Amsden. 1970. *Pneumocystis carinii* pneumonia diagnosed from sputum and successfully treated with pentamidine isethionate. Cancer 26:911-3.
- Frenkel, J. K. 1976. *Pneumocystis jiroveci* n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. Natl Cancer Inst Monogr 43:13-30.
- Frenkel, J. K. 1999. *Pneumocystis* pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview. J Eukaryot Microbiol 46(Suppl.):S89-92.
- Fujisawa, T., T. Suda, H. Matsuda, N. Inui, Y. Nakamura, J. Sato, M. Toyoshima, Y. Nakano, K. Yasuda, H. Gemma, H. Hayakawa, and K. Chida. 2009. Real-time PCR is more specific than conventional PCR for induced sputum diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in immunocompromised patients without HIV infection. Respirology 14:203-9.
- Gajdusek, D. C. 1957. *Pneumocystis carinii*-Etiologic agent of interstitial plasma cell pneumonia of premature and young infants. Pediatrics 19:543-65.
- Garvy, B. A., R. A. Ezekowitz, and A. G. Harmsen. 1997. Role of gamma interferon in the host immune and inflammatory responses to *Pneumocystis carinii* infection. Infect Immun 65:373-9.
- Gianella, S., L. Haeberli, B. Joos, B. Ledermann, R. P. Wuthrich, R. Weber, H. Kuster, P. M. Hauser, T. Fehr, and N. J. Mueller. 2010. Molecular evidence of interhuman transmission in an outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among renal transplant recipients. Transpl Infect Dis 12:1-10.
- Gill, V. J., N. A. Nelson, F. Stock, and G. Evans. 1988. Optimal use of the cytocentrifuge for recovery and diagnosis of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage and sputum specimens. J Clin Microbiol 26:1641-4.
- Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon. 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med 305:1425-31.
- Grocott, R. G. 1955. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. Am J Clin Pathol 25:975-9.
- Hamlin, W. B. 1968. *Pneumocystis carinii*. JAMA 204:171-3.
- Hamperl, H. 1956. *Pneumocystis* infection and cytomegaly of the lungs in the newborn and adult. Am J Pathol 21:1-13.
- von Harnack, G. A. 1960. Organisatorische Probleme bei der Bekämpfung der interstitiellen Pneumonie. Mschr Kinderheilk 108:159-64.
- Hartel, P. H., K. Shilo, M. Klassen-Fischer, R. C. Neafie, I. H. Ozburak, J. R. Galvin, and T. J. Franks. 2010. Granulomatous reaction to *Pneumocystis jirovecii*: clinicopathologic review of 20 cases. Am J Surg Pathol 34:730-4.
- Hartman, B., M. Koss, A. Hui, W. Baumann, L. Athos, and T. Boylen. 1985. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Diagnosis with bronchial brushings, biopsy, and bronchoalveolar lavage. Chest 87:603-7.
- Hauser, P. M., D. S. Blanc, J. Bille, and P. Francioli. 1998. Typing methods to approach *Pneumocystis carinii* genetic heterogeneity. FEMS Immunol Med Microbiol 22:27-35.
- Hauser, P. M., D. S. Blanc, P. Sudre, E. Sengen Manoloff, A. Nahimana, J. Bille, R. Weber, and P. Francioli. 2001. Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* in HIV-positive and -negative patients as revealed by PCR-SSCP typing. AIDS 15:461-6.
- Hauser, P. M., A. Nahimana, P. Taffe, R. Weber, P. Francioli, J. Bille, and M. Rabodonirina. 2010. Interhuman transmission as a potential key parameter for geographical variation in the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutations. Clin Infect Dis 51:e28-33.
- Helweg-Larsen, J., A. G. Tsolaki, R. F. Miller, B. Lundgren, and A. E. Wakefield. 1998. Clusters of *Pneumocystis carinii* pneumonia: analysis of person-to-person transmission by genotyping. Q J Med 91:813-20.
- Helweg-Larsen, J., B. Lundgren, and J. D. Lundgren. 2001. Heterogeneity and compartmentalization of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* genotypes in autopsy lungs. J Clin Microbiol 39:3789-92.

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

- Helweg-Larsen, J.** 2004. *Pneumocystis jiroveci*. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. *Dan Med Bull* 51:251-73.
- Hocker, B., C. Wendt, A. Nahimana, B. Tonshoff, and P. M. Hauser.** 2005. Molecular evidence of *Pneumocystis* transmission in pediatric transplant unit. *Emerg Infect Dis* 11:330-2.
- Hof, H., and P. Schnulle.** 2008. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in a patient with Wegener's granulomatosis treated efficiently with caspofungin. *Mycoses* 51(Suppl.):65-7.
- Hoffman, O. A., J. E. Standing, and A. H. Limper.** 1993. *Pneumocystis carinii* stimulates tumor necrosis factor-alpha release from alveolar macrophages through a beta-glucan-mediated mechanism. *J Immunol* 150:3932-40.
- Huang, L., C. B. Beard, J. Creasman, D. Levy, J. S. Duchin, S. Lee, N. Pieniazek, J. L. Carter, C. del Rio, D. Rimland, and T. R. Navin.** 2000. Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *J Infect Dis* 182:1192-8.
- Huang, L., J. Friedly, A. M. Morris, J. L. Carter, J. R. Turner, C. Merrifield, T. R. Navin, and C. B. Beard.** 2001. *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase genotypes in HIV-infected persons residing in San Francisco: possible implications for disease transmission. *J Eukaryot Microbiol* 48(Suppl.):S137-8.
- Huang, L.** 2005. Clinical presentation and diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-infected patients, p. 349-406. In P. D. Walzer, and M. Cushion (ed.), *Pneumocystis* pneumonia, 3rd ed. Marcel Dekker, New York, NY.
- Huggett, J. F., M. S. Taylor, G. Kocjan, H. E. Evans, S. Morris-Jones, V. Gant, T. Novak, A. M. Costello, A. Zumla, and R. F. Miller.** 2008. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax* 63:154-9.
- Hughes, W. T.** 1982. Natural mode of acquisition for de novo infection with *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 145:842-8.
- Hughes, W. T., D. L. Bartley, and B. M. Smith.** 1983. A natural source of infection due to *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 147:595.
- Hughes, W. T.** 2005. Historical overview, p1-38. In P. D. Walzer, and M. Cushion (ed.), *Pneumocystis* pneumonia, 3rd ed. Marcel Dekker, New York, NY.
- Iliades, P., D. J. Walker, L. Castelli, J. Satchell, S. R. Meshnick, and I. G. Macreadie.** 2004. Cloning of the *Pneumocystis jirovecii* trifunctional FAS gene and complementation of its DHPS activity in *Escherichia coli*. *Fungal Genet Biol* 41:1053-62.
- Institut de veille sanitaire.** 2006. Infection à VIH et SIDA. <http://www.invs.sante.fr/bdd/index.htm>
- Ito, M., T. Tsugane, K. Kobayashi, T. Kuramochi, K. Hioki, T. Furuta, and T. Nomura.** 1991. Study on placental transmission of *Pneumocystis carinii* in mice using immunodeficient SCID mice as a new animal model. *J Protozool* 38(Suppl.):S218-9.
- Ito, M., R. Nozu, T. Kuramochi, N. Eguchi, S. Suzuki, K. Hioki, T. Itoh, and F. Ikeda.** 2000. Prophylactic effect of FK463, a novel antifungal lipopeptide, against *Pneumocystis carinii* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2259-62.
- Jacobs, J. B., C. Vogel, R. D. Powell, and V. T. DeVita.** 1969. Needle biopsy in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Radiology* 93:525-30.
- Kaiser, K., M. Rabodonirina, and S. Picot.** 2001. Real time quantitative PCR and RT-PCR for analysis of *Pneumocystis carinii hominis*. *J Microbiol Methods* 45:113-8.
- Kazanjian, P., A. B. Locke, P. A. Hossler, B. R. Lane, M. S. Bartlett, J. W. Smith, M. Cannon, and S. R. Meshnick.** 1998. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. *AIDS* 12:873-8.
- Kazanjian, P., W. Armstrong, P. A. Hossler, C. H. Lee, L. Huang, C. B. Beard, J. Carter, L. Crane, J. Duchin, W. Burman, J. Richardson, and S. R. Meshnick.** 2001. *Pneumocystis carinii* cytochrome b mutations are associated with atovaquone exposure in patients with AIDS. *J Infect Dis* 183:819-22.
- Keely, S. P., R. P. Baughman, A. G. Smulian, M. N. Dohn, and J. R. Stringer.** 1996. Source of *Pneumocystis carinii* in recurrent episodes of pneumonia in AIDS patients. *AIDS* 10:881-8.
- Kitada, K., S. Oka, S. Kimura, K. Shimada, T. Serikawa, J. Yamada, H. Tsunoo, K. Egawa, and Y. Nakamura.** 1991. Detection of *Pneumocystis carinii* sequences by polymerase chain reaction: animal models and clinical application to noninvasive specimens. *J Clin Microbiol* 29:1985-90.
- Kovacs, J. A., V. Gill, J. C. Swan, F. Ognibene, J. Shelhamer, J. E. Parrillo, and H. Masur.** 1986. Prospective evaluation of a monoclonal antibody in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 2:1-3.
- Kovacs, J. A., V. L. Ng, H. Masur, G. Leoung, W. K. Hadley, G. Evans, H. C. Lane, F. P. Ognibene, J. Shelhamer, J. E. Parrillo, and V. J. Gill.** 1988. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 318:589-93.
- Kovacs, J. A., F. Powell, J. C. Edman, B. Lundgren, A. Martinez, B. Drew, and C. W. Angus.** 1993. Multiple genes encode the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J Biol Chem* 268:6034-40.
- Kucera K., and T. Valousek.** 1966. The direct proof of *Pneumocystis carinii* in alive nurslings and a new evolutive stage of *Pneumocystis*. *Folia Parasitol* 1:113-22.
- Lane, B. R., J. C. Ast, P. A. Hossler, D. P. Mindell, M. S. Bartlett, J. W. Smith, and S. R. Meshnick.** 1997. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 175:482-5.
- Larsen, H. H., H. Masur, J. A. Kovacs, V. J. Gill, V. A. Silcott, P. Kogulan, J. Maenza, M. Smith, D. R. Lucey, and S. H. Fischer.** 2002. Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 40:490-4.
- Latouche, S., J. L. Poirot, V. Bertrand, and P. Roux.** 1997a. *Pneumocystis carinii hominis* sequencing for reactivation or de novo contamination and for hypothetic transmission from person to person. *APMIS* 77(Suppl.):11-3.
- Latouche, S., J. L. Poirot, C. Bernard, and P. Roux.** 1997b. Study of internal transcribed spacer and mitochondrial large-subunit genes of *Pneumocystis carinii hominis* isolated by repeated bronchoalveolar lavage from human immunodeficiency virus-infected patients during one or several episodes of pneumonia. *J Clin Microbiol* 35:1687-90.
- Latouche, S., E. Ortona, E. Mazars, P. Margutti, E. Tamburini, A. Siracusano, K. Guyot, M. Nigou, and P. Roux.** 1997c. Biodiversity of *Pneumocystis carinii hominis*: typing with different DNA regions. *J Clin Microbiol* 35:383-7.
- Latouche, S., A. Totet, P. Lacube, J. Bolognini, G. Nevez, and P. Roux.** 2001. Development of an RT-PCR on the heat shock protein 70 gene for viability detection of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in patients with pneumocystosis and in air sample. *J Eukaryot Microbiol* 48(Suppl.):S176-7.
- Le Gal, S., G. Hery-Arnaud, S. Ramel, M. Virmaux, C. Damiani, A. Totet, and G. Nevez.** 2010. *Pneumocystis*

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

- jirovecii* and cystic fibrosis in France. Scand J Infect Dis 42:225-7.
- Le Tan, V., A. M. Cochard, D. Vu Trieu, and W. Solonar. 1963. In Vivo Diagnosis of *Pneumocystis* Pneumonia. Arch Fr Pediatr 20:773-92.
- Lee, C. H., J. J. Lu, M. S. Bartlett, M. M. Durkin, T. H. Liu, J. Wang, B. Jiang, and J. W. Smith. 1993. Nucleotide sequence variation in *Pneumocystis carinii* strains that infect humans. J Clin Microbiol 31:754-7.
- Lee, C. H., J. Helweg-Larsen, X. Tang, S. Jin, B. Li, M. S. Bartlett, J. J. Lu, B. Lundgren, J. D. Lundgren, M. Olsson, S. B. Lucas, P. Roux, A. Cargnel, C. Atzori, O. Matos, and J. W. Smith. 1998. Update on *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. J Clin Microbiol 36:734-41.
- Limper, A. H., J. S. Hoyte, and J. E. Standing. 1997a. The role of alveolar macrophages in *Pneumocystis carinii* degradation and clearance from the lung. J Clin Invest 99:2110-7.
- Limper, A. H. 1997b. Tumor necrosis factor alpha-mediated host defense against *Pneumocystis carinii*. Am J Respir Cell Mol Biol 16:110-1.
- Linder, E., K. Elvin, A. Bjorkman, S. Bergdahl, L. Morfeldt-Mansson, L. Moberg, and A. Sonnerborg. 1986. Monoclonal antibody to detect *Pneumocystis carinii*. Lancet 2:634.
- Linke, M. J., A. A. Ashbaugh, J. V. Koch, L. Levin, R. Tanaka, and P. D. Walzer. 2009. Effects of surfactant protein-A on the interaction of *Pneumocystis murina* with its host at different stages of the infection in mice. J Eukaryot Microbiol 56:58-65.
- Lu, J. J., M. S. Bartlett, M. M. Shaw, S. F. Queener, J. W. Smith, M. Ortiz-Rivera, M. J. Leibowitz, and C. H. Lee. 1994. Typing of *Pneumocystis carinii* strains that infect humans based on nucleotide sequence variations of internal transcribed spacers of rRNA genes. J Clin Microbiol 32:2904-12.
- Lu, J. J., C. H. Chen, M. S. Bartlett, J. W. Smith, and C. H. Lee. 1995. Comparison of six different PCR methods for detection of *Pneumocystis carinii*. J Clin Microbiol 33:2785-8.
- Lu, J. J., and C. H. Lee. 2008. *Pneumocystis* pneumonia. J Formos Med Assoc 107:830-42.
- Lund, F. E., K. Schuer, M. Hollifield, T. D. Randall, and B. A. Garvy. 2003. Clearance of *Pneumocystis carinii* in mice is dependent on B cells but not on *P. carinii*-specific antibody. J Immunol 171:1423-30.
- Lundgren, B., and A. E. Wakefield. 1998. PCR for detecting *Pneumocystis carinii* in clinical or environmental samples. FEMS Immunol Med Microbiol 22:97-101.
- Ma, L., L. Borio, H. Masur, and J. A. Kovacs. 1999. *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim-sulfamethoxazole or dapsone use. J Infect Dis 180:1969-78.
- Ma, L., G. Kutty, Q. Jia, H. Imamichi, L. Huang, C. Atzori, P. Beckers, G. Groner, C. B. Beard, and J. A. Kovacs. 2002a. Analysis of variation in tandem repeats in the intron of the major surface glycoprotein expression site of the human form of *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis 186:1647-54.
- Ma, L., Q. Jia, and J. A. Kovacs. 2002b. Development of a yeast assay for rapid screening of inhibitors of human-derived *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase. Antimicrob Agents Chemother 46:3101-3.
- Magne, D., A. Angoulvant, F. Botterel, C. Bouges-Michel, M. E. Bougnoux, C. Chochillon, M. Cornet, E. Dannaoui, A. Datry, J. Dunan, G. Galeazzi, C. Sarfati, H. Yera, and P. Roux. 2007. Surveillance de la pneumocystose dans 14 hôpitaux de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), France, 2003-2005. Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire 5: 42-4.
- Maher, N. H., S. H. Vermund, D. A. Welsh, H. K. Dillon, A. Awooda, and T. R. Unnasch. 2001. Development and characterization of a molecular viability assay for *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*. J Infect Dis 183:1825-7.
- Mansharmani, N. G., D. Balachandran, I. Vernovsky, R. Garland, and H. Koziel. 2000. Peripheral blood CD4 + T-lymphocyte counts during *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised patients without HIV infection. Chest 118:712-20.
- Marty, P., P. Dellamonica, Y. le Fichoux, E. Bernard, G. Pagliardini, and J. Villevieille. 1981. *Pneumocystis carinii* Delanoë & Delanoë 1912 en microscopie optique. Les différentes techniques d'identification. Annales de Parasitologie humaine et comparée 56:363-74.
- Masur, H., M. A. Michelis, J. B. Greene, I. Onorato, R. A. Stouwe, R. S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H. W. Murray, and S. Cunningham-Rundles. 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. N Engl J Med 305:1431-8.
- Masur, H., H. C. Lane, J. A. Kovacs, C. J. Allegra, and J. C. Edman. 1989a. *Pneumocystis* pneumonia: from bench to clinic. Ann Intern Med 111:813-26.
- Masur, H., F. P. Ognibene, R. Yarchoan, J. H. Shelhamer, B. F. Baird, W. Travis, A. F. Suffredini, L. Deyton, J. A. Kovacs, J. Falloon, and et al. 1989b. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. Ann Intern Med 111:223-31.
- Matsumoto, Y., and Y. Yoshida. 1984. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. J Protozool 31:420-8.
- van der Meer, G., and L. S. Brug. 1942. Infection à *Pneumocystis carinii* chez l'homme et chez les animaux. Annales de la société belge de médecine tropicale 22:301-307.
- Meliani, L., M. Developoux, M. Marteau-Miltgen, D. Magne, V. Barbu, J. L. Poirot, and P. Roux. 2003. Real time quantitative PCR assay for *Pneumocystis jirovecii* detection. J Eukaryot Microbiol 50(Suppl.):S651.
- Merali, S., U. Frevert, J. H. Williams, K. Chin, R. Bryan, and A. B. Clarkson Jr. 1999. Continuous axenic cultivation of *Pneumocystis carinii*. Proc Natl Acad Sci U S A 96:2402-7.
- Meuwissen, J. H., I. Tauber, A. D. Leeuwenberg, P. J. Beckers, and M. Sieben. 1977. Parasitologic and serologic observations of infection with *Pneumocystis* in humans. J Infect Dis 136:43-9.
- Miller, R. F., H. E. Ambrose, V. Novelli, and A. E. Wakefield. 2002. Probable mother-to-infant transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* infection. J Clin Microbiol 40:1555-7.
- Miller, R. F., A. R. Lindley, A. S. Malin, H. E. Ambrose, and A. E. Wakefield. 2005. Isolates of *Pneumocystis jirovecii* from Harare show high genotypic similarity to isolates from London at the superoxide dismutase locus. Trans R Soc Trop Med Hyg 99:202-6.
- Montes-Cano, M. A., M. Chabe, M. Fontillon-Alberdi, C. de-Lahorra, N. Respaldiza, F. J. Medrano, J. M. Varela, E. Deicas, and E. J. Calderon. 2009. Vertical transmission of *Pneumocystis jirovecii* in humans. Emerg Infect Dis 15:125-7.
- Morris, A., F. C. Sciurba, and K. A. Norris. 2008. *Pneumocystis*: a novel pathogen in chronic obstructive pulmonary disease? COPD 5:43-51.

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

- Musto, L., M. Flanigan, and A. Elbadawi.** 1982. Ten-minute silver stain for *Pneumocystis carinii* and fungi in tissue sections. *Arch Pathol Lab Med* 106:292-4.
- Nahimana, A., M. Rabodonirina, J. Bille, P. Francioli, and P. M. Hauser.** 2004. Mutations of *Pneumocystis jirovecii* dihydrofolate reductase associated with failure of prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4301-5.
- Ndam, N. G., B. Dumont, C. Demanche, A. Chapel, P. Lacube, J. Guillot, and P. Roux.** 2003. Development of a real-time PCR-based fluorescence assay for rapid detection of point mutations in *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene. *J Eukaryot Microbiol* 50(Suppl.):S658-60.
- Nevez, G., C. Raccurt, V. Jounieaux, E. Dei-Cas, and E. Mazars.** 1999. Pneumocystosis versus pulmonary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients. *AIDS* 13:535-6.
- Nevez, G., A. Totet, O. Ganry, I. Dorion, S. Tabuteau, F. Leclercq, V. Jounieaux, and C. Raccurt.** 2002. *Pneumocystis jirovecii* detection using the polymerase chain reaction in patients with sarcoidosis. *J Med Mycol* 12:183-6.
- Nevez, G., A. Totet, V. Jounieaux, J. L. Schmit, E. Dei-Cas, and C. Raccurt.** 2003. *Pneumocystis jirovecii* Internal Transcribed Spacer Types in Patients Colonized by the Fungus and in Patients with Pneumocystosis from the Same French Geographic Region. *J Clin Microbiol* 41:181-6.
- Nevez, G., V. Jounieaux, and A. Totet.** 2006a. *Pneumocystis jirovecii*, not *Pneumocystis jiroveci*. *Chest*, 6 march e-letter.
- Nevez, G., E. Magois, H. Duwat, V. Gouilleux, V. Jounieaux, and A. Totet.** 2006b Apparent absence of *Pneumocystis jirovecii* in healthy subjects. *Clin Infect Dis* 42:e99-101.
- Nevez, G., M. Chabe, M. Rabodonirina, M. Virmaux, E. Dei-Cas, P. M. Hauser, and A. Totet.** 2008. Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* infections. *Parasite* 15:359-65.
- Ng, V. L., D. M. Yajko, and W. K. Hadley.** 1997. Extrapulmonary pneumocystosis. *Clin Microbiol Rev* 10:401-18.
- Ognibene, F. P., J. Shelhamer, V. Gill, A. M. Macher, D. Loew, M. M. Parker, E. Gelmann, A. S. Fauci, J. E. Parrillo, and H. Masur.** 1984. The diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome using subsegmental bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 129:929-32.
- Olsson, M., K. Elvin, S. Lofdahl, and E. Linder.** 1993. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in sputum and bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31:221-6.
- Olsson, M., C. Lidman, S. Latouche, A. Bjorkman, P. Roux, E. Linder, and M. Wahlgren.** 1998. Identification of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* gene sequences in filtered air in hospital environments. *J Clin Microbiol* 36:1737-40.
- Olsson, M., B. M. Eriksson, K. Elvin, M. Strandberg, and M. Wahlgren.** 2001. Genotypes of clustered cases of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Scand J Infect Dis* 33:285-9.
- Palladino, S., I. Kay, R. Fonte, and J. Flexman.** 2001. Use of real-time PCR and the LightCycler system for the rapid detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 39:233-6.
- Peters, S. E., A. E. Wakefield, K. Sinclair, P. R. Millard, and J. M. Hopkin.** 1992. A search for *Pneumocystis carinii* in post-mortem lungs by DNA amplification. *J Pathol* 166:195-8.
- Peterson, J. C., and M. T. Cushion.** 2005. *Pneumocystis*: not just pneumonia. *Curr Opin Microbiol* 8:393-8.
- Pifer, L. L., W. T. Hughes, S. Stagno, and D. Woods.** 1978. *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. *Pediatrics* 61:35-41.
- Pifer, L. L., C. P. Lattuada, C. C. Edwards, D. R. Woods, and D. R. Owens.** 1984. *Pneumocystis carinii* infection in germ-free rats: implications for human patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2:23-36.
- Ponce, C. A., M. Gallo, R. Bustamante, and S. L. Vargas.** 2010. *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clin Infect Dis* 50:347-53.
- Pop, S. M., J. K. Kolls, and C. Steele.** 2006. *Pneumocystis*: immune recognition and evasion. *Int J Biochem Cell Biol* 38:17-22.
- Pottratz, S. T., and A. L. Weir.** 1997. Gamma-interferon inhibits *Pneumocystis carinii* attachment to lung cells by decreasing expression of lung cell-surface integrins. *Eur J Clin Invest* 27:17-22.
- Powles, M. A., P. Liberator, J. Anderson, Y. Karkhanis, J. F. Dropinski, F. A. Bouffard, J. M. Balkovec, H. Fujioka, M. Aikawa, D. McFadden, and D. Schmatz.** 1998. Efficacy of MK-991 (L-743,872), a semisynthetic pneumocandin, in murine models of *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1985-9.
- Prevost, M. C., R. Escamilla, E. M. Aliouat, N. Cere, P. Coudert, and E. Dei-Cas.** 1998. Pneumocystosis pathophysiology. *FEMS Immunol Med Microbiol* 22:123-8.
- Rabodonirina M., C. Pariset, and J. Fabry.** 1999. Connaissances actuelles sur l'épidémiologie de la pneumocystose et propositions pour une limitation du risque de transmission nosocomiale. *Hygiènes* 5:260-2.
- Rabodonirina, M., P. Vanhems, S. Couray-Targe, R. P. Gillibert, C. Ganne, N. Nizard, C. Colin, J. Fabry, J. L. Touraine, G. van Melle, A. Nahimana, P. Francioli, and P. M. Hauser.** 2004. Molecular evidence of interhuman transmission of *Pneumocystis* pneumonia among renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. *Emerg Infect Dis* 10:1766-73.
- Rao, C. P., and E. W. Gelfand.** 1983. *Pneumocystis carinii* pneumonitis in patients with hypogammaglobulinemia and intact T cell immunity. *J Pediatr* 103:410-2.
- Redhead, S. A., M. T. Cushion, J. K. Frenkel, and J. R. Stringer.** 2006. Pneumocystis and Trypanosoma cruzi: nomenclature and typifications. *J Eukaryot Microbiol* 53:2-11.
- von Reitstebauer, E., and H. Moritsch.** 1956. Epidemiologische un serologische Untersuchungen bei intertierlicher plasmacellulärer Frühgeburtspneumonie. *Monatsschrift für Kinderheilkunde* 104:41-6.
- Repsher, L. H., G. Schroter, and W. S. Hammond.** 1972. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonitis by means of endobronchial brush biopsy. *N Engl J Med* 287:340-1.
- Réseau national de santé publique.** 1995. Surveillance du SIDA en France. Situation au 30 septembre 1995. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* 46: 201-2.
- Réseau national de santé publique.** 1997. Surveillance du SIDA en France. Situation au 30 juin 1997. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* 37-38:165-73.
- Ripamonti, C., A. Orenstein, G. Kutty, L. Huang, R. Schuhegger, A. Sing, G. Fantoni, C. Atzori, C. Vinton, C. Huber, P. S. Conville, and J. A. Kovacs.** 2009. Restriction fragment length polymorphism typing demonstrates substantial diversity among *Pneumocystis jirovecii* isolates. *J Infect Dis* 200:1616-22.
- Rivero, L., C. de la Horra, M. A. Montes-Cano, A. Rodriguez-Herrera, N. Respaldiza, V. Friaza, R. Morilla, S. Gutierrez, J. M. Varela, F. J. Medrano, and E. J. Calderon.** 2008. *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. *Emerg Infect Dis* 14:1116-8.

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

- Robberts, F. J., L. D. Liebowitz, and L. J. Chalkley.** 2004. Genotyping and coalescent phylogenetic analysis of *Pneumocystis jirovecii* from South Africa. *J Clin Microbiol* 42:1505-10.
- Robberts, F. J., L. J. Chalkley, K. Weyer, P. Goussard, and L. D. Liebowitz.** 2005. Dihydropteroate synthase and novel dihydrofolate reductase gene mutations in strains of *Pneumocystis jirovecii* from South Africa. *J Clin Microbiol* 43:1443-4.
- Robberts, F. J., L. D. Liebowitz, and L. J. Chalkley.** 2007. Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jirovecii*: evaluation of 9 assays. *Diagn Microbiol Infect Dis* 58:385-92.
- Rohner, P., V. Jacomo, R. Studer, J. Schrenzel, and J. D. Graf.** 2009. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by two staining methods and two quantitative PCR assays. *Infection* 37:261-5.
- Roux P, and P. M. Girard.** 1990. Quels sont les indications, les impératifs techniques, la sensibilité et le bénéfice de l'expectoration induite dans le diagnostic de la pneumopathie à *Pneumocystis carinii*? *Medecine et maladies infectieuses Suppl.*:339-46.
- Russel J. G.** 1959. *Pneumocystis* pneumonia associated with agammaglobulinaemia. *Arch Dis Child* 34:338-41.
- Saulsbury, F. T., M. T. Bernstein, and J. A. Winkelstein.** 1979. *Pneumocystis carinii* pneumonia as the presenting infection in congenital hypogammaglobulinemia. *J Pediatr* 95:559-61.
- Schluger, N., T. Godwin, K. Sepkowitz, D. Armstrong, E. Bernard, M. Rifkin, A. Cerami, and R. Bucala.** 1992. Application of DNA amplification to pneumocystosis: presence of serum *Pneumocystis carinii* DNA during human and experimentally induced *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Exp Med* 176:1327-33.
- Schmatz, D. M., M. Powles, D. C. McFadden, L. A. Pittarelli, P. A. Liberator, and J. W. Anderson.** 1991. Treatment and prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia and further elucidation of the *P. carinii* life cycle with 1,3-beta-glucan synthesis inhibitor L-671,329. *J Protozool* 38(Suppl.):S151-3.
- Schmidtt, S., R. Schuhhegger, T. Wendler, I. Huber, H. Sollner, M. Hogardt, H. Arbogast, J. Heesemann, L. Bader, and A. Sing.** 2008. Molecular evidence of nosocomial *Pneumocystis jirovecii* transmission among 16 patients after kidney transplantation. *J Clin Microbiol* 46:966-71.
- Sedaghatian, M. R., and D. B. Singer.** 1972. *Pneumocystis carinii* in children with malignant disease. *Cancer* 29:772-7.
- Sepkowitz, K. A.** 2002. Opportunistic infections in patients with and patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clin Infect Dis* 34:1098-107.
- Sheldon, W.** 1959. Subclinical *Pneumocystis* pneumonitis. *American Journal of Disease of Children* 97:287-97.
- Shimizu, Y., N. Sunaga, K. Dobashi, M. Fueki, N. Fueki, S. Makino, and M. Mori.** 2009. Serum markers in interstitial pneumonia with and without *Pneumocystis jirovecii* colonization: a prospective study. *BMC Infect Dis* 9:47.
- Siegel, J. D., E. Rhinehart, M. Jackson, L. Chiarello, and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee.** 2007 Guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in healthcare settings, appendix A. Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/isolation2007.pdf>.
- Sing, A., C. Wonhas, L. Bader, M. Luther, and J. Heesemann.** 1999. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in the air filter of a ventilated patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 29:952-3.
- Smith, J. A., and C. M. Wiggins.** 1973. Identification of *Pneumocystis carinii* in sputum. *N Engl J Med* 289:1254-5.
- Soulez, B., F. Palluault, J. Y. Cesbron, E. Dei-Cas, A. Capron, and D. Camus.** 1991. Introduction of *Pneumocystis carinii* in a colony of SCID mice. *J Protozool* 38(Suppl.):S123-5.
- Stratton, N., J. Hryniwcki, S. L. Aarnaes, G. Tan, L. M. de la Maza, and E. M. Peterson.** 1991. Comparison of monoclonal antibody and calcofluor white stains for the detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 29:645-7.
- Stringer, S. L., K. Hudson, M. A. Blase, P. D. Walzer, M. T. Cushion, and J. R. Stringer.** 1989. Sequence from ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* compared to those of four fungi suggests an ascomycetous affinity. *J Protozool* 36(Suppl.):S14-6.
- Stringer, J. R., M. T. Cushion, and A. E. Wakefield.** 2001. New nomenclature for the genus *Pneumocystis*. *J Eukaryot Microbiol* 48(Suppl.):S184-9.
- Stringer, J. R., C. B. Beard, R. F. Miller, and A. E. Wakefield.** 2002. A New Name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from Humans. *Emerg Infect Dis* 8:891-6.
- Stringer, J. R., C. B. Beard, and R. F. Miller.** 2009. Spelling *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg Infect Dis* 15:506.
- Stringer, J. R., A. E. Wakefield, M. T. Cushion, and E. Dei-Cas.** 1997. *Pneumocystis* taxonomy and nomenclature: an update. *J Eukaryot Microbiol* 44:5S-6S.
- Takahashi, T., T. Kanda, and A. Iwamoto.** 2002. Genetic diversity of drug targets including dihydropteroate synthase, dihydrofolate reductase and cytochrome b, in *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 112:159-76.
- Tasci, S., S. Ewig, A. Burghard, and B. Luderitz.** 2003. *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 362:124.
- Taylor, M. B., M. Phillips, and C. S. Easmon.** 1992. Opsonophagocytosis of *Pneumocystis carinii*. *J Med Microbiol* 36:223-8.
- Thomas Jr, C. F., and A. H. Limper.** 2007. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis* pneumonia. *Nat Rev Microbiol* 5:298-308.
- Totet, A., J. C. Pautard, C. Raccourt, P. Roux, and G. Nevez.** 2003. Genotypes at the internal transcribed spacers of the nuclear rRNA operon of *Pneumocystis jirovecii* in nonimmunosuppressed infants without severe pneumonia. *J Clin Microbiol* 41:1173-80.
- Totet, A., S. Latouche, P. Lacube, J. C. Pautard, V. Jounieaux, C. Raccourt, P. Roux, and G. Nevez.** 2004a. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in immunocompetent infants and immunosuppressed adults, Amiens, France. *Emerg Infect Dis* 10:667-73.
- Totet, A., H. Duwat, E. Magois, V. Jounieaux, P. Roux, C. Raccourt, and G. Nevez.** 2004b. Similar genotypes of *Pneumocystis jirovecii* in different forms of *Pneumocystis* infection. *Microbiology* 150:1173-8.
- Tsolaki, A. G., R. F. Miller, A. P. Underwood, S. Banerji, and A. E. Wakefield.** 1996. Genetic diversity at the internal transcribed spacer regions of the rRNA operon among isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia. *J Infect Dis* 174:141-56.
- Tsolaki, A. G., P. Beckers, and A. E. Wakefield.** 1998. Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*: high genotype similarity with contemporary isolates. *J Clin Microbiol* 36:90-3.
- Vanek, J., and O. Jirovec.** 1952. Parasitäre Pneumonie "Interstitielle" Plasmazellenpneumonie der Frühgeborenen, verursacht durch *Pneumocystis carinii*. *Zbl Bakt* 158:120-8.

## PNEUMOCYSTIS JIROVECII

- Vargas, S. L., W. T. Hughes, A. E. Wakefield, and H. S. Oz. 1995. Limited persistence in and subsequent elimination of *Pneumocystis carinii* from the lungs after *P. carinii* pneumonia. *J Infect Dis* 172:506-10.
- Vargas, S. L., C. A. Ponce, F. Gigliotti, A. V. Ulloa, S. Prieto, M. P. Munoz, and W. T. Hughes. 2000. Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *J Clin Microbiol* 38:1536-8.
- Wakefield, A. E., F. J. Pixley, S. Banerji, K. Sinclair, R. F. Miller, E. R. Moxon, and J. M. Hopkin. 1990. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 336:451-3.
- Wakefield, A. E., L. Guiver, R. F. Miller, and J. M. Hopkin. 1991. DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 337:1378-9.
- Wakefield, A. E., R. F. Miller, L. A. Guiver, and J. M. Hopkin. 1993. Oropharyngeal samples for detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification. *Q J Med* 86:401-6.
- Wakefield, A. E., R. F. Miller, L. A. Guiver, and J. M. Hopkin. 1994a. Granulomatous *Pneumocystis carinii* pneumonia: DNA amplification studies on bronchoscopic alveolar lavage samples. *J Clin Pathol* 47:664-6.
- Wakefield, A. E., C. C. Fritscher, A. S. Malin, L. Gwanzura, W. T. Hughes, and R. F. Miller. 1994b. Genetic diversity in human-derived *Pneumocystis carinii* isolates from four geographical locations shown by analysis of mitochondrial rRNA gene sequences. *J Clin Microbiol* 32:2959-61.
- Wakefield, A. E. 1996. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J Clin Microbiol* 34:1754-9.
- Wakefield, A. E. 1998. Genetic heterogeneity in human-derived *Pneumocystis carinii*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 22:59-65.
- Walker, D. J., A. E. Wakefield, M. N. Dohn, R. F. Miller, R. P. Baughman, P. A. Hossler, M. S. Bartlett, J. W. Smith, P. Kazanjian, and S. R. Meshnick. 1998. Sequence polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* cytochrome b gene and their association with atovaquone prophylaxis failure. *J Infect Dis* 178:1767-75.
- Walzer, P. D., V. Schnelle, D. Armstrong, and P. P. Rosen. 1977a. Nude mouse: a new experimental model for *Pneumocystis carinii* infection. *Science* 197:177-9.
- Walzer, P. D. 1977b. *Pneumocystis carinii* infection. *South Med J* 70:1330-7.
- Walzer, P. D., K. Djawe, L. Levin, K. R. Daly, J. Koch, L. Kingsley, M. Witt, E. T. Golub, J. H. Bream, B. Taiwo, and A. Morris. 2009. Long-term serologic responses to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein in HIV-positive individuals with and without *P. jirovecii* infection. *J Infect Dis* 199:1335-44.
- Watanabe, J. M., H. Chinchinian, C. Weitz, and S. K. McIlvanie. 1965. *Pneumocystis carinii* pneumonia in a family. *JAMA* 193:119-20.
- Wright, T. W., R. H. Notter, Z. Wang, A. G. Harmsen, and F. Gigliotti. 2001. Pulmonary inflammation disrupts surfactant function during *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infect Immun* 69:758-64.
- Yazaki, H., N. Goto, K. Uchida, T. Kobayashi, H. Gatanaga, and S. Oka. 2009. Outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in renal transplant recipients: *P. jirovecii* is contagious to the susceptible host. *Transplantation* 88:380-5.
- Yéni, P. 2010. Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH. Recommandations du groupe d'experts. <http://www.sante.gouv.fr>
- Yong, S. J., Z. Vuk-Pavlovic, J. E. Standing, E. C. Crouch, and A. H. Limper. 2003. Surfactant protein D-mediated aggregation of *Pneumocystis carinii* impairs phagocytosis by alveolar macrophages. *Infect Immun* 71:1662-71.
- Ypma-Wong, M. F., W. A. Fonzi, and P. S. Sypherd. 1992. Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 60:4140-5.

## Adresses des auteurs :

— Docteur Solène LE GAL  
Université européenne de Bretagne,  
Université de Brest,  
LUBEM-EA 3882, IFR 148,  
Faculté de Médecine, Brest, France  
CHU de Brest,  
Laboratoire de parasitologie et mycologie, Brest  
e-mail : solene.legal@chu-brest.fr

## — Docteur Céline DAMIANI

Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, CHU d'Amiens  
Laboratoire PériTox, périnatalité & risques toxiques  
EA 4285 - UMI 01 Unité mixte INERIS,  
Université de Picardie Jules Verne  
Adresse : Laboratoire de Parasitologie et Mycologie,  
Centre Hospitalier Sud, CHU d'Amiens, 80054 AMIENS cedex 1  
e-mail : damiani.celine@chu-amiens.fr

## — Professeur Anne TOTET

Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, CHU d'Amiens  
Laboratoire PériTox, périnatalité & risques toxiques  
EA 4285 - UMI 01 Unité mixte INERIS,  
Université de Picardie Jules Verne  
Adresse : Laboratoire de Parasitologie et Mycologie,  
Centre Hospitalier Sud, CHU d'Amiens, 80054 AMIENS cedex 1  
e-mail : totet.anne@chu-amiens.fr

## — Professeur Gilles NEVEZ

Université européenne de Bretagne,  
Université de Brest,  
LUBEM-EA 3882, IFR 148, Faculté de Médecine, Brest  
CHU de Brest, Laboratoire de parasitologie et mycologie, Brest  
Adresse : Laboratoire de parasitologie et mycologie,  
Centre Hospitalier de la Cavale Blanche,  
Boulevard Tanguy Prigent, 29269, Brest, France  
e-mail : gilles.nevez@chu-brest.fr  
Téléphone : + 33 (0)2 98 14 51 02 ;  
télécopie : +33 (0)2 98 14 51 49

## **CHAPITRE 1**

### **Dépistage et caractérisation des populations infectées par *Pneumocystis jirovecii***

## 1. Détection de *Pneumocystis jirovecii* chez les patients atteints de mucoviscidose

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques graves dans la population caucasienne. La transmission se fait sur le mode autosomique récessif. Son incidence peut atteindre 1 cas pour 1600 naissances en Bretagne [219]. Ceci explique que le CRCM de Roscoff et le CHRU de Brest suivent une cohorte d'environ 160 patients [17].

Des cas de colonisation par *P.jirovecii* ont été décrits chez les patients atteints de mucoviscidose en Allemagne et en Espagne avec des prévalences de 7,4% et 21,6% respectivement [210, 227]. En revanche, aucune donnée n'était disponible en France et en particulier en Bretagne. Notre objectif a été de définir la prévalence de *P.jirovecii* chez les patients atteints de mucoviscidose dans le Finistère. Pour cela nous avons analysé les expectorations prélevées entre juillet 2005 et août 2007 chez 76 patients suivis au CRCM de Roscoff et au CHRU de Brest. Cent quarante-six prélèvements ont été analysés par amplification du gène codant pour l'ARN de la grande sous-unité du ribosome de la mitochondrie de *P. jirovecii*, au moyen d'une PCR nichée et d'une PCR en temps réel selon des protocoles précédemment décrits [154, 248, 253, 274]. Le champignon a été détecté chez un patient, uniquement par PCR en temps réel. La prévalence de la colonisation par *P. jirovecii* est donc estimée à 1,3% dans le Finistère. Ces résultats indiquent que la colonisation par *P.jirovecii* est peu fréquente chez les patients mucoviscidosques dans le Finistère et qu'en conséquence, ces patients sont peu impliqués en termes de réservoir humain de *P.jirovecii* dans notre région. De plus, le champignon n'est pas impliqué en tant que cofacteur de morbidité chez ces patients.

Ce travail est présenté dans l'article "*Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis in France. Le Gal S, Héry-Arnaud G, Ramel S, Virmaux M, Damiani C, Totet A, Nevez G. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 2010; 42(3) : 225-7".

**Article 1**

***Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis in France**

$$(\text{ } 2(\text{ } \text{ }, 1 \text{ } \text{ }), \text{ } \alpha_1 \text{ } \text{ } (\text{ }$$

P

informa  
healthcare

U& % U -) % , / & T - % & T ) & , && + + + ( ) % & - 1  
 , 0 2 0 1 , - 0 2 0 0 10 ( 0  
 , 0 ( 0 , 0 3 , 0 ( 0 , - 0 ) ( 0 ( 0 0 0 0 0 ( 3 , , 0  
 2 ( 0 , 0 3 , 0 ( ( ) 0 , - 0 ) ( 0 ( 0 ( 0 ( 0 ( ( 1 )

. 9 F9H**E**07H@MJ9GH;5B8 D5H9BH**KH** 7MGH O6FGGCFH9 DF9G9B7Q ( B9IA C7MGH FQ97 6MD9FCAB;  
F9**H**A9( ) 5B8 B9GH98 ) 5GM**CB** 5F7J 5@GIHA G**V**A 9BG( FQ97 K5G89H**T**H98 B CB@MD5H**BH**  
G**C**KB; H5HB DIF F9;CB F9GHFB79 H9 :IB;IG GFF9@MJ**C**@98 B II@ACB5MT@EN5ICB B D5H**BHGKH** 7MGH  
O6FGG

(B9IA C7MGHGFQ97 G 5 H1B5GAGG@9IB;IG H5H  
751G9G9F9LB9IA CB5 (B9 IA C7MGHGB9IA CB5  
( ( B A AIBC7ADFA G98 D5H9BH@8998  
( ( F9A5BG H9 A CGH F9E19BH 89CBB;  
@@@B9B@C9J9@D@98 7DBHFG 2 3 CK9J9F (B9I  
A C7MGH@: 97HBG7Q9F5 G97HIA C DF9G9BH  
HCBG 5A CB; K 7 ( ( B A AIBC7ADFA G98  
D5H9BH@9F9G9BKB@M GA@@DODDH@B A CGH  
(B9IA C7MGH@: 97HBG7CH9G1B8 HCA @ B: 97  
HCBGF9@D@H@K @9@G D5F5GHGA2 3 B8998  
DC@A9FG@ 5B F95H@ ( ) 5GGNG 5J9F9P5@98  
H5HD1G@GBCH 5JB; ( ( 75B 69 B: 97H9KH  
5 :9K OF;5BGAG 2 3 B HG 7CBH9LHH9 H@A  
4D@ACB5FM7C@EN5H@B G:F9E9BHM@G982 3  
A AIBC7ADFA G98 D5H9BH@B 5@G@ AI  
BC7AD9H9BH@H9BH@C 5J9 @IB 8G95G9C5B  
E9T@R@H@997C@BN98 6M ECI97 2 3 (C9RE@

A AIBC7CA DFC@ G98 D5H9BHG8 5@G& AI  
BC/CD9H9BEBH9BHG C 5J9 @IB 8G95G9G5B  
:F9E9BH@M7C@EN98 6M( FCJ97 2 3 ( C9BH@  
F@9G H9 :IB;IG 5G5 ACF@H7C:57HE5B8 C  
H9 7C@EN98 DDI@HCBG5G( FCJ97 B:97KEIG  
G@F79G 5J9 699B GI;;9GH98 P 3 CFH9G9F95  
GBGH9 89H7HCB 5B8 7 5F5719FNHCB C 7C@B N98  
DDI@HCBGG F9EF98 CF BGH579 H 5G699B  
9GH@G98 H5H7C@ENHCB KH ( FCJ97 :F9  
E9BH@M7IFG B IFD@5B D5H9BH@GH 7MGH  
OFGG 3 D5H7I@5@B9J @@B85 @IGD 5B

B K 7 5 DF9F5@9B7C 5G699B F9DCH48  
2 3 CBJ9IG9@M9F95F9BC85H CB ( FCJ97 B  
F9B7 D5H9BGKH 7MGH O6FCGG5B8 G97075@AM  
BC9:FC A HHHM5 F9;CB H5HG 7 5F719IN98 6M  
H9 ; 9GK7IHF9B79C HG 5IHGA5@F99GQJ  
8GF89BB H9 K H9DCL@HCB B F9EB  
5F9GJG B FB79 2 3 B HG GHIM K9  
BJ9GH;E1985 DCL@HCB C 7MGH O6FCGG5H4BH  
@B; B HG F9;CB C FB79 :CF H9 DF9G9B7C  
( FCJ97

+ 9 GHI8MK5G D9FCFA 98 5H F9GH<sub>B</sub> J 9IGM  
CGH@ F9GH HHBM FB79 9J 9BMLGL  
D5H9BHK9F9F9HE@7HP@MBF@@@98 98 5B; 5;9  
M FB;9 P M A 5@9GB8 :9A 5@9G  
+ FHMD9BHCG8 F979P8 7CH@ CLNC@HF9H  
A 9BHGI@5A 9HCL5N@9 A; ; 85MHA 9HCLPA  
A;;85 MQ9FH9 A CBHGF9798B; GAD@B;  
+ 9M BH5 @@MB89FI9BH 5 GIHIA DFC981F9  
:CF FC@B9 657H9E@C75 @B8 AM@C75 @GIF9@  
@B79 69HE9B I@M 5B8 I;IGH CHM  
Q9 D5H9BH@89H9BH GIHIA GAD@B; 957  
K 9F9G D5H9BH@89FI9BH@9BH5@GIHIA  
GAD@B;

CF9GDB89B79 &9J9N 56CFHE9 89 (5F9GHQ9 9H%MCQ9 9BH9 CGDB@9E BJ 9IGHF9 F9GHFB79 +9@  
5L A5@; @@9J9N 7 I 6F9GH

(2) -0 -0 0  
 & DF BH & CB@B9 S B: CFA 5 , H B: CFA 5 95 H 75 I9 +5MCF F5B7 G

9 690 7 /-3/8 A// /B 7 3/. . / -/. 31 2/ 8/ /. C 3 2/ , /8- 90  
 9 / 23 / 3. 29A31 2 9 90 38 323 39 89 2/ 7 /-3/8 097 23 38  
 A / -908D. , C, - / 3 9 0 813 3C / 8 38 -96- / . 7 98 2 0/ 2/ E 98/ A 3-6 / . 3  
 2 . 6 98 C-908D 38A32 / . 97 98 / 1 2/ /-3/8 8/690 23 . C . 3 89 / 9 33/  
 39 / 8 90 2/ / 7 38 2. 6 98 C 2/ /-3/8 8/690 23 . C . 3 89 / 9 33/  
 -908D 38A32 200-9-- / 90 2/ / 2/ /-3/8 8/690 23 . C . 3 89 / 9 33/  
 38 A / 69-908D. A32 / 136 0 7 3 2/ 9 2/ 38 A / -908D. , C 6 983  
 7 88396C3 38 5296 / 3 -/- 3 -96- / . 7 98 2 0/ 2/ E 98/ A 3-6 / . 3  
 -97 6B 38 / 89 9 297 98 7 69 238 2/ 7 9 236 3F / 8D/ 8. / 7 9 236 3F  
 / 8D/ 38 / -2 7 /-3/8 A// , 7 3/. 9 / / 6 2C 92 // 7 C, / -983/ / . 9 /B 6 38  
 /B -398 381 -97 7 /-3 6C 36, 6/53 7 2// .300/8- / , A //8 2/ 832 8. /8-2  
 - ° 83 60 2 / /B 7 38 398 9 6 398 2 /C A// 89 . / 9 93, 6/6-5 90  
 38 , 68. / . 0 2398 , C 38. / 8/8 9 / 9 09 /833 3C90 2/ 8//. C8//. A / .  
 2/ / 8/- 90 49 /-3 31 / 6 37 / 2/ 7 / 8//. C 2/ 832 / 7 8.  
 C 8. 8/ /. C 2/ C A9 6. /B /- 933 / . /- 38 38 909  
 7 60C31 2/ 7 39-298. 366 1/ , 83 3/8  
 1/8/ 90 2/ 0 81 2/ / 6 37 / CA 39 /B 9/ 9 -9 379B D6/9 / /8 , -  
 / 0 7/. A32 2/ 37 / % 8. % 8. / 36380- 38 382 / ./. 9 6 398 2 96. 69  
 ; 8H 9, / 6, /6. A32 2/ / 9 / , /-983//. 8 9 .C 9 902 /  
 2/ / 8. 8. A32 898 F 9 / -/8 ; / 8-2/ 3/8 /-3 / . -9 379B D6/9 / 2/ 7 98 2  
 -9 6. A32 7 38 1 99 / , 38. / 2/ / 8. , / 39 6C / 9 /. ) 2/ 7 9-G681 F 9 / -/8- /09/ 7 6381A2// 986C  
 . / /- 38 8. 7 6E- 38 / 6 8 6C3 A // / 382 / 832 .C 2 . /-3 / . 23 / 7/8 8  
 0 7/. 98 2/ 37 H 6. 39 7 C 2 / , //8 / . 2 / 081 -98/; /8 6C  
 C / 7 2/ / 0E-38-C 90 /B - 38 A , /381 8//. , 6/ , C 2 3 /B 6 8 398 2  
 -98 96. 38 1 7 6E- 38 90 38 16-9 C2 7 8 6A 6/ / 90 9 , , 363G/- / 2/ 081 A 89  
 1/8/ ; 8 / 98 96 / 1/8 3 2/ . //-. 38 3/8 A29 3. 89 /-3 / 2 3 /  
 / 8- / 90 9 / 8 36 3823 39 A . / /-/. 38 1 / 8 A236/9 2 / -98 C 3 A . //-. 38  
 7 6E- 38 90 8 38 / 8 6 9 33 / -98 96 ; 8 3/8 A29 A / . A32 -9 379B D6/  
 B91/89 8 / 8 6 9 33 / 98 96 3 2/ 8/ /. CA / 0 7/. A32 37 / 3 ( 3/8 1/ 7 312 69 2 / 00- . 2 / //8-/  
 8. ( E 9 8. 8. ( 8. 98. /-98. 9 8. / 3 6C. / -3/. 90 439 /-332 / 7 / 3 8 1/ 902 / 3/8 / 89 66.  
 ) 2/ 9. - 90 2/ E 8. 2/ /-98. 38 2 / 832 .C A 6A / 2 8 2 90 2/ 3/8 2 A/ .3/. C 2/ -969  
 9 8. 8. / A/8 / 6- 9 29 / 3 98 1 9 / 83D398 A32 439 /-337 C, / 83/8 8. 7 C  
 1/6-98 3821 / 23 3 7 , 97 3 / 9 3 6D 2/ 9- / 63/ 2 8 , - / 36-9683D398 -983 / 8  
 /B / -/. , 8. , 8. D 8. , / /- A32 2 / 49 /-33 //8- / 382 / 832 3/8  
 3/6C 9 -98 96 2 / 0E-38-C 90 /B - 38 8. 439 /-33 , /8- / 382 / /8-2 3/8 3  
 8. 69 9. / /- 2/ / 8- / 90 9 / 8 3 63823 39 89 589A8 A2/ 2/ 2/ 832 3/8 9 6 38  
 7 6 A / 8 6D. 38 1 C. 3 /-/. 9 A -9683D , C, - / 3 8. 9. 081 338-98 9  
 2 / /8-2 3/8 9 6 398 90A297 38.33. 6 //8. 7 3-9, 3 6-9683D398  
 . /-3/. ) 9 93 -98 7 38 38 / -2 / 2 , /8 / , 632/ 2 23 -9683D398 3/ 6 /  
 A / 0 7/. 38 30 / 8 / A32. 30 / 8 / 381 2/ 3 / 9 1/39 8 8. - 8 11  
 90 7 3 9 3 / / 38 / 1/8 A / / / . 38 31 0 - 9 90 2/ 6 98 C. C0 8- 38 )  
 6 7 38 F9A - , 38 / 9 7 9839 09 9 3 6 -98 9 / 9 / /-3 / 6 / . 380- 38. C8 7 3 9--  
 7 38 38 8 / 1 3 / -98 96 A / 38-6 / . 38 / -2 2 9 129 2 / 60 90 38 833 6C380- / . , C  
 /B / 38 / 8 8. 9 8. 38 A -98 3 38F / 8D/ 8. / 2/ 38 0 2/ 38 / 69 / 1 389 9 -/ -3 -97 6/B380-  
 / / . 9 33 / 09 49 /-3 / /- 38 30 2 / 081 389 9A / 636 / 3 589A8 -98- / 8381 9 / 8 3 6  
 A . / /-/. , C 6 90 2/ C 38 39 -97 / 33 / 3823,338 , /A //8 /-3 / 2/ 38 / 69 / 1 389 7 C6373  
 /-3 / 8 38 1 2 / 6 37 / , 3 A 89 , -/ 3 6F9 09 38 8 / / 1 389 7 C6373

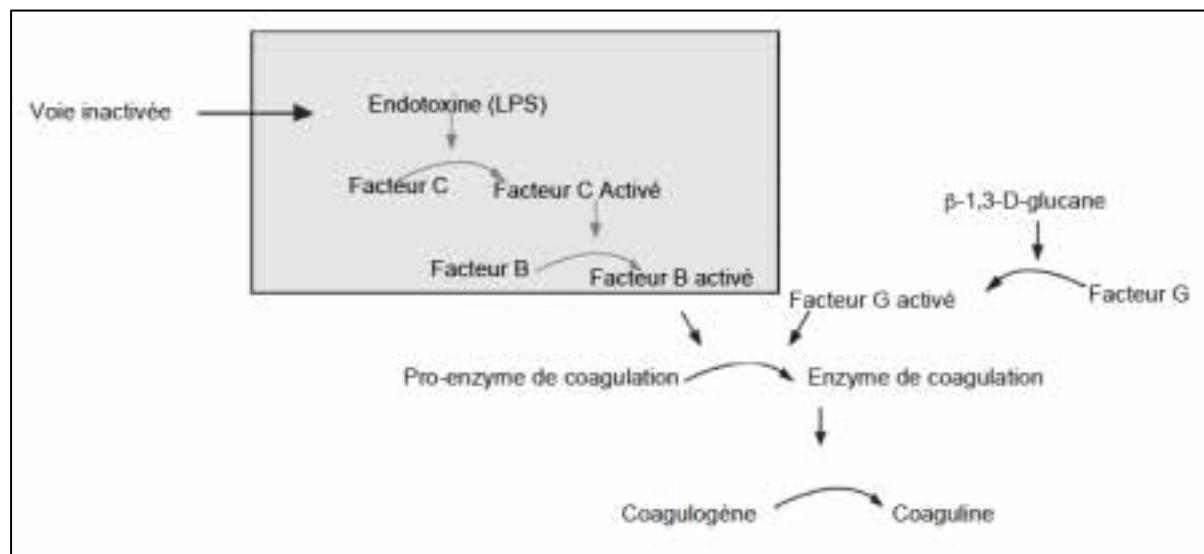
C<sub>4</sub> B A40 5 98AE4288F8C7 C<sub>4</sub>; D6B 4C74 ; B 80;80G ) 78BD3HF0B  
 ;4BB8GB C4FACHC0CC7B ;4 0C84F7 C4BC43  
 B8GBEA 98AE4288 DABCD3FB2 ; 8I 43 1H  
 1 C7( 0DA4DB 04AD6 B0  
 ;B 0C84CB8C2HBC82A B8BA4B4G 2  
 C8DDDB542C8;40 A04 2H;48 E ;B6 98AE4288  
 0BA424C;H4 AC431H C4B 0 4O; . / )7 4  
 09 A8CH5 0C8CB 0C84CB7CF4 8 E4BC8643  
 383 CD34A6 C<sub>4</sub>B4 D4C80B DC0A 243DA47 8B  
 0H4G;08 8 0ACC4; F 5A4D42H 582834C0;  
 34C42C8 5 98AE4288C7CF4 1B4E43  
 854A4 24B8 540DAB 5 98AE4284 84 8; 6H  
 8 C<sub>4</sub> 288IB 0H140 C4A20DB4 5C4B438E4A64 C  
 A1H0GB A1BC G;0A64BC28H8 A0 24 D0G  
 5 8 0 4CA ;80 0A40 34 BKH :  
 8B 270A02GAB43 1H0 ; F 8 284 24 5 ( 0 3  
 4D 2HKB 4D 8 8 2 G0BCC ( 4B;4 G  
 ;0A64BC28H8 ( 08 D0G 8 0 4C  
 A ;80 0A40 34 BKH : 8 F7827 C<sub>4</sub> 8 28  
 34 24 5 C4B4 2 388 B8 C G 4B 78674A  
 . / 2 D GAB 14C44 G G;H 8 542G3  
 0 3 8 542G3 4AB B0A4 A4 ;84;H8 ( 4B;4  
 A13B B6C 8 284 0; 02 DBK8 0 3 34G2G  
 5 98AE4288 0C81 GBF87 27A 82 ;D 6 3B10B4B  
 ;8 0C820A0 4C4B 8670;B 05542CC7 28A2D;0  
 C8 03 C4B 8B88 5C4 5D6DB8 C<sub>4</sub> ( 08B7  
 28C1B8C4AA40 2;8 0C403 8 A4B2C ; 0A  
 8C84 2;8 0C4 A4E8 DBBCD38EB F86 B868L0C  
 385A424B8 98AE4288A4B424 8 0C84CB8C7  
 27A 82 1A 2 7 D; 0 AH 38B4B 1DCF8C DC  
 2HBC82A B8EA (4E8;403 5A 84B 82A3H  
 AC7A A04 EB  
 . / 70E4 BD664BC40CC7A40A4 09 A 64  
 6A0 7829 B0A8C8B 8 98AE4284 834 8; 6H8  
 DA 4 )7 4 A4B4BCD3H A834B0338C8 ; 30C0  
 8 50E DA 5C8B/H C7B8B  
 8 0;H 98AE4288B C8 E ;E43 8 D 0AH  
 2 ; B0G 0 3 20 C14 2 BB4A13 0B0 H8;4  
 2 502CA 5 A188GB C4 081 C D0G C70CF4  
 RD3813 )74; F ;4E4; 5 98AE4288 0A0BKB 8 C74B4  
 0C81 GB F7 0A4 G G;H0CAB 5 A D 0AH2 ;  
 B0G 1420DB4 5 C74A27A 82 ;D 6 3B10B1B 0H  
 A1A2C0 ; F ;4E4; 5 282D0G 5 C4 5D 6DBF878  
 7D 0 2 D 83B8 DAA68 , 74C74AC74B4K 3  
 8 6B20 14 64 4A;843 C C4A A4 27 081 GBF87  
 2H82 K1A BB DEC F 14 F 8 E4R860G3

) 78BD3HF0B HD A03 8 0AC1HJ+08 2A4 ;0  
 D2 E8283 B1N 2 G02C % 0 3 C4  
 64 24 A0 S0B4 34 (T2DACT ( 0 8084 34  
 ; B8A 4 4 C4C3D) A0E08 (( ) 2 G02C  
 ( ) 74 2 ;;42G 5 0A278B;  
 B 428 4 BF0B A1682A13 F87 C4 A4 27 8 B8A  
 5 4B10A27 0 3 C4 64 24 T68 0;4 34

; B 80;80G ) 78BD3HF0B  
 A1B4 G3 8 0AC0CC74 G G0G 0; , A B  
 5 A G8B 0H BC ( ) 740DG AB  
 C0 : 2CA 40 4 870 5 A78B2 G81D8  
 0DG AB70B42 L82G 5  
 8 GABCC A4 AC

. / , 0;I4A 4D 2HBC8B4D 80 A 43 4F - A:  
 0 A24;4:4A  
 . / 4C4A DB8 ) 4D 2HBC8B C9DB4D  
 80 DA% 8 82A 18; M  
 . / A8B , 48 B70A 5 B70A D6 834 8;  
 6H03 2;8829 B868L024 54D 2HBC8B; 8DC8  
 5 42GB M  
 . / 4B1 022DPC +8 24 C D 840DG+ 48 0B D  
 0AH2 ; B0G F87 4D 2HKB 20A8 88 8 7D 0  
 8 D 34K281 2H8AB 460GB1 0GB1 0B8H6 AB F87  
 1; 3 ) 24; 2 D G ;8 542C B M  
 . / (86 4864A 60A3C 44B 0 4D 2HBC8B  
 20A8820A8640 6 2HBC82A B8B0C84CDB34C42C1H  
 4B43 ;8 82A 18; M  
 . / 4B 0;810 G 0 0 4 0 34;0 A0  
 0A1 B 43A0 4CO; A1H4 24 52; B8G 0 3  
 64 GH 82 270A02GABG 5 4D 2HKB 9A E428 0 6  
 2H82 K1A BB 0C81 G 8 ( 08 ;8 8A 18; 542C  
 M  
 . / 827D- 48 40 A420; D3A4I4C ( 2 C4E  
 4A42 BC80C86C4 064 5 ) DC08B A43 8  
 0 C;H5 D3 8 A8CH, 4BC4A A04 HBC 81A B8B  
 M  
 . / 4;80 8 4E 4; DG 0 AC4D8;C64 0 64  
 0AD+ 8AC 4O; 40 ; C84 DC8C08E 0BBH  
 5 A4D 2HBC8B8A128834C42C8 D:0AH C82A 18;  
 ( . / , 0:4K4;3 8G;4H 04A98( (82;0 8A 8;4A  
 G 4CO; 4C42C8 5 4D 2HBC8B8A88 F8C7  
 0 ;8120C8 024C M  
 . / , 0:4K4;3 B4D424B 834C820C 4D 2HBC8B  
 20A885 B 20A8803 4D 2HBC8B8A885 B 7 88B  
 8 B0 ;4B 508AB A0 ;8 82A 18; M  
 . / AF E0 BB4B 4C 5 LD A4B24C8 B8CD  
 7H8A380C8 03 10B43 4C73B5 AA083834C8E0  
 C8 5 DA7;34A0 24 02802 ;4G A68B B 38A42C;H  
 5A B DCD B0 ;4B ;8 82A 18; M  
 . / C4B 0 34;0 A0 0 40 0 C4B  
 A810+ 4B 0;38D 4CO; H 0 822 ;8I 0C8 1H385  
 5A4C 4D 2HBC8B8A128864 CHB8 2HBC82A B8B  
 0C84CB ;8 82A 18; 5 42C M  
 . / BC8CD4+8;4 (08C8A4(DA48;:Q4 34; 8542C8 R+  
 ( 4 A04 D;4C8 83T 8; 68 D4 41  
 3 0308A4 M  
 . / 0;34A +0A4;0 43A0 84C +  
 I 0;4I 424A0 4B 0;38D 4CO; 834 8; 6H 5  
 4D 2HBC8B8A88 4D 80 8 ( DC4A ( 08 ;8  
 82A 18; 5 42C M  
 . / 0;34A 34;0 A0 43A0 4I ( DAI  
 GB 0 0 4B 0;38D 4CO; 4D 2HKB 9A E128  
 B;0GB F87 38H8A GAOG H1G0B4 D0G B8 0C81 G  
 F87 27A 8 1A 278B DA ;8 8A 18; 542C B8  
 M  
 . / 4E 4I 0 6 8B DF 0C D8;4D6 D840DG+  
 ) C4C 0A4C 01B424 5 4D 2HBC8B8A128864  
 740CHBD942CB;8 5 42GB 4 M

## 2. Amélioration des techniques de diagnostic et de dépistage des populations infectées



**Figure 1.** Voies d'activation du lysat d'amoebocytes de Limule (d'après Finkelman et Obayashi et al. [71, 191]). Pour le dosage du  $\beta$ -1,3-D glucane, la voie du facteur C est inactivée.

Le  $\beta$ -1,3-D glucane est un composant majeur de la paroi fongique et en particulier de la paroi du kyste de *P.jirovecii* [50, 149]. Des taux sériques de  $\beta$ -1,3-D glucane supérieurs à 80 pg/mL, détectés à l'aide du kit Fungitell® (Associates of Cape Cod, Inc.), ont été rapportés chez les patients présentant des infections fongiques profondes, dont la PPC [42, 48, 53, 57, 71, 89, 144, 200, 276]. Le dosage du  $\beta$ -1,3-D glucane est basé sur une modification du mécanisme du lysat d'amoebocytes de limule (Limulus Amebocyte Lysate, LAL) [71, 178, 191]. Le LAL est un extrait aqueux de cellules sanguines (amoebocytes) de la limule (*Limulus polyphemus*). Les granules des amoebocytes libèrent en présence de lipopolysaccharide (LPS), composant de la paroi cellulaire des bactéries gram négatif, des facteurs de coagulation dont l'activation entraîne la coagulation du sang de limule. Le  $\beta$ -1,3-D glucane permet également l'activation des facteurs du LAL (Figure 1) [71, 191]. La réaction est une cascade constituée de deux voies d'activation enzymatique entraînant le clivage d'une protéine, le coagulogène. Le LPS active la voie du facteur C, tandis que le  $\beta$ -1,3-D glucane active la voie du facteur G. Quelle que soit la voie, le produit du clivage, la coaguline, entraîne une turbidité du milieu réactionnel, suivie de la formation d'un gel caillot.

Cette propriété est mise à profit pour la lecture des résultats du test diagnostic basé sur le LAL (Tableau 1). Cette cascade enzymatique peut également entraîner le clivage de petites molécules synthétiques chromogènes [191]. Ces molécules sont constituées de la paranitroaniline (pNA) et d'une portion peptidique qui comporte un site de clivage similaire au coagulogène. Le clivage protéolytique du substrat libère la pNA, un chromophore qui吸orbe à 405 nm. Cette propriété est également mise à profit pour la lecture des résultats du test diagnostic basé sur le LAL (Tableau 1). La voie du facteur C peut être inactivée pour rendre le test LAL spécifique du  $\beta$ -1,3-D glucane. La trousse Fungitell® est une des 4 trousse développées sur la base de ce test pour doser le  $\beta$ -1,3-D glucane. Elle est la seule trousse disponible en Europe et aux Etats-Unis (Tableau 1). Elle fait appel à une technique chromogénique.

**Tableau 1.** Trousses de dosage du  $\beta$ -1,3-D glucane commercialisées (d'après Finkelman [71]).

Nom de la trousse	Fournisseur	Principe de mesure	Seuil de positivité
<b>Fungitell</b>	Associates of Cape Code, Inc	Dosage colorimétrique (lecture de la densité optique à 405-490 nm)	≥ 80 pg/mL
<b>Fungitec G-MK</b>	Seikagaku Biobusiness Corporation	Dosage colorimétrique (lecture de la densité optique à 402-492 nm)	≥ 20 pg/mL
<b>β glucan test</b>	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	Dosage turbidimétrique (lecture de la densité optique à 660 nm)	≥ 11 pg/mL
<b>Beta Glucan Test</b>	Maruha Nichiro Foods Inc.	Dosage colorimétrique (lecture de la densité optique à 450-650 nm)	≥ 11 pg/mL

L'intérêt du dosage du  $\beta$ -1,3-D glucane dans le cadre du diagnostic des infections à *P.jirovecii* a été essentiellement évalué pour le diagnostic des PPC [48, 53, 54, 57, 110, 144, 177, 200, 276]. Les données concernant l'intérêt de ce dosage chez les patients adultes colonisés restent en revanche parcellaires. Une étude japonaise montre que le  $\beta$ -1,3-D glucane peut être un marqueur sérique utile pour discriminer PPC et colonisation [225].

En revanche aucune donnée n'est disponible sur l'intérêt du dosage du  $\beta$ -1,3-D glucane pour dépister les nourrissons immunocompétents qui développent une primo-infection à *P.jirovecii*. La primo-infection survient dans les deux premières années de vie [186, 245,

264] avec une fréquence maximale à 5 mois [245]. Elle peut se manifester par une symptomatologie pulmonaire associée ou non à des infections virales et/ou bactériennes. Ces infections sont le plus souvent résolutives en l'absence de traitement spécifique anti-*Pneumocystis* [186, 245, 264].

Dans ce contexte, nous avons donc évalué l'intérêt du dosage du  $\beta$ -1,3-D glucane sérique pour discriminer PPC, colonisation et primo-infection. Pour cela, nous avons dosé rétrospectivement le  $\beta$ -1,3-D glucane avec le kit Fungitell®, dans le sérum de 6 patients atteints de PPC, 8 patients colonisés, 14 nourrissons présentant une primo-infection à *P.jirovecii*. Parallèlement, 14 nourrissons pour lesquels la détection de *P.jirovecii* dans les aspirations naso-pharyngées était négative, ont été inclus en tant que contrôles négatifs. Les taux de  $\beta$ -1,3-D glucane étaient inférieurs au seuil de 80 pg/mL chez 6 des 8 patients colonisés et chez les nourrissons non infectés par *P.jirovecii*. Les taux de  $\beta$ -1,3-D glucane étaient supérieurs à 80 pg/mL chez 13 des 14 nourrissons présentant une primo-infection (taux médian=217,6 pg/mL [56-394]) et chez les 6 patients atteints de PPC (taux médian=1768,5 pg/mL [184-2710]). Les taux dans ces deux populations de patients étaient significativement plus élevés que chez les patients colonisés ( $p<0,05$ ). Ces résultats montrent que le dosage du  $\beta$ -1,3-D glucane peut être un outil intéressant pour discriminer PPC et colonisation. Ils apportent également les premières données sur les taux de  $\beta$ -1,3-D glucane observés au cours de la primo-infection chez les nourrissons.

Ce travail est rapporté dans l'article " **Serum (1→3)  $\beta$ -D-Glucan levels in primary infection and pulmonary colonization with *Pneumocystis jirovecii*.** Damiani C, Le Gal S, Lejeune D, Virmaux M, Nevez G, Totet A. Journal of Clinical Microbiology 2011; 49(5): 2000-2".

**Article 2**

**Serum (1-->3)  $\beta$ -D-Glucan levels in primary infection and pulmonary colonization with  
*Pneumocystis jirovecii***

## Serum (1→3)- $\beta$ -D-Glucan Levels in Primary Infection and Pulmonary Colonization with *Pneumocystis jirovecii*<sup>▽</sup>

Céline Damiani,<sup>1,2</sup> Solène Le Gal,<sup>3,4</sup> Delphine Lejeune,<sup>1</sup> Naima Brahimi,<sup>1</sup> Michèle Virmaux,<sup>3</sup> Gilles Nevez,<sup>3,4</sup> and Anne Totet<sup>1,2\*</sup>

Parasitology and Mycology Department, University Hospital, Amiens, France<sup>1</sup>; University of Picardy Jules Verne, EA 4285 UMI INERIS 01, Amiens, France<sup>2</sup>; UEB, University of Brest, LUBEM EA 3882, IFR 148, Brest, France<sup>3</sup>; and Parasitology and Mycology Department, University Hospital, Brest, France<sup>4</sup>

Received 4 February 2011/Returned for modification 28 February 2011/Accepted 11 March 2011

This article describes positive (1→3)- $\beta$ -D-glucan levels in serum from infants with primary *Pneumocystis* infection and from immunosuppressed patients with *Pneumocystis* pneumonia (PCP) and negative levels in serum from patients colonized by *Pneumocystis jirovecii*. Glucan detection is a complementary tool for the diagnosis of the diverse clinical presentations of *P. jirovecii* infection.

*Pneumocystis jirovecii* (the human-specific *Pneumocystis* species) is an atypical fungus that has been recognized for a long time as a cause of severe pneumonia (*Pneumocystis* pneumonia [PCP]) in immunocompromised individuals. More recently, the use of PCR assays for *P. jirovecii* detection in pulmonary samples has revealed that immunocompromised patients and patients with lung diseases can be infected by only a small number of microorganisms, which are usually not detected by microscopy (13). The term colonization is frequently used in this context. It has also been established that *P. jirovecii* can be detected by PCR in nasopharyngeal aspirates (NPA) from immunocompetent infants who develop primary *Pneumocystis* infection contemporaneously with acute respiratory syndromes (18, 19).

(1→3)- $\beta$ -D-Glucan (BG) represents a major structural component of the cell wall of most fungi and is abundant in *Pneumocystis* cysts (4). Previous studies have reported high levels of BG in serum samples from patients with PCP (2, 3, 5–9, 11, 12, 14, 15, 17, 20). In contrast, this marker has been investigated in only one study concerning pulmonary colonization with *P. jirovecii* (16) and has not yet been studied in primary *Pneumocystis* infection. In this study, we retrospectively investigated BG levels in serum samples from infants developing primary *Pneumocystis* infection, adults colonized by *P. jirovecii*, and adults developing PCP, who were followed up at Amiens University Hospital (France).

Fourteen immunocompetent term infants (mean age, 6 months [range, 1.7 to 15.7]; 9 boys and 5 girls) with primary *Pneumocystis* infection were enrolled. They were hospitalized between November 1999 and April 2001. NPA and serum samples were initially collected from all infants to investigate an acute respiratory syndrome. Serum samples were collected over an interval ranging from 2 days before to 3 days after NPA retrieval. No infants presented immunodeficiency and risk factors or clinical signs of invasive fungal infection. No infants had

received antibiotics before sampling. *P. jirovecii* was detected by a real-time PCR assay targeting the mitochondrial large subunit rRNA (mtLSU rRNA) gene, as previously reported (18). The diagnosis of primary *Pneumocystis* infection was based on positive results of *P. jirovecii* detection and the low mean age of the infants (6 months), compatible with first contact with the fungus. Clinical improvement was obtained in all infants in response to respiratory physiotherapy, despite the absence of any specific treatment for the fungus. Eight patients colonized by *P. jirovecii* (mean age, 50.8 years [range, 23 to 77]; 5 men and 3 women) hospitalized between February 2008 and June 2009 were enrolled. Bronchoalveolar lavage (BAL) and serum samples were initially collected from patients to investigate pulmonary symptoms (abnormal chest X-ray, cough) or fever. Serum samples were collected over an interval ranging from 2 days before to 10 days after BAL fluid retrieval. None of the patients presented clinical or laboratory signs of invasive fungal infection. Detection of *Aspergillus* galactomannan and *Candida* mannan antigens in serum samples using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Platelia Candida Ag plus and Platelia Aspergillus Ag; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and blood cultures (Bactec Mycosis; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD) were negative. *P. jirovecii* was not detected in BAL specimens by microscopic examination but was detected by a real-time PCR assay directed at the mtLSU rRNA gene, as previously described (10). Alternative diagnoses of PCP were bacterial pneumonia (six patients), pulmonary sarcoidosis (one patient), and bronchial carcinoma (one patient). Clinical improvement was observed in all patients except for the patient with bronchial carcinoma, despite the absence of any specific treatment for the fungus. Patients with bacterial pneumonia and pulmonary sarcoidosis were successfully treated by extended-spectrum beta-lactam antibiotics and corticosteroids, respectively. The follow-up with no PCP occurrence ranged from 2 to 21 months. The patient with lung cancer died 6 weeks after *P. jirovecii* detection in a context of terminal cancer with no evidence of a contribution of *P. jirovecii* to death. A diagnosis of PCP was therefore excluded by the physicians, and all eight patients were considered to be colonized by *P. jirovecii*.

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU, Centre Hospitalier Sud, 1 Avenue René Laennec, 80054 Amiens, France. Phone: 33 3 22 45 59 75. Fax: 33 3 22 45 56 53. E-mail: totet.anne@chu-amiens.fr.

▽ Published ahead of print on 23 March 2011.

Six patients diagnosed with PCP (mean age, 53 years [range, 31 to 69]; 5 men and 1 woman) hospitalized between August 2008 and April 2009 were enrolled and were used as positive controls for BG detection. The diagnosis of PCP was based on the criteria described by the Centers for Disease Control and Prevention for HIV-infected patients (1). BAL and serum samples were initially collected from all patients to investigate pulmonary symptoms. Serum samples were collected on the same day as BAL fluid retrieval. None of the patients presented any clinical or laboratory signs of invasive fungal infection other than PCP. Serum samples were negative for *Aspergillus* galactomannan and *Candida* mannan antigens. Blood cultures were also negative. None of the patients had received antibiotics before sampling. The BAL specimens tested positive for *P. jirovecii* by microscopic examination with Giemsa stain and an immunofluorescence assay (MonofluoKit *Pneumocystis*; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and by a real-time PCR assay directed at the mtLSU rRNA gene. Underlying conditions were HIV infection, bronchial carcinoma, colonic adenocarcinoma, acute alcoholic hepatitis treated with high-dose corticosteroids (one patient each), and kidney transplantation (two patients). All patients received anti-*Pneumocystis* treatment immediately after the diagnosis of PCP was established. Clinical improvement was obtained after 3 weeks of treatment in five patients. One patient died from stroke 4 days after PCP diagnosis.

Serum samples from the three populations were stored at -80°C. BG levels in stored serum samples were determined using the Fungitell test kit (Associates of Cape Cod, Inc., Cape Cod, MA) according to the manufacturer's instructions. A BG level of  $\geq 80$  pg/ml was considered to be positive. The results of BG detection in the three populations were compared using Student's test and Wilcoxon's test. Statistical significance was defined as a *P* value of  $< 0.05$ .

The results of BG detection in infants ranged from 56 to 394 pg/ml, with a median value of 217.6 pg/ml. Thirteen of the 14 infants had a positive result, i.e.,  $\geq 80$  pg/ml. The results in colonized patients ranged from 45 to 84 pg/ml, with a median value of 69.5 pg/ml. Six of the 8 colonized patients had a negative result. BG levels in the remaining two patients were 82.7 and 84 pg/ml. Patients with PCP had positive BG results, with high values ranging from 184 to 2,710 pg/ml and a median value of 1,768.5 pg/ml.

BG levels in infants and colonized patients were significantly lower than those in the PCP control group (*P* < 0.05). BG levels in infants were significantly higher than those in colonized adults (*P* < 0.05). Results are shown in Fig. 1.

This study reports high BG levels for patients with PCP. Similar results have previously been reported (2, 3, 5-9, 11, 12, 14-17, 20). None of these patients presented any factors that interfere with BG levels, especially antibiotics prior to sampling or invasive fungal infection. These BG levels can then be correlated with the presence of *P. jirovecii* cysts in the lungs, which were effectively numerous and easily observed on microscopic examination of BAL samples.

Although the number of infants is limited, this is the first study to report serum BG levels during primary *Pneumocystis* infection. Positive serum BG levels were observed in 93% (13/14) of infants, with a median value of 217.6 pg/ml. None of these infants presented any factors that interfere with serum

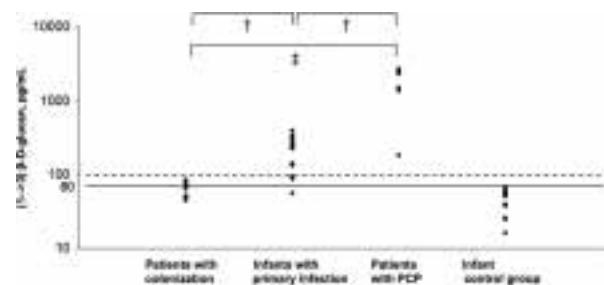


FIG. 1. Serum (1→3)- $\beta$ -D-glucan levels in infants with primary *Pneumocystis* infection, patients with *Pneumocystis* colonization, patients with *Pneumocystis* pneumonia (PCP), and an infant control group. Serum BG levels were significantly higher in the PCP control group than in infants with primary infection (†, Student's test, *P* < 0.05) and colonized patients (‡, Wilcoxon's test, *P* < 0.05). Serum BG levels were significantly higher in infants with primary infection than in colonized patients (†, Student's test, *P* < 0.05).

BG levels. Furthermore, BG was not detected in a control group that consisted of 14 infants hospitalized for an acute respiratory syndrome and negative for *P. jirovecii* detection (results are shown in Fig. 1). These results are therefore consistent with the presence of *P. jirovecii* cysts in the lungs of infants with primary *Pneumocystis* infection, as was established in adults with PCP. However, none of the infants presented BG levels higher than 400 pg/ml, in contrast with adult patients with PCP. The burden of *P. jirovecii* cysts in the lungs may be limited during the course of primary infection. Indeed, although infants are immune naive for *P. jirovecii*, they are not immunocompromised and their immune response is sufficiently effective to finally clear the fungus without the need for specific treatment.

In contrast, 6/8 colonized patients had negative serum BG levels, i.e., less than 80 pg/ml. The two remaining patients presented positive BG results, but with values clearly lower than 100 pg/ml, i.e., 82.7 and 84 pg/ml. These results may be explained by the absence or rarity of *P. jirovecii* cysts in pulmonary alveoli.

Taking into account the results of BG detection, *Pneumocystis* infection in immunocompetent infants appears to be a clinical entity which may be closer to PCP than to pulmonary colonization. Moreover, serum BG levels combined with PCR assay may discriminate between PCP and pulmonary colonization with *P. jirovecii*. A serum BG assay is a noninvasive test which appears to be a complementary tool for the diagnosis of the diverse presentations of *P. jirovecii* infection.

This study was supported by the Agence Française de la Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (conventions EST/2006/1/41).

This study was approved by the Ethics Commission of Picardy, France. The project was registered in France with the Direction Générale de la Santé (no. 990440).

#### REFERENCES

1. Centers for Disease Control and Prevention. 1992. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 41:1-19.
2. Cuetara, M. S., et al. 2008. Use of a serum (1→3)-beta-D-glucan assay for diagnosis and follow-up of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Clin. Infect. Dis. 47:1364-1366.
3. de Boer, M. G., et al. 2011.  $\beta$ -D-Glucan and s-adenosylmethionine serum

- levels for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-negative patients: a prospective study. *J. Infect.* **63**:93–100.
4. Dei-Cas, E., E. M. Aliouat, and J. C. Caillez. 2005. *Pneumocystis* cellular structure, p. 61–94. In P. D. Walzer and M. Cushion (ed.), *Pneumocystis* pneumonia, 3rd ed. Marcel Dekker, New York, NY.
  5. Del Bono, V., et al. 2009. Clinical evaluation of a (1,3)-beta-D-glucan assay for presumptive diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients. *Clin. Vaccine Immunol.* **16**:1524–1526.
  6. Desmet, S., et al. 2009. Serum (1–3)-beta-D-glucan as a tool for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection or hematological malignancy. *J. Clin. Microbiol.* **47**:3871–3874.
  7. Finkelman, M. A. 2010. *Pneumocystis jirovecii* infection: Cell wall (1→3)- $\beta$ -D-glucan biology and diagnostic utility. *Crit. Rev. Microbiol.* **36**:271–281.
  8. Held, J., M. Koch, U. Reischl, T. Danner, and A. Serr. 2010. Serum (1→3)-beta-D-glucan measurement as early indicator for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and evaluation of its prognostic value. *Clin. Microbiol. Infect.* doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03318.x.
  9. Marty, F. M., S. Koo, J. Bryar, and L. R. Baden. 2007. (1→3) beta-D-glucan assay positivity in patients with *Pneumocystis (carinii) jirovecii* pneumonia. *Ann. Intern. Med.* **147**:70–72.
  10. Meliani, L., et al. 2003. Real time quantitative PCR assay for *Pneumocystis jirovecii* detection. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50**(Suppl.):651.
  11. Nakamura, H., et al. 2009. Clinical utility of serum beta-D-glucan and KL-6 levels in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Intern. Med.* **48**:195–202.
  12. Persat, F., et al. 2008. Contribution of the (1→3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* **46**:1009–1013.
  13. Peterson, J. C., and M. T. Cushion. 2005. *Pneumocystis*: not just pneumonia. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:393–398.
  14. Pisculli, M. L., and P. E. Sax. 2008. Use of a serum beta-glucan assay for diagnosis of HIV-related *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with negative microscopic examination results. *Clin. Infect. Dis.* **46**:1928–1930.
  15. Shimizu, A., H. Oka, T. Matsuda, and S. Ozaki. 2005. (1→3)-Beta-D glucan is a diagnostic and negative prognostic marker for *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with connective tissue disease. *Clin. Exp. Rheumatol.* **23**:678–680.
  16. Shimizu, Y., et al. 2009. Serum markers in interstitial pneumonia with and without *Pneumocystis jirovecii* colonization: a prospective study. *BMC Infect. Dis.* **9**:47.
  17. Tasaka, S., et al. 2007. Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. *Chest* **131**:1173–1180.
  18. Totet, A., et al. 2003. Immunocompetent infants as a human reservoir for *Pneumocystis jirovecii*: rapid screening by non-invasive sampling and real-time PCR at the mitochondrial large subunit rRNA gene. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50**(Suppl.):668–669.
  19. Vargas, S. L., et al. 2001. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin. Infect. Dis.* **32**:855–861.
  20. Watanabe, T., et al. 2009. Serum (1→3) beta-D-glucan as a noninvasive adjunct marker for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **49**:1128–1131.

## CHAPITRE 2

### Caractérisation de *Pneumocystis jirovecii* dans les populations infectées

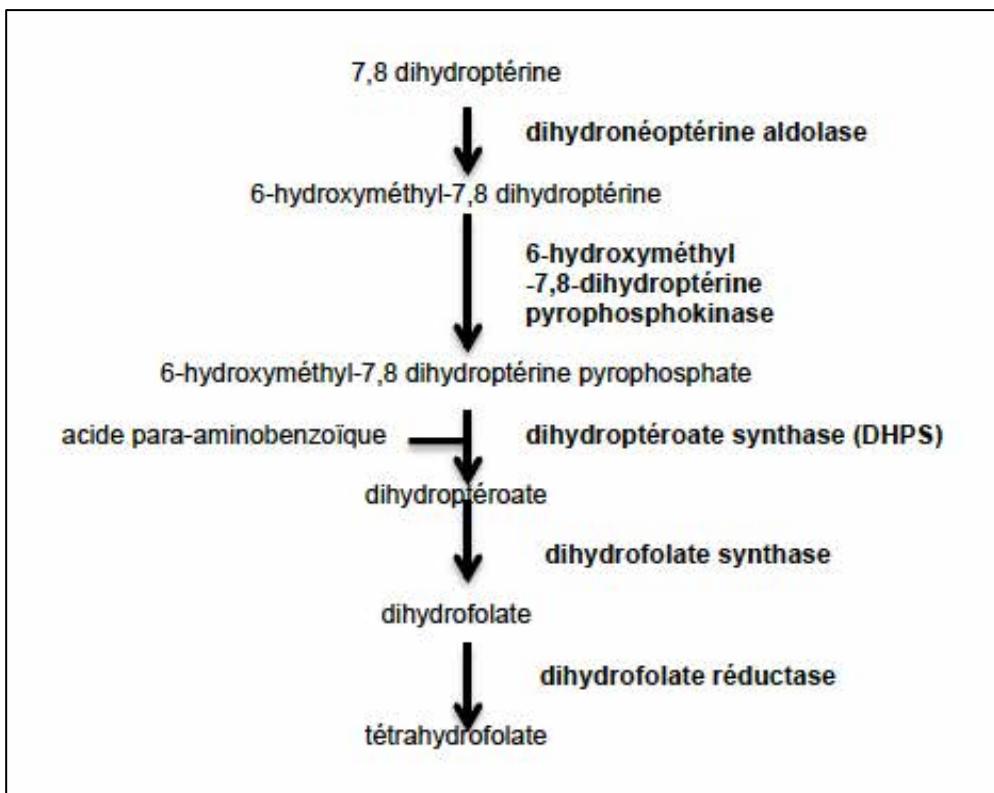
En raison de l'impossibilité de cultiver et donc d'isoler *P.jirovecii*, les méthodes utilisées pour caractériser ce champignon reposent sur l'amplification de séquences génomiques spécifiques. Ces méthodes diffèrent par le nombre de loci étudiés et le mode d'analyse de ces loci. L'analyse des séquences nucléotidiques reste la méthode la plus fréquemment utilisée. Les loci les plus fréquemment étudiés sont ceux codant pour la mtLSUrRNA [15, 46, 66, 67, 79, 119, 125, 160, 166, 260, 273], la DHPS [7, 15, 19, 23, 40, 41, 58, 67, 68, 91, 99, 115-117, 122, 123, 130, 136, 147, 151, 159, 173, 175, 179, 212, 230, 239, 259, 260, 269, 277], et les séquences des ITS1 et 2 [18, 78, 93, 98, 125, 127, 131, 134, 151, 185, 189, 213, 231, 249, 253, 254, 259, 260]. Une variabilité géographique des génotypes de *P.jirovecii* a été rapportée sur ces loci [7, 15, 18, 19, 23, 41, 46, 58, 68, 78, 79, 91, 93, 98, 99, 115-117, 119, 122, 125, 127, 131, 134, 136, 147, 151, 159, 160, 166, 173, 179, 185, 189, 213, 231, 249, 253, 254, 259, 260, 269, 273, 277]. Toutefois, les données sur les caractéristiques génotypiques de *P.jirovecii* en France restent limitées. Plus précisément, aucune donnée concernant ces caractéristiques en Bretagne n'est disponible. Dans ce contexte, nous avons génotypé *P.jirovecii* à partir des isolats fongiques provenant de patients suivis au CHRU de Brest. L'analyse a porté sur le locus de la DHPS d'une part, et sur les ITS 1 et 2 d'autre part.

## 1. Prévalence des mutants DHPS à Brest

FasA	FasB	FasC	FasD = DHPS
------	------	------	-------------

**Figure 2.** Représentation des quatre domaines du polypeptide Fas d'après Volpe et al., 1993 [270].

Le gène *fas* ("folic acid synthesis") code pour un polypeptide constitué de 4 domaines, FasA, FasB, FasC et FasD dont 3 présentent une activité enzymatique (Figure 2). Le domaine FasB porte l'activité dihydronoptérine aldolase, le domaine FasC l'activité 6-hydroxyméthyl-7,8-dihydroptérine pyrophosphokinase et le domaine FasD l'activité dihydroptéroate synthase (DHPS) [270]. Ces trois enzymes interviennent dans la synthèse du tétrahydrofolate, coenzyme nécessaire à la synthèse des bases puriques notamment (Figure 3).

**Figure 3.** Voie de synthèse des folates.

Par ailleurs, la DHPS est l'enzyme cible des sulfamides, molécules utilisées dans la prophylaxie et le traitement des infections à *Pneumocystis* [122, 145]. Les sulfamides sont des analogues structuraux de l'acide para-aminobenzoïque, substrat de la DHPS, qui agissent comme des inhibiteurs compétitifs en se fixant sur l'enzyme au niveau du site de liaison de l'acide para-aminobenzoïque [10]. Dix mutations non synonymes ont été décrites au niveau de la séquence du locus DHPS [122, 147]. Deux de ces mutations ont été plus fréquemment étudiées. Elles concernent les nucléotides des positions 165 et 171 du locus. La première mutation est une transition d'une adénine en guanine en position 165 qui entraîne la substitution d'une thréonine par une alanine au niveau du codon 55 [122, 136]. La seconde mutation est une transition d'une cytosine en thymidine en position 171 qui entraîne à la substitution d'une proline par une sérine au niveau du codon 57 [122, 136]. Ces mutations concernent des acides aminés situés dans une région hautement conservée dont la séquence est proche de celles d'autres microorganismes, tels que *Escherichia coli* (*E.coli*) et *Plasmodium falciparum* (*P.falciparum*) [45, 136, 251]. Cette région serait située au niveau du site de liaison putatif de l'acide para-aminobenzoïque et des sulfamides d'après la structure cristalline de la DHPS d'*E.coli* [1]. Des mutations identifiées dans cette région confèrent une

résistance aux sulfamides chez *E.coli* et *P.falciparum* [21, 252, 268]. Par analogie, les mutations au niveau des nucléotides 165 et 171 du locus DHPS de *P.jirovecii* pourraient également conférer une moindre sensibilité du champignon à ces molécules. Elles ont été associées à des échecs de prophylaxie par les sulfamides chez des patients développant une PPC [10, 116, 153, 176, 269]. Les patients infectés par des souches mutantes présenteraient également un risque relatif significativement plus élevé d'échec de traitement de la PPC par les sulfamides que les patients infectés par une souche sauvage [115, 259]. Toutefois, les échecs thérapeutiques pourraient ne pas être imputés au seul fait que les patients sont infectés par une souche mutante, et le rôle d'autres facteurs, comme les affections sous-jacentes, les facteurs de co-morbidité et la sévérité de la PPC est discuté [100].

Si en théorie ces mutations sont susceptibles d'induire chez *P.jirovecii* une diminution de la sensibilité aux sulfamides, en pratique cela reste difficile à prouver in vitro en raison de l'impossibilité de cultiver ce champignon. Les résultats obtenus avec les modèles *Saccharomyces cerevisiae* et *Escherichia coli* suggèrent que les souches de *P.jirovecii* mutées au niveau des nucléotides 165 et 171 présentent une moindre sensibilité aux sulfamides que les souches sauvages [105-107, 155, 171]. Toutefois les résultats obtenus à l'aide de ces modèles sont difficiles à interpréter.

Il est désormais admis que les antécédents de traitement ou de prophylaxie par sulfamides représentent un facteur de risque de développer une infection par une souche mutante de *P.jirovecii* [10, 41, 91, 99, 115, 137, 159, 175, 176]. Le lieu de résidence a également été défini comme un facteur de risque de développer une infection avec une souche mutante indépendamment des antécédents d'exposition aux sulfamides [15, 99]. En effet, la prévalence des mutants varie en fonction des régions [147] (Annexe 1). Elle est par exemple de 81% à San Francisco [99], de 54% à Atlanta [99], de 20% à Copenhague [91], de 18,5% à Paris [139], de 8% à Amiens [247] et de 0% à Stockholm [19]. La pression de sélection exercée par les sulfamides, variable en fonction du lieu de résidence des patients, combinée avec la transmission de *P.jirovecii* de patients infectés traités à patients susceptibles non traités, pourrait expliquer ces différences de prévalence [15, 40, 58, 88, 99, 101, 115, 117, 159, 176, 259]. Les populations infectées joueraient donc un rôle majeur dans la circulation du champignon [15, 88, 99, 101, 247].

En l'absence de données sur la prévalence des mutants DHPS dans l'ouest de la France, nous avons déterminé la prévalence des mutants à Brest. L'analyse du locus DHPS a été effectuée rétrospectivement sur les prélèvements pulmonaires de 85 patients infectés par *P.jirovecii* et

admis au CHRU de Brest entre octobre 2007 et février 2010. Cette analyse a été réalisée à l'aide d'une technique de PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) [15, 59, 92, 122]. L'amplification du locus DHPS et l'analyse des profils de restriction ont été possibles chez 66 patients. Un génotype sauvage a été identifié chez 64 patients. Des génotypes mutants ont été identifiés chez deux patients, soit une prévalence de 3% (2/66). Par ailleurs, l'analyse des dossiers des patients a révélé que les deux patients infectés par des souches mutantes résidaient habituellement en région parisienne, zone caractérisée par une prévalence élevée de mutants comprise entre 18,5 et 40 % [59, 139]. Les diagnostics des infections à *P.jirovecii* ont été posés chez ces deux patients au cours d'un séjour à Brest inférieur à 1 mois. La période d'incubation des infections à *P.jirovecii* généralement admise étant d'environ 2 mois [90, 207], nous pouvons poser l'hypothèse que ces patients se sont infectés à Paris, leur lieu de résidence habituel. Les mutants détectés chez ces patients auraient donc pu être "importés" de Paris. Ces résultats constituent des arguments faisant de la ville de résidence habituelle, plus que la ville où le diagnostic a été effectué, un facteur de risque d'acquisition de mutants. Ces résultats suggèrent également que les infections par des mutants potentiellement résistants aux sulfamides ne représentent pas un problème de santé publique au CHRU de Brest.

Ce travail est présenté dans l'article "**Circulation of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutants in France.** Le Gal S, Damiani C, Perrot M, Rouillé A, Virmaux M, Moalic E, Quinio D, Saliou P, Le Meur Y, Berthou C, Totet A, Nevez G. Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases 2012; 74:119-24".

**Article 3**

**Circulation of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutants in France**



## Circulation of *Pneumocystis dihydropteroate synthase* mutants in France

Solène Le Gal <sup>a,b,\*</sup>, Céline Damiani <sup>c,d</sup>, Maëla Perrot <sup>a</sup>, Amélie Rouillé <sup>e</sup>, Michèle Virmaux <sup>a</sup>, Dorothée Quinio <sup>a,b</sup>, Elodie Moalic <sup>a,b</sup>, Philippe Saliou <sup>f</sup>, Christian Berthou <sup>g,h</sup>, Yann Le Meur <sup>g,i</sup>, Anne Totet <sup>c,d</sup>, Gilles Nevez <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> UEB, University of Brest, LUBEM EA 3882, SFR 148, Brest, France

<sup>b</sup> Laboratory of Parasitology and Mycology, Brest University Hospital, Brest, France

<sup>c</sup> Department of Parasitology and Mycology, Amiens University Hospital, Amiens, France

<sup>d</sup> University of Picardy-Jules Verne, EA 4285 UMI INERIS 01, Amiens, France

<sup>e</sup> Department of Biochemistry and Pharmacology, Brest University Hospital, Brest, France

<sup>f</sup> Department of Public Health, Brest University Hospital, Brest, France

<sup>g</sup> UEB, University of Brest, EA 2216, SFR 148, Brest, France

<sup>h</sup> Department of Haematology, Brest University Hospital, Brest, France

<sup>i</sup> Department of Nephrology and Renal Transplantation Unit, Brest University Hospital, Brest, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 April 2012

Accepted 4 June 2012

Available online 15 July 2012

#### Keywords:

*Pneumocystis jirovecii*

DHPS

Mutants

### ABSTRACT

Data on the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) dihydropteroate synthase (DHPS) mutants in France are still limited. In this study, mutant prevalence in the Brest region (western France) was determined. Archival pulmonary specimens from 85 patients infected with *P. jirovecii* and admitted to our institution (University Hospital, Brest) from October 2007 to February 2010 were retrospectively typed at the DHPS locus using a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. Type identification was successful in 66 of 85 patients. Sixty-four patients were infected with a wild type, whereas mutants were found in 2 patients (2/66, 3%). Medical chart analysis revealed that these 2 patients usually lived in Paris. Another patient usually lived on the French Riviera, whereas 63 patients were from the city of Brest. Thus, the corrected prevalence of mutants in patients who effectively lived in our geographic area was 0% (0/63). Taking into account that i) Paris is characterized by a high prevalence of mutants from 18.5% to 40%, ii) infection diagnoses were performed in the 2 Parisians during their vacation <30 days, iii) infection incubation is assumed to last about 2 months, the results provide evidence of mutant circulation from Paris to Brest through infected vacationers. The study shows that the usual city of patient residence, rather than the city of infection diagnosis, is a predictor of mutants and that *P. jirovecii* infections involving mutants do not represent a public health issue in western France.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The transmissible fungus *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) is the causative agent of severe pneumonia (*Pneumocystis* pneumonia [PCP]) in immunocompromised patients (Walzer and Cushion, 2005). However, PCP represents only part of the clinical presentations of the fungal infection, while mild infections such as pulmonary

colonization in patients with diverse levels of deficiency and lung diseases account for the main part (Morris et al., 2008; Nevez et al., 1999). *P. jirovecii* is widespread within human communities, while no exosaprophytic form of *Pneumocystis* sp. has been identified so far. Since *Pneumocystis* organisms infecting each mammalian species are host specific (Stringer et al., 2002), an animal reservoir for *P. jirovecii* is excluded. For these reasons, *P. jirovecii* infection in humans is considered to be an anthropozoonosis, with humans as potential infectious sources of the fungus.

The dihydropteroate synthase (DHPS) is the enzymatic target of sulfonamides, which are the main drugs used in PCP prophylaxis or treatment. *P. jirovecii* organisms with mutations at the DHPS locus, mainly at nucleotide positions 165 and 171, have been detected in patients developing *P. jirovecii* infections (Lane et al., 1997) (reviewed in Matos and Esteves, 2010; Totet et al., 2004). The first mutation corresponds to a transition from A to G and an amino acid substitution from threonine to alanine at codon 55. The second one corresponds to

\* Conflict of interest: None of the authors has any conflicts of interest to declare.

\*\* Financial support: This study was supported by the Cellule Régionale d'Epidémiologie Nosocomiale (CRENO), the Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFSSET) (contract number EST-2006/1/41), and the Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) (contract number 2011/1/053). The results of this study were presented in part at the 5th Trends in Medical Mycology, Valencia, Spain, 2–5 October 2011, abstract P230.

\* Corresponding author. Tel.: +33-(0)2-98-14-51-02; fax: +33-(0)2-98-14-51-49.  
E-mail address: [solene.legal@chu-brest.fr](mailto:solene.legal@chu-brest.fr) (S. Le Gal).

a transition from C to T and an amino acid substitution from proline to serine at codon 57. These changes, which are located within the putative sulfa-binding site, have been associated with failure of sulfonamide prophylaxis (Armstrong et al., 2000; Kazanjian et al., 1998; Mei et al., 1998; Nahimana et al., 2003; Visconti et al., 2001).

Prior exposure to sulfonamides has been identified as the main factor for developing infection involving *P. jirovecii* DHPS mutants (Crothers et al., 2005; Huang et al., 2000; Kazanjian et al., 2000; Ma et al., 2002; Miller et al., 2003; Nahimana et al., 2003). In addition, the city of patient residence has also been identified as a predictor of mutants in patients with or without prior exposure to sulfonamides (Beard et al., 2000; Huang et al., 2000). These factors support the hypothesis that *P. jirovecii* is transmitted from infected treated patients to susceptible untreated patients. For these reasons, analysis of the DHPS locus may serve as a marker of *P. jirovecii* circulation within human communities (Beard et al., 2000; Hauser et al., 2010; Huang et al., 2000).

Geographical variations of mutant prevalence have been reported worldwide (reviewed in Matos and Esteves, 2010; Totet et al., 2004). In French cities, this prevalence varies from 18.5% to 40% in Paris (Diop-Santos et al., 1999; Magne et al., 2011); from 33% to 36% in Lyon, southeastern France (Hauser et al., 2010; Nahimana et al., 2003); and 8% in Amiens, northern France (Totet et al., 2004). Data on mutant prevalence in France are still limited, and no information on this topic from our city, Brest, in western France is available. Brest is a city of 160,000 people (in a metropolitan area of 303,000), located at the western tip of France, in the Brittany region on the coasts of the Atlantic Ocean and the English Channel, 660 km from Paris and Amiens, and 900 km from Lyon. The region is characterized by a low incidence of AIDS and AIDS-related PCP (Cazein et al., 2010), which represent particular geographic features of *P. jirovecii* epidemiology. In this context, to determine the frequency of mutants in our region, archival *P. jirovecii* specimens from 85 patients admitted to Brest University Hospital were typed using amplification of the DHPS locus, followed by a restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients and specimens

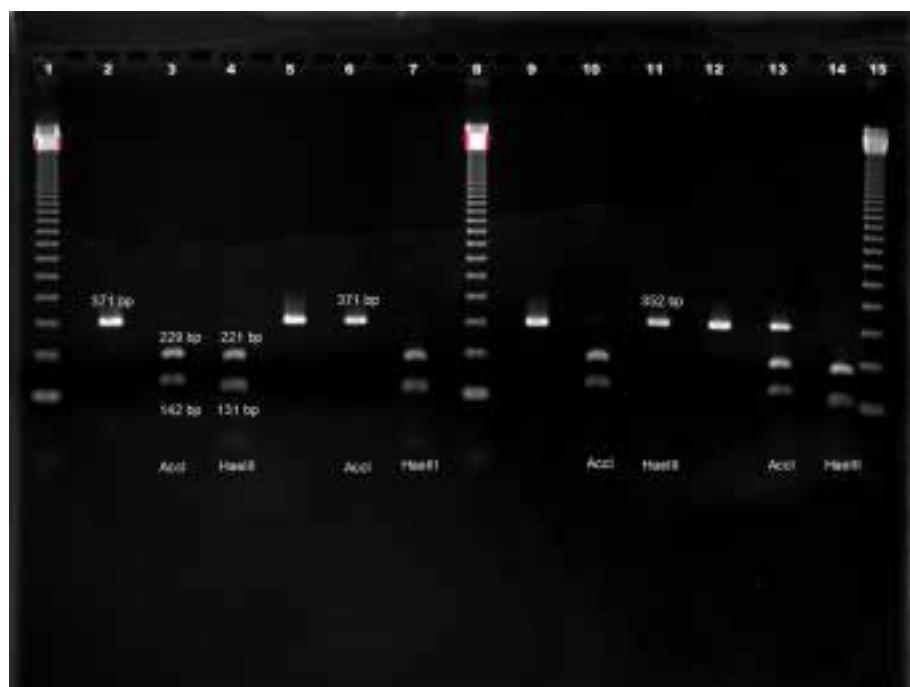
Ninety-three archival *P. jirovecii* DNA specimens from 85 patients were examined for DHPS type identification. The patients were admitted to Brest University Hospital in the period from October 3, 2007, through February 10, 2010. The patients' median age was 63 years (range, 3–87 years). The male/female sex ratio was 53:32. The BAL specimens had initially tested positive for *P. jirovecii* based on microscopic examination using Wright–Giems and Toluidine blue O stains and a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay. After DNA extraction using NucliSENS easyMag system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), the PCR assay was performed with specific probe and primers of the gene encoding the mitochondrial large subunit rRNA (mtLSUrRNA) as reported elsewhere (Meliani et al., 2003; Totet et al., 2003). Risk factors for *P. jirovecii* infection were hematologic malignancies (24 patients), transplantation (18 patients), cancers (14 patients), immunosuppressive therapies (13 patients), chronic bronchopulmonary diseases (7 patients), HIV infection (4 patients), malnutrition (2 patients), congenital immunodeficiency, alcoholism, and adrenocortical carcinoma (1 patient each). Forty-four patients developed PCP, whereas 41 patients were colonized by the fungus. The fungus was detected by both microscopic techniques and the PCR assay in 22 patients who developed PCP, whereas it was detected by only the PCR assay in the remaining 22 PCP patients and in 41 colonized patients. The 22 patients were considered to have developed PCP despite the absence of microscopic detection of *P. jirovecii*, because they presented clinical and radiological signs

compatible with PCP, combined with improvement after specific treatment and absence of alternative diagnoses of PCP. The 41 patients were considered to be colonized since they presented alternative diagnoses of PCP. These alternative diagnoses were bacterial pneumonia (23 patients), bronchial carcinoma (5 patients), drug-induced pneumonia (4 patients), pulmonary aspergillosis (2 patient), and viral pneumonia, sarcoidosis, tuberculosis, exacerbation of chronic bronchitis, Eisenmenger syndrome, pulmonary edema, pulmonary fibrosis (1 patient each). Extracted DNA samples of the 93 BAL fluids were stored at –80 °C until they were typed.

A retrospective analysis of medical charts was performed to collect data on the clinical outcome, the city of patient residence, and the past history of *P. jirovecii* prophylaxis or treatment with sulfonamides in the 3 months preceding *Pneumocystis* infection diagnoses.

### 2.2. *P. jirovecii* DHPS typing

The typing was performed using an original PCR-RFLP assay. First, the DHPS locus was amplified using a nested-PCR assay. The first round was performed using the primer pair F1 (5'-CCT GGT ATT AAA CCA GTT TTG CC-3') (Beard et al., 2000) and B45 (5'-CAA TTT AAT AAA TTT CT TCC AAA TAG CAT C-3') (Lane et al., 1997). The second-round PCR was performed using the primer pair A<sub>HUM</sub> (5'-GCG CCT ACA CAT ATT ATG GCC ATT TTA AAT C-3') (Lane et al., 1997) and BN (5'-GGA ACT TTC AAC TTG GCA ACC AC-3') (Beard et al., 2000; Lane et al., 1997). The same reagent conditions were used for the 2 rounds with 1 μmol/L of each primer, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 15 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 200 μmol/L dNTPs (dNTP set, Eurogentec, Seraing, Belgium), and 1 U of polymerase (HotGoldstar® DNA Polymerase, Eurogentec) in a final volume of 50 μL. The second-round PCR was performed with 2.5 μL of the first PCR products. The first-round PCR was done with denaturation at 92 °C for 30 s, annealing at 52 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min for 35 cycles (Beard et al., 2000). The second-round PCR was carried out for 35 cycles with denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min (Beard et al., 2000). The first and the second PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gel containing ethidium bromide to visualize the expected bands of 895 and 371 bp, respectively. To avoid contamination due to environmental amplicons, extraction, reagent preparation, and amplification procedures were performed in separate rooms with different sets of micropipettes and using barrier tips. Extraction and reagent preparations were performed in flow cabinets. To monitor for possible contamination, negative controls (ultrapure distilled water) were included in extraction and first- and second-round PCR procedures. Second, the RFLP assay was performed with 2 restriction enzymes, Accl and HaeIII, according to the manufacturer's recommendations (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). The PCR products were divided into 2 parts. One part was digested with Accl and the second part with HaeIII, making it possible to detect mutations at nucleotide positions 165 and 171, respectively (Diop-Santos et al., 1999). The restriction profiles were visualized using gel electrophoresis of each digested product on a 1.5% agarose gel with ethidium bromide (Fig. 1). The mutations inhibit the restriction enzyme activity. Thus, a wild type (W<sub>165</sub>/W<sub>171</sub>) that has no mutations at nucleotide positions 165 and 171 was shown, after digestion with Accl, by 2 fragments of 229 and 142 bp, and after digestion with HaeIII, by 3 fragments of 221, 131, and 19 bp. A mutant (M<sub>165</sub>/W<sub>171</sub>) that has a mutation at nucleotide position 165 was shown, after digestion with Accl, by only 1 uncut fragment of 371 bp, and after digestion with HaeIII, by the 3 fragments of 221, 131, and 19 bp. A mutant (W<sub>165</sub>/M<sub>171</sub>) that has a mutation at nucleotide position 171 was shown, after digestion with Accl, by the 2 fragments of 229 and 142 bp, and after digestion with HaeIII, by 2 fragments of 352 and 19 bp. A double mutant (M<sub>165</sub>/M<sub>171</sub>) that has mutations at 2 nucleotide positions, 165 and 171, was shown after



**Fig. 1.** Identification of *P. jirovecii* dihydropteroate synthase (DHPS) types. Electrophoresis on 1.5% agarose gel of amplification products before and after digestion with AccI and HaeIII. Lanes 1, 8, and 15: molecular weight marker (123 Gibco BRL, CergyPontoise, France). The expected fragments are indicated, except for the 19-bp fragment which cannot be visualized on lanes 4, 7, 11, and 14. Lanes 2, 3, and 4: wild type ( $W_{165}/W_{171}$ ); lanes 5, 6, and 7: mutant type with the mutation at nucleotide position 165 ( $M_{165}/W_{171}$ ); lanes 9, 10, and 11: mutant type with the mutation at nucleotide position 171 ( $W_{165}/M_{171}$ ); lanes 12, 13, and 14: mixed infection with a wild type and a mutant type with the mutation at nucleotide position 165 ( $W_{165}M_{165}/W_{171}$ ). These types were identified in control specimens which were provided by Dr P. Roux, Saint-Antoine Hospital, Paris.

digestion with AccI and HaeIII, respectively, by the uncut fragment of 371 bp, and by the 2 fragments of 352 and 19 bp.

### 2.3. PCR-RFLP assay efficiency

The efficiency of the PCR-RFLP assay for discriminating wild types and mutants was assessed. Four control specimens initially investigated by another French team (Saint-Antoine Hospital, Paris) and which harbored respectively a wild type ( $W_{165}/W_{171}$ ), a mutant ( $M_{165}/W_{171}$ ), a mutant ( $W_{165}/M_{171}$ ), and a mixed infection due to a wild type ( $W_{165}/W_{171}$ ) associated with a mutant ( $M_{165}/W_{171}$ ) were tested by both PCR-RFLP assay and sequencing. DNA from these 4 specimens was amplified using the nested-PCR assay as described above. A part of the PCR products was submitted to the RFLP assay (Fig. 1). Another part was purified using Microcon® PCR columns (Millipore, Bedford, MA, USA) and cloned into the plasmid pGEMT (pGEMT easy Vector® System II kit, Promega, Madison, WI, USA). To verify whether the transformation was related to correct recombinant plasmids, each positive clone was subjected to a PCR assay using T7P (5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA G-3') and SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA-3') universal primers specific for the T7P and SP6 promoters flanking the cloning region, as described elsewhere (Nevez et al., 2003). Recombinant plasmids were sequenced from the 2 strands using the same universal primers with the dideoxy chain termination method and an automatic sequencer (BigDye Terminator Method, Applied Biosystems Sequencer 3700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequence alignment was performed using the BioEdit software (version 7.0.0, Thomas Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) with the Clustal W program. The results of the 2 methods for identifying *P. jirovecii* DHPS types were compared.

### 3. Results

A full match between the results of DHPS type identification in control specimens using the RFLP assay on the one hand, and those obtained using sequencing on the other, was observed. Thus, the RFLP assay appears to be a reliable method for distinguishing wild types and mutants, and for detecting mixed infections.

Positive results of DHPS type identification were obtained in 66 of the 85 patients (70 of 93 *P. jirovecii* specimens) (Table 1). Sixty-four patients were infected with a wild type alone, whereas 2 patients were infected with mutants. A mixed infection revealed by a complex RFLP profile was detected in one of these 2 patients. Thus, the prevalence of mutants among patients who were admitted to our

**Table 1**  
*Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase types in patients who developed *Pneumocystis* infections and were admitted to Brest University Hospital, France.

DHPS type	Nucleotide at position (amino acid at position)		No. of patients
	165 (55)	171 (57)	
Wild type ( $W_{165}/W_{171}$ )	A (Thr)	C (Pro)	64
Mutant type ( $M_{165}/W_{171}$ ) <sup>a</sup>	G (Ala)	C (Pro)	0
Mutant type ( $W_{165}/M_{171}$ ) <sup>b</sup>	A (Thr)	T (Ser)	1
Double mutant type ( $M_{165}/M_{171}$ ) <sup>c</sup>	G (Ala)	T (Ser)	0
Mixed infection ( $W_{165}M_{165}/W_{171}M_{171}$ )	A/G (Thr/Ala)	C/T (Pro/Ser)	1
Undetermined type <sup>d</sup>			19

DHPS = Dihydropteroate synthase.

<sup>a</sup> Mutant type with a mutation at nucleotide position 165 (amino acid position 55).

<sup>b</sup> Mutant type with a mutation at nucleotide position 171 (amino acid position 57).

<sup>c</sup> Double mutant with both mutations at nucleotide positions 165 and 171.

<sup>d</sup> Absence of DHPS locus amplification despite initial detection by PCR at the mtLSUrRNA gene.

hospital was assessed at 3% (2/66). Four of the 85 patients had past histories of PCP prophylaxis using sulfonamides. These patients harbored a wild type. Four other patients had a negative clinical outcome and died after the PCP episode. They were infected with a wild type. A mutant ( $W_{165}/M_{171}$ ) was detected in an 83-year-old patient who suffered from sarcoidosis and who underwent long-term corticosteroid treatment. The patient was colonized by *P. jirovecii*. A mixed infection revealed by a complex restriction profile ( $W_{165}M_{165}/W_{171}M_{171}$ ) was detected in a 28-year-old woman who suffered from adrenocortical carcinoma during pregnancy and who developed PCP 1 week after delivery. The 2 patients had no past history of *P. jirovecii* prophylaxis or treatment with sulfonamides and their clinical outcome was improved. Analysis of the medical charts of the 85 patients initially enrolled in this study showed that 82 patients usually lived in the Brest region, 2 patients lived in Paris, and 1 patient lived on the French Riviera. The 2 patients who lived in Paris were those harboring mutants. The corrected prevalence of mutants in patients who effectively lived in the Brest area and for whom *P. jirovecii* DHPS types were identified is 0% (0/63).

#### 4. Discussion

The 2 pairs of primers F1 and B45, and  $A_{HUM}$  and BN specific for the DHPS locus were previously designed by other teams (Beard et al., 2000; Lane et al., 1997). However, they were used for the first time for an RFLP procedure. The nested-PCR assay conducted with these primers was more sensitive than the nested-PCR assay conducted with the 2 pairs of primers  $A_{HUM}$  and  $B_{HUM}$ , and  $C_{PRIM}$  and  $D_{PRIM}$  (Demanche et al., 2001; Lane et al., 1997) that we used elsewhere (Totet et al., 2004) (data not shown). Despite the increased sensitivity, the amplification failed to give positive results in 23 specimens from 19 patients, although they had initially tested positive for *P. jirovecii* using the PCR assay at the mtLSUrRNA gene. These discrepant results were due to differences in sensitivity between the PCR assays, which could be explained by the fact that the mtLSUrRNA gene is present in several copies within the *P. jirovecii* genome (Choukri et al., 2010), whereas the folic acid synthesis gene, encoding the DHPS, is thought to be present in only 1 copy (Volpe et al., 1992). A PCR-RFLP procedure was chosen for typing since this method is less time consuming than the cloning–sequencing of PCR products. A day and a half is required for the first procedure, whereas a minimum of 5 days is required for the second one. The PCR-RFLP assay seemed to be equally efficient as the sequencing procedure for type identification.

Colonized patients were enrolled in the study, since they represent the major part of populations infected with *P. jirovecii* (Nevez et al., 1999) and there is evidence of their involvement in the human reservoir of the fungus (Le Gal et al., 2012).

In this study, it is noteworthy that i) the 2 patients infected with mutants had no past history of prophylaxis or treatment with sulfonamides and ii) the 4 patients who had a past history of prophylaxis or treatment with sulfonamides and who developed *Pneumocystis* infections harbored a wild type. These observations seemed to be inconsistent with the correlations that were previously established between mutants and i) past history of treatment with sulfonamides (Crothers et al., 2005; Huang et al., 2000; Kazanjian et al., 2000; Ma et al., 2002; Miller et al., 2003; Nahimana et al., 2003) and ii) failure of sulfonamide prophylaxis (Armstrong et al., 2000; Kazanjian et al., 1998; Mei et al., 1998; Nahimana et al., 2003; Visconti et al., 2001). The apparent absence of correlations in the present study, unlike in studies reported elsewhere, may be essentially due to the low number of patients infected with mutants, 2 (3%) of 66 in this study, and the high number of patients infected with mutants in other studies, 57 of 158 in Lyon (Nahimana et al., 2003) and 175 of 197 in San Francisco (Crothers et al., 2005) for example. Conversely, correlations established in these cities may be due in part to the high prevalence of mutants circulating in these areas.

The first patient infected with a mutant had no aggravation despite the absence of specific treatment for the fungus. This clinical outcome was explained by the fact that the patient presented pulmonary colonization, which is a mild *P. jirovecii* infection, and no profound immunosuppression. The clinical improvement of the second patient who developed PCP can be explained by a relative improvement of her immune status beyond pregnancy, combined with the efficiency of the specific treatment on the part of *P. jirovecii* organisms that may have corresponded to the putative wild type within the mixed infection. The 2 patients infected with mutants usually lived in Paris, a city that is characterized by a high prevalence of mutants ranging from 18.5% to 40% (Diop-Santos et al., 1999; Magne et al., 2011). Their *P. jirovecii* infections were diagnosed during their vacations in the course of a stay of less than 30 days in Brest. Taking into account the median duration of the infection incubation of 2 months (Helweg-Larsen, 2004; Rabodonirina et al., 2004), the above data strongly suggest that the patients were infected in Paris, their usual city of residence. In this case, mutants would have been imported from Paris to Brest. The patients infected with mutants represent potential infectious sources of *P. jirovecii* organisms for other susceptible patients. This hypothesis is prompted by investigations of the circulation of particular genotypes of *Mycobacterium tuberculosis*, another pulmonary microorganism that is known to circulate from one region to another through infected patients (Cohen-Bacie et al., 2011).

DHPS type identification in 19 (23.5%) of the 85 patients initially enrolled in the study is lacking. However, it would be improbable that there was a high proportion of mutants within these 19 patients, whereas the prevalence of mutants in 66 (66 [76.5%] of 85 patients initially enrolled in the study) was only 2 (3%) of 66. Since these 2 patients did not usually live in Brest, the prevalence of mutants in patients who effectively lived in our city was considered to be 0%. This apparent absence of mutants shows that the occurrence of *P. jirovecii* infections involving organisms potentially resistant to sulfonamides in our geographic area is a rare event.

This prevalence is lower than that reported in Lyon (33–36%) (Hauser et al., 2010; Nahimana et al., 2003), Paris (18.5–40%) (Diop-Santos et al., 1999; Magne et al., 2011), Copenhagen (20%) (Helweg-Larsen et al., 1999), Milan (9%) (Valerio et al., 2007), London (17–36%) (Miller et al., 2003), Seville (22–35.5%) (Esteves et al., 2008; Montes-Cano et al., 2004), Barcelona (5.5–33%) (Alvarez-Martinez et al., 2010), Lisbon (7–27%) (Costa et al., 2003; Esteves et al., 2008), and Zurich (10%) (Hauser et al., 2010) (Fig. 2). The differences in prevalence between Brest and other French and European cities may be explained by the different features of *P. jirovecii* epidemiology in these cities. The city of Brest, at a distance from large French and European urban centers, is characterized by a low incidence of AIDS and AIDS-related PCP, in contrast to larger French or European cities in which the incidence of these 2 conditions is 5 to 10 times higher (Cazein et al., 2010; European Centre for Disease Prevention, Control/WHO Regional Office for Europe, 2010). Consequently, use of sulfonamides is widespread in these cities, favoring the emergence of mutants and provoking a high risk for incidental acquisition of these mutants, even in patients not directly exposed to sulfonamides. Moreover, differences in population densities, 2870/km<sup>2</sup> in Brest versus 21,064/km<sup>2</sup> in Paris, for example, may explain the differences in the risk of encounters and, consequently, of transmission of *P. jirovecii* between potentially infected and noninfected persons. These hypotheses are consistent with the results of a recent study on *P. jirovecii* mutants in Lausanne, Zurich, and Lyon, which suggests that interhuman transmission plays a major role in geographical variation in the prevalence of mutants (Hauser et al., 2010).

Nonetheless, the prevalence of mutants in Stockholm (0%) (Beser et al., 2012), a large European urban center, and in Amiens (8%) (Totet et al., 2004), a city presenting demographic features similar to those of Brest, seems to be contradictory and unclear. As nonindependent factors, the low prevalence of HIV infection in Sweden (0.06%) (Beser



**Fig. 2.** Prevalence of *P. jirovecii* dihydropteroate synthase (DHPS) mutants in the city of Brest and in other European cities: Amiens (Totet et al., 2004), Lyon (Hauser et al., 2010; Nahimana et al., 2003), Paris (Diop-Santos et al., 1999; Magne et al., 2011), London (Miller et al., 2003), Zurich (Hauser et al., 2010), Lausanne (Hauser et al., 2010), Copenhagen (Helweg-Larsen et al., 1999), Milan (Valerio et al., 2007), Seville (Esteves et al., 2008; Montes-Cano et al., 2004), Barcelona (Alvarez-Martinez et al., 2010), Lisbon (Costa et al., 2003; Esteves et al., 2008), and Stockholm (Besar et al., 2012).

et al., 2012) and the proximity of Amiens to Paris (140 km) may partly explain these rates.

In conclusion, the results of this study show that mutants can be imported from a given region to another through infected visitors. The concept that the city of patient residence is a predictor of mutants as previously postulated in the USA may be applied in France and Europe. Specifically, the usual city of patient residence rather than the city in which the diagnosis of *P. jirovecii* infection has been made is a predictor of mutants. Above all, the present study shows that *P. jirovecii* infections due to mutants potentially resistant to sulfonamides do not represent a public health issue in western France.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Dr P. Roux\*, Saint-Antoine Hospital, Paris, for providing control specimens and Ms P. Lecordier, C. Carrou, and D. Roué for their contribution.

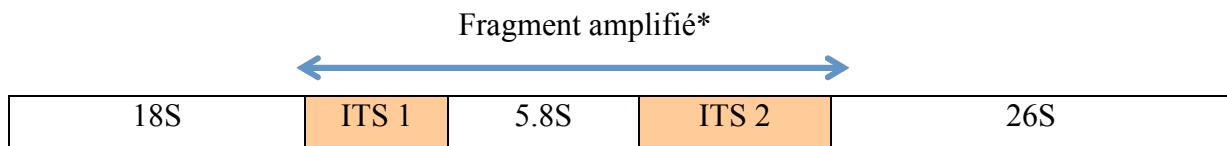
\*This study is dedicated to the memory of P. Roux who shared her enthusiasm for *Pneumocystis* epidemiology with us.

#### References

- Alvarez-Martinez MJ, Miro JM, Valls ME, Mas J, de la Bellacasa JP, Sued O, et al. Prevalence of dihydropteroate synthase genotypes before and after the introduction of combined antiretroviral therapy and their influence on the outcome of *Pneumocystis pneumonia* in HIV-1-infected patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68:60–5.
- Armstrong W, Meshnick S, Kazanjian P. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in immunocompromised patients. *Microbes Infect* 2000;2:61–7.
- Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, et al. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis* 2000;6:265–72.
- Besar J, Dini L, Botero-Kleiven S, Krabbe M, Lindh J, Hagblom P. Absence of dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jirovecii* isolated from Swedish patients. *Med Mycol* 2012;50:320–3.
- Cazein F, Lot F, Pillonel J, Pinget R, Bousquet V, Le Strat Y, et al. Surveillance de l'infection à VIH-sida en France, 2009. *Bull Epidémiol Hebd* 2010;45–46:467–72.
- Choukri F, Menotti J, Sarfati C, Lucet JC, Nevez G, Garin YJ, et al. Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Clin Infect Dis* 2010;51:259–65.
- Cohen-Bacie S, Ben Kahla I, Botelho-Nevers E, Million M, Parola P, Brouqui P, et al. Imported extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype, Marseilles, France. *Euro Surveill* 2011;16(16): pii=19846. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleID=19846> 2011.
- Costa MC, Helweg-Larsen J, Lundgren B, Antunes F, Matos O. Mutations in the dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portuguese patients with *Pneumocystis pneumonia*. *Int J Antimicrob Agents* 2003;22:516–20.
- Crothers K, Beard CB, Turner J, Groner G, Fox M, Morris A, et al. Severity and outcome of HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia containing *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations. *AIDS* 2005;19:801–5.
- Demanche C, Berthelemy M, Petit T, Polack B, Wakefield AE, Dei-Cas E, et al. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. *J Clin Microbiol* 2001;39:2126–33.
- Diop-Santos I, Lacube P, Latouche S, Kac G, Mayaud C, Marteau M, et al. Contribution of dihydropteroate synthase gene typing for *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis* epidemiology. *J Eukaryot Microbiol* 1999;46:133S–4S.

- Esteves F, Montes-Cano MA, de la Horra C, Costa MC, Calderon Ej, Antunes F, et al. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. Clin Microbiol Infect 2008;14:356–62.
- European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. HIV/AIDS surveillance in Europe 2009. Stockholm: European Center for Disease Prevention and Control; 2010.
- Hauser PM, Nahimana A, Taffe P, Weber R, Francioli P, Bille J, et al. Interhuman transmission as a potential key parameter for geographical variation in the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutations. Clin Infect Dis 2010;51:e28–33.
- Helweg-Larsen J. *Pneumocystis jirovecii*. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. Dan Med Bull 2004;51:251–73.
- Helweg-Larsen J, Benfield TL, Eugen-Olsen J, Lundgren JD, Lundgren B. Effects of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS-associated *P. carinii* pneumonia. Lancet 1999;354:1347–51.
- Huang L, Beard CB, Creasman J, Levy D, Duchin JS, Lee S, et al. Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. J Infect Dis 2000;182:1192–8.
- Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA, Burman W, Richardson J, Lee CH, et al. *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. J Infect Dis 2000;182:551–7.
- Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, et al. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. AIDS 1998;12:873–8.
- Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, et al. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis 1997;175:482–5.
- Le Gal S, Damiani C, Rouille A, Grall A, Treguer L, Virmaux M, et al. A cluster of *Pneumocystis* infections among renal transplant recipients: molecular evidence of colonized patients as potential infectious sources of *Pneumocystis jirovecii*. Clin Infect Dis 2012;54:e62–71.
- Ma L, Kovacs JA, Cargnel A, Valerio A, Fantoni G, Atzori C. Mutations in the dihydropteroate synthase gene of human-derived *Pneumocystis carinii* isolates from Italy are infrequent but correlate with prior sulfa prophylaxis. J Infect Dis 2002;185:1530–2.
- Magne D, Angoulvant A, Botterel F, Bouges-Michel C, Bougnoux ME, Bouree P, et al. Pneumocystosis: a network survey in the Paris area 2003–2008. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011;30:673–5.
- Matos O, Esteves F. Epidemiology and clinical relevance of *Pneumocystis jirovecii* Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations. Parasite 2010;17:219–32.
- Mei Q, Gurunathan S, Masur H, Kovacs JA. Failure of co-trimoxazole in *Pneumocystis carinii* infection and mutations in dihydropteroate synthase gene. Lancet 1998;351:1631–2.
- Melian I, Develoux M, Marteau-Miltgen M, Magne D, Barbu V, Poirot JL, et al. Real time quantitative PCR assay for *Pneumocystis jirovecii* detection. J Eukaryot Microbiol 2003;50(Suppl):651.
- Miller RF, Lindley AR, Ambrose HE, Malin AS, Wakefield AE. Genotypes of *Pneumocystis jirovecii* isolates obtained in Harare, Zimbabwe, and London, United Kingdom. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:3979–81.
- Montes-Cano MA, de la Horra C, Martin-Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N, et al. *Pneumocystis jirovecii* genotypes in the Spanish population. Clin Infect Dis 2004;39:123–8.
- Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. J Infect Dis 2008;197:10–7.
- Nahimana A, Rabodonirina M, Zanetti G, Meneau I, Francioli P, Bille J, et al. Association between a specific *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutation and failure of pyrimethamine/sulfadoxine prophylaxis in human immunodeficiency virus-positive and -negative patients. J Infect Dis 2003;188:1017–23.
- Nevez G, Raccuit C, Jounieaux V, Dei-Cas E, Mazars E. Pneumocystosis versus pulmonary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients. AIDS 1999;13:535–6.
- Nevez G, Totet A, Jounieaux V, Schmit JL, Dei-Cas E, Raccuit C. *Pneumocystis jirovecii* internal transcribed spacer types in patients colonized by the fungus and in patients with pneumocystosis from the same French geographic region. J Clin Microbiol 2003;41:181–6.
- Rabodonirina M, Vanhems P, Couray-Targe S, Gillibert RP, Ganne C, Nizard N, et al. Molecular evidence of interhuman transmission of *Pneumocystis* pneumonia among renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. Emerg Infect Dis 2004;10:1766–73.
- Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. Emerg Infect Dis 2002;8:891–6.
- Totet A, Latouche S, Lacube P, Pautard JC, Jounieaux V, Raccuit C, et al. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in immunocompetent infants and immunosuppressed adults, Amiens, France. Emerg Infect Dis 2004;10:667–73.
- Totet A, Meliani L, Lacube P, Pautard JC, Raccuit C, Roux P, et al. Immunocompetent infants as a human reservoir for *Pneumocystis jirovecii*: rapid screening by non-invasive sampling and real-time PCR at the mitochondrial large subunit rRNA gene. J Eukaryot Microbiol 2003;50(Suppl):668–9.
- Valerio A, Tronconi E, Mazza F, Fantoni G, Atzori C, Tartarone F, et al. Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Italian AIDS patients. Clinical outcome is influenced by dihydropteroate synthase and not by internal transcribed spacer genotype. J Acquir Immune Defic Syndr 2007;45:521–8.
- Visconti E, Ortona E, Mencarini P, Margutti P, Marinaci S, Zolfo M, et al. Mutations in dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis carinii* in HIV patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. Int J Antimicrob Agents 2001;18:547–51.
- Volpe F, Dyer M, Scaife JG, Darby G, Stammers DK, Delves CJ. The multifunctional folic acid synthesis fas gene of *Pneumocystis carinii* appears to encode dihydropteroate synthase and hydroxymethylidihydropterin pyrophosphokinase. Gene 1992;112:213–8.
- Walzer PD, Cushion MT. *Pneumocystis* pneumonia. New York: Marcel Dekker; 2005.

## 2. Diversité des haplotypes ITS de *Pneumocystis jirovecii*



**Figure 4.** Position des ITS 1 et ITS 2 sur l'opéron ARN ribosomique nucléaire de *Pneumocystis jirovecii*.

\* Ce fragment est amplifié par PCR, étape préalable au clonage et au séquençage en vue du typage.

Les séquences des ITS1 et 2 sont les loci les plus polymorphes utilisés pour le génotypage de *P.jirovecii* [16]. L'ITS1 qui comprend 150 paires de bases (pb) est localisé entre les gènes codant pour l'ARN de la sous-unité 18S et l'ARN de la sous-unité 5.8S. L'ITS2 qui comprend 170 pb est localisé entre les gènes codant pour l'ARN de la sous-unité 5.8S et de l'ARN de la sous-unité 26S (Figure 4). Ces séquences sont transcrtes puis épissées lors de la synthèse de l'ARNr. Un haplotype de *P.jirovecii* est défini par la combinaison d'un allèle ITS1 et d'un allèle ITS2. Les principaux travaux réalisés sur ces séquences sont ceux de Tsolaki et al. [253, 254] et Lee et al. [127, 134]. Ces équipes ont chacune décrit des couples d'amorces pour l'amplification ainsi qu'un score utilisé pour le typage. Les scores sont basés sur l'étude des variations d'un nucléotide ou d'un groupe de nucléotides à des positions définies, par comparaison avec une séquence de référence. Selon la nomenclature de Tsolaki et al. [253, 254], l'allèle ITS1 est désigné par une lettre majuscule associée à un indice numérique, l'allèle ITS2 par une lettre minuscule également associée à un indice numérique. Le dernier score publié par cette équipe décrit six allèles ITS1 (A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C) et neuf allèles ITS 2 (a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, a<sub>3</sub>, a<sub>4</sub>, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>, d) (Annexe 2).

Selon la nomenclature de Lee et al. [127], l'ITS1 est désigné par une lettre majuscule et l'ITS2 par une lettre minuscule. Quinze allèles ITS1 (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O) et 13 allèles ITS2 (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, m, n) ont été décrits par cette équipe (Annexes 3 et 4). Il existe une correspondance incomplète entre les haplotypes identifiés à l'aide des scores décrits par ces deux équipes. La nomenclature de Lee et al. a été privilégiée car elle permet d'identifier en théorie 195 haplotypes ITS différents [127]. Cette nomenclature a permis initialement d'identifier environ 75 haplotypes et plus d'une centaine

d'haplotypes si l'on prend en compte les séquences ITS1 et ITS2 décrites dans les publications ultérieures [78, 98, 131, 148, 189, 213, 231, 249, 260] (Annexes 2 et 3).

Les données actuellement disponibles à partir de l'analyse des isolats provenant d'un millier de patients mettent en évidence une grande diversité des haplotypes ITS et une possible variabilité géographique de ces haplotypes [18, 68, 78, 93, 98, 127, 131, 134, 148, 151, 161, 189, 213, 231, 253-255, 259, 260]. Néanmoins, les deux haplotypes les plus fréquemment rapportés sont Eg et Ne. Ces haplotypes ont été respectivement identifiés dans environ 50% et 15 à 20% de l'ensemble des échantillons de *P.jirovecii* typés.

La diversité des haplotypes ITS a également été rapportée en France chez un total de 59 patients [125, 185, 249]. Les études menées par Nevez et al. et Totet et al. ont apporté des données originales sur la diversité de *P.jirovecii*, non seulement chez les patients immunodéprimés atteints de PPC, mais également chez 9 patients colonisés par le champignon et 26 nourrissons développant une primo-infection à *P.jirovecii* [185, 249]. Cependant, les données françaises restent limitées à un faible effectif de patients. Pour cette raison, l'objectif principal de notre travail a été de déterminer la diversité des haplotypes ITS de *P.jirovecii* chez les 81 patients non infectés par le VIH, suivis au CHRU de Brest entre octobre 2007 et février 2010. Le typage des ITS a reposé sur l'analyse des séquences après amplification et clonage. Les conditions de réaction pour l'amplification ont été améliorées pour éviter les phénomènes de recombinaison in vitro [20]. Les haplotypes ITS ont été déterminés en utilisant une nomenclature actualisée à partir de celle de Lee et al. [127]. L'identification des haplotypes ITS a été possible pour 56/81 patients, soit 31 patients atteints de PPC et 25 patients colonisés. Une grande diversité a été observée puisque 27 haplotypes ont été identifiés. Eg est l'haplotype le plus fréquent puisqu'il a été identifié chez 31/56 patients (55,3%). Les haplotypes Ec et Ai ont été identifiés chez 5 patients (8,9%). En revanche, Ne n'a été identifié que chez 2 patients (3,6%), alors que cet haplotype est habituellement le second en ordre de fréquence en Europe et aux Etats-Unis [18, 93, 185, 189]. Ces observations pourraient constituer des caractéristiques particulières de *P.jirovecii* dans notre région. Des infections mixtes ont été détectées chez 12 patients atteints de PPC et 6 patients colonisés (18/56 patients, 32,1%). Aucune différence significative n'a été observée entre ces deux populations de patients, en termes de diversité des haplotypes ITS, de fréquences des haplotypes ITS et des infections mixtes. Ces résultats confortent l'hypothèse que les souches de *P.jirovecii* isolées chez les patients infectés, qu'ils développent une PPC ou qu'ils soient colonisés, partagent des caractéristiques génotypiques communes. Les

patients colonisés par *P.jirovecii*, comme les patients développant une PPC, participeraient à un même réservoir du champignon. Par ailleurs, le typage ITS reste une méthode sensible et discriminante pour identifier *P.jirovecii* chez les patients colonisés qui présentent une faible charge fongique.

Ces résultats sont présentés dans le manuscrit "***Pneumocystis jirovecii Haplotypes at the Internal Transcribed Spacers of the Nuclear rRNA operon in French HIV-negative patients with Diverse Clinical Presentations of Pneumocystis infections.*** Le Gal S, Rouillé A, Guéguel P, Virmaux M, Berthou C, Guillerm G, Couturaud F, Le Meur Y, Damiani C, Totet A, Nevez G." soumis à Medical Mycology.

**Article 4**

***Pneumocystis jirovecii* Haplotypes at the Internal Transcribed Spacers of the Nuclear rRNA Operon in French HIV-negative patients with Diverse Clinical Presentations of *Pneumocystis* infections**

1   *Pneumocystis jirovecii* Haplotypes at the Internal Transcribed Spacers of the rRNA Operon in  
2   French HIV-negative Patients with Diverse Clinical Presentations of *Pneumocystis* infections.

3

4   **Running title**

5   French *P.jirovecii* ITS haplotypes

6

7   **Keywords**

8   *Pneumocystis jirovecii*, internal transcribed spacers, HIV-negative, *Pneumocystis* pneumonia,  
9   colonization

10

11   **Authors**

12   Solène Le Gal\*†, Amélie Rouillé‡, Paul Guéguen§#, Michèle Virmaux\*, Christian  
13   Berthou^@, Gaëlle Guillerm^@, Francis Couturaud\$&, Yann Le Meur@%, Céline  
14   Damiani+«, Anne Totet+«, Gilles Nevez\*†

15

16   **Author affiliations**

17   \*University of Brest, LUBEM EA 3882, SFR 148, Brest, France

18   †Laboratory of Parasitology and Mycology, Brest University Hospital, Brest, France

19   ‡Laboratory of Biochemistry and Pharmacology, Brest University Hospital, Brest, France

20   §Laboratory of molecular Genetics and Histocompatibility, Brest University Hospital, Brest,  
21   France

22   #University of Brest, INSERM 1078, Molecular Genetics and Epidemiological Genetics, SFR  
23   148, Brest, France

24   ^Department of Haematology, Brest University Hospital, Brest, France

25   @University of Brest, EA 2216, SFR 148, Brest, France

26   \$Department of Internal Medicine and Pneumology, Brest University Hospital, Brest, France

1 &UEB, University of Brest, EA3878 (GETBO), SFR 148, Brest, France  
2 %Department of Nephrology and Renal transplantation unit, Brest University Hospital, Brest,  
3 France  
4 +Department of Parasitology and Mycology, Amiens University Hospital, Amiens  
5 «University of Picardy-Jules Verne, EA 4285 UMI INERIS 01, Amiens, France

6

7 **Corresponding author**

8 Solène Le Gal, Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, Hôpital de La Cavale Blanche,  
9 CHU de Brest, boulevard Tanguy Prigent, 29609, Brest, France.  
10 Tel: +33 (0)2 98 14 51 02, Fax: +33(0)2 98 14 51 49, e-mail: [legalsolene@yahoo.com](mailto:legalsolene@yahoo.com);  
11 [solene.legal@chu-brest.fr](mailto:solene.legal@chu-brest.fr)

12

13 **Alternate corresponding author**

14 Gilles Nevez, Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, Hôpital de La Cavale Blanche, CHU  
15 de Brest, boulevard Tanguy Prigent, 29609, Brest, France.  
16 Tel: +33 (0)2 98 14 51 02, Fax: +33(0)2 98 14 51 49, e-mail: [gilles.nevez@chu-brest.fr](mailto:gilles.nevez@chu-brest.fr)

17

1    **Abstract**

2    *Pneumocystis jirovecii* (*P.jirovecii*) is a transmissible fungus and the causative agent of  
3    pulmonary infections. *P.jirovecii* genomic diversity has been reported worldwide but data on  
4    *P.jirovecii* genotypes in France are still limited. This study describes the typing of *P.jirovecii*  
5    isolates from 81 HIV-negative patients monitored at Brest University Hospital, Brittany,  
6    France. Forty patients developed *Pneumocystis* pneumonia (PcP), and 41 patients were  
7    colonized by the fungus. The isolates were assayed at the internal transcribed spacer (ITS)1  
8    and ITS2 under improved amplification conditions to avoid in vitro ITS recombination.  
9    *P.jirovecii* ITS haplotypes were identified in 56/81 patients (31 PcP patients and 25 colonized  
10   patients). A high diversity of *P.jirovecii* organisms was revealed by identification of 27  
11   different haplotypes. Eg was the most frequent haplotype (31/56, 55.3%). The second most  
12   frequent haplotypes were Ec and Ai (5/56, 8.9% each) whereas Ne, the usual second most  
13   frequent haplotype in Europe and the USA, was observed in only 2/56 patients (3.6%). Mixed  
14   infections were detected in 18/56 patients (32.1%) (12 PcP patients and 6 colonized patients).  
15   No significant difference in haplotype diversity, frequency of peculiar haplotypes, and mixed  
16   infection occurrence, between the two patient populations, was observed. The study,  
17   conducted from the largest HIV-negative patient population investigated so far, shows that  
18   ITS typing remains efficient for characterizing *P.jirovecii* organisms among human  
19   populations in which the fungus circulates, whatever their clinical presentation of  
20   *Pneumocystis* infections.

21

1    **Introduction**

2    *Pneumocystis jirovecii* (*P.jirovecii*), the human specific *Pneumocystis* species is a  
3    transmissible fungus that causes severe pneumonia [*Pneumocystis* pneumonia (PcP)] in  
4    human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients [1-4]. Despite the decrease of PcP  
5    incidence in HIV-infected patients due to the use of highly active antiretroviral treatment, PcP  
6    remains the most frequent acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-defining illness in  
7    most developed countries [1]. PcP is also observed in non-HIV-infected patients who received  
8    immunosuppressive therapy [5, 6]. However, PcP represents only part of the clinical  
9    presentations of the fungal infection, while mild infections such as pulmonary colonization in  
10   patients with diverse levels of deficiency and lung diseases account for the main part [6, 7].  
11   Thus, *P.jirovecii* appears to be widespread within human communities. The host specificity of  
12   *P.jirovecii* for humans combined with the fact that the fungus does not synthesize aminoacids  
13   [8] and that no exosaprophytic form of the fungus has been identified so far, plead in favor of  
14   a strict human reservoir. This hypothesis is strengthened by recent evidence of *P.jirovecii*  
15   transmission in humans, with patients harboring the fungus, whatever their clinical  
16   presentation of the infection, behaving as potential infectious sources [3]. For these reasons,  
17   *P.jirovecii* infections remain a public health issue and studies on characterization of both  
18   infected populations and *P.jirovecii* organisms are still necessary.  
  
19   Genomic identification of *P.jirovecii* usually needs a first step of DNA amplification since the  
20   fungus remains uncultivable in vitro. After the amplification step, polymorphism of amplified  
21   products can be assessed using sequencing. The internal transcribed spacers (ITS) 1 and 2 of  
22   the nuclear rRNA operon are informative loci that have frequently been chosen to identify  
23   *P.jirovecii* haplotypes. The ITS1 sequence is located on the nuclear rRNA operon between the  
24   genes of the 18S rRNA and the 5.8S rRNA, and ITS2 is located between the genes of the 5.8S  
25   rRNA and the 26S rRNA. These noncoding loci are spliced during rRNA synthesis.

1 *P.jirovecii* ITS typing has been reported in patients from North America – first by Lu et al.  
2 (15 patients) [9] and second by Lee et al. (44 out of 207 total patients) [10] – and from Great  
3 Britain (54 patients) [11-13]. Other studies described *P.jirovecii* ITS genotyping in patients  
4 from The Netherlands (10 patients) [14], Denmark (130 patients) [15], Portugal (94 patients)  
5 [16, 17], Spain (13 patients) [17], Italy (207 patients) [18], Sweden (64 patients) [19], the  
6 USA again (60 patients) [20], South Africa (19 patients) [21], Australia (60 patients) [22],  
7 Japan (80 patients) [23, 24], Thailand (28 patients) [25], India (43 patients) [26], and China  
8 (12 patients) [27]. The high diversity of *P.jirovecii* ITS haplotypes, with about 105  
9 haplotypes reported worldwide among a thousand patients to date, suggests possible  
10 geographical variations. Nonetheless, the two most frequent haplotypes are Eg and Ne. They  
11 have been respectively identified in about 50% and 15-20% of the *P. jirovecii* specimens  
12 typed to date. The typing has mostly been performed with *P.jirovecii* isolates from HIV-  
13 positive patients with PCP (about 80%), while there have been less data on *P.jirovecii* types in  
14 HIV-negative patients. Moreover data on *P.jirovecii* types involved in colonized patients are  
15 still scarce [28].

16 *P.jirovecii* genetic diversity based on ITS haplotype identification has also been reported in  
17 patients from France (59 patients) [28-30]. Contrary to other studies that have focused on  
18 *P.jirovecii* diversity in immunosuppressed patients with PCP, studies by Nevez et al. and Totet  
19 et al. have provided data on *P.jirovecii* diversity in colonized patients (9 patients) and in  
20 immunocompetent infants with primary *Pneumocystis* infection (26 patients) [28, 30]. Be that  
21 as it may, French data appear to be limited to an average low number of patients. For these  
22 reasons, the main objective of the present study was to investigate *P.jirovecii* genomic  
23 diversity through ITS haplotype identification in a larger population of 81 HIV-negative  
24 patients developing PCP (40 patients) or colonized by the fungus (41 patients), and followed  
25 up in Brest University Hospital, Brest, Brittany, France.

26

1   **Materials and methods**

2   Patients and *P.jirovecii* specimens

3   Archival *P.jirovecii* isolates obtained from 81 patients monitored in Brest University Hospital  
4   (89 specimens) were retrospectively analyzed for typing based on ITS1 and ITS2 sequence  
5   analysis. These patients were diagnosed with *P.jirovecii* infections from October 18, 2007  
6   through February 10, 2010. Demographic, clinical and biological characteristics of the  
7   patients were extracted from the database of the Laboratory and Medical Information Systems  
8   [Hexaflux Galaxie II (5.3.0) and Susie V4]. Risk factors for *P.jirovecii* infection were  
9   hematological malignancies (24 patients), transplantation (18 patients), cancers (15 patients),  
10   immunosuppressive therapies (13 patients), chronic bronchopulmonary diseases (7 patients),  
11   malnutrition (two patients), congenital immunodeficiency, alcoholism (one patient each).  
12   Biological diagnoses of *P.jirovecii* infection had been initially based on *P.jirovecii* detection  
13   in bronchoalveolar lavage (BAL) specimens by microscopy using Wright-Giemsa and  
14   Toluidine Blue O stains, and a real time PCR assay with specific primers and probe of the  
15   gene encoding the mitochondrial large subunit rRNA. After DNA extraction procedure using  
16   NucliSens easyMag system (bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France), the PCR assay was  
17   performed as reported elsewhere [31, 32]. Forty patients developed PcP and 41 patients were  
18   colonized by the fungus. The fungus was detected by both microscopic examination and the  
19   PCR assay in 18 patients who developed PcP, whereas it was only detected by the PCR assay,  
20   in the absence of positive results of microscopic detection, in the 22 remaining patients with  
21   PcP and in the 41 colonized patients. The 22 patients were considered to have developed PcP  
22   despite the absence of microscopic detection of *P.jirovecii*, because they presented clinical  
23   and radiological signs compatible with PcP, combined with improvement after specific  
24   treatment and absence of alternative diagnoses of PcP. The 41 patients were considered to be  
25   colonized since they presented alternative diagnoses of PcP. These alternative diagnoses were

1 bacterial pneumonia (23 patients), bronchopulmonary tumor (five patients), drug induced  
2 pneumonia (four patients), pulmonary aspergillosis (two patients), and viral pneumonia,  
3 sarcoidosis, tuberculosis, exacerbation of chronic bronchitis, Eisenmenger's syndrome,  
4 pulmonary edema and pulmonary fibrosis (one patient each). Patients' characteristics are  
5 detailed in Table 1.

6

7 *P.jirovecii* ITS typing

8 To amplify the ITS1 and ITS2 sequences, a nested PCR assay was performed with two pairs  
9 of primers specific for *P.jirovecii*, N18SF (5'-GGT CTT CGG ACT GGC AGC-3'), N26SRX  
10 (5'-TTA CTA AGG GAA TCC TTG TTA-3') (first PCR round) and ITSF3 (5'-CTG CGG  
11 AAG GAT CAT TAG AAA-3') and ITS2R3 (5'-GAT TTG AGA TTA AAA TTC TTG-3')  
12 (second PCR round) described by Tsolaki et al. [11, 12]. The two rounds were performed  
13 under the same reagent conditions. The primers were used (1 µM each) in a reaction mixture  
14 (50 µL) containing 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 200 µM dNTPs (dNTP set,  
15 Eurogentec, Seraing, Belgium) and 1 U of polymerase (HotGoldstar® DNA Polymerase  
16 Eurogentec, Seraing, Belgium). The second PCR round was performed with 1.5 µL of the  
17 first PCR products. The first PCR round consisted of 40 cycles with denaturation at 94°C for  
18 1.5 min, annealing at 55°C for 1.5 min and extension at 72°C for 2 min [28]. The second PCR  
19 round was performed with denaturation at 94°C for 1.5 min, annealing at 55°C for 1.5 min  
20 and extension at 72°C for 5 min, for 35 cycles. This PCR procedure includes increased  
21 elongation durations as well as a high concentration of primers (1 µM), as suggested by Beser  
22 et al. [33]. The second PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gel containing  
23 ethidium bromide to visualize the expected band (517 bp). To avoid contamination due to  
24 potential environmental amplicons, extraction, reagent preparation and amplification  
25 procedures were performed in separate rooms with different sets of micropipettes and using

1 barrier tips. Extraction and reagent preparations were performed in flow cabinets. To monitor  
2 for possible contamination, negative controls (ultra-pure distilled water) were included in  
3 extraction and first and second PCR round procedures.

4 The second round PCR products were purified using Microcon® PCR columns (Millipore,  
5 Bedford, MA, USA) and cloned into the plasmid pGEMT (pGEMT easy Vector® System II kit  
6 Promega Corporation, Madison, WI, USA) as described elsewhere [28]. In order to verify  
7 whether the transformation was related to correct recombinant plasmids, each positive clone  
8 was subjected to a PCR assay using T7P (5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA G-3') and SP6  
9 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA-3') universal primers specific for the T7P and SP6  
10 promoters flanking the cloning region [28]. Recombinant plasmids were sequenced from the  
11 two strands using the same universal primers with the dideoxy chain termination method and  
12 an automatic sequencer (BigDyeTerminators Method, Applied Biosystems Sequencer 3730xl,  
13 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequence alignment was performed using the  
14 BioEdit software (Version 7.0.0, Thomas Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) with  
15 the Clustal® W program.

16 ITS1 and ITS2 alleles were identified based on sequence analysis using the score previously  
17 described by Lee et al. [10]. *P.jirovecii* ITS haplotypes are defined by combination of the  
18 alleles of the two loci. The nomenclature by Lee et al. designates ITS1 alleles with an  
19 uppercase letter (from A to O) and ITS2 alleles with a lowercase letter (from a to n). We  
20 extended this score with the new scoring positions described by Helweg-Larsen [34] and by  
21 Siripattanapipong et al. [25]. Sequences and potential new alleles identified in this study were  
22 examined taking into account the following restrictive criteria. The sequences were  
23 considered to reflect new ITS1 or ITS2 alleles if new changes were observed at scoring  
24 positions in: *i*) two different *P.jirovecii* specimens, *ii*) only one specimen but observed and  
25 reported elsewhere by another team.

1 Typability index ( $T$ ) and discriminative power ( $D$ ) of the typing method were evaluated using  
2 the following equations:  $T = N_t/N$  ( $N_t$  is the number of isolates assigned a type and  $N$  the  
3 number of isolates tested) and  $D = 1 - ((1 / (X(X - 1)) \sum n_j(n_j - 1))$  ( $X$  is the number of  
4 unrelated strains tested and  $n_j$  the number of strains belonging to the  $j$ th type) [35, 36]. The  
5 discriminatory power was based on the results of *P.jirovecii* haplotype identification among  
6 the single infections (i.e. except mixed infections) and on the 28 specimens not  
7 epidemiologically linked. Indeed, 11 specimens related to a cluster of *P.jirovecii* infections  
8 were ruled out [3].

9 The reproducibility of the sequencing was assessed by subsequently sequencing three  
10 randomized clones in two independent experiments.

11 The in vivo stability of *P.jirovecii* ITS typing was assessed by analyzing the results observed  
12 in three patients (P1, P2, P3) who underwent two subsequent BALs, with an interval of four,  
13 three, and three weeks respectively, within the same PcP episode.

14

## 15 Statistical Analysis

16 Frequencies of *P. jirovecii* ITS haplotypes (major haplotype, peculiar haplotype) and of  
17 mixed infections (more than one haplotype in the same specimen) in PcP patients and  
18 colonized patients were compared using the Fisher exact test and  $\chi^2$  test. Differences were  
19 considered significant at  $P < 0.05$ .

20

## 21 Nucleotide sequence accession numbers

22 The nucleotide sequences of the new ITS2 allele, and of the two ITS1 and the eight ITS2  
23 sequences with changes at scoring positions have been deposited in GenBank under accession  
24 numbers KC407706, KC407698, KC407699, KC407700, KC407701, KC407702, KC407703,  
25 KC407704, KC407705, KC407707, KC407708.

26

1    **Results**

2    The consensus nucleotide sequences of ITS1 and ITS2 are shown in Fig. 1. The ITS2  
3    sequence length has been changed from 192 to 196 bp, taking into account new scoring  
4    positions described by Helweg-Larsen [34] and Siripattanapipong et al. [25]. Insertions of  
5    new bases include TA between positions 60 and 61, and AT between positions 72 and 73. The  
6    nucleotides of the revised sequence have been renumbered and new position numbers are  
7    used hereafter. Positive results of *P.jirovecii* typing were obtained in 56 of the 81 patients (59  
8    of the 89 samples), precisely in 31 of the 40 PcP patients, and in 25 of the 41 colonized  
9    patients. A total of 217 clones were sequenced and aligned (data not shown). Taking into  
10   account our restrictive criteria, we identified 13 ITS1 alleles, and 11 ITS2 alleles, of which  
11   one was newly described (Tables 2a and 2b).

12   Thirteen ITS1 alleles (alleles A, B, D, E, F, G, H, I, J, K, L, N, IV) previously reported were  
13   identified [10, 21]. Two other ITS1 sequences with changes at scoring positions were  
14   identified in one patient each. The first sequence, designated BES-ITS1-1 (GenBank  
15   accession number KC407698), differed from allele E previously reported by Lee et al. [10] by  
16   deletion of a T residue at position 117. The second sequence, BES-ITS1-2 (GenBank  
17   accession number KC407699), differs from allele N previously reported by Lee et al. [10] by  
18   having a G residue at position 15. Taking into account our restrictive criteria, these sequences  
19   that were identified in only one clone each did not represent new ITS1 alleles.

20   Eleven ITS2 alleles were identified, of which nine were previously described by Lee et al.  
21   (alleles b, c, e, f, g, h, i, m, p) [10], one was previously described by Siripattanapipong et al.  
22   (allele r) [25], and one was a newly described allele that we designated as x. Allele x was  
23   identified in four clones from one patient. It differed from allele e previously reported by Lee  
24   et al. [10] by having AT residues at positions 75-76 (GenBank accession number KC407706).  
25   This allele has also been described by Helweg-Larsen [34] who considered that these changes

1 represented new scoring positions. These changes defined the new allele a<sub>5</sub> based on the  
2 nomenclature described by Tsolaki et al. [14]. It is noteworthy that Totet et al. identified a  
3 similar sequence in 3 clones while they did not consider it to be a new allele at that time [30].  
4 Interestingly, eight other ITS2 sequences with base changes at scoring positions were  
5 observed in one patient each. The first sequence, designated BES-ITS2-1, was observed in the  
6 first *P.jirovecii* specimen from one patient. It differed from allele h previously reported by  
7 Lee et al. [10] by an insertion of CAAAATA residues at positions 181-187 (GenBank  
8 accession number KC407700). The second sequence, BES-ITS2-2, was observed in the  
9 second specimen from the same patient. It differed from allele m previously reported by Lee  
10 et al. [10] by deletions of AT residues at positions 174-175 and of CAAAATA residues at  
11 positions 181-187 (GenBank accession number KC407701). The third sequence, BES-ITS2-  
12 3, differed from allele f previously reported by Lee et al. [10] by having a C residue at  
13 position 175 (GenBank accession number KC407702). The fourth sequence, BES-ITS2-4,  
14 differed from allele g previously reported by Lee et al. [10] by having a G residue at position  
15 64 (GenBank accession number KC407703). The fifth sequence, BES-ITS2-5, differed from  
16 allele g previously reported by Lee et al. [10] by having a G residue at positions 64 and 74  
17 (GenBank accession number KC407704). The sixth sequence, BES-ITS2-6, differed from  
18 allele g previously reported by Lee et al. [10] by having a T residue at position 177 (GenBank  
19 accession number KC407705). The seventh sequence, BES-ITS2-y was identified in three  
20 clones from one patient. It differed from allele g previously reported [10] by having two A  
21 residues at positions 48-49 and a T residue at position 173 (Genbank accession number  
22 KC407707). The eighth sequence, BES-ITS2-z was identified in three clones from one  
23 patient. It differed from allele h previously reported by Lee et al. [10] by having an A residue  
24 at position 48, a deletion of AT residues at positions 174-175 and an insertion of CAA  
25 residues at positions 181-183 (Genbank accession number KC407708). These eight ITS2

1 sequences were not considered to be new ITS2 alleles based on our restrictive criteria, since  
2 they were found in only one patient each and were not previously reported.

3 A total of 27 *P.jirovecii* ITS haplotypes resulting from the combination of the two ITS1 and  
4 ITS2 alleles were identified. Twenty-six haplotypes result from the combination of ITS1 and  
5 ITS2 alleles previously described whereas one haplotype resulted from the combination of a  
6 previously described ITS1 allele with a new ITS2 allele (Nx).

7 More than one haplotype was detected in 18 patients (12 PcP patients and six colonized  
8 patients, 32.1%) suggesting the occurrence of mixed infections. The most frequent haplotype  
9 was Eg (31/56 patients, 55.3%). The second most frequent haplotypes were Ec and Ai (five  
10 patients each, 8.9%). The other haplotypes were Ir (four patients, 7.1%), Jf, Bi, IVg (three  
11 patients each, 5.3%), Gg, Kf, Ne, Ef, Ig (two patients each, 3.6%). The 15 remaining  
12 haplotypes were identified in one patient each (1.8%) (Table 3).

13 A high diversity of ITS haplotypes was observed in patients with PcP (20 different  
14 haplotypes) and in colonized patients (14 different haplotypes) (Bi, Eb, Ec, Ef, Eg, Fg, Ig, If,  
15 Ir, Ih, Jf, Kf, Lg, and Ne). Thirteen haplotypes were detected only in PcP patients (Ai, Di, Eh,  
16 Ei, Em, Ep, Gg, Hg, Jg, Ng, Nh, Nx, and IVg). Seven haplotypes were detected only in  
17 colonized patients (Eb, Fg, If, Ir, Ih, Kf, and Lg). Seven ITS haplotypes were identified in  
18 both populations (Bi, Ec, Ef, Eg, Ig, Jf, and Ne) (Table 3).

19 The typability of the method was 0.66 since haplotypes were identified in 59/89 specimens.  
20 This index increased to 1 if its calculation was based on the 19 specimens (18 patients) related  
21 to positive microscopic detection of *P.jirovecii*. The discriminatory power of the typing  
22 method was 0.82. The results of the first and second experiments of ITS sequencing of the  
23 three randomized clones showed 100% concordance of nucleotides at scoring positions. The  
24 results of *P.jirovecii* ITS typing in subsequent BAL specimens from three patients in the  
25 course of the same episode showed complete or partial concordance of haplotypes.

1 Haplotypes Ec and Em in the first BAL specimen of patient P1 were also identified in the  
2 second BAL specimen of the same patient. Haplotype Eg in the first BAL specimen of patient  
3 P2 was also identified in the second BAL specimens of the same patient. Haplotype Eg (2  
4 clones), which was associated with haplotypes Ng, Eh, and IVg (1 clone each) in the first  
5 BAL specimen of patient P3, was identified (5 clones) in the second BAL specimen of the  
6 same patient, whereas the other haplotypes were not detected. These results are consistent  
7 with an in vivo stability of *P.jirovecii* ITS haplotypes.

8 Eg was the most frequent haplotype in both Pcp and colonized patients with no significant  
9 difference (20/31 patients vs. 11/25 patients; p=0.1,  $\chi^2$  test). No difference was observed in  
10 the occurrence of mixed infections in the two populations (12 in Pcp patients vs. 6 in  
11 colonized patients; p=0.22,  $\chi^2$  test). Likewise, no difference of peculiar type frequencies in  
12 the two populations was observed.

13

#### 14 **Discussion**

15 Positive results for *P.jirovecii* ITS haplotype identification were obtained in 56 of the 81  
16 patients. Thus, the amplification of ITS loci failed to give positive results in 25 patients,  
17 whereas they had initially tested positive for *P.jirovecii* using the PCR assay at the  
18 mtLSUrRNA gene. The higher sensitivity of this PCR assay is due to the presence of several  
19 copies of the mtLSUrRNA gene within the *P.jirovecii* genome [37], whereas ITS1 and ITS2  
20 loci are present in only one copy [38, 39]. This difference of sensitivity between the two PCR  
21 assays has previously been reported [28, 30].

22 Occurrence of in vitro recombination during the PCR process has been suggested for DNA of  
23 microorganisms including *P.jirovecii* [33, 40, 41]. This issue has been observed especially  
24 during *P.jirovecii* ITS sequence amplification [33]. Beser et al. showed that recombination  
25 between ITS1 and ITS2 (or intra ITS1 and intra ITS2) occurred with a frequency of up to

1 37.2% in specimens harboring multiple haplotypes (mixed infections) when a standard PCR  
2 protocol was followed [33]. This frequency can be dramatically decreased to 2.8% when a  
3 modified PCR protocol is used [33]. In the present study, a recombination between ITS1 and  
4 ITS2 in one specimen can be hypothesized. In this specimen, four haplotypes, Eg (1 clone), Jf  
5 (1 clone), Ef (1 clone), and Jg (1 clone) were identified. The haplotypes Ef and Jg might result  
6 from the recombination of ITS1 alleles, E and J, and ITS2 alleles, f and g, generated from the  
7 original haplotypes Eg and Jf. In another specimen, an intra-ITS2 recombinant in one  
8 specimen can also be hypothesized. Indeed, in this specimen we identified: *i*) 2 haplotypes Ec  
9 (2 clones) and Em (2 clones) resulting from the combination of ITS1 allele E and ITS2 alleles  
10 c and m; *ii*) and another putative haplotype E BES-ITS2-1 resulting from the combination of  
11 ITS1 allele E with ITS2 sequence BES-ITS2-1 that differed from allele h previously reported  
12 [10] by having an insertion of CAAAATA residues at positions 181-187. In fact, this  
13 sequence, BES-ITS2-1, that we did not consider to be a new ITS2 allele, might be an intra-  
14 ITS2 recombinant between ITS2 alleles c and m (see nucleotides of ITS2 alleles c and m,  
15 table 2b). Thus, we observed putative recombination in only three clones (corresponding to  
16 Ef, Jg, and E BES-ITS2-1) out of the 81 clones related to mixed infections (3.7%). This low  
17 rate can be explained by the PCR procedure including increased elongation durations to 2 min  
18 and 5 min (first and second PCR rounds respectively) as well as a high concentration of  
19 primers (1 µM), which are part of the guidelines recommended by Beser et al. [33].  
20 Apparent mixed infections related to multiple haplotypes found in a single specimen may  
21 result from two different co-infecting *P.jirovecii* strains, as well as from the presence of  
22 heterozygote diploid organisms. A meiotic process, rather than in vitro artifacts during the  
23 PCR procedure, may also explain recombination between ITS1 and ITS2. This explanation  
24 remains a hypothesis.

1 We observed variations in lengths of thymine and adenine homopolymeric tracts in ITS1 and  
2 ITS2 sequences from 53 patients (146 clones) (data not shown). Such variations were initially  
3 described by Tsolaki et al. who showed that they were due to PCR-induced errors and must be  
4 ruled out in defining the scoring positions [11]. For these reasons, we considered that the  
5 ITS1 sequence of allele E, harboring 9 T instead of 10 T at positions 62-71 (data not shown)  
6 did not reflect a new allele, contrary to the conclusions of van Hal et al. who renamed it allele  
7 SYD1 [22]. Other sporadic changes not located at scoring positions and detected in ITS1 and  
8 ITS2 from 44 patients (83 clones) may also be due to PCR-induced errors. Indeed, although  
9 the rate of PCR-induced errors due to our Taq polymerase has not been evaluated, this rate is  
10 usually estimated at  $2 \times 10^{-5}$  errors per base pair [42].

11 The two ITS1 sequences and six ITS2 sequences with base changes at scoring positions,  
12 designated BES-ITS1-1, BES-ITS1-2, BES-ITS2-1 to BES-ITS2-6, BES-ITS2-y and BES-  
13 ITS2-z, but identified in only one patient each, and never described elsewhere, were ruled out  
14 as putative new alleles. Nonetheless, they have been named and deposited, in order to provide  
15 arguments for future definition of putative new alleles by other teams.

16 To our knowledge, the typability index and the discriminatory power of a typing method of  
17 *P.jirovecii* isolates based on DNA sequencing has not been assessed until the present report  
18 whereas the PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) method, which does not  
19 require sequencing, is the only *P.jirovecii* typing method for which this index and  
20 discriminatory power have been calculated [43, 44]. The typability indexes of 0.66 and 1 are  
21 higher than the index value of SSCP (0.64) and show that the method based on ITS  
22 sequencing is efficient for typing low fungal burdens detected by PCR assay or high fungal  
23 burdens detected by microscopic examination. The discriminatory power of 0.82 remains  
24 lower than the 0.93 index value of the PCR-SSCP. PCR-SSCP, which incorporates  
25 information from several loci, is more discriminative than a unilocus method. An alternative

1 would be a method based on the sequencing of several loci in addition to ITSs. Such typing  
2 approaches have been proposed by other teams through multilocus sequence typing (MLST)  
3 methods [45].

4 The ITS sequencing reproducibility was verified, since the results of the first and second  
5 experiments of ITS sequencing of the three randomized clones showed 100% concordance of  
6 nucleotides at scoring positions. However, the evaluation of ITS typing reproducibility was  
7 not achieved. Indeed, the reproducibility is the ability of a typing system to assign the same  
8 type to a “strain” tested during independent assays. *P.jirovecii* strain isolation is not possible  
9 since it remains an uncultivable microorganism. Moreover, it remains unknown whether a  
10 patient harbors a single genetic strain. For these reasons, consensus guidelines for evaluation  
11 of typing systems by the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases  
12 cannot be strictly followed [35]. It has been suggested that the reproducibility of the ITS  
13 typing may be decreased by intrinsic instability of the ITS regions which may generate  
14 changes from a single *P.jirovecii* ITS haplotype [15]. Our results are consistent with in vivo  
15 stability of *P.jirovecii* ITS haplotypes. Conversely, the in vitro stability cannot be assessed  
16 since *P.jirovecii* strain isolation is not possible. However, in the fungal kingdom, the mean  
17 DNA substitution rate at ITS regions has been estimated at  $1.4 \pm 1.3 \cdot 10^{-9}$  substitutions per site  
18 per year [46]. Change at this rate would not present a problem for *P.jirovecii* ITS genotyping  
19 in epidemiological studies.

20 Twenty-seven different haplotypes were identified in 56 HIV-negative patients showing a  
21 diversity of *P.jirovecii* organisms, which appeared to be close to that reported by other teams,  
22 whatever the HIV status of the patients studied. Likewise, the frequency of mixed infections,  
23 32.1%, was close to that reported elsewhere (Table 4).

24 The most frequent haplotype in our geographic region was Eg (55.3%). Similarly, this was the  
25 most frequent haplotype previously observed in Picardy, Northern France [28, 30] and

1 worldwide [10, 12, 16, 18-22, 26] except in Thailand and Japan [23-25], where Ir and Eb were  
2 the most frequent haplotypes respectively (Table 4). The second most frequent haplotype  
3 differs, depending on the country or the geographic area. In the present study, the second most  
4 frequent haplotypes were Ec and Ai (five patients each, 8.9%) whereas interestingly, Ne was  
5 observed in only 2 patients (3.6%). These results provided additional data on peculiar  
6 characteristics of *P.jirovecii* organisms and infections in our geographic area. Indeed,  
7 Brittany, a region of 3,175,100 people, located at the western tip of France on the Atlantic  
8 Ocean and English Channel is characterized by a low incidence of AIDS-related PcP [47] and  
9 a low prevalence of *P.jirovecii* dihydropteroate synthase (DHPS) mutants [48].  
10 There are shared features of haplotypes in both colonized and PcP patients not infected with  
11 HIV, monitored in the same geographic area during the same period. These results strengthen  
12 the hypothesis that all infected patients harbor a common population of *P.jirovecii* organisms.  
13 *P.jirovecii* ITS haplotype identification makes it possible to investigate the circulation and  
14 transmission of the fungus within infected patient populations. Using this typing method, we  
15 recently provided evidence of the role of HIV-negative colonized patients as potential  
16 infectious sources of *P.jirovecii* [3]. Using the same typing method applied on pairs of  
17 pulmonary and air samples from PcP patients, we also provided arguments showing that  
18 *P.jirovecii* organisms could be exhaled by infected patients in their close environment [49].  
19 Finally, the ITS typing system remains a reliable method for identification of *P.jirovecii* in  
20 diverse populations of infected patients, in which the fungus circulates, whatever their clinical  
21 presentation and their HIV-status.

22

### 23 **Acknowledgements**

24 The authors would like to thank the following physicians: Drs S Airiau, N André, S Ansart, A  
25 Barnier, A Cleuziou, F Dalbies, A Delluc, H Floch, M Garré, A Gentric, K Goulesque A

1 Grall, C Gut-Gobert, C Hanrotel-Saliou, E Huchot, S Jaffuel, K Lacut, R Le Berre, P Le  
2 Magnet, E Le Moigne, C Leroyer, MC Moal, O Pradier, G Prat, G Quéré, A Renault, N  
3 Rouzic, L de Saint Martin, A Saraux, and C Verveur for monitoring the patients from whom  
4 *P.jirovecii* specimens were obtained.

5 The authors would also like to thank Dr D. Quinio and Dr E Moalic, and Mrs P Lecordier, C  
6 Carrou, D Roué, C Le Guen, C Roger, C Cam, K Quinaou, and V Abiven for performing  
7 biological diagnoses of *Pneumocystis* infections.

8 This study was supported in part by the "Agence nationale de sécurité sanitaire de  
9 l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses)" (contract number 2011/1/053).

10

11 **Declaration of interest:** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are  
12 responsible for the content and the writing of the paper.

13

## 14 **References**

- 15 1 Walzer PD, Cushion MT (eds). *Pneumocystis pneumonia*. New York: Marcel Dekker; 2005.
- 16 2 Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for  
17 *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis* 2002; **8**: 891-896.
- 18 3 Le Gal S, Damiani C, Rouille A, *et al*. A cluster of *Pneumocystis* infections among renal  
19 transplant recipients: molecular evidence of colonized patients as potential infectious  
20 sources of *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: e62-71.
- 21 4 Redhead SA, Cushion MT, Frenkel JK, Stringer JR. *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*:  
22 nomenclature and typifications. *J Eukaryot Microbiol* 2006; **53**: 2-11.
- 23 5 Tasaka S, Tokuda H. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients in the  
24 era of novel immunosuppressive therapies. *J Infect Chemother* 2012; **18**: 793-806.

- 1 6 Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin*  
2 *Microbiol Rev* 2012; **25**: 297-317.
- 3 7 Nevez G, Raccourt C, Jounieaux V, Dei-Cas E, Mazars E. Pneumocystosis versus pulmonary  
4 *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients. *AIDS* 1999;  
5 **13**: 535-536.
- 6 8 Hauser PM, Burdet FX, Cisse OH, *et al.* Comparative genomics suggests that the fungal  
7 pathogen *Pneumocystis* is an obligate parasite scavenging amino acids from its host's  
8 lungs. *PLoS One* 2010; **5**: e15152.
- 9 9 Lu JJ, Bartlett MS, Shaw MM, *et al.* Typing of *Pneumocystis carinii* strains that infect  
10 humans based on nucleotide sequence variations of internal transcribed spacers of rRNA  
11 genes. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 2904-2912.
- 12 10 Lee CH, Helweg-Larsen J, Tang X, *et al.* Update on *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*  
13 typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of  
14 rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 734-741.
- 15 11 Tsolaki AG, Miller RF, Underwood AP, Banerji S, Wakefield AE. Genetic diversity at the  
16 internal transcribed spacer regions of the rRNA operon among isolates of *Pneumocystis*  
17 *carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia. *J Infect Dis* 1996; **174**: 141-156.
- 18 12 Tsolaki AG, Miller RF, Wakefield AE. Oropharyngeal samples for genotyping and  
19 monitoring response to treatment in AIDS patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J*  
20 *Med Microbiol* 1999; **48**: 897-905.
- 21 13 Miller RF, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* genotypes and severity of pneumonia.  
22 *Lancet* 1999; **353**: 2039-2040.
- 23 14 Tsolaki AG, Beckers P, Wakefield AE. Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii* f.  
24 sp. *hominis*: high genotype similarity with contemporary isolates. *J Clin Microbiol* 1998;  
25 **36**: 90-93.

- 1 15 Helweg-Larsen J, Lee CH, Jin S, *et al.* Clinical correlation of variations in the internal  
2 transcribed spacer regions of rRNA genes in *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis*. *AIDS*  
3 2001; **15**: 451-459.
- 4 16 Matos O, Lee CH, Jin S, *et al.* *Pneumocystis jiroveci* in Portuguese immunocompromised  
5 patients: association of specific ITS genotypes with treatment failure, bad clinical outcome  
6 and childhood. *Infect Genet Evol* 2003; **3**: 281-285.
- 7 17 Esteves F, Montes-Cano MA, de la Horra C, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* multilocus  
8 genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**:  
9 356-362.
- 10 18 Valerio A, Tronconi E, Mazza F, *et al.* Genotyping of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in  
11 Italian AIDS patients. Clinical outcome is influenced by dihydropteroate synthase and not  
12 by internal transcribed spacer genotype. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; **45**: 521-528.
- 13 19 Beser J, Botero-Kleiven S, Lebbad M, Hagblom P, Fernandez V. A limited number of ITS  
14 haplotypes defines the diversity of *Pneumocystis jirovecii* strains in Sweden. *Infect Genet  
15 Evol* 2011; **11**: 948-954.
- 16 20 Nimri LF, Moura IN, Huang L, *et al.* Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* f. sp.  
17 hominis based on variations in nucleotide sequences of internal transcribed spacers of  
18 rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 1146-1151.
- 19 21 Robberts FJ, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Genotyping and coalescent phylogenetic analysis  
20 of *Pneumocystis jiroveci* from South Africa. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 1505-1510.
- 21 22 van Hal SJ, Gilgado F, Doyle T, *et al.* Clinical significance and phylogenetic relationship  
22 of novel Australian *Pneumocystis jirovecii* genotypes. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 1818-  
23 1823.

- 1 23 Hosoya N, Takahashi T, Wada M, *et al.* Genotyping of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*  
2 isolates in Japan based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer  
3 regions of rRNA genes. *Microbiol Immunol* 2000; **44**: 591-596.
- 4 24 Matsumura Y, Shindo Y, Iinuma Y, *et al.* Clinical characteristics of *Pneumocystis*  
5 pneumonia in non-HIV patients and prognostic factors including microbiological  
6 genotypes. *BMC Infect Dis* 2011; **11**: 76.
- 7 25 Siripattanapipong S, Worapong J, Munghin M, Leelayoova S, Tan-ariya P. Genotypic  
8 study of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-positive patients in  
9 Thailand. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 2104-2110.
- 10 26 Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, *et al.* Genotyping and phylogenetic analysis of  
11 *Pneumocystis jirovecii* isolates from India. *Infect Genet Evol* 2010; **10**: 712-719.
- 12 27 Li K, He A, Cai WP, *et al.* Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Chinese  
13 HIV-infected patients based on nucleotide sequence variations in the internal transcribed  
14 spacer regions of rRNA genes. *Med Mycol* 2013; **51**: 108-112.
- 15 28 Nevez G, Totet A, Jounieaux V, *et al.* *Pneumocystis jiroveci* internal transcribed spacer  
16 types in patients colonized by the fungus and in patients with pneumocystosis from the  
17 same French geographic region. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 181-186.
- 18 29 Latouche S, Poirot JL, Bernard C, Roux P. Study of internal transcribed spacer and  
19 mitochondrial large-subunit genes of *Pneumocystis carinii hominis* isolated by repeated  
20 bronchoalveolar lavage from human immunodeficiency virus-infected patients during one  
21 or several episodes of pneumonia. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 1687-1690.
- 22 30 Totet A, Pautard JC, Racourt C, Roux P, Nevez G. Genotypes at the internal transcribed  
23 spacers of the nuclear rRNA operon of *Pneumocystis jiroveci* in nonimmunosuppressed  
24 infants without severe pneumonia. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 1173-1180.

- 1 31 Meliani L, Developoux M, Marteau-Miltgen M, *et al.* Real time quantitative PCR assay for  
2 *Pneumocystis jirovecii* detection. *J Eukaryot Microbiol* 2003; **50 Suppl**: 651.
- 3 32 Totet A, Meliani L, Lacube P, *et al.* Immunocompetent infants as a human reservoir for  
4 *Pneumocystis jirovecii*: rapid screening by non-invasive sampling and real-time PCR at the  
5 mitochondrial large subunit rRNA gene. *J Eukaryot Microbiol* 2003; **50 Suppl**: 668-669.
- 6 33 Beser J, Hagblom P, Fernandez V. Frequent in vitro recombination in internal transcribed  
7 spacers 1 and 2 during genotyping of *Pneumocystis jirovecii*. *J Clin Microbiol* 2007; **45**:  
8 881-886.
- 9 34 Helweg-Larsen J. *Pneumocystis jirovecii*. Applied molecular microbiology, epidemiology  
10 and diagnosis. *Dan Med Bull* 2004; **51**: 251-273.
- 11 35 Struelens MJ. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial  
12 epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect* 1996; **2**: 2-11.
- 13 36 Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing  
14 methods. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 1903-1905.
- 15 37 Choukri F, Menotti J, Sarfati C, *et al.* Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii*  
16 in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Clin Infect Dis* 2010; **51**:  
17 259-265.
- 18 38 Tang X, Bartlett MS, Smith JW, Lu JJ, Lee CH. Determination of copy number of rRNA  
19 genes in *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 2491-2494.
- 20 39 Cisse OH, Pagni M, Hauser PM. De Novo Assembly of the *Pneumocystis jirovecii*  
21 Genome from a Single Bronchoalveolar Lavage Fluid Specimen from a Patient. *MBio*  
22 2012; **4**.
- 23 40 Meyerhans A, Vartanian JP, Wain-Hobson S. DNA recombination during PCR. *Nucleic*  
24 *Acids Res* 1990; **18**: 1687-1691.

- 1    41 Tanabe K, Sakihama N, Farnert A, *et al.* In vitro recombination during PCR of  
2    *Plasmodium falciparum* DNA: a potential pitfall in molecular population genetic analysis.  
3    *Mol Biochem Parasitol* 2002; **122**: 211-216.
- 4    42 Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, *et al.* High-fidelity amplification using a  
5    thermostable DNA polymerase isolated from Pyrococcus furiosus. *Gene* 1991; **108**: 1-6.
- 6    43 Hauser PM, Blanc DS, Sudre P, *et al.* Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* in HIV-  
7    positive and -negative patients as revealed by PCR-SSCP typing. *AIDS* 2001; **15**: 461-466.
- 8    44 Beard CB, Roux P, Nevez G, *et al.* Strain typing methods and molecular epidemiology of  
9    *Pneumocystis* pneumonia. *Emerg Infect Dis* 2004; **10**: 1729-1735.
- 10   45 Matos O, Esteves F. *Pneumocystis jirovecii* multilocus gene sequencing: findings and  
11   implications. *Future Microbiol* 2010; **5**: 1257-1267.
- 12   46 Kasuga T, White TJ, Taylor JW. Estimation of nucleotide substitution rates in  
13   Eurotiomycete fungi. *Mol Biol Evol* 2002; **19**: 2318-2324.
- 14   47 Institut de Veille Sanitaire. Infection à VIH et Sida, Base de Données Sida [database on the  
15   Internet]. Saint-Maurice: Institut de Veille Sanitaire (France) [cited 2013 Feb 28]  
16   Available at: [http://www.invs.sante.fr/surveillance/vih-sida/bdd\\_sida/index.htm](http://www.invs.sante.fr/surveillance/vih-sida/bdd_sida/index.htm).
- 17   48 Le Gal S, Damiani C, Perrot M, *et al.* Circulation of *Pneumocystis* dihydropteroate  
18   synthase mutants in France. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; **74**: 119-124.
- 19   49 Damiani C, Choukri F, Le Gal S, *et al.* Possible nosocomial transmission of *Pneumocystis*  
20   *jirovecii*. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**: 877-878.
- 21
- 22

**Table 1** Characteristics of 81 HIV-negative patients from Brest University Hospital, France, from whom *Pneumocystis jirovecii* specimens were obtained and examined for typing at the internal transcribed spacer (ITS) 1 and ITS2.

	PcP Patients	Patients colonized by <i>P.jirovecii</i>
Number of patients	40	41
Median age (range)	61 years (3-86)	65 years (34-87)
Sex ratio (Male/Female)	25/15	24/17
Number of BAL specimens	47	42
Period of collection (day-mo-yr)	22-10-07 to 10-02-10	18-10-07 to 17-12-09
Method with positive results of <i>P.jirovecii</i> detection	Microscopy <sup>a</sup> (18/40 patients) and PCR assay <sup>b</sup> (40/40 patients)	PCR assay <sup>b,c</sup> (41/41 patients)

<sup>a</sup> Wright Giemsa and Toluidine Blue O stains

<sup>b</sup> Real-time polymerase chain reaction assay at the mitochondrial large subunit rRNA gene [30, 31]

<sup>c</sup> None of the patients were positive for *P.jirovecii* detection using microscopic examination

### **ITS1 consensus sequence**

10	20	30	40	50	60	70
GAAA <u>A</u> TTCAG	<u>C</u> TTTAAACAC	<u>TTT</u> CCCTAG	TG <u>TT</u> TTAGCA	<u>TTT</u> CAAAC	AT <u>AT</u> CTGTGA	ATTTTTTTT
80	90	100	110	120	130	140
TGTTGGCG <u>A</u>	<u>G</u> GAGCTGGCT	TTTTGCTTG	CCTGCCAAA	GGTG <u>TT</u> ATT	TTTAAAATT	TAAATTGAAT
150	160					
TTCAGTTTA GAATTTTTA A						

### **ITS2 consensus sequence**

10	20	30	40	50	60	70
TTAAGTTCCCT	TTTTCAAGC	AGAAAAAAGG	GGATTGGCT	TTGC <u>AAA</u> <u>AAT</u>	<u>ATA</u> <u>ATA</u> <u>ATTA</u>	<u>TAG</u> <u>AA</u> <u>ATA</u> <u>AA</u>
80	90	100	110	120	130	140
<u>AT</u> <u>AT</u> <u>AT</u> <u>TT</u> <u>AT</u>	TATGCATGCT	AGTCTGAAAT	TCAAAAGTAG	CTTTTTTCT	TTGCC <u>C</u> TAGT	GTCGTAAAAA
150	160	170	180	190		
TTCGCTGGGA AAGAAGGAAA <u>AAAG</u> <u>CT</u> <u>TT</u> <u>TA</u> <u>TAT</u> <u>AT</u> <u>AG</u> <u>ATA</u> <u>CAA</u> <u>AA</u> <u>AT</u> <u>ACA</u> GAATT						

**Fig. 1** Consensus sequences of ITS1 and ITS2. The number of nucleotides has been changed from the previously reported 192 bp [10] to 196 bp for ITS2. Nucleotide positions in bold and underlined are used as scoring positions to classify ITS1 and 2 alleles.

**Table 2a** *Pneumocystis jirovecii* internal transcribed spacer (ITS)1 alleles identified in the present study, according to an updated nomenclature derived from that which was initially described by Lee et al. [10].

ITS1 allele	Nucleotide positions (bp)												Authors (Study reference)	GenBank accession number
	6	12	15	21	23-24	28	34	42	53-54	80-81	115-118			
<b>A</b>	C	T	A	T	—	T	T	T	—	—	TTTA	Lee et al. [10]	AF013806	
<b>B</b>	C	—	A	T	—	T	T	T	—	—	TTTA	Lee et al. [10]	AF013807	
<b>D</b>	C	T	A	T	—	T	T	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [10]	AF013809	
<b>E</b>	T	—	A	T	—	T	T	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [10]	AF013810	
<b>F</b>	T	—	A	T	—	T	T	T	—	AG	—	Lee et al. [10]	AF013811	
<b>G</b>	T	—	A	T	—	T	T	T	—	—	TTTA	Lee et al. [10]	AF013812	
<b>H</b>	T	—	A	T	—	C	T	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [10]	AF013813	
<b>I</b>	T	—	A	T	TT	C	T	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [10]	AF013814	
<b>J</b>	T	—	C	T	—	C	T	T	AT	AG	TTTA	Lee et al. [10]	AF013815	
<b>K</b>	T	—	C	T	—	C	T	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [10]	AF013816	
<b>L</b>	T	—	A	T	—	T	C	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [10]	AF013817	
<b>N</b>	T	—	A	A	—	T	T	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [10]	AF013819	
<b>IV</b>	T	—	A	T	—	T	T	T	—	GG	TTTA	Roberts et al. [21]	AY328046	

**Table 2b** *Pneumocystis jirovecii* internal transcribed spacer (ITS) 2 alleles identified in the present study, according to an updated nomenclature, derived from that which was initially described by Lee et al. [10].

ITS2 alleles	Nucleotide positions (bp)											Authors (Study reference)	GenBank accession number	
	48-49	52-57	61-62 <sup>a</sup>	64-68	70-76 <sup>a</sup>	80	126	164	170-175	177	181-187			
b	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	AT_AT	G	_____	Lee et al. [10]	AF013822	
c	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	C	G	AT_AT	G	_____	Lee et al. [10]	AF013823	
e	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	____AT	G	_____	Lee et al. [10]	AF013825	
f	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	T	—	G	____AT	A	_____	Lee et al. [10]	AF013826	
g	—	TAA	—	AA_TA	AATAA	—	—	G	____AT	A	_____	Lee et al. [10]	AF013827	
h	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	____AT	A	_____	Lee et al. [10]	AF013828	
i	—	—	—	—	AATAA	—	—	G	____AT	A	_____	Lee et al. [10]	AF013829	
m	—	TAATAA	—	AA_TA	AATAA	—	—	G	____AT	A	CAAAATA	Lee et al. [10]	AF013833	
p (FR004)	—	TAA	—	AA_TA	AATAA	—	—	G	AT_AT	G	_____	Lee et al. [10]	AF013836	
r	A	TAA	—	TA	AA_TA	AATAT	—	—	G	_____	A	_____	Siripattanapipong et al. [25]	AY550105
x <sup>b</sup>	—	TAA	—	AA_TA	AATATAT	—	—	G	____AT	G	_____	This study	KC407706	

<sup>a</sup>The nomenclature by Lee et al. [10] has been extended with new scoring positions, 61-62, and 75-76.

<sup>b</sup> Allele x is newly described and designated in the present study.

**Table 3** Occurrence of *Pneumocystis jirovecii* Internal Transcribed Spacer haplotypes in patients with *Pneumocystis* Pneumonia or pulmonary colonization monitored at Brest University Hospital, France.

Haplotypes	No. of patients (No. clones)	
	PcP	Colonization
Eg	20 (81)	11 (30)
Ai	5 (8)	0
Ec	2 (6)	3 (10)
Ir	0	4 (11)
Bi	2 (4)	1 (3)
IVg	3 (3)	0
Jf	1 (1)	2 (6)
Gg	2 (8)	0
Ig, Ef	1 (1)	1 (1)
Ne	1 (3)	1 (3)
Kf	0	2 (6)
Nx, Em	1 (4)	0
Nh	1 (2)	0
Ei, Eh, Hg, Jg, Ng, Di, Ep	1 (1)	0
Ih, Fg	0	1 (3)
If, Eb, Lg	0	1 (1)

**Table 4** Main investigations of *Pneumocystis jirovecii* internal transcribed spacer haplotypes reported over the past two decades.

Authors (Study reference)	Country	No. of patients or specimens	Patients' characteristics	Clinical presentation of <i>P.jirovecii</i> infection	Procedure of the typing method	Most frequent haplotypes	Total no. of haplotypes identified in the study	No. of patients or specimens harboring more than one haplotypes (%)
Tsolaki et al. [11]	United Kingdom	12 patients (24 specimens)	HIV-infected adults	PcP	Cloning and sequencing	Ne, Ed, Eg	10	8/24 (33%)
Latouche et al. [29]	France (Paris)	16 patients (36 specimens)	HIV-infected adults	PcP	Direct sequencing	Ne, Eg	9	0/36
Lee et al. [10]	Denmark, USA, Ivory Coast, Italy, France Sweden, The Netherlands, Portugal, Thailand	207 patients: 123 (Denmark), 44 (USA), 10 (Ivory Coast) 9 (Italy), 6 (France), 5 (Sweden), 4 (The Netherlands), 4 (Portugal), 2 (Thailand)	NP	PcP	Direct sequencing Cloning and sequencing	Eg, Ne, Eb	59	52/207 (25%)
Tsolaki et al. [14]	The Netherlands	6 patients	Immunocompromised adults (4 patients) and non HIV-infected infants (2 patients)	PcP	Cloning and sequencing	Ne	9	4/6 (67%)
Tsolaki et al. [12]	United Kingdom	12 patients (35 specimens)	HIV-infected adults	PcP	Direct sequencing Cloning and sequencing	Eg, Ne, Eb	15	3/12 (25%)
Miller et al. [13]	United Kingdom	30 patients (43 specimens)	HIV-infected adults	PcP	NP	Ne, Eg	21	11/43 (25.6%)
Hosoya et al. [23]	Japan	24 patients	HIV-infected adults (16 patients) Immunocompromised non HIV- infected adults (8 patients)	PcP	Cloning and sequencing	Eb, Eg, Ne	30	16/24 (67%)
Helweg-Larsen et al. [15]	Denmark	130 patients (162 specimens)	HIV-infected adults	PcP	Direct sequencing Cloning and sequencing	Eg, Ne, Eb	49	37/162 (23%)
Nimri et al. [20]	USA	60 patients	HIV-infected adults	PcP	Cloning and sequencing	Eg, Ne	36	36/60 (60%)

<b>Nevez et al. [28]</b>	France (Amiens)	17 patients	HIV-infected adults (11 patients) Immunocompromised non HIV-infected adults (6 patients)	PcP (11 patients) Colonization (6 patients)	Cloning and sequencing	Eg, Ne	14	8/17 (47%) [6/11 (54%), 2/6 (33%)]
<b>Totet et al. [30]</b>	France (Amiens)	26 patients	Immunocompetent infants	Primary infection	Cloning and sequencing	Eg, Bi, Ne	13	3/26 (11%)
<b>Matos et al. [16]</b>	Portugal	42 patients (43 specimens)	Immunocompromised adults (35 patients) and children (7 patients)	PcP	Direct sequencing Cloning and sequencing	Eg, Eb, Ne	17	2/43 (5%)
<b>Robberts et al. [21]</b>	South Africa	19 patients (20 specimens)	NP	PcP	Cloning and sequencing	Eg, Gg, Eu	33	15/19 (79%)
<b>Siripattanapipong et al. [25]</b>	Thailand	28 patients	HIV-infected adults	PcP	Cloning and sequencing	Ir, Eb, Eg	23	15/28 (54%)
<b>Valerio et al. [18]</b>	Italy	207 patients	HIV-infected adults	PcP	Direct sequencing	Eg, Bi, Kf	46	NP
<b>Esteves et al. [17]</b>	Spain Portugal	53 patients (Spain) 52 patients (55 specimens) (Portugal)	HIV-infected adults (67 patients) Immunocompromised non HIV-infected infants (4 patients) Adults with diverse pulmonary disorders (34 patients)	NP	Direct sequencing Cloning and sequencing on 15% specimens	Bi, Eg (Spain) Eg, Cg, Gg (Portugal)	22	1/13 patients with positive typing results (8%) (Spain) 3/55 (5%) (Portugal)
<b>van Hal et al. [22]</b>	Australia	60 patients (68 specimens)	HIV-infected adults (53 patients) Immunocompromised non HIV-infected adults (7 patients)	PcP	Direct sequencing	Eg, Isyd2, Ec	16	NP
<b>Gupta et al. [26]</b>	India	43 patients	HIV-infected adults (19 patients) Immunocompromised non HIV-infected adults (24 patients)	PcP	Direct sequencing Cloning and sequencing on 13 specimens	Eg, Ea, Ec	21	3/13 cloned specimens (23%)
<b>Beser et al. [19]</b>	Sweden	64 patients	HIV-infected patients (14) Immunocompromised non HIV-infected patients (50)	PcP	Cloning and sequencing	Eg, Ne, Bi, Eb	12	32/64 (50%)
<b>Matsumura et al. [24]</b>	Japan	56 patients	Immunocompromised non-HIV infected patients	PcP	Cloning and sequencing	Eb, Eg, Bi	9	5/31 (16%)
<b>Li et al. [27]</b>	China	12 patients	HIV-infected adults	PcP	Cloning and sequencing	Eg, Eb, Bi	5	2/12 (17%)

Footnote: NP, not provided; HIV, Human Immunodeficiency Virus; PcP, *Pneumocystis Pneumonia*

## **CHAPITRE 3**

**Cas groupés d'infections à *Pneumocystis jirovecii* en  
milieu hospitalier et infections nosocomiales**

### 1. Cas groupés d'infections à *P.jirovecii* chez des transplantés de reins au CHRU de Brest et rôle potentiel des patients colonisés en tant que source infectieuse

Le travail de caractérisation génotypique présenté précédemment a permis d'améliorer les méthodes de génotypage de *P.jirovecii* sur les loci DHPS et ITS. Cette étape préalable était indispensable pour permettre l'exploration des cas groupés d'infections à *P.jirovecii* survenus chez des patients transplantés de rein au CHRU de Brest. Dix-huit cas d'infections à *P.jirovecii* ont été diagnostiqués entre mai 2008 et avril 2010, alors qu'aucun cas de PPC n'avait été diagnostiqué chez des patients transplantés de rein par notre laboratoire hospitalier depuis 2002.

L'étude de ces cas groupés a reposé sur l'analyse du locus de la DHPS et des séquences ITS 1 et 2 chez les 18 patients transplantés. Douze patients présentaient une PPC et 6 patients étaient colonisés par *P.jirovecii*. Nous avons réalisé en parallèle le génotypage de *P.jirovecii* sur ces mêmes loci chez un groupe contrôle constitué de 22 patients hospitalisés sur un autre site du CHRU et ayant développé une infection à *P.jirovecii* sur la même période. Les résultats de l'identification des génotypes DHPS et ITS de *P.jirovecii*, ainsi que la fréquence de l'haplotype ITS majoritaire chez les patients transplantés ont été comparés, d'une part, à ceux du groupe contrôle et, d'autre part, à ceux d'une plus large population de 69 patients représentative des patients infectés par *P.jirovecii* dans notre région (cette population est désignée comme le groupe 3 dans la suite du manuscrit; elle chevauche la population étudiée dans le chapitre 2 "Caractérisation de *P.jirovecii* dans les populations infectées").

Nous avons établi une carte de transmission prenant en compte l'analyse des rencontres entre les patients et les résultats du génotypage de *P.jirovecii*. Tous les patients infectés ont été considérés comme des patients "source" potentiels. Un patient "source" a été défini comme un patient pour lequel le diagnostic d'infection à *Pneumocystis* a reposé sur la mise en évidence du champignon dans un LBA et qui, au cours de cette infection, a rencontré au moins une fois un patient considéré comme susceptible. Un patient susceptible a été défini comme un patient qui a rencontré au moins une fois un patient "source" et qui a développé par la suite une infection à *P.jirovecii* prouvée par le diagnostic biologique. Nous avons considéré que la transmission de *P.jirovecii* a pu avoir lieu si un patient "source" et un patient susceptible étaient présents au sein de l'unité de transplantation rénale le même jour et si ces patients étaient infectés avec le même génotype de *P.jirovecii*.

Le génotypage DHPS a été possible pour 16 des 18 patients transplantés, 18 des 22 patients du groupe contrôle et 52 des 69 patients du groupe 3. Un génotype sauvage a été identifié

chez tous les patients transplantés, chez tous les patients du groupe contrôle et chez 50 patients du groupe 3. Un génotype mutant a été identifié chez 2 patients du groupe 3. Le génotypage ITS a été possible pour 14 patients transplantés, 15 patients contrôles et 48 patients du groupe 3. L'haplotype Eg est l'haplotype majeur dans les 3 groupes. Cependant sa fréquence était plus élevée dans le groupe des transplantés que dans le groupe contrôle (13/14 vs. 9/15; p=0,049, test exact de Fisher) et le groupe 3 (13/14 vs. 23/48; p=0,007, test exact de Fisher). Cette fréquence plus élevée chez les transplantés constitue une caractéristique spécifique de *P.jirovecii* dans ce groupe. Ces résultats sont en faveur d'une source identique commune du champignon chez ces patients.

L'analyse des rencontres entre patients transplantés combinée avec les résultats du génotypage a permis de retenir 14 rencontres compatibles avec la transmission de *P.jirovecii*. Dix patients ont été considérés comme des patients "source". Sept patients présentaient une PPC et 3 patients étaient colonisés par *P.jirovecii*. Ce travail apporte les premières données sur le rôle des patients transplantés colonisés comme sources potentielles de *P.jirovecii* dans un contexte d'acquisition nosocomiale du champignon.

Les résultats de ce travail ont été publiés dans l'article "**A cluster of *Pneumocystis* infections among renal transplant recipients : molecular evidence of colonized patients as potential infectious sources of *Pneumocystis jirovecii*.**" Le Gal S, Damiani C, Rouillé A, Grall A, Tréguer L, Virmaux M, Moalic E, Quinio D, Moal MC, Berthou C, Saliou P, Le Meur Y, Totet A, Nevez G. Clinical Infectious Diseases 2012; 54(7):e62-71".

**Article 5**

**A cluster of Pneumocystis infections among renal transplant recipients : molecular evidence of colonized patients as potential infectious sources of *Pneumocystis jirovecii***

## MAJOR ARTICLE

# A Cluster of *Pneumocystis* Infections Among Renal Transplant Recipients: Molecular Evidence of Colonized Patients as Potential Infectious Sources of *Pneumocystis jirovecii*

Solène Le Gal,<sup>1,3</sup> Céline Damiani,<sup>7,8</sup> Amélie Rouillé,<sup>1</sup> Anne Grall,<sup>4</sup> Laetitia Tréguer,<sup>4</sup> Michèle Virmaux,<sup>1</sup> Elodie Moalic,<sup>1,3</sup> Dorothée Quinio,<sup>1,3</sup> Marie-Christine Moal,<sup>4</sup> Christian Berthou,<sup>2,5</sup> Philippe Saliou,<sup>6</sup> Yann Le Meur,<sup>2,4</sup> Anne Totet,<sup>7,8</sup> and Gilles Nevez<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>LUBEM EA 3882, IFR 148, and <sup>2</sup>EA 2216, IFR 148, University of Brest, and <sup>3</sup>Laboratory of Parasitology and Mycology, <sup>4</sup>Department of Nephrology and Renal Transplantation Unit, <sup>5</sup>Department of Hematology, and <sup>6</sup>Department of Public Health, Brest University Hospital, Brest, France; <sup>7</sup>Department of Parasitology and Mycology, Amiens University Hospital, and <sup>8</sup>University of Picardie-Jules Verne, EA 4285 UMI INERIS 01, Amiens, France

**Background.** Eighteen renal transplant recipients (RTRs) developed *Pneumocystis jirovecii* infections at the renal transplantation unit of Brest University Hospital (Brest, Brittany, France) from May 2008 through April 2010, whereas no cases of *P. jirovecii* infection had been diagnosed in this unit since 2002. This outbreak was investigated by identifying *P. jirovecii* types and analyzing patient encounters.

**Methods.** The identification of *P. jirovecii* internal transcribed spacer (ITS) types was performed on *P. jirovecii* isolates from the 18 RTRs (12 patients with *Pneumocystis* pneumonia [PCP], 6 colonized patients), 22 unlinked control patients (18 patients with PCP, 4 colonized patients), and 69 patients (34 patients with PCP, 35 colonized patients) with contemporaneously diagnosed *P. jirovecii* infections in the Brest geographic area. A transmission map was drawn up. Its analysis was combined with the results of *P. jirovecii* typing.

**Results.** *P. jirovecii* ITS type identification was successful in 14 of 18 RTRs, 15 of 22 control patients, and 48 of the 69 patients. Type Eg was the most frequent type in the 3 patient groups. However, its frequency was significantly higher in the first patient group than in the 2 other groups ( $P < .05$  and  $P < .01$ , respectively). Fourteen encounters between RTRs who harbored an identical type were observed. Ten patients were considered as possible index patients, of whom 3 were colonized by the fungus, and 7 presented PCP.

**Conclusions.** The results provide to our knowledge the first data on the role of colonized patients as potential sources of *P. jirovecii* in a context of nosocomial acquisition of the fungus.

*Pneumocystis jirovecii* is an opportunistic fungus that causes severe pneumonia in immunocompromised patients. *Pneumocystis* pneumonia (PCP) remains the most frequent AIDS-defining illness in developed countries in human immunodeficiency virus (HIV)-

Received 12 October 2011; accepted 6 December 2011; electronically published 14 February 2012.

Presented in part: 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, Illinois, 17–20 September 2011. Abstract M-492.

Correspondence: Gilles Nevez, MD, PhD, Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, Hôpital de La Cavale Blanche, CHU de Brest, blvd Tanguy Prigent, 29609, Brest, France (gilles.nevez@chu-brest.fr).

**Clinical Infectious Diseases** 2012;54(7):e62–71

© The Author 2012. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/cid/cir996

infected patients. In France, 32% of AIDS cases, which were registered with the Institut de Veille Sanitaire in 2009, were related to PCP [1]. PCP is also observed in non-HIV-infected patients who receive immunosuppressive therapy particularly for organ transplantation [2]. In the absence of prophylaxis, PCP occurs in 2%–24% of renal transplant recipients (RTRs), with a mortality rate of up to 49% [2]. These data show that PCP remains a public health issue and needs measures to prevent it in immunocompromised individuals.

Currently, PCP is considered to result from de novo acquisition of the fungus rather than from reactivation of latent forms of *P. jirovecii* present in the lungs [3–6]. Because *Pneumocystis* organisms infecting each mammalian species are host specific [7], an animal reservoir

for *P. jirovecii* is excluded and PCP in humans can be considered as an anthroponosis.

No exosaprophytic form of *Pneumocystis* species has been identified so far, whereas *P. jirovecii* seems to be widespread within human communities. Indeed, *P. jirovecii* infections cover a large spectrum of clinical presentations of which PCP represents only a part, and mild infections such as pulmonary colonization may be the main part [8]. The potential human sources of *P. jirovecii* may be represented by all infected patients. Host-to-host transmission of *Pneumocystis* species via the airborne route has been demonstrated in models [9, 10] and was suspected in humans through the occurrence of clusters of PCP cases in hospitals [11–19].

Studies of PCP case clusters among RTRs—in the course of which analysis of patient encounters were combined with *P. jirovecii* genotype identification—support the hypothesis of nosocomial acquisition and patient-to-patient transmission of the fungus [12, 13, 15, 17–19]. However, the potential role of colonized patients as *P. jirovecii* sources was not investigated.

We report herein a cluster of *Pneumocystis* infections in 18 RTRs, which occurred in Brest University Hospital, Brest, France from May 2008 through April 2010. No cases of PCP had been diagnosed among RTRs followed up in our institution since 2002. PCP was diagnosed in 12 of the 18 patients, and 6 patients were colonized by *P. jirovecii*. To investigate the potential nosocomial acquisition and transmission of *P. jirovecii* in the course of this cluster, we identified *P. jirovecii* types based on the analysis of 2 loci. Encounters between RTRs were analyzed, and a transmission map combined with the results of *P. jirovecii* type identification was drawn up.

## METHODS

### Hospital Settings

Brest University Hospital is a 2100-bed healthcare facility, located at 2 main sites 5 km apart, Cavale Blanche Hospital and Morvan Hospital. The renal transplantation unit is located at the first site. Specialized care is provided for 550 RTRs. Because outpatient clinic and hospitalization department are located on the same floor in the same building, outpatients and inpatients may encounter each other.

### Patients and *P. jirovecii* Isolates

Eighteen RTRs were involved in the cluster. The patients' median age was 62 years (range, 44–77 years); the male-female ratio was 11:7; the median posttransplantation period was 39.5 months (range, 13–183 months). None of the patients were submitted to PCP prophylaxis at the time of *P. jirovecii* infection diagnoses. Biological diagnoses of *P. jirovecii* infection were based on *P. jirovecii* detection in bronchoalveolar lavage (BAL) specimens by microscopy using Wright-Giemsa

and toluidine blue O stains, and a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay. The PCR assay was performed, after DNA extraction procedure using NucliSens easyMag system (Bio-Mérieux), with specific probe and primers of the gene encoding the mitochondrial large subunit ribosomal RNA (rRNA), as reported elsewhere [20]. The fungus was detected by both microscopy and the PCR assay in 7 patients who developed PCP. It was detected only by PCR in 5 other patients with PCP and 6 colonized patients. In the colonized patients, improvement was obtained despite the absence of specific treatment for *P. jirovecii*, alternative diagnoses of PCP were available, and the fungus was only detected by the PCR assay because of its low apparent burden (Table 1).

Twenty-two other patients hospitalized at Morvan Hospital and with contemporaneously diagnosed *P. jirovecii* infection were also enrolled. They had no a priori encounters with RTRs and represented a control group. Their median age was 58 years (range, 3–79 years), and their male-female ratio was 13:9. Biological diagnoses of *P. jirovecii* infection were performed as described above. The fungus was detected by both microscopy and PCR in 10 patients who developed PCP. It was detected only by PCR in 8 other patients with PCP and 4 colonized patients (Table 2).

The frequency of occurrence of the different *P. jirovecii* genotypes in the Brest geographic area was determined by analysis of *P. jirovecii* isolates from 69 patients with *P. jirovecii* infections diagnosed contemporaneously in our laboratory (from 3 October 2007 to 10 February 2010). The median age of these patients was 63 years (range, 3–87 years); the male-female ratio, 43:26. Risk factors for *P. jirovecii* infection included hematological malignancies (24 patients), cancers (14 patients), immunosuppressive therapy (13 patients), chronic bronchopulmonary diseases (7 patients), HIV infection (4 patients), malnutrition (2 patients), and liver transplantation, heart transplantation, congenital immunodeficiency, alcoholism, and pregnancy (1 patient each). Thirty-four patients developed PCP, whereas 35 patients were colonized by the fungus. Alternative diagnoses of PCP in these 35 patients were bacterial pneumonia (20 patients), bronchial carcinoma (5 patients), pulmonary aspergillosis (2 patients), drug-induced pneumonia (2 patients), and sarcoidosis, tuberculosis, exacerbation of chronic bronchitis, Eisenmenger syndrome, pulmonary edema, and pulmonary fibrosis (1 patient each). Biological diagnoses of *P. jirovecii* infection were performed as described above. The fungus was detected by both microscopy and PCR in 17 patients who developed PCP. It was detected only by PCR in 17 other patients with PCP and 35 colonized patients. This patient population is designated as the third patient group in the subsequent sections.

DNA samples of BAL specimens from all patients were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until typing.

**Table 1. Characteristics of 18 Renal Transplant Recipients Involved in a Cluster of *Pneumocystis jirovecii* Infections and Results of *P. jirovecii* Type Identification**

Patient Code	Sex	Age, y	Posttransplant Period, mo	Immunosuppressive Regimens	Date of BAL Retrieval <sup>a</sup>	Presentation of <i>P. jirovecii</i> Infection (Alternative Diagnosis of PCP)	<i>P. jirovecii</i> ITS Type (No. of Clones) <sup>b</sup>	<i>P. jirovecii</i> DHPS Type <sup>b</sup>
P1	M	69	84	Sirolimus, prednisone	20/05/08	Pulmonary colonization (bacterial pneumonia)	...	...
P2	M	72	140	Sirolimus	15/11/08	PCP	Gg (5)	Wild
P3	M	67	50	Everolimus, cyclosporin, prednisone	27/01/09	PCP	...	...
P4	M	45	23	Cyclosporin, MMF, prednisone	25/02/09	PCP	Eg (5)	Wild
P5	F	61	80	Tacrolimus, MMF, prednisone	25/02/09	PCP	Eg (5)	Wild
P6	M	77	26	Belatacept, MMF, prednisone	27/02/09	PCP	Eg (5)	Wild
P7	F	60	27	Sirolimus, MMF, prednisone	10/04/09	Pulmonary colonization (drug induced pneumonia)	Eg (5)	Wild
P8	F	63	29	Belatacept, MMF, prednisone	16/05/09	Pulmonary colonization (viral pneumonia)	...	Wild
P9	M	54	15	Cyclosporin, MMF, prednisone	28/05/09	PCP	Eg (5)	Wild
P10	M	54	16	Cyclosporin, MMF, prednisone	28/05/09;17/06/09 <sup>c</sup>	PCP	Eg (2), <sup>d</sup> "N" <sup>e</sup> Eg (1), Eh (1), IV <sup>f</sup> g (1); Eg (5) <sup>c</sup>	Wild; Wild <sup>c</sup>
P11	F	53	62	Cyclosporin, MMF, prednisone	03/06/09	PCP	Eg (5)	Wild
P12	M	62	69	Tacrolimus, MMF, prednisone	16/06/09	PCP	Eg (3), <sup>d</sup> E <sup>g</sup> "g <sub>1</sub> " <sup>g</sup> (1)	Wild
P13	F	62	183	Cyclosporin, MMF, prednisone	06/07/09	Pulmonary colonization (bacterial pneumonia)	...	Wild
P14	M	48	69	Sirolimus, MMF, prednisone	08/07/09	Pulmonary colonization (drug induced pneumonia)	Eg (4), <sup>d</sup> E <sup>g</sup> "g <sub>2</sub> " <sup>h</sup> (1)	Wild
P15	M	65	25	Cyclosporin, MMF, prednisone	14/07/09	Pulmonary colonization (bacterial pneumonia)	Eg (4), <sup>d</sup> Lg (1)	Wild
P16	F	66	13	Tacrolimus, MMF, prednisone	23/10/09	PCP	Eg (5)	Wild
P17	F	44	21	Tacrolimus, MMF, prednisone	01/03/10	PCP	Eg (5)	Wild
P18	M	77	71	Sirolimus, MMF, prednisone	11/03/10;21/04/10 <sup>c</sup>	PCP	Eg (4); Eg (5) <sup>c</sup>	Wild; Wild <sup>c</sup>

Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; DHPS, dihydropteroate synthase; F, female; ITS, internal transcribed spacer; M, male; MMF, mycophenolate mofetil; PCP, *Pneumocystis* pneumonia.

<sup>a</sup> Dates are given as date/month/year.

<sup>b</sup> Ellipses indicate that *P. jirovecii* typing failed to give positive results.

<sup>c</sup> Patients P10 and P18 underwent 2 consecutive BAL procedures, for which dates of retrieval and *P. jirovecii* type identification are separated by a semicolon.

<sup>d</sup> Major type within mixed infections due to >1 type in patients P10, P12, P14, and P15.

<sup>e</sup> "N" differs from ITS1 allele N reported elsewhere by Lee et al [21] by the presence of a G residue at position 15.

<sup>f</sup> IV is an ITS1 allele described elsewhere by Robberts et al [22] (Genbank access no. AY328046).

<sup>g</sup> "g<sub>1</sub>" differs from ITS2 allele g reported elsewhere by Lee et al [21] by the presence of a G residue at position 62.

<sup>h</sup> "g<sub>2</sub>" differs from ITS2 allele g reported elsewhere by Lee et al [21] by the presence of G residues at positions 62 and 72.

#### *P. jirovecii* Typing

The *P. jirovecii* dihydropteroate synthase (DHPS) locus was examined using PCR-restriction fragment length polymorphism

(RFLP) analysis. First, the DHPS locus was amplified using a nested-PCR assay using primer pairs F1 [23] and B45 [24] (first round) and Ahum [24] and BN [23, 24] (second round).

# Cas groupés d'infections à *P.jirovecii* en milieu hospitalier et infections nosocomiales

**Table 2. Characteristics of the 22 Control Patients and Results of *Pneumocystis jirovecii* Type Identification**

Patient Code	Sex	Age, y	Underlying Conditions	Date of BAL Retrieval <sup>a</sup>	Presentation of <i>P. jirovecii</i> Infection (Alternative Diagnosis of PCP)	<i>P. jirovecii</i> ITS Type (No. of Clones) <sup>b</sup>	<i>P. jirovecii</i> DHPS Type <sup>b</sup>
C1	M	62	Cancer	23/10/07	Pulmonary Colonization (bronchial carcinoma)	...	Wild
C2	F	41	Hematological malignancy	20/11/07	PCP	Eg (4), <sup>c</sup> IV <sup>d</sup> g (1)	Wild
C3	F	3	Congenital immunodeficiency	21/12/07	PCP	...	...
C4	M	71	Hematological malignancy	05/02/08	PCP	...	Wild
C5	F	74	Hematological malignancy	07/02/08	PCP	Gg (3)	Wild
C6	M	79	Cancer	20/02/08	Pulmonary colonization (bacterial pneumonia)	Ec (3)	Wild
C7	F	56	Hematological malignancy	14/05/08	PCP	Eg (3)	Wild
C8	M	57	Hematological malignancy	18/07/08	PCP	...	...
C9	F	38	Hematological malignancy	14/10/08	Pulmonary colonization (bacterial pneumonia)	Ec (5)	Wild
C10	M	72	Immunosuppressive treatment	15/06/09; 22/06/09 <sup>e</sup>	PCP	...; Ne (3) <sup>e</sup>	Wild, Wild <sup>e</sup>
C11	F	42	Liver transplantation	29/06/09	PCP	Eg (3)	Wild
C12	F	65	Cancer	21/07/09	PCP	Bi (2), <sup>c</sup> Ai (1)	Wild
C13	M	75	Immunosuppressive treatment	07/10/09	PCP	Eg (3)	Wild
C14	M	60	Hematological malignancy	13/10/09; 27/11/09 <sup>e</sup>	PCP	...; ... <sup>e</sup>	...; Wild <sup>e</sup>
C15	M	73	Immunosuppressive treatment	16/10/09	PCP	...	...
C16	M	57	Cancer	23/10/09	Pulmonary colonization (pulmonary aspergillosis)	...	...
C17	M	26	Hematological malignancy	13/11/09; 01/12/09 <sup>e</sup>	PCP	Eg (5); Eg (3) <sup>e</sup>	Wild; Wild <sup>e</sup>
C18	M	59	Hematological malignancy	20/11/09	PCP	Eg (3)	Wild
C19	M	61	Cancer	27/11/09	PCP	Eg (1), E''b'' <sup>f</sup> (1)	Wild
C20	F	46	Cancer	14/12/09	PCP	Eg (3), <sup>c</sup> Jf (2)	Wild
C21	F	41	Hematological malignancy	02/02/10	PCP	Eg (1), Ng (1), IV <sup>d</sup> g (1), "E''g" <sub>1</sub> (1), "E''g" <sub>3</sub> " <sup>h</sup> (1)	Wild
C22	M	57	Hematological malignancy	10/02/10	PCP	Ai (2), Di (2)	Wild

Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; DHPS, dihydropteroate synthase; F, female; ITS, internal transcribed spacer; M, male; PCP, *Pneumocystis* pneumonia.

<sup>a</sup> Dates are given as date/month/year.

<sup>b</sup> Ellipses indicate that *P. jirovecii* typing failed to give positive results.

<sup>c</sup> Major type within mixed infections due to >1 type in control patients C2, C12, and C20.

<sup>d</sup> IV is an ITS1 allele described elsewhere by Robberts et al [22] (GenBank access No. AY328046).

<sup>e</sup> Patients C10, C14, and C17 underwent 2 consecutive BAL procedures, for which dates of retrieval and *P. jirovecii* type identification are separated by a semicolon.

<sup>f</sup> "b" differs from ITS2 allele b reported elsewhere by Lee et al [21] by the presence of an A residue at position 72.

<sup>g</sup> "E" differs from ITS1 allele E reported elsewhere by Lee et al [21] by nucleotide deletion at position 117.

<sup>h</sup> "g<sub>3</sub>" differs from ITS2 allele g reported elsewhere by Lee et al [21] by the presence of T residue at position 173.

Reagent and amplification conditions of the 2 rounds of PCR were described elsewhere [23]. Second, the RFLP assay was performed using restriction enzymes, *Acc*I and *Hae*III (New

England Biolabs), which made possible the detection of mutations at nucleotide positions 165 and 171 respectively, as described elsewhere [25].

**Table 3. Comparison of Characteristics and Results of *Pneumocystis jirovecii* Typing in 18 Renal Transplant Recipients, 22 Control Patients, and 69 Patients With Contemporaneously Diagnosed *P. jirovecii* Infections in the Brest, France, Geographic Area**

Characteristics	Renal Transplant Recipients (n = 18)	Control Patients (n = 22)	Other Patient Population (n = 69)
PCP, No. of patients; colonization, No. of patients	12; 6	18; 4	34; 35
Age, median (range), years	62 (44–77)	58 (3–79)	63 (3–87)
Sex ratio, male-female	11:7	13:9	43:26
Period of BAL retrieval	20 May 2008 to 21 April 2010	23 October 2007 to 10 February 2010	3 October 2007 to 10 February 2010
Patients, No.			
Positive results of DHPS typing	16	18	52
Infected with mutant types	0	0	2
Infected with wild types	16	18	50
Positive results of ITS typing	14	15	48
ITS types, total No.	8	13	31
Mixed infections, No.	4	6	17
Main ITS type	Eg	Eg	Eg
Patients infected with main ITS type, No. (%)	13 (92.8%) <sup>a,b</sup>	9 (60%) <sup>a</sup>	23 (47.9%) <sup>b</sup>

Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; DHPS, dihydropteroate synthase; ITS, internal transcribed spacer; PCP, *Pneumocystis* pneumonia.

<sup>a</sup> 13/14 versus 9/15 (Fisher exact test,  $P \leq .05$ ).

<sup>b</sup> 13/14 versus 23/48 ( $\chi^2$  test, Yates correction,  $P \leq .01$ ).

To amplify the internal transcribed spacer (ITS) 1 and 2 sequences, a nested-PCR assay was performed with 2 pairs of primers specific for *P. jirovecii*, N18SF and N26SRX (first round) and ITSF3 and ITS2R3 (second round) [4, 26]. The 2 rounds were performed under reagent and amplification conditions described elsewhere [26, 27] but with the following modifications. The second PCR round was done with denaturation at 94°C for 1.5 minutes, annealing at 55°C for 1.5 minutes, and extension at 72°C for 5 minutes, for 35 cycles. The second round PCR products were purified (Microcon PCR columns, Millipore) and cloned into the plasmid pGEMT (pGEMT easy Vector System II kit; Promega) [27]. Recombinant plasmids were sequenced from the 2 strands using T7P and SP6 universal primers on an automatic sequencer (Big-Dye Terminator Method, Applied Biosystems Sequencer 3700, Applied Biosystems). Sequence alignment was performed with BioEdit software, version 7.0.0, using the Clustal W program. ITS1 and ITS2 alleles were identified using the score described by Lee et al [21]. *P. jirovecii* ITS types are defined by a combination of the alleles of the 2 loci.

#### Transmission Map

A transmission map was drawn up to reveal encounters and *P. jirovecii* transmission between patients. We assumed that transmission took place via the airborne route. Dates of outpatient visits and patient hospitalization were extracted from the database of the Laboratory and Medical Information Systems (Hexaflux Galaxie II [5.3.0] and Susie V4). All infected

patients were regarded as possible index patients. A possible index patient was defined as a patient for whom a diagnosis of *Pneumocystis* infection was confirmed by a positive result of *P. jirovecii* detection in a BAL specimen, and who had, contemporaneously with the course of *P. jirovecii* infection,  $\geq 1$  encounter with a potential susceptible patient. A susceptible patient was defined as a patient who had  $\geq 1$  encounter with an index patient and who later developed *P. jirovecii* infection, as revealed by a positive result of *P. jirovecii* detection in BAL specimen. We considered that encounters and transmission conditions were combined if index patients and susceptible patients visited the outpatient clinic or the hospitalization department at the same day and harbored identical *P. jirovecii* types.

#### Statistical Analysis

*P. jirovecii* ITS type frequencies in RTRs, the control group, and the third group were compared using Fisher exact test and  $\chi^2$  test with Yates' correction. Differences were considered significant at  $P < .05$ .

## RESULTS

#### *P. jirovecii* Typing

Positive results of *P. jirovecii* DHPS type identification were obtained in 16 of the 18 RTRs (Tables 1 and 3), in 18 of the 22 patients of the control group (Tables 2 and 3), and in 52 of the 69 patients of the third group (Table 3). A wild type was

identified in all 16 RTRs, in the 18 patients of the control group, and in 50 of the 52 patients (96.2%) in the third group. Mutant types were identified in the 2 remaining patients. Thus, there were identical characteristics of *P. jirovecii* DHPS genotypes in RTRs and in the patient control group.

Positive results of *P. jirovecii* ITS type identification were obtained in 14 of the 18 RTRs of whom 11 developed PCP and 3 were colonized by the fungus. Eight ITS types—Eg, Eh, Gg, IVg, Lg, “N”g, E“g<sub>1</sub>”, E“g<sub>2</sub>”—were identified. Type Eg, Eh, Gg, and Lg result from the combination of ITS1 and ITS2 alleles described elsewhere by Lee et al [21]. Type IVg results from the combination of ITS1 allele IV described by Robberts et al [22] with ITS2 allele g. Type “N”g results from the combination of ITS2 allele g with a new ITS1 allele that we designated as “N”. Type E“g<sub>1</sub>” results from the combination of ITS1 allele E with a new ITS2 allele that we designated as “g<sub>1</sub>”. Type E“g<sub>2</sub>” results from the combination of ITS1 allele E with a new ITS2 allele that we designated as “g<sub>2</sub>” (sequence data of new ITS1 and 2 alleles are described in Table 1). More than 1 type was detected in 4 of the 14 patients (28.6%), suggesting mixed infections. Type Eg, which was detected in 13 of the 14 patients (92.8%), was the most frequent type in RTRs.

Positive results of *P. jirovecii* ITS type identification were obtained in 15 of the 22 control patients, of whom 13 developed PCP and 2 were colonized by the fungus. Thirteen ITS types—Eg, Gg, IVg, Ec, Ne, Ai, Bi, Jf, Di, Ng, “E”g, E“b”, E“g<sub>3</sub>”—were identified. Type Eg, Gg, IVg, Ec, Ne, Ai, Bi, Jf, Di, Ng result from the combination of ITS1 and ITS2 alleles described elsewhere by Lee et al [21] and Robberts et al [22]. Type “E”g results from the combination of ITS2 allele g with a new ITS1 allele that we designated as “E”. Type E“b” results from the combination of ITS1 allele E with a new ITS2 allele that we designated as “b”. Type E“g<sub>3</sub>” results from the combination of ITS1 allele E and a new ITS2 allele designated “g<sub>3</sub>” (sequence data of new ITS1 and 2 alleles are described in Table 2). More than 1 type was detected in 6 of the 15 patients (40%), suggesting mixed infections. Type Eg, which was detected in 9 of the 15 patients (60%), was the most frequent type.

Positive results of *P. jirovecii* ITS type identification were obtained in 48 of the 69 patients of the third group. Twenty-six patients developed PCP, and 22 were colonized by the fungus. Thirty-one ITS types were identified. Types Ai, Bi, Di, Eb, Ec, Ed, Ef, Eg, Eh, Ei, Em, Gg, Hf, Hg, Ig, Ir, Jf, Kf, Ne, Ng, Nh, and IVg resulted from the combination of ITS1 and ITS2 alleles described elsewhere by Lee et al [21], Robberts et al [22], and Siripattanapipong et al [28]. Nine ITS types result from the combination of a new ITS1 allele with a previously described ITS2 allele, or a previously described ITS1 allele with a new ITS2 allele (complete list of types not shown; sequence data available on request). More than 1 type was detected in 17 of the 48 patients (35.4%), suggesting mixed infections. Type

Eg, which was detected in 23 of the 48 patients (47.9%), was the most frequent type. Types Ir, Ec, and Ai were identified in 5 patients each. Other types were detected in 1, 2, or 3 patients each.

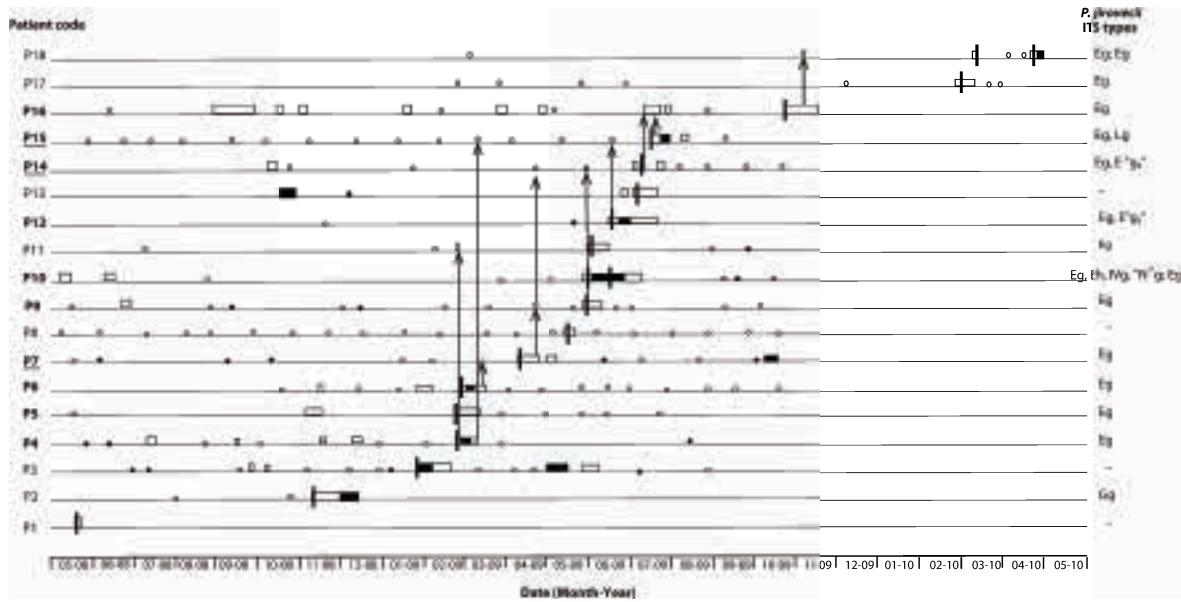
Frequencies of mixed infection in the 3 patient groups did not differ (4 of 14 RTRs vs 6 of 15 control patients [ $P = .4$ ]; 4 of 14 RTRs vs 17 of 48 patients of the third group [ $P = .44$ ]). Conversely, the frequency of type Eg is higher in RTRs than in the control group (13 of 14 vs 9 of 15;  $P = .049$ ) or in the third group (13 of 14 vs 23 of 48;  $P = .007$ ) (Table 3).

#### Transmission Map

Taking into account the above definitions of index and susceptible patients, a total of 25 encounters involving 16 patients were initially observed (Figure 1). The analysis of encounters combined with the results of typing enable us to rule out 11 of the 25 encounters as the cause of *P. jirovecii* transmission. Four encounters involved patients from whom *P. jirovecii* ITS types did not match. Indeed, P2 was infected with type Gg, whereas the potential susceptible patients P4, P5, P6, and P12 were infected with type Eg. Moreover, 7 encounters involved patients from whom ITS typing failed to give positive results for at least 1 patient. Finally, 14 encounters occurred between patients who developed *Pneumocystis* infections due to identical *P. jirovecii* ITS and DHPS types (Figure 1, arrows). Ten patients were considered as index patients (patients P4, P5, P6, P7, P9, P10, P12, P14, P15, and P16), 7 were considered as susceptible patients (patients P7, P9, P11, P14, P15, P16, and P18). Patients P7, P9, P14, P15, and P16 were considered as either index patients or susceptible patients. Three of the index patients were colonized by *P. jirovecii* (patients P7, P14, and P15), whereas 7 presented PCP (patients P4, P5, P6, P9, P10, P12, and P16).

#### DISCUSSION

The cluster of *Pneumocystis* infections occurred from May 2008 through April 2010, whereas no cases of PCP had been diagnosed in RTRs followed up in our institution since 2002. The apparent increase in *P. jirovecii* infection incidence may be partly due to recent use of PCR assay, which is more sensitive than microscopic techniques for *P. jirovecii* detection. Indeed, we started to use PCR assay for routine detection of *P. jirovecii* in our laboratory in October 2007; the fungus was detected with PCR in 11 of the 18 RTRs, whereas it was not detected with microscopy. Nonetheless, we diagnosed no *Pneumocystis* infection cases in RTRs using both PCR and microscopic techniques from October 2007, when PCR assay use was initiated, to May 2008, the date when the cluster began. Moreover, we detected *P. jirovecii* in 7 patients using conventional microscopic techniques that have not changed since 2002. Likewise, immunosuppressive and PCP chemoprophylaxis



**Figure 1.** Cluster of *Pneumocystis* infection cases among renal transplant recipients, shown as map of *Pneumocystis jirovecii* transmission between patients with *Pneumocystis pneumonia* (PCP) or patients colonized by the fungus. The y-axis presents patient codes; x-axis and horizontal lines, patient histories; white circles, outpatient visits in the transplantation unit; black circles, outpatient visits in other units; white rectangles, hospitalization periods in the transplantation unit; black rectangles, hospitalization periods in other units; and vertical bars, dates when *P. jirovecii* infection was diagnosed. Patients P10 and P18 underwent 2 consecutive bronchoalveolar lavage procedures, for which *P. jirovecii* type identification are separated by a semicolon. Results of *P. jirovecii* internal transcribed spacer (ITS) type identification are indicated on the right side. Arrows denote the 14 encounters compatible with *Pneumocystis* transmission. Arrows between patients P4 and P11, P5, and P11 (i), P4 and P15, P5 and P15, P6, and P15 (ii), and P9 and P14, P10, and P14 (iii) are superimposed and indicate several encounters. Ten patients were considered as index patients (bold), of whom 7 (patients P4, P5, P6, P9, P10, P12, and P16) presented with PCP and 3 (patients P7, P14, and P15) were colonized by *P. jirovecii* (underlined).

regimens have not changed recently. No patients were submitted to chemoprophylaxis when *P. jirovecii* infections occurred, because the posttransplantation period for all patients was >13 months, whereas the duration of recommended prophylaxis is limited to 4 or 6 months after transplantation [29, 30]. For all the above reasons, we believed that we were confronted with a genuine outbreak, revealed by the cluster in the course of which patient-to-patient transmission of the fungus may have occurred.

Amplifications of DHPS or ITS loci failed to give positive results in 23 patients, although they had tested positive with the PCR assay at the mtLSUrRNA gene. These sensitivity differences in PCR assays are due to the presence of the mtLSUrRNA gene in several copies within the *P. jirovecii* genome [31], contrary to DHPS and ITS loci [32, 33]. DHPS locus analysis was poorly informative because no RTRs were infected with a mutant. ITS loci were chosen because there are considered more informative than the mtLSUrRNA gene [34, 35]. Type Eg, which was the most frequent type in patients living in our geographic region, is also the most frequent type identified worldwide [21, 22, 26, 35–37]. However,

its higher frequency in RTRs involved in the cluster represents a specific characteristic of *P. jirovecii* organisms infecting this group. The higher frequency may be explained by the fact that fungus acquisition in this group resulted from common sources. Choukri and colleagues recently provided arguments against environmental sources of *P. jirovecii*. They did not detect *P. jirovecii* in air samples collected in the hospital far from wards admitting patients with PCP or in the hospital yard. Conversely, they detected *P. jirovecii* in the air surrounding patients with PCP. The fungal burden in the air decreased with distance from patients, suggesting the airborne spread of the fungus within patients' environment [31].

Several encounters were not taken into account in drawing up the transmission map, because it is unknown whether patients can transmit the fungus during the *P. jirovecii* infection incubation. An incubation duration of about 2 months has been suggested, but it varies greatly [17, 36]. Following our restrictive criteria of index patient definition and transmission conditions, we finally considered 14 encounters involving 12 patients. Seven patients who encountered a proven index patient and who later developed *P. jirovecii* infection,

**Table 4. Main Clusters of *Pneumocystis Pneumonia* in Hospitals Reported During the Past 5 Decades**

Source (Year of Publication)	Patients, No.	Underlying Conditions of Patients	Genotyping Method
Ruskin et al (1968) <sup>a</sup>	2	Connective tissue diseases	NP
Brazinski et al (1969) <sup>a</sup>	2	Hematological malignancies	NP
Perera et al (1970) <sup>a</sup>	19	Cancers	NP
Yates et al (1975) <sup>a</sup>	2	Hematological malignancies	NP
Singer et al (1975) <sup>a</sup>	11	Hematological malignancies	NP
Ruebush et al (1978) <sup>a</sup>	10	Cancers	NP
Goesch et al (1990) <sup>a</sup>	2	Hematological malignancies	NP
Bensousan et al (1990) <sup>a</sup>	10	Renal transplantation	NP
Chave et al (1991) <sup>a</sup>	5	Renal transplantation	NP
Jacobs et al (1991) <sup>a</sup>	5	Hospitalization in ICU	NP
Glotz et al (1992) <sup>a</sup>	8	Renal transplantation	NP
Cheung et al (1994) <sup>a</sup>	3	Cancers	NP
Hennequin et al (1995) <sup>a</sup>	7	Renal transplantation	NP
Helweg-Larsen et al (1998) <sup>a,b</sup>	8; 6	Hematological malignancies; AIDS	Analysis of ITS1 and ITS2 loci (12 patients <sup>c</sup> )
Olsson et al (2001) <sup>a,b</sup>	10 (3 + 7); 7	Renal transplantation; hematological malignancies	Analysis of mtLSUrRNA locus (17 patients <sup>c</sup> )
Rabodonirina et al (2004) <sup>b,d</sup> [17]	10; 39	Renal transplantation; AIDS	SSCP at 4 loci (9 patients <sup>c</sup> ; 30 patients <sup>c</sup> )
Höcker et al (2005) <sup>d</sup> [18]	4	Renal transplantation in pediatrics	SSCP at 4 loci (4 patients <sup>c</sup> )
de Boer et al (2007) <sup>d</sup> [19]	22	Renal transplantation	Analysis of ITS1 and ITS2 loci (16 patients <sup>c</sup> )
Schmoldt et al (2008) <sup>d</sup> [12]	16	Renal transplantation	MLST at 4 loci (14 patients <sup>c</sup> )
Arichi et al (2009) [14]	9	Renal transplantation	NP
Yazaki et al (2009) <sup>d</sup> [13]	27	Renal transplantation	Analysis of ITS1 and ITS2 loci (6 patients <sup>c</sup> )
Gianella et al (2010) <sup>d</sup> [15]	19	Renal transplantation	MLST at 4 loci (7 patients <sup>c</sup> )
Struijk et al (2011) [16]	9	Renal transplantation	NP

Abbreviations: ICU, intensive care unit; ITS, internal transcribed spacers; MLST, multilocus sequence typing; mtLSUrRNA, mitochondrial large-subunit rRNA; NP, not performed; SSCP, single-strand conformation polymorphism;

<sup>a</sup> Reviewed in reference [11].

<sup>b</sup> Investigation of 2 or 3 clusters.

<sup>c</sup> No. of patients with positive results of *P. jirovecii* typing.

<sup>d</sup> Results of these studies are compatible with nosocomial acquisition of *P. jirovecii* through interhuman transmission.

whatever the postencounter period, were all considered to be susceptible patients. The postencounter period in the 7 susceptible patients theoretically represented the incubation duration, which varied from 1 to 4.5 months.

Three colonized patients were considered to be index patients. The possible transmission of *P. jirovecii* from colonized patients to susceptible patients who later develop PCP or pulmonary colonization is prompted by experimental *Pneumocystitis murina* infections. *P. murina* can be transmitted from mice with severe combined immunodeficiency (SCID) with corticosteroid-induced PCP to Balb/c mice, which do not develop PCP but which are transiently colonized. Colonized Balb/c mice can afterward transmit *P. murina* to susceptible SCID mice [10].

We assumed that direct transmission of *P. jirovecii* from index patients to susceptible patients has occurred. The hypothetical *P. jirovecii* circulation via healthcare workers in contact with infected patients, as discussed by Miller and colleagues [38], was not investigated in this retrospective study.

Main clusters that have previously been reported were most frequently observed in RTRs (Table 4). This apparent higher risk for *P. jirovecii* infection outbreaks may be related to the high number of RTRs worldwide, their immunosuppression status, and their compliance with regular follow-up within hospital settings, combined with the consequent high rate of encounters and potential transmission of the fungus. We hypothesize that the causes of our PCP case cluster were the absence of PCP prophylaxis and measures to prevent *P. jirovecii* acquisition in the hospital combined with the occurrence of PCP during the late posttransplantation period. Causes of this occurrence—as observed by many teams and our own—were not the focus of the present study and are still subject to debate [16, 39].

Be that as it may, the extension of the period of chemoprophylaxis beyond the 4 or 6 months recommended by guidelines must be discussed [29, 30]. However, measures to prevent *P. jirovecii* infections based only on chemotherapy may not be enough to achieve prevention. Data on outbreaks

in hospitals and *Pneumocystis* transmission in animal models currently seem sufficient to justify a policy of isolation [40]. This policy should be extended to patients in whom pulmonary colonization with *P. jirovecii* is diagnosed.

## Notes

**Acknowledgments.** The authors would like to thank Dr M. Perrot, and P. Lecordier, C. Carrou, and D. Roué for their contributions.

**Financial support.** This study was supported by the Agence Française de la Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (grant EST/2006/1/41).

**Potential conflicts of interest.** All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

## References

- Cazein F, Lot F, Pillonel J, et al. Surveillance de l'infection à VIH-sida en France, 2009. Bull Epidemiol Hebd 2010; 45-46:467-72.
- Gordon SM, LaRosa SP, Kalmadi S, et al. Should prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in solid organ transplant recipients ever be discontinued? Clin Infect Dis 1999; 28:240-6.
- Keely SP, Stringer JR. Sequences of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* strains associated with recurrent pneumonia vary at multiple loci. J Clin Microbiol 1997; 35:2745-7.
- Tsolaki AG, Miller RF, Underwood AP, Banerji S, Wakefield AE. Genetic diversity at the internal transcribed spacer regions of the rRNA operon among isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia. J Infect Dis 1996; 174: 141-56.
- Chen W, Gigliotti F, Harmsen AG. Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. Infect Immun 1993; 61:5406-9.
- Peters SE, Wakefield AE, Sinclair K, Millard PR, Hopkin JM. A search for *Pneumocystis carinii* in post-mortem lungs by DNA amplification. J Pathol 1992; 166:195-8.
- Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. Emerg Infect Dis 2002; 8:891-6.
- Nevez G, Raccourt C, Jounieaux V, Dei-Cas E, Mazars E. Pneumocystosis versus pulmonary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients. AIDS 1999; 13:535-6.
- Hughes WT, Bartley DL, Smith BM. A natural source of infection due to *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis 1983; 147:595.
- Dumoulin A, Mazars E, Seguy N, et al. Transmission of *Pneumocystis carinii* disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19:671-8.
- Nevez G, Chabé M, Rabodonirina M, et al. Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* infections. Parasite 2008; 15:359-65.
- Schmoldt S, Schuhegger R, Wendler T, et al. Molecular evidence of nosocomial *Pneumocystis jirovecii* transmission among 16 patients after kidney transplantation. J Clin Microbiol 2008; 46:966-71.
- Yazaki H, Goto N, Uchida K, Kobayashi T, Gatanaga H, Oka S. Outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in renal transplant recipients: *P. jirovecii* is contagious to the susceptible host. Transplantation 2009; 88:380-5.
- Arichi N, Kishikawa H, Mitsui Y, et al. Cluster outbreak of *Pneumocystis* pneumonia among kidney transplant patients within a single center. Transpl Proc 2009; 41:170-2.
- Gianella S, Haeberli L, Joos B, et al. Molecular evidence of interhuman transmission in an outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among renal transplant recipients. Transpl Infect Dis 2010; 12:1-10.
- Struijk GH, Gijsen AF, Yong SL, et al. Risk of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients long after renal transplantation. Nephrol Dial Transplant 2011; 26:3391-8.
- Rabodonirina M, Vanhems P, Couray-Targe S, et al. Molecular evidence of interhuman transmission of *Pneumocystis* pneumonia among renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. Emerg Infect Dis 2004; 10:1766-73.
- Höcker B, Wendt C, Nahimana A, Tönshoff B, Hauser P. Molecular evidence of *Pneumocystis* transmission in pediatric transplant unit. Emerg Infect Dis 2005; 11:330-2.
- de Boer M, Bruijnestijn van Coppenraet L, Gaasbeek A, et al. An outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia with 1 predominant genotype among renal transplant recipients: interhuman transmission or a common environmental source? Clin Infect Dis 2007; 44:1143-9.
- Totet A, Meliani L, Lacube P, et al. Immunocompetent infants as a human reservoir for *Pneumocystis jirovecii*: rapid screening by non-invasive sampling and real-time PCR at the mitochondrial large subunit rRNA gene. J Eukaryot Microbiol 2003; 50:668-9.
- Lee CH, Helweg-Larsen J, Tang X, et al. Update on *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. J Clin Microbiol 1998; 36:734-41.
- Roberts FJ, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Genotyping and coalescent phylogenetic analysis of *Pneumocystis jirovecii* from South Africa. J Clin Microbiol 2004; 42:1505-10.
- Beard CB, Carter JL, Keely SP, et al. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. Emerg Infect Dis 2000; 6:265-72.
- Lane BR, Ast JC, Hossler PA, et al. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis 1997; 175:482-5.
- Diop Santos L, Lacube P, Latouche S, et al. Contribution of dihydropteroate synthase gene typing for *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis* epidemiology. J Eukaryot Microbiol 1999; 46:1338-45.
- Tsolaki AG, Miller RF, Wakefield AE. Oropharyngeal samples for genotyping and monitoring response to treatment in AIDS patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. J Med Microbiol 1999; 48:897-905.
- Nevez G, Totet A, Jounieaux V, Schmit JL, Dei-Cas E, Raccourt C. *Pneumocystis jirovecii* internal transcribed spacer types in patients colonized by the fungus and in patients with pneumocystosis from the same French geographic region. J Clin Microbiol 2003; 41:181-6.
- Siripattanapipong S, Worapong J, Munghin M, Leelayoova S, Tan-ariya P. Genotypic study of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-positive patients in Thailand. J Clin Microbiol 2005; 43:2104-10.
- EBPG Expert Group on Renal Transplantation. European best practice guidelines for renal transplantation. Section IV: long-term management of the transplant recipient. IV.7.1 Late infections. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Nephrol Dial Transplant 2002; 17(Suppl 4):36-9.
- Kidney Disease: Improving Global outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. Am J Transplant 2009; 9:S1-155.
- Choukri F, Menotti J, Sarfati C, et al. Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* pneumonia. Clin Infect Dis 2010; 51:259-65.
- Tang X, Bartlett MS, Smith JW, Lu JJ, Lee CH. Determination of copy number of rRNA genes in *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*. J Clin Microbiol 1998; 36:2491-4.
- Volpe F, Dyer M, Scaife JG, Darby G, Stammers DK, Delves CJ. The multifunctional folic acid synthesis fas gene of *Pneumocystis carinii* appears to encode dihydropteroate synthase and hydroxymethyl-dihydropteroate pyrophosphokinase. Gene 1992; 112:213-8.
- Beser J, Hagblom P, Fernandez V. Frequent in vitro recombination in internal transcribed spacers 1 and 2 during genotyping of *Pneumocystis jirovecii*. J Clin Microbiol 2007; 45:881-6.
- Beard C, Roux P, Nevez G, et al. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. Emerg Infect Dis 2004; 10: 1729-35.

36. Helweg-Larsen J. *Pneumocystis jiroveci*. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. *Dan Med Bull* **2004**; 51:251–73.
37. Matos O, Lee CH, Jin S, et al. *Pneumocystis jiroveci* in Portuguese immunocompromised patients: association of specific ITS genotypes with treatment failure, bad clinical outcome and childhood. *Infect Genet Evol* **2003**; 3:281–5.
38. Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* **2001**; 39:3877–82.
39. McCaughey JA, Courtney AE. *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in renal transplantation: time to review our practice? *Nephrol Dial Transplant* **2011**; 21:5750–2.
40. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. 2007 guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in health care settings. *Am J Infect Control* **2007**; 35:S65–164.

## 2. Comparaison des génotypes de *P.jirovecii* identifiés chez des patients développant une PPC et dans des échantillons d'air prélevés dans leur environnement proche

La transmission par voie aérienne de *P.murina* et de *P.carinii* a été démontrée à l'aide des modèles murins [102, 232]. Pour cette raison, ce mode de transmission est suspecté pour *P.jirovecii* chez l'homme. De l'ADN de *P.jirovecii* a été détecté par PCR dans des prélèvements d'air réalisés dans l'environnement de patients présentant une PPC [13, 195]. Récemment, Choukri et al. ont détecté et quantifié de l'ADN de *P.jirovecii* dans des prélèvements d'air réalisés à 1 mètre (m), 3 m, 5 m et 8 m de distance de patients présentant une PPC. La quantité d'ADN de *P.jirovecii* détectée dans ces prélèvements d'air décroît de façon inversement proportionnelle à la distance du prélèvement par rapport au patient. Ces résultats suggèrent fortement que *P.jirovecii* est exhalé par les patients infectés et diffuse dans l'air environnant ces patients. Toutefois, cette hypothèse pourrait être confortée par l'identité des génotypes de *P.jirovecii* identifiés dans les prélèvements pulmonaires et dans les prélèvements d'air.

Dans ce contexte, nous avons effectué le typage de *P.jirovecii* chez 15 patients développant une PPC (15 LBA) et dans 15 prélèvements d'air réalisés à une distance de 1 mètre de ces patients à l'aide d'un appareil d'impaction en milieu liquide, le Coriolis® μ air sampler (Bertin technologies). Le génotypage a reposé sur l'analyse des séquences des ITS 1 et 2 et du locus de la DHPS. Les haplotypes ITS ont été identifiés dans les 15 LBA et 7 des 15 échantillons d'air. Une concordance complète a été observée pour 4 couples "LBA/air". Une concordance partielle a été observée pour 2 couples. Aucune concordance n'a été observée pour le septième couple. La concordance complète pour 4 couples plaide en faveur de l'origine pulmonaire de *P.jirovecii* détecté dans l'air.

Les génotypes DHPS ont été identifiés dans les 15 LBA et 6/15 échantillons d'air. Une concordance complète a été observée pour les six couples "LBA/air". Un géotype sauvage a été identifié dans 4 couples et un mutant a été identifié dans deux couples. Ceci suggère que des organismes mutants et potentiellement résistants aux sulfamides peuvent circuler en milieu hospitalier à partir de patients infectés source. Au total, ces résultats apportent des données complémentaires sur l'excrétion possible de *P.jirovecii* dans l'air environnant à partir des patients infectés et, en conséquence, sur la transmission aérienne potentielle du champignon en milieu hospitalier. Ces résultats complètent ceux obtenus lors de l'exploration

des cas groupés survenus dans notre hôpital. Ils sont en faveur de l'acquisition et de la transmission de *P.jirovecii* en milieu hospitalier.

Les résultats de ce travail sont rapportés dans la lettre "**Possible nosocomial transmission of *Pneumocystis jirovecii*.** Damiani C, Choukri F, Le Gal S, Menotti J, Sarfati C, Nevez G, Derouin F, Totet A. Emerging Infectious Diseases 2012; 18:877-8".

**Article 6**

**Possible nosocomial transmission of *Pneumocystis jirovecii***

## Possible Nosocomial Transmission of *Pneumocystis jirovecii*

**To the Editor:** Diversity of genotypes among *Pneumocystis jirovecii* (human-specific *Pneumocystis* species) isolates mainly involves internal transcribed spacer (ITS) loci (1). Type Eg, one of the most frequently detected ITS genotypes, has been found worldwide (2). The locus of dihydropteroate synthase (DHPS) is also of interest because DHPS is the target of sulfonamides, the main drugs used to treat *Pneumocystis* pneumonia (PCP). Studies of the DHPS locus have found mutations at positions 165 and 171, which confer potentially lower sensitivity to sulfonamides to mutant *P. jirovecii* organisms (3).

Airborne transmission of *Pneumocystis* ssp. has been demonstrated among animals and probably occurs among humans (4). Reports of clusters of PCP cases in hospitals (4,5) provide a rationale for considering the possibility of nosocomial *P. jirovecii* infections.

Moreover, we recently quantified *P. jirovecii* in the air surrounding patients with PCP (6). Our findings suggested that the fungus is exhaled from infected patients and then spreads into their surrounding air.

Because matches of *P. jirovecii* genotypes between pulmonary and air samples would strengthen these findings, we conducted DHPS and ITS typing of *P. jirovecii* isolates from PCP patients and from the air in their close environment. We assayed *P. jirovecii* DNA that we had previously detected in pulmonary samples (bronchoalveolar lavage and induced sputum) from 15 PCP patients and in 15 air samples collected 1 meter from each patient's head (6).

ITS genotyping was based on sequence analysis of ITS 1 and 2 regions after amplification with a nested PCR, cloning, and sequencing, as described (7). ITS alleles were identified by using the typing system by Lee et al. (2). DHPS genotyping was based on a PCR restriction fragment-length polymorphism assay that enables detection of mutations at positions 165 and 171, as described (8).

Among the 15 pulmonary samples, ITS genotyping was successful for all 15; among these, 8 ITS genotypes

were identified (Table). Type Eg was most frequently identified. Mixed infections, which correspond to detection of >1 genotype in a given sample, were detected in 5 samples. DHPS genotyping was successful for all 15 pulmonary samples. A wild genotype was identified in 9 samples, a 165 mutant genotype in 1 sample, and a 171 mutant genotype in 2 samples. Mixed infections were identified in the 3 remaining samples.

Among the 15 room air samples, ITS genotyping was successful for 7; among these, 4 ITS genotypes were identified (Table). Type Eg was again most frequently identified. A mixed infection was detected in 1 of the 7 samples. These results enabled us to compare ITS genotypes for 7 pairs of pulmonary and air samples. A full match was found for 4 (57.1%) pairs of samples, and a partial match, defined as at least 1 common genotype for pulmonary and air samples in mixed infections, was found for 2 (28.6%) pairs. No matches were found for the remaining pair of samples. DHPS genotyping was successful for 6 of the 15 air samples. A wild genotype was identified in 4 samples, a 165 mutant genotype was identified in 1 sample, and a 171 mutant genotype

Table. Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in pairs of pulmonary and air samples from 15 patients with *Pneumocystis* pneumonia\*

Patient no.†	No. days between pulmonary and air sampling	ITS genotype (no. sequenced clones)‡		DHPS genotype§	
		Pulmonary sample	Air sample	Pulmonary sample	Air sample
1	6	Gg, Fg (3)¶	ND	Wild	ND
2	1	Ih (3)	Eg (3)	Wild	ND
4	0	Gg (3)	Gg (3)	Wild	Wild
5	0	Eg (3)	Eg, Eg (3)¶	Wild	Wild
6	0	Eg (3)	Eg (3)	Mutant 171#	Mutant 171
7	1	Eg (3)	ND	Wild	Wild
8	0	Eg (2)	Eg (1)	Wild	ND
10	0	Eg (3)	ND	Mutant 171	ND
11	0	Be, Ec (3)¶	Ec (3)	Mutant 165**	Mutant 165
13	2	Eg (3)	ND	Wild	ND
15	0	Eg, Fg (3)¶	ND	Wild + mutant 171	ND
16	0	Eg (3)	ND	Wild	Wild
17	1	Ie, Ih (2)	ND	Wild	ND
18	1	Bl (3)	Bl (3)	Wild + mutant 165	ND
19	0	Eg, Bl (3)¶	ND	Wild + mutant 165	ND

\*ITS, internal transcribed spacers; DHPS, dihydropteroate synthase; ND, not determined.

†Patients are numbered as described in (6). Pulmonary samples were bronchoalveolar lavage specimens for patients 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 18, and 19 and induced sputum specimens for patients 1, 5, 13, 15, 16, and 17.

‡*P. jirovecii* ITS genotype identification using sequence analysis with a prior cloning step and applying the score by Lee et al. (2).

§*P. jirovecii* DHPS genotype identification using a PCR restriction fragment length polymorphism assay (8).

¶Major ITS genotype, as identified in 2 of 3 clones.

#Mutant genotype with the mutation at position 171.

\*\*Mutant genotype with the mutation at position 165.

## LETTERS

was identified in 1 sample. These results enabled us to compare DHPS genotypes for 6 pairs of samples. A full match was found for these 6 pairs. DHPS and ITS genotype matches were found for 4 pairs.

Several lines of evidence suggest that *P. jirovecii* is exhaled by infected patients and transmitted by the airborne route to susceptible persons (4). In the study reported here, ITS or DHPS genotype matches between pairs of pulmonary and air samples are consistent with the possibility that *P. jirovecii* organisms in the air originated from patients. DHPS mutants were detected in 6 (40%) of the 15 pulmonary samples; none of the 15 patients had received sulfonamide treatment at the time of PCP diagnosis. These results were not unexpected because frequency of finding DHPS mutants in PCP patients in Paris who had no prior sulfonamide treatment is high (8). The exhalation of DHPS mutants from infected patients can spread potentially sulfonamide-resistant organisms.

Matches of *P. jirovecii* genotypes in pairs of pulmonary and room air samples argue in favor of *P. jirovecii* exhalation by infected patients. The exhalation of *P. jirovecii* organisms emphasizes the risk for their nosocomial transmission. Our data provide additional arguments in favor of the application of measures to prevent the airborne transmission of *P. jirovecii* in hospitals.

This study was supported by the Agence Française de la Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (grant no. EST/2006/1/41).

**Céline Damiani, Firas Choukri,  
Solène Le Gal, Jean Menotti,  
Claudine Sarfati, Gilles Nevez,  
Francis Derouin,  
and Anne Totet**

Author affiliations: Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens, Amiens, France (C. Damiani, A. Totet); Université de Picardie-Jules Verne, Amiens (C. Damiani, A. Totet); Hôpital Saint Louis, Paris, France (F. Choukri, J. Menotti, C. Sarfati, F. Derouin); Université Paris Diderot, Paris (F. Choukri, J. Menotti, C. Sarfati, F. Derouin); Centre Hospitalier Universitaire de Brest, Brest, France (S. Le Gal, G. Nevez); and Université de Brest, Brest (S. Le Gal, G. Nevez)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1805.111432>

## References

1. Beard CB, Roux P, Nevez G, Hauser PM, Kovacs JA, Unnasch TR, et al. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:1729–35.
2. Lee CH, Helweg-Larsen J, Tang X, Jin S, Li B, Bartlett MS, et al. Update on *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J Clin Microbiol*. 1998;36:734–41.
3. Iliades P, Meshnick SR, Macreadie IG. Mutations in the *Pneumocystis jirovecii* DHPS gene confer cross-resistance to sulfamides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:741–8. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.2.741-748.2005>
4. Nevez G, Chabe M, Rabodonirina M, Virmaux M, Dei-Cas E, Hauser PM, et al. Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* infections. *Parasite*. 2008;15:359–65.
5. de Boer MG, de Fijter JW, Kroon FP. Outbreaks and clustering of *Pneumocystis* pneumonia in kidney transplant recipients: a systematic review. *Med Mycol*. 2011;49:673–80.
6. Choukri F, Menotti J, Sarfati C, Lucet JC, Nevez G, Garin YJ, et al. Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2010;51:259–65. <http://dx.doi.org/10.1086/653933>
7. Totet A, Pautard JC, Raccourt C, Roux P, Nevez G. Genotypes at the internal transcribed spacers of the nuclear rRNA operon of *Pneumocystis jirovecii* in nonimmunosuppressed infants without severe pneumonia. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1173–80. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.3.1173-1180.2003>
8. Totet A, Latouche S, Lacube P, Pautard JC, Journeaux V, Raccourt C, et al. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in immunocompetent infants and immunosuppressed adults, Amiens, France. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:667–73.

Address for correspondence: Anne Totet, Service de Parasitologie et Mycologie Médicales CHU, Centre Hospitalier Sud, 1 Ave René Laennec, 80054 Amiens, France; email: totet.anne@chu-amiens.fr

## Fatal Human Co-infection with *Leptospira* spp. and Dengue Virus, Puerto Rico, 2010

To the Editor: Leptospirosis, caused by *Leptospira* spp. bacteria, and dengue, caused by dengue viruses (DENVs), are potentially fatal acute febrile illnesses (AFI) endemic to the tropics (1,2). Because their clinical manifestations are similar (3), leptospirosis may be misidentified as dengue (4). We report a fatal case of co-infection with *Leptospira* spp. and DENV-1 in a man in Puerto Rico.

On May 23, 2010, a 42-year-old unemployed male carpenter came to an outpatient clinic in Puerto Rico reporting a 4-day history of fever, headache, generalized myalgia, anorexia, nausea, and vomiting. He was being treated for chronic hypertension and had been released from jail 2 weeks before illness onset. On evaluation, he was febrile, hypertensive, and tachycardic; laboratory results showed thrombocytopenia and leukocytosis with a predominance of neutrophils. Viral syndrome was diagnosed, and the patient was given acetaminophen, solumedrol, and ketoprofen.

The patient returned to the clinic on May 25 with continued fever, myalgia, worsening headache, and bilateral calf pain; he was afebrile and tachycardic and appeared acutely ill. He had no rash, jaundice, icteric sclera, cardiac murmurs, or organomegaly, and his

## **Discussion générale**

Nous avons rapporté les premières données sur la prévalence de *P.jirovecii* chez les patients mucoviscidosiques en France. Cette prévalence est de 1,3% chez les patients suivis à Brest. Elle est significativement inférieure à la prévalence de 21,6% observée à Séville [210]. L'âge médian des patients brestois est plus élevé que celui des patients espagnols (18,5 ans vs. 15,8 ans). En raison de leur âge, les premiers sont a priori à un stade plus avancé de leur maladie que les seconds et en conséquence, sont plus susceptibles d'être colonisés par *P.aeruginosa*. La présence de la bactérie inhiberait celle du champignon et expliquerait cette différence de prévalence. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats observés lors d'une étude multicentrique française portant sur un total de 104 patients suivis à Lille (58 patients), Dunkerque (20 patients), Bordeaux (8 patients), et Angers (18 patients) et publiée postérieurement à nos travaux. Cette étude au cours de laquelle une prévalence globale de 12,5% a été observée [94], a mis en évidence que les patients infectés par des souches mucoïdes de *P.aeruginosa* étaient significativement moins colonisés par *P.jirovecii* que ceux non infectés par la bactérie. A contrario, des résultats inverses ont été observés lors d'une autre étude récente menée au Brésil et portant sur un nombre plus faible de 34 patients [199]. Quoiqu'il en soit, les informations sur les interactions microbiennes complexes qui interviennent au niveau pulmonaire chez les patients mucoviscidosques restent parcellaires [56, 83] et justifieront de futurs travaux sur le microbiote pulmonaire basés éventuellement sur des approches métagénomiques.

D'autres hypothèses non mutuellement exclusives peuvent être proposées pour expliquer la faible prévalence de *P.jirovecii* chez les patients suivis à Brest par rapport à ceux suivis à Séville. Les différences climatiques évidentes entre les deux villes pourraient jouer un rôle. Toutefois, les données actuellement disponibles sur l'impact des facteurs climatiques sur les infections à *P.jirovecii* sont contradictoires et difficiles à interpréter [97, 135, 158, 229, 262, 263]. Les différences en termes d'épidémiologie de l'infection par le VIH et des cas de PPC s'y rapportant pourraient être également impliquées. La Bretagne se caractérise par une faible incidence du sida (8 cas pour un million d'habitants en 2007) et de la PPC (2,5 cas pour un million d'habitants en 2007) par rapport à l'Andalousie (27,6 cas de sida pour un million d'habitants et 6 cas de PPC pour un million d'habitants en 2007) [29, 108]. Parallèlement, la densité des habitants est plus élevée à Séville qu'à Brest ( $5000/\text{km}^2$  vs.  $2900/\text{km}^2$ ). La probabilité de rencontre entre individus infectés et non infectés est donc a priori plus grande dans la première ville que dans la seconde. Cette hypothèse est concordante avec les résultats de l'étude brésilienne menée à Porto Alegre qui rapporte une prévalence de la colonisation par *P.jirovecii* de 38% (13/34 patients) [199]. Dans cette ville, les prévalences de l'infection à

VIH, du SIDA et des cas de PPC qui s'y rapportent sont comme à Séville bien plus élevées qu'à Brest [8, 142]. Selon l'hypothèse qu'une faible circulation de *P.jirovecii* caractériserait notre région, nous devrions observer une faible fréquence de la colonisation par *P.jirovecii* chez d'autres patients connus pour être susceptibles, tels que les bronchopathes chroniques. En l'absence de données disponibles actuellement, cette population de patients mériterait d'être explorée à Brest.

Nous avons évalué le dosage du  $\beta$ -1,3-D glucane sérique à l'aide du kit Fungitell® pour le dépistage des patients infectés par *P.jirovecii*. L'augmentation du seuil de positivité de 80 à 100 pg/mL permet la discrimination entre les patients développant une PPC et les patients colonisés par le champignon. Ces résultats sont concordants avec ceux de Desmet et al qui avaient retenu dès 2009, le seuil de 100 pg/mL pour augmenter la spécificité du dosage du  $\beta$ -1,3-D glucane pour le diagnostic de la PPC à l'aide du même kit [57]. Nos résultats sont partiellement en accord avec ceux publiés en 2009 par Shimizu et al. qui ont dosé les taux de  $\beta$ -1,3-D glucane sérique à l'aide du kit commercialisé par Wako Pure Chemical Industries [225]. Bien que le seuil de positivité de ce test soit de 11 pg/mL, Shimizu et al. ont montré que les taux de  $\beta$ -1,3-D glucane étaient significativement plus élevés chez les patients développant une PPC que chez les patients colonisés (moyenne 32,8 pg/mL vs. 3,4 pg/mL; p<0,05). Postérieurement à notre travail, Matsumura et al. ont évalué le dosage du  $\beta$ -1,3-D glucane sérique à l'aide du même kit. Les taux de  $\beta$ -1,3-D glucane étaient significativement plus élevés chez les patients développant une PPC que chez les patients colonisés (médianes 39,5 vs. 4,3 pg/mL ; p<0,001) [150].

Le dosage du  $\beta$ -1,3-D glucane pour le diagnostic des mycoses profondes dont la PPC a été principalement évalué chez les patients adultes avec un nombre estimé de 8000 patients au total [2-5, 43, 48, 49, 52, 53, 57, 64, 81, 82, 89, 95, 110-114, 121, 144, 150, 156, 162, 164, 167, 177, 188, 190, 191, 193, 196-198, 200, 203-205, 217, 220, 224, 243] alors que les données disponibles en pédiatrie restent limitées à environ 250 enfants immunodéprimés non infectés par *P.jirovecii* [12, 163-165, 172, 281]. Alors que la primo-infection à *P.jirovecii* chez le nourrisson immunocompétent était considérée comme essentiellement asymptomatique, Nevez et al. [186] et Totet [245] ont montré que celle-ci pouvait se présenter comme une infection pulmonaire symptomatique mais résolutive en l'absence de traitement par sulfamides. Nous avons montré que les nourrissons développant une primo-infection ont des taux de  $\beta$ -1,3-D glucane significativement supérieurs à ceux observés chez les patients

colonisés (médianes 217,6 pg/ml vs. 69,5 pg/ml, p<0,05). Ces résultats sont en accord avec le fait que la primoinfection puisse être symptomatique et physiopathologiquement plus proche de la PPC que d'une colonisation pulmonaire, forme plus torpide de l'infection.

Le dosage du  $\beta$ -1,3-D glucane sérique à l'aide du kit Fungitell® est un test de seconde intention pour le diagnostic de routine des infections à *P.jirovecii*. Celui-ci doit rester associé à la détection du champignon dans les échantillons pulmonaires par l'examen microscopique et la PCR. Dans le but d'affiner la discrimination de la PPC et de la colonisation, nous développons à présent une nouvelle approche associant une PCR quantitative, pour évaluer la charge fongique pulmonaire, avec le dosage du  $\beta$ -1,3-D glucane sérique. Ceci apportera aux cliniciens des arguments biologiques supplémentaires pour faire le choix entre les options thérapeutiques adaptées à l'une et l'autre présentation clinique de l'infection. Quoi qu'il en soit, instaurer un traitement chez les patients colonisés et en définir les modalités, restent des questions ouvertes.

Nous avons analysé le locus DHPS de *P.jirovecii* à l'aide d'une technique de PCR-RFLP ciblant les positions nucléotidiques 165 et 171 dans le but de caractériser le champignon dans notre région. Cette technique permet de détecter les infections mixtes sans passer par une étape de séquençage et clonage [59, 92, 247]. Nous avons identifié 2 patients infectés avec des souches mutantes sur 66 patients. Ces patients ne présentaient pas d'antécédent de traitement ou de prophylaxie par les sulfamides. Leur lieu de domicile habituel était la région parisienne, les diagnostics d'infection à *P.jirovecii* ayant été posés au cours d'un séjour de moins d'un mois dans notre région. La période médiane d'incubation des infections à *P.jirovecii* étant de 2 mois [90, 207], nous avons posé l'hypothèse que ces patients s'étaient infectés en région parisienne, région caractérisée par une prévalence de mutants s'élevant à 18,5% [139]. Ainsi, le lieu habituel de résidence, plutôt que le lieu de diagnostic de l'infection à *P.jirovecii*, serait un facteur prédictif de l'infection par un mutant. *P.jirovecii* pourrait circuler en France d'une région à une autre via des voyageurs infectés. La prévalence des mutants chez les patients vivant effectivement à Brest est de 0% et le risque de contracter une souche potentiellement résistante dans cette ville est quasi nul. Il s'agit ici des trois points principaux apportés par notre travail.

Deux hypothèses qui se complètent peuvent être retenues pour expliquer ces différences de prévalence des mutants en fonction de l'origine géographique des patients (18,5% à Paris vs 0% à Brest). La pression de sélection par les sulfamides plus importante à Paris qu'à Brest d'une part, et la circulation et la transmission de *P.jirovecii* dans les communautés humaines

plus importantes à Paris qu'à Brest d'autre part, peuvent jouer un rôle. Les files actives des patients infectés par le VIH sont de 28000 à Paris et 800 dans le Finistère [33-38] et l'incidence du SIDA est 11 fois plus élevée à Paris que dans le Finistère (66 vs. 6 pour un million d'habitants) [108]. Dans ce contexte, les sulfamides sont utilisés plus fréquemment à Paris que dans le Finistère pour la prophylaxie de la PPC, favorisant l'émergence de mutants et augmentant le risque d'acquisition de ces mutants par des patients non exposés aux sulfamides. Ce rôle de la pression de sélection exercée par les sulfamides, utilisés chez les patients infectés par le VIH aux Etats-Unis et en Europe, et chez d'autres populations, en particulier en Afrique, a été déjà largement discuté [7, 15, 58, 88, 99, 100, 115, 117, 137, 159, 176, 247]. Parallèlement, le risque de rencontres entre patients infectés et susceptibles et par conséquent de transmission de *P.jirovecii*, est augmenté dans les zones urbaines à forte densité de population telles que Paris (21000 habitants/km<sup>2</sup>) par rapport à Brest (2900 habitants/km<sup>2</sup>). Nous avons émis précédemment cette hypothèse pour expliquer la faible prévalence de *P.jirovecii* chez les patients mucoviscidosiques dans le Finistère par rapport à celle retrouvée chez cette même catégorie de patients dans la région de Séville.

En somme, la faible prévalence de mutants observée à Brest pourrait être plus largement le reflet d'une faible prévalence en Bretagne. Pour étayer cette hypothèse, nous menons actuellement un second travail à l'aide d'une méthode identique, chez des patients suivis au CHU de Rennes. Logiquement, les résultats attendus mettront en évidence une faible prévalence de mutants à Rennes.

Dans le but de caractériser *P.jirovecii*, nous avons également analysé les séquences des ITS 1 et 2 des échantillons provenant de 81 patients non infectés par le VIH suivis dans notre centre hospitalier. Nous avons identifié 27 haplotypes dont les trois plus fréquents sont Eg (30/56 patients, 55,3%) suivis de Ec et Ai (5/56 patients chaque, 8,9%). Eg est aussi l'haplotype le plus fréquent dans le nord de la France [185, 249] et dans le monde [18, 68, 78, 93, 127, 131, 148, 189, 213, 255, 259, 260], excepté au Japon et en Thaïlande où les haplotypes les plus fréquents sont Eb et Ir respectivement [98, 151, 231]. Le second haplotype le plus fréquent varie en fonction des pays et des régions, mais il s'agit souvent de Ne en Europe et aux Etats-Unis [18, 93, 185, 189]. Dans notre région, Ne n'a été identifié que chez deux patients (3,6%). En revanche, nous avons identifié l'haplotype Ir chez quatre patients alors qu'à notre connaissance, il n'a été décrit qu'en Asie [78, 131, 151, 231]. Ces résultats apportent des données complémentaires sur d'éventuelles caractéristiques de *P.jirovecii* propres à notre région, et plus généralement, sur l'existence de particularités géographiques de *P.jirovecii*.

pouvant être mises en évidence par le typage des ITS. Ceci doit être discuté car les résultats du typage des ITS ont été obtenus par des méthodologies non strictement identiques. Par exemple, des équipes ont pris en compte les variations de longueur des zones polyT et identifient par conséquent un allèle ITS1 nommé SYD1 que nous récusons [78, 260]. Cette démarche conduit à augmenter de façon artéfactuelle le pouvoir discriminant de leur méthode de typage. Nous avons suivi des règles strictes pour définir les nouveaux allèles ITS1 et ITS2, ce qui explique que nous n'ayons pas retenu toutes les séquences présentant des variations au niveau des positions scorantes, BES-ITS1-2 par exemple, et les séquences présentant des variations en dehors des positions scorantes. Au cours de ce travail, nous avons pris en compte de nouvelles positions scorantes décrites par Helweg-Larsen [90] et Siripattanapipong et al. [231] (ex: positions 61-62, Table 2b de l'article 4) postérieurement à l'article de Lee et al. [127]. Pour cette raison, nous avons présenté en introduction de l'article 4 des tableaux synthétiques de l'analyse de la bibliographie sur les allèles ITS1 et ITS2 (Annexes 3 et 4) différents de ceux de l'article 4 (Table 2a et Table 2b) qui présentent les allèles effectivement identifiés au cours de notre travail selon nos critères et les nouvelles positions scorantes. Toutefois, il n'est pas envisageable d'imposer ces règles aux autres équipes, d'autant que les variations observées en dehors des positions scorantes, lorsque celles-ci sont identifiées chez plusieurs patients au cours d'une même étude ou dans des études différentes, pourraient bien représenter de réels allèles. L'allèle R décrit par Siripattanapipong et al. [231] en est un exemple (Annexe 3).

Le pouvoir discriminant de notre méthode de génotypage reste moyen et inférieur à celui de la PCR-SSCP (0,82 vs. 0,93) [85, 86] qui intègre l'analyse de la conformation des séquences de 4 loci. Notre méthode pourrait être plus discriminante si elle intégrait les résultats du séquençage de plusieurs loci. C'est pourquoi nous prévoyons de l'améliorer en ajoutant au séquençage des ITS 1 et 2 celui des gènes codant pour mtLSUrRNA et le cytochrome b. L'index de typabilité de notre méthode est de 1 si son calcul prend en compte les échantillons pour lesquels *P.jirovecii* a été détecté à l'examen microscopique. De plus, la méthode a permis de typer 40 des 70 échantillons pour lesquels le champignon n'a été détecté que par PCR. Pour cette raison nous avons pu caractériser *P.jirovecii* chez les patients colonisés. En effet, nous avons identifié les haplotypes *P.jirovecii* chez 56 patients non infectés par le VIH dont 25 étaient colonisés et 31 présentaient une PPC. Nous n'avons pas observé de différence entre les deux groupes de patients en termes de diversité et de fréquence des haplotypes et des infections mixtes. Ces résultats ne sont pas originaux mais ils confirment que tous les

patients, quelle que soit leur présentation clinique de l'infection à *P.jirovecii*, sont infectés par une même population fongique et qu'ils participent à un même réservoir humain.

En résumé, en raison de sa sensibilité, la méthode de typage reposant sur l'analyse des ITS reste une méthode efficiente pour caractériser *P.jirovecii* chez diverses populations, dont les patients colonisés qui présentent une faible charge pulmonaire. Ce volet de notre travail constituait une étape préalable indispensable à l'exploration de cas groupés d'infection à *P.jirovecii* impliquant des patients colonisés survenus dans notre CHU.

En effet, l'analyse des ITS1 et 2 a été plus informative que celle du locus DHPS puisque des génotypes sauvages ont été identifiés chez tous les patients. Toutefois, le choix de ce locus reste pertinent car la transmission potentielle de mutants ne pouvait être a priori écartée.

La plus grande fréquence de l'haplotype ITS Eg chez les transplantés représente une caractéristique particulière de la population fongique dans ce groupe et est compatible avec une source identique commune de *P.jirovecii*. Cette plus grande fréquence combinée avec l'identité des types chez les patients "source" et les patients susceptibles est compatible avec l'acquisition et la transmission nosocomiales de *P.jirovecii*. A notre connaissance, nous apportons les premières informations sur le rôle des patients colonisés dans la transmission de *P.jirovecii* dans un contexte d'infection nosocomiale. Ces résultats observés en pathologie humaine pour *P.jirovecii* concordent avec ceux obtenus expérimentalement pour *P.murina* chez la souris [60]. Notre hypothèse de transmission repose sur les résultats du typage, les critères stricts définissant les patients "source" et les patients susceptibles, ainsi que la présence de ceux-ci dans le service le même jour. En revanche, nous n'avons pas pu établir précisément que des contacts directs et rapprochés entre patients avaient eu lieu. Le rôle du personnel soignant en tant que source de *P.jirovecii* et relais de transmission entre patients n'a pas non plus été étudié puisque notre travail était rétrospectif.

Récemment, Choukri et al. ont détecté et quantifié par PCR l'ADN de *P.jirovecii* dans l'air environnant les patients développant une PPC [32]. La quantité amplifiée est inversement proportionnelle à la distance de prélèvement par rapport au patient [32]. Ces résultats sont compatibles avec l'exhalation de *P.jirovecii* par ces patients et sa diffusion dans leur environnement aérien proche [32]. Nous avons effectué le typage de *P.jirovecii* provenant des LBA de ces patients et des échantillons d'air correspondants. La concordance partielle ou complète des génotypes ITS et DHPS dans les couples "prélèvements d'air – LBA" a conforté cette hypothèse. Nous menons actuellement un travail similaire sur la diffusion aérienne de *P.jirovecii* par les patients colonisés en milieu hospitalier dans le cadre du projet Pneumair ("Caractérisation de l'excrétion et de la diffusion de *Pneumocystis* dans l'air et quantification

de l'exposition des patients et des personnels soignants en milieu hospitalier", Anses, 2011/1/053).

En somme, le rôle des patients développant une PPC comme celui des patients colonisés en tant que sources potentielles de *P.jirovecii* en milieu hospitalier, ne peut plus être occulté et des mesures de prévention des infections nosocomiales devraient être précisées. Les "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC) recommandent d'éviter qu'un patient développant une PPC ne partage sa chambre avec un patient immunodéprimé susceptible [226]. Cette mesure "a minima" devrait être étendue aux patients colonisés par le champignon. Toutefois, les données concernant la transmission de *Pneumocystis* sp. chez le modèle animal et chez l'homme sont désormais suffisantes pour recommander des mesures de prévention respiratoire de type précautions "gouttelettes" pour prévenir la transmission entre les patients développant une PPC, les soignants et les patients susceptibles. Les précautions "gouttelettes" visent à limiter la transmission d'agents infectieux par l'intermédiaire des sécrétions orotrachéo-bronchiques de taille supérieure à 5 µm qui sont projetées généralement sur des distances inférieures à 1 m, restent peu de temps en suspension dans l'air, et se déposent sur les muqueuses des patients contacts [222, 223, 226]. Les mesures à appliquer comprennent : i) l'isolement du patient infecté en chambre individuelle, ii) le port d'un masque chirurgical pour le personnel soignant et les visiteurs, iii) la limitation des déplacements du patient, iv) le port d'un masque chirurgical par le patient, s'il est amené à sortir de sa chambre [223, 226]. L'application des précautions "gouttelettes" dans le cadre de la PPC a été proposée par Rabodonirina et al. et la société française d'hygiène hospitalière dès 1997 [206, 223]. Ces recommandations sont encore peu appliquées et devraient être généralisées. Celles-ci ont été initialement proposées pour la prévention de la transmission de *P.jirovecii* à partir des patients développant une PPC. Elles devraient désormais prendre en compte les patients colonisés.

Au cours de l'étude de Choukri et al., de l'ADN de *P.jirovecii* a été détecté au-delà de la distance de 1 m par rapport aux patients développant une PPC [32]. Ceci pourrait être un argument pour recommander les précautions "air" qui concernent des microorganismes dont la transmission pourrait survenir même en dehors de contacts rapprochés. Les précautions respiratoires de type "air" ou "aérosol" visent à limiter la dissémination de particules de petite taille, généralement inférieure à 5 µm, ou de "droplet nuclei" (résidus de gouttelettes après évaporation) qui restent longtemps en suspension dans l'air, sont dispersées sur de longues distances et peuvent être inhalées à distance de la source [223, 226]. Les agents pathogènes transmis selon ce mode, dont l'exemple type est *Mycobacterium tuberculosis*, demeurent

infectieux à distance du patient lorsqu'ils sont en suspension dans l'air [223, 226]. Les mesures à appliquer comprennent : *i)* l'isolement du patient infecté en chambre individuelle maintenue si possible en pression négative ou au minimum maintenue porte fermée et aérée 10 minutes 3 à 4 fois par jour, *ii)* le port d'un appareil de protection respiratoire de type FFP pour le personnel soignant et les visiteurs, à mettre avant d'entrer dans la chambre et à enlever après être sorti de la chambre, *iii)* la limitation des déplacements du patient, *iv)* le port d'un masque chirurgical par le patient, s'il est amené à sortir de sa chambre [223, 226].

La possibilité que *Pneumocystis* sp. puisse s'aérosoliser n'a pas été démontrée. De même, le stade inhalé dans des conditions naturelles d'acquisition ou de transmission n'a pas été identifié. En conséquence, la taille de la particule transmise, que celle-ci provienne d'un aérosol du champignon ou d'une gouttelette contenant celui-ci, n'est pas connue. Pour ces raisons, la mise en place des précautions "air" plus contraignantes que les précautions "gouttelettes" reste discutable.

L'infectiosité de *P.jirovecii* à distance des patients ne peut être testée expérimentalement pour des raisons techniques mais aussi éthiques évidentes. L'infectiosité des espèces de *Pneumocystis* sp. à partir de l'air ne peut non plus être testée expérimentalement en l'absence de système de culture performant. En revanche, la détection d'ARNm spécifiques de *P.carinii* et *P.jirovecii* dans des prélèvements d'air de l'environnement proche de sujets développant une PPC est en faveur de la viabilité de ces deux espèces en situation transitoire dans l'air [126, 140, 141]. Le projet Pneumair prévoit de tester, selon le même principe, la viabilité de *P.jirovecii* dans des prélèvements d'air collectés à 1 m et 5 m de patients présentant une PPC. La durée de mise en œuvre des précautions "gouttelettes" n'a pas été définie pour la PPC par la société française d'hygiène hospitalière [223]. Pour d'autres micro-organismes concernés par ce mode de transmission, cette durée correspond en général à la période durant laquelle le risque de transmission persiste ou à la durée des symptômes cliniques. Elles sont par exemple maintenues jusqu'à 24h après le début d'un traitement efficace pour les infections à *Neisseria meningitidis*, jusqu'à négativation de la culture sur 2 prélèvements espacés de 24h pour la diphtérie, jusqu'à la guérison clinique pour l'infection à adénovirus ou pour la grippe [223, 226]. L'amélioration clinique au cours de la PPC est généralement observée 4 à 8 jours après la mise en place d'un traitement efficace [145]. La durée d'exhalation de *P.jirovecii* chez les patients infectés traités n'est pas connue. A notre connaissance, cette durée d'exhalation de *Pneumocystis* chez le sujet traité, la viabilité et l'infectiosité du microorganisme dans ce contexte n'ont pas encore été explorées chez les modèles animaux. En l'absence de ces

données, nous conseillons donc de maintenir les précautions "gouttelettes" jusqu'à 8 jours après la mise en place d'un traitement efficace chez le patient infecté.

Quoi qu'il en soit, si les mesures de prévention de la transmission nosocomiale sont proposées et discutées, la chimioprophylaxie reste primordiale pour la prévention individuelle de l'infection à *P.jirovecii* chez l'immunodéprimé.

Les modalités thérapeutiques de la PPC chez les patients immunodéprimés quelle que soit l'origine de l'immunodépression sont bien définies. Le traitement de première intention est l'association sulfamétoxazole-triméthoprime à la dose de 75 mg/kg/j-15mg/kg/j pendant trois semaines chez l'adulte [145, 280]. Les patients adultes sidéens bénéficient ensuite d'une chimioprophylaxie secondaire de la PPC par sulfamétoxazole-triméthoprime à la dose de 800 mg/j-160 mg/j ou par aérosols mensuels de pentamidine tant que leur immunodépression est caractérisée par un taux de lymphocytes CD4<sup>+</sup> sanguins inférieurs à 15% ou une valeur absolue inférieure à 200/mm<sup>3</sup> [109, 146, 280]. Un régime thérapeutique identique est proposé pour la chimioprophylaxie primaire chez les patients infectés par le VIH présentant cet état d'immunodépression [109, 280].

Les recommandations concernant la chimioprophylaxie de la PPC chez les patients immunodéprimés non infectés par le VIH qui ne représentent pas une population homogène sont moins précises. Elles varient en fonction des maladies sous-jacentes et des groupes d'experts (Tableau 2). La chimioprophylaxie de la PPC par sulfamétoxazole-triméthoprime de préférence, par des aérosols mensuels de pentamidine, ou par atovaquone utilisée hors AMM, est recommandée chez les patients : *i)* présentant une leucémie aiguë lymphoblastique [11, 76, 180], *ii)* ayant bénéficié d'une allogreffe de moelle osseuse [11, 28, 76], *iii)* traités par alemtuzumab [11], *iv)* traités par analogues des purines (fludarabine, cladribine) [11, 192], *v)* présentant un cancer solide et recevant une corticothérapie de plus d'un mois, à une dose supérieure à 20 mg/j [11, 180] ou traités par temozolomide et radiothérapie [11], *vi)* ayant bénéficié d'une autogreffe de moelle osseuse pour une hémopathie maligne [11, 28], *vii)* ayant bénéficié d'une autogreffe de moelle osseuse après une thérapie de conditionnement intense [11, 28], *viii)* ayant bénéficié d'une autogreffe de moelle osseuse et traités par fludarabine ou 2-chlorodeoxyadenosine [11, 28], *ix)* présentant un déficit immunitaire combiné sévère [6], *x)* transplantés d'organe [143]. En l'absence de consensus pour la prévention de la PPC chez les patients souffrant de connectivites, les pratiques varient en fonction des centres [30]. Certains auteurs recommandent l'instauration d'une prophylaxie chez les patients souffrant d'une granulomatose de Wegener [76, 194], et plus généralement chez les patients présentant une connectivité, lorsque ceux-ci sont traités par corticoïdes à une dose quotidienne supérieure à

15 mg pendant plus d'un mois et qu'ils présentent un taux de lymphocytes CD4<sup>+</sup> inférieur à 200/mm<sup>3</sup> [215, 233].

**Tableau 2.** Recommandations pour la chimioprophylaxie de la pneumonie à *Pneumocystis* chez les patients immunodéprimés non infectés par le VIH.

Maladie sous-jacente / Traitement immunosuppresseur	Durée de la prophylaxie	Références
Leucémie aiguë lymphoïde	Équivalente à la durée de la chimiothérapie	[11, 28, 76]
Allogreffe de moelle osseuse	≥6 mois après la greffe >6 mois en cas de thérapie immunosuppressive ou de maladie du greffon contre l'hôte	[11, 28, 76]
Alemtuzumab	≥2 mois après l'arrêt du traitement Taux de lymphocytes CD4 <sup>+</sup> <200/mm <sup>3</sup>	[11]
Analogues des purines (fludarabine, cladribine)	Taux de lymphocytes CD4 <sup>+</sup> <200/mm <sup>3</sup>	[11, 192]
Cancer solide <u>et</u> corticothérapie (>1 mois et ≥20 mg/j) ou temozolamide + radiothérapie	Équivalente à la durée de la lymphopénie	[11]
Autogreffe de moelle osseuse pour une leucémie ou un lymphome	6 mois post-greffe	[11, 28]
Autogreffe de moelle osseuse et traitement par fludarabine ou 2-chlorodeoxyadenosine	6 mois post-greffe	[11, 28]
Autogreffe de moelle osseuse avec une thérapie de conditionnement intense	6 mois post-greffe	[11, 28]
Déficit immunitaire combiné sévère		[6]
Connectivite traitée par corticothérapie (>1 mois, >15-20 mg/j)	Taux de lymphocytes CD4 <sup>+</sup> <200/mm <sup>3</sup>	[215, 233]
Transplantation d'organe (excepté rein)	≥6 à 12 mois post-greffe	[143]
Transplantation rénale	3 à 6 mois post-greffe 6 semaines à 4 mois en cas de rejet	[70, 120]

Les groupes d'experts américains et européens recommandent une prophylaxie par sulfamétoxazole-triméthoprime à la dose quotidienne de 800 mg-160 mg chez les patients transplantés de rein durant au minimum 4 mois [120] ou 3 à 6 mois [70] après la transplantation. Ces groupes recommandent une prophylaxie identique pendant 6 semaines [120] ou 4 mois [70] en cas de rejet. Le suivi des ces recommandations n'assure que partiellement la prévention de la PPC. En effet, les patients concernés par les cas groupés observés à Brest mais aussi dans d'autres centres en Europe, au Japon et en Australie ont majoritairement développé leur PPC bien au-delà des 6 mois post-greffe [9, 74, 202, 237, 278, 279]. Toutefois, il est difficile de maintenir la chimioprophylaxie pendant plusieurs années chez ces patients en raison de ses effets secondaires et toxiques, et du risque de sélection de souches mutantes potentiellement résistantes.

D'ores et déjà, le diagnostic de colonisation par *P.jirovecii* devrait être suivi de l'instauration au minimum d'une chimioprophylaxie. En effet, nous plaidons pour l'instauration d'un traitement spécifique dans la mesure où le champignon peut agir comme co-facteur de morbidité chez les patients colonisés, que la colonisation pourrait être prédictive de PPC, et que les patients colonisés peuvent représenter des sources infectieuses [169, 170]. Toutefois, il sera nécessaire de définir des critères cliniques, des marqueurs immunologiques et mycologiques fiables pour caractériser le risque de développer une PPC chez les patients immunodéprimés non infectés par le VIH, et de définir les modalités prophylactiques précises de l'infection chez ces patients.

## **Conclusion et perspectives**

La première partie de notre travail portait sur le dépistage et la caractérisation des populations infectées par *P.jirovecii*. Notre contribution reste modeste puisque nous n'avons pas dépisté de nouvelles populations infectées par le champignon. La faible prévalence de la colonisation pulmonaire par *P.jirovecii* observée à Brest chez les patients mucoviscidosiques est toutefois un résultat original. Ceci suggère que ces patients participeraient peu ou pas au réservoir humain de *P.jirovecii*. Ainsi, cette faible prévalence pourrait être la conséquence d'une faible circulation du *P.jirovecii* dans les communautés humaines dans notre région. Afin de conforter cette hypothèse, nous mènerons un second travail selon la même méthodologie à partir d'une population de patients mucoviscidosques suivis au CHU de Rennes. Selon cette même hypothèse, une faible prévalence de la colonisation pulmonaire par *P.jirovecii* chez d'autres patients connus comme susceptibles devrait aussi être observée. Dans le même but, nous analyserons de façon rétrospective les dossiers médicaux des patients brestois pour lesquels *P.jirovecii* a été détecté à l'aide de la PCR de routine depuis 2007, et identifierons les patients bronchopathes pour en déduire une prévalence de la colonisation dans cette population à risque.

Il sera nécessaire de caractériser d'autres populations à risque de développer une infection à *P.jirovecii*. La PPC chez les patients infectés par le VIH bénéficie d'un système de déclaration au niveau national via l'InVS. En revanche, il n'existe pas de système de déclaration de la PPC chez les autres patients immunodéprimés. Nous participons à une étude rétrospective coordonnée par un groupe d'étude national sur *Pneumocystis* dont le but est de recueillir des données fiables sur la prévalence globale de la PPC en France. Cette étude permettra d'identifier et de chiffrer de nouvelles populations à risque, par exemple celles traitées par de nouveaux immunosuppresseurs tels que les biothérapies.

L'amélioration des techniques de diagnostic de l'infection à *P.jirovecii* participe au dépistage et à la caractérisation des populations infectées. Nous avons montré que le dosage du β-1,3-D glucane sérique couplé à la détection de *P.jirovecii* dans les LBA par la microscopie et la PCR permettait de différencier la PPC et la colonisation. Nous développons à présent une nouvelle approche plus discriminante combinant une PCR quantitative et le dosage du β-1,3-D glucane sérique. Par ailleurs, les résultats du dosage du β-1,3-D glucane chez les nourrissons plaident en faveur de l'hypothèse que la primo-infection serait physiopathologiquement plus proche de la PPC que d'une colonisation pulmonaire, forme plus torpide de l'infection. Cette information devrait être diffusée plus largement auprès des pédiatres. S'il est probable que le dosage du β-1,3-D glucane sérique sera à terme utilisé pour

le diagnostic de routine des mycoses profondes, il restera un examen de seconde intention en ce qui concerne celui des infections à *P.jirovecii*. En effet, selon l'hypothèse qu'une concentration sérique de  $\beta$ -1,3-D glucane inférieure à 100 pg/mL écarterait le diagnostic de PPC, la détection du champignon par la microscopie et par PCR resterait indispensable pour dépister les patients colonisés.

La seconde partie de notre travail portait sur la caractérisation de *P.jirovecii* dans les populations infectées. Les résultats obtenus lors de l'analyse du locus DHPS de *P.jirovecii* chez les patients suivis à Brest ont montré que : *i)* le lieu habituel de résidence plutôt que le lieu de diagnostic de l'infection à *P.jirovecii* serait un facteur prédictif d'infection par un mutant, *ii)* *P.jirovecii* pourrait circuler en France d'une région à une autre via des voyageurs infectés, *iii)* la prévalence de mutants potentiellement résistants chez les patients vivant effectivement à Brest était de 0%. Cette faible prévalence de mutants observée à Brest pourrait être le reflet d'une faible prévalence de mutants dans notre région. Le travail mené à partir de patients suivis au CHU de Rennes à l'aide d'une méthode identique devrait étayer cette hypothèse. Cette hypothèse se positionne de façon logique avec celle évoquée plus haut, qui postule qu'une faible circulation du champignon dans les communautés humaines en Bretagne expliquerait la faible prévalence de *P.jirovecii* chez les patients mucoviscidosiques. L'analyse des séquences des ITS1 et 2 a permis de caractériser le champignon chez 56 patients non infectés par le VIH. Il s'agit de la plus importante population de patients non infectés par le VIH examinée en France jusqu'à présent. La comparaison des caractéristiques de *P.jirovecii* chez les patients colonisés et ceux présentant une PPC n'a pas conduit à des résultats originaux mais confirme ceux précédemment observés à partir d'un nombre limité de patients. Globalement, tous les patients seraient infectés par une même population fongique et participeraient à un même réservoir humain.

Nous travaillerons sur l'amélioration du pouvoir discriminant de notre méthode de typage basée sur le séquençage, par l'analyse combinée de plusieurs loci. En ce sens, une collaboration avec l'équipe du docteur Kovacs du "National Institute of Health" ([http://clinicalcenter.nih.gov/about/SeniorStaff/joseph\\_kovacs.html](http://clinicalcenter.nih.gov/about/SeniorStaff/joseph_kovacs.html)) a été instaurée. Toutefois, la technique actuelle, en raison de sa sensibilité, est efficiente pour caractériser *P.jirovecii* chez les patients colonisés. Ceci a été essentiel pour déterminer le rôle des patients colonisés dans la transmission du champignon en milieu hospitalier.

Nous avons effectué le typage de *P.jirovecii* provenant des LBA de patients présentant une PPC et des échantillons d'air correspondants. La concordance partielle ou complète des génotypes ITS et DHPS dans les couples "prélèvements d'air – LBA" est compatible avec

l'exhalation du champignon et sa diffusion aérienne dans l'environnement hospitalier. Nous menons actuellement un travail similaire sur la diffusion aérienne de *P.jirovecii* par les patients colonisés. Les résultats attendus devraient apporter des arguments supplémentaires pour étendre les mesures de prévention aux patients colonisés.

Selon les recommandations des CDC aux Etats-Unis, le partage des chambres des patients présentant une PPC avec des patients immunodéprimés susceptibles doit être évité [226]. Les recommandations de Rabodonirina et al. et de la société d'hygiène hospitalière en France comprennent la mise en place des précautions "gouttelettes" [206, 223]. Celles-ci sont encore peu appliquées et devraient pourtant désormais être étendues aux patients colonisés.

La durée de mise en œuvre de ces précautions est empirique. Elle devrait correspondre à la durée de l'excrétion du champignon dans l'environnement par les sujets infectés et traités. Cette durée d'excrétion devrait être évaluée au cours de futurs travaux comportant un volet expérimental basé sur un modèle animal et un volet médical basé sur des observations cliniques à l'hôpital. Les techniques de prélèvements, de détection, de quantification du champignon dans l'environnement des sujets infectés sont actuellement disponibles pour mener ces travaux.

Nous plaidons pour le traitement de tous les patients infectés y compris les patients colonisés et pour l'instauration d'une chimioprophylaxie au long cours chez les patients immunodéprimés non infectés par le VIH. Toutefois, l'instauration de ce traitement comme celle d'une chimioprophylaxie au long cours chez les patients immunodéprimés non infectés par le VIH, en particulier les transplantés de rein, relève au final d'une décision prise par les cliniciens. De futurs travaux devront être menés pour définir des marqueurs immunologiques et mycologiques fiables pour caractériser le risque de développer une PPC chez les patients immunodéprimés non infectés par le VIH, et pour aider les cliniciens à définir les modalités précises de la chimioprophylaxie à instaurer chez leurs patients.

Ce travail de thèse a porté sur le réservoir humain et sur la transmission nosocomiale de *P.jirovecii*. Au cours de ce travail mené durant 3 ans, nous avons acquis une expérience notable sur les techniques de biologie moléculaire. Au final, la mise en place au laboratoire de techniques diagnostiques performantes, destinées à l'amélioration de la prise en charge des patients à l'hôpital en a constitué les principales retombées pratiques.

## **Bibliographie**

1. **Achari A, Somers DO, Champness JN, Bryant PK, Rosemond J, Stammers DK.** Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. *Nat Struct Biol* 1997; **4**:490-497.
2. **Acosta J, Catalan M, del Palacio-Perez-Medel A, Lora D, Montejo JC, Cuetara MS, Moragues MD, Ponton J, del Palacio A.** A prospective comparison of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of pulmonary invasive aspergillosis in medical patients under intensive care: comparison with the diagnostic performance of galactomannan and of (1--> 3)-beta-D-glucan chromogenic assay in serum samples. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**:1053-1060.
3. **Acosta J, Catalan M, del Palacio-Perez-Medel A, Montejo JC, De-La-Cruz-Bertolo J, Moragues MD, Ponton J, Finkelman MA, del Palacio A.** Prospective study in critically ill non-neutropenic patients: diagnostic potential of (1,3)-beta-D-glucan assay and circulating galactomannan for the diagnosis of invasive fungal disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; **31**:721-731.
4. **Akamatsu N, Sugawara Y, Kaneko J, Tamura S, Makuchi M.** Preemptive treatment of fungal infection based on plasma (1 --> 3)beta-D-glucan levels after liver transplantation. *Infection* 2007; **35**:346-351.
5. **Alexander BD, Smith PB, Davis RD, Perfect JR, Reller LB.** The (1,3){beta}-D-glucan test as an aid to early diagnosis of invasive fungal infections following lung transplantation. *J Clin Microbiol* 2010; **48**:4083-4088.
6. **Allenspach E, Rawlings D, Scharenberg A.** X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR et al., eds *GeneReviews™* [en ligne]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 26/08/2003 [mis à jour le 24/01/2013]. Disponible sur : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1410/>
7. **Alvarez-Martinez MJ, Miro JM, Valls ME, Mas J, de la Bellacasa JP, Sued O, Sole M, Rivas PV, de Lazzari E, Benito N, Garcia F, Agusti C, Wilson PE, Gatell JM, Jimenez de Anta MT, Meshnick SR, Moreno A.** Prevalence of dihydropteroate synthase genotypes before and after the introduction of combined antiretroviral therapy and their influence on the outcome of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-1-infected patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; **68**:60-65.
8. **Anonymous.** Boletim epidemiologico-Aids e DST. Brasilia: Ministerio da Saude-Departamento de DST, Aids e Hepatitis virais; 2010. Disponible sur : [http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2011/50652/boletim\\_aids\\_2011\\_final\\_m\\_pdf\\_26659.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2011/50652/boletim_aids_2011_final_m_pdf_26659.pdf)
9. **Arichi N, Kishikawa H, Mitsui Y, Kato T, Nishimura K, Tachikawa R, Tomii K, Shiina H, Igawa M, Ichikawa Y.** Cluster outbreak of *Pneumocystis* pneumonia among kidney transplant patients within a single center. *Transplant Proc* 2009; **41**:170-172.

10. Armstrong W, Meshnick S, Kazanjian P. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in immunocompromised patients. *Microbes Infect* 2000; **2**:61-67.
11. Baden LR, Bensinger W, Angarone M, Casper C, Dubberke ER, Freifeld AG, Garzon R, Greene JN, Greer JP, Ito JI, Karp JE, Kaul DR, King E, Mackler E, Marr KA, Montoya JG, Morris-Engemann A, Pappas PG, Rolston K, Segal B, Seo SK, Swaminathan S, Naganuma M, Shead DA. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology-Prevention and treatment of cancer-related infections. National Comprehensive Cancer Network 2012; version 1.2012 [mis à jour le 18/09/2012]. Disponible sur <http://www.nccn.org/>
12. Badiee P, Alborzi A, Karimi M, Pourabbas B, Haddadi P, Mardaneh J, Moieni M. Diagnostic potential of nested PCR, galactomannan EIA, and beta-D-glucan for invasive aspergillosis in pediatric patients. *J Infect Dev Ctries* 2012; **6**:352-357.
13. Bartlett MS, Lee CH, Lu JJ, Bauer NL, Bettz JF, McLaughlin GL, Smith JW. *Pneumocystis carinii* detected in air. *J Eukaryot Microbiol* 1994; **41**:75S.
14. Bartlett MS, Vermund SH, Jacobs R, Durant PJ, Shaw MM, Smith JW, Tang X, Lu JJ, Li B, Jin S, Lee CH. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air samples: likely environmental risk to susceptible persons. *J Clin Microbiol* 1997; **35**:2511-2513.
15. Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, Roberts JM, Hightower AW, Bens MS, Freeman AR, Lee S, Stringer JR, Duchin JS, del Rio C, Rimland D, Baughman RP, Levy DA, Dietz VJ, Simon P, Navin TR. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis* 2000; **6**:265-272.
16. Beard CB, Roux P, Nevez G, Hauser PM, Kovacs JA, Unnasch TR, Lundgren B. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. *Emerg Infect Dis* 2004; **10**:1729-1735.
17. Bellis G, Cazes MH, Lemonnier L, Sponga M. Registre français de la mucoviscidose-Bilan des données 2010. Paris: Association Vaincre la mucoviscidose; 2012. Disponible sur : [http://www.vaincrelamuco.org/e\\_upload/pdf/rapport\\_registre\\_2010.pdf](http://www.vaincrelamuco.org/e_upload/pdf/rapport_registre_2010.pdf)
18. Beser J, Botero-Kleiven S, Lebbad M, Hagblom P, Fernandez V. A limited number of ITS haplotypes defines the diversity of *Pneumocystis jirovecii* strains in Sweden. *Infect Genet Evol* 2011; **11**:948-954.
19. Beser J, Dini L, Botero-Kleiven S, Krabbe M, Lindh J, Hagblom P. Absence of dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jirovecii* isolated from Swedish patients. *Med Mycol* 2012; **50**:320-323.

20. **Beser J, Hagblom P, Fernandez V.** Frequent in vitro recombination in internal transcribed spacers 1 and 2 during genotyping of *Pneumocystis jirovecii*. *J Clin Microbiol* 2007; **45**:881-886.
21. **Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE.** Sequence variation of the hydroxymethylidihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J Biochem* 1994; **224**:397-405.
22. **Buchacz K, Baker RK, Palella FJ, Jr., Chmiel JS, Lichtenstein KA, Novak RM, Wood KC, Brooks JT, Investigators H.** AIDS-defining opportunistic illnesses in US patients, 1994-2007: a cohort study. *AIDS* 2010; **24**:1549-1559.
23. **Calderon E, de la Horra C, Medrano FJ, Lopez-Suarez A, Montes-Cano MA, Respaldiza N, Elvira-Gonzalez J, Martin-Juan J, Bascunana A, Varela JM.** *Pneumocystis jiroveci* isolates with dihydropteroate synthase mutations in patients with chronic bronchitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; **23**:545-549.
24. **Calderon EJ, Regordan C, Medrano FJ, Ollero M, Varela JM.** *Pneumocystis carinii* infection in patients with chronic bronchial disease. *Lancet* 1996; **347**:977.
25. **Calderon EJ, Rivero L, Respaldiza N, Morilla R, Montes-Cano MA, Friaza V, Munoz-Lobato F, Varela JM, Medrano FJ, Horra Cde L.** Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jiroveci*. *Clin Infect Dis* 2007; **45**:e17-19.
26. **Casanova-Cardiel L, Leibowitz MJ.** Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. *J Eukaryot Microbiol* 1997; **44**:28S.
27. **Cazein F, Lot F, Pillonel J, Pinget R, Bousquet V, Le Strat Y, Le Vu S, Leclerc M, Benyelles L, Haguy H, Brunet S, Thierry D, Barin F, Semaille C.** Surveillance de l'infection à VIH-sida en France, 2009. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 2010; **45-46**: 467-472.
28. **Centers for Disease Control and Prevention, Infectious Disease Society of America, American Society of Blood and Marrow Transplantation.** Guidelines for Preventing Opportunistic Infections Among Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *MMWR Recomm Rep* 2000; **49**: 1-125.
29. **Centro Nacional de Epidemiología.** Epidemiological surveillance of AIDS in Spain. National AIDS case registry. Updated to 30 june 2010. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2010. Disponible sur : [http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/fd-sida/Registro\\_sida\\_junio2010\\_ENG\\_REV.pdf](http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/fd-sida/Registro_sida_junio2010_ENG_REV.pdf)
30. **Cettomai D, Gelber AC, Christopher-Stine L.** A survey of rheumatologists' practice for prescribing *Pneumocystis* prophylaxis. *J Rheumatol* 2010; **37**:792-799.

31. **Chabe M, Dei-Cas E, Creusy C, Fleurisse L, Respaldiza N, Camus D, Durand-Joly I.** Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: histological and rt-PCR data demonstrate active replication. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; **23**:89-97.
32. **Choukri F, Menotti J, Sarfati C, Lucet JC, Nevez G, Garin YJ, Derouin F, Totet A.** Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with Pneumocystis pneumonia. Clin Infect Dis 2010; **51**:259-265.
33. **COREVIH Bretagne.** Rapport d'activité 2011. Rennes: Coordination régionale de lutte contre l'infection due au VIH (France); 2012. Disponible sur: <http://www.corevih-bretagne.fr/presentation-du-corevih-bretagne/?p=86>.
34. **COREVIH Ile de France Centre.** Rapport d'activité 2010. Paris: Coordination régionale de lutte contre l'infection due au VIH (France); 2011. Disponible sur: [http://www.corevih-idfcentre.org/wp-content/uploads/Rapport\\_corevih\\_2011\\_oct.pdf](http://www.corevih-idfcentre.org/wp-content/uploads/Rapport_corevih_2011_oct.pdf)
35. **COREVIH Ile de France Est.** Rapport d'activité 2011. Paris: Coordination régionale de lutte contre l'infection due au VIH (France); 2012. Disponible sur: <http://www.corevihest.fr/userfiles/RA%202011.pdf>
36. **COREVIH Ile de France Nord.** Rapport d'activité 2010. Paris: Coordination régionale de lutte contre l'infection due au VIH (France); 2011. Disponible sur: [http://www.corevih-idfnord.fr/wp-content/uploads/2011/01/COREVIH.IDFN\\_Rapport.Activite.2010.pdf](http://www.corevih-idfnord.fr/wp-content/uploads/2011/01/COREVIH.IDFN_Rapport.Activite.2010.pdf)
37. **COREVIH Ile de France Ouest.** Rapport d'activité 2010. Boulogne-Billancourt: Coordination régionale de lutte contre l'infection due au VIH (France); 2011. Disponible sur: [http://www.corevihouest.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=52:rapport-dactivite-2010](http://www.corevihouest.org/index.php?option=com_content&view=article&id=52:rapport-dactivite-2010)
38. **COREVIH Ile de France Sud.** Rapport d'activité 2010. Créteil: Coordination régionale de lutte contre l'infection due au VIH; 2011. Available at: <http://www.corevih-sud.org/index.php/j-stuff-mainmenu-26/rapports-dactivites.html>
39. **Costa MC, Esteves F, Antunes F, Matos O.** Genetic characterization of the dihydrofolate reductase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portugal. J Antimicrob Chemother 2006; **58**:1246-1249.
40. **Costa MC, Helweg-Larsen J, Lundgren B, Antunes F, Matos O.** Mutations in the dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portuguese patients with *Pneumocystis* pneumonia. Int J Antimicrob Agents 2003; **22**:516-520.
41. **Crothers K, Beard CB, Turner J, Groner G, Fox M, Morris A, Eiser S, Huang L.** Severity and outcome of HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia containing

- Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations. AIDS 2005; **19**:801-805.
42. **Cuetara MS, Alhambra A, Chaves F, Moragues MD, Ponton J, del Palacio A.** Use of a serum (1-->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis and follow-up of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia. Clin Infect Dis 2008; **47**:1364-1366.
43. **Cuetara MS, Alhambra A, Moragues MD, Gonzalez-Elorza E, Ponton J, del Palacio A.** Detection of (1-->3)-beta-D-glucan as an adjunct to diagnosis in a mixed population with uncommon proven invasive fungal diseases or with an unusual clinical presentation. Clin Vaccine Immunol 2009; **16**:423-426.
44. **Cushion MT, Keely SP, Stringer JR.** Molecular and phenotypic description of *Pneumocystis wakefieldiae* sp. nov., a new species in rats. Mycologia 2004; **96**:429-438.
45. **Dallas WS, Gowen JE, Ray PH, Cox MJ, Dev IK.** Cloning, sequencing, and enhanced expression of the dihydropteroate synthase gene of *Escherichia coli* MC4100. J Bacteriol 1992; **174**:5961-5970.
46. **de Armas Y, Friaza V, Capo V, Durand-Joly I, Govin A, de la Horra C, Dei-Cas E, Calderon EJ.** Low genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* among Cuban population based on two-locus mitochondrial typing. Med Mycol 2012; **50**:417-420.
47. **de Boer MG, de Fijter JW, Kroon FP.** Outbreaks and clustering of *Pneumocystis* pneumonia in kidney transplant recipients: a systematic review. Med Mycol 2011; **49**:673-680.
48. **de Boer MG, Gelinck LB, van Zelst BD, van de Sande WW, Willems LN, van Dissel JT, de Jonge R, Kroon FP.** beta-D-glucan and S-adenosylmethionine serum levels for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-negative patients: a prospective study. J Infect 2011; **62**:93-100.
49. **De Vlieger G, Lagrou K, Maertens J, Verbeken E, Meersseman W, Van Wijngaerden E.** Beta-D-glucan detection as a diagnostic test for invasive aspergillosis in immunocompromised critically ill patients with symptoms of respiratory infection: an autopsy-based study. J Clin Microbiol 2011; **49**:3783-3787.
50. **Dei-Cas E, Aliouat EM, Caillez J.** Pneumocystis cellular structure. In: Walzer P, Cushion M (ed.), *Pneumocystis* pneumonia, 3rd ed, New York: Marcel Dekker; 2005: 61-94.
51. **Dei-Cas E, Chabe M, Moukhlis R, Durand-Joly I, Aliouat el M, Stringer JR, Cushion M, Noel C, de Hoog GS, Guillot J, Viscogliosi E.** *Pneumocystis oryctolagi* sp. nov., an uncultured fungus causing pneumonia in rabbits at weaning: review of current knowledge, and description of a new taxon on genotypic, phylogenetic and phenotypic bases. FEMS Microbiol Rev 2006; **30**:853-871.

52. **Del Bono V, Delfino E, Furfaro E, Mikulska M, Nicco E, Bruzzi P, Mularoni A, Bassetti M, Viscoli C.** Clinical performance of the (1,3)-beta-D-glucan assay in early diagnosis of nosocomial *Candida* bloodstream infections. Clin Vaccine Immunol 2011; **18**:2113-2117.
53. **Del Bono V, Mularoni A, Furfaro E, Delfino E, Rosasco L, Miletich F, Viscoli C.** Clinical evaluation of a (1,3)-beta-D-glucan assay for presumptive diagnosis of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in immunocompromised patients. Clin Vaccine Immunol 2009; **16**:1524-1526.
54. **Del Palacio A, Llenas-Garcia J, Soledad Cuetara M, Pulido F, Rubio R, Ponton J, Del Palacio-Perez-Medel A.** Serum (1-->3) beta-D-Glucan as a noninvasive adjunct marker for the diagnosis and follow-up of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in patients with HIV infection. Clin Infect Dis 2010; **50**:451-452; author reply 452-453.
55. **Delanoë P, Delanoë M.** Sur les rapports des kystes de Carini du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. C R Acad Sci (Paris) 1912; **155**:658-660.
56. **Delhaes L, Monchy S, Frealle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, Prevotat A, Wallet F, Wallaert B, Dei-Cas E, Sime-Ngando T, Chabe M, Viscogliosi E.** The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management. PLoS One 2012; **7**:e36313.
57. **Desmet S, Van Wijngaerden E, Maertens J, Verhaegen J, Verbeken E, De Munter P, Meersseman W, Van Meensel B, Van Eldere J, Lagrou K.** Serum (1-3)-beta-D-glucan as a tool for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection or hematological malignancy. J Clin Microbiol 2009; **47**:3871-3874.
58. **Dini L, du Plessis M, Frean J, Fernandez V.** High prevalence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* isolated from patients with *Pneumocystis* pneumonia in South Africa. J Clin Microbiol 2010; **48**:2016-2021.
59. **Diop-Santos L, Lacube P, Latouche S, Kac G, Mayaud C, Marteau M, Poirot JL, Maury E, Guillot J, Roux P.** Contribution of dihydropteroate synthase gene typing for *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis* epidemiology. J Eukaryot Microbiol 1999; **46**:133S-134S.
60. **Dumoulin A, Mazars E, Seguy N, Gargallo-Viola D, Vargas S, Cailliez JC, Aliouat EM, Wakefield AE, Dei-Cas E.** Transmission of *Pneumocystis carinii* disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; **19**:671-678.
61. **Durand-Joly I, Aliouat el M, Recourt C, Guyot K, Francois N, Wauquier M, Camus D, Dei-Cas E.** *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* is not infectious for SCID mice. J Clin Microbiol 2002; **40**:1862-1865.

62. **Durand-Joly I, Soula F, Chabe M, Dalle JH, Lafitte JJ, Senechal M, Pinon A, Camus D, Dei-Cas E.** Long-term colonization with *Pneumocystis jirovecii* in hospital staffs: a challenge to prevent nosocomial pneumocystosis. *J Eukaryot Microbiol* 2003; **50 Suppl**:614-615.
63. **Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML.** Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* 1988; **334**:519-522.
64. **Ellis M, Al-Ramadi B, Finkelman M, Hedstrom U, Kristensen J, Ali-Zadeh H, Klingspor L.** Assessment of the clinical utility of serial beta-D-glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. *J Med Microbiol* 2008; **57**:287-295.
65. **Eriksson OE.** *Pneumocystis carinii*, a parasite in lungs of mammals, referred to a new family and order (*Pneumocystidaceae*, *Pneumocystidales*, *Ascomycota*). *Systema Ascomycetum* 1994; **13**:165-180.
66. **Esteves F, Gaspar J, De Sousa B, Antunes F, Mansinho K, Matos O.** Clinical relevance of multiple single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: development of a multiplex PCR-single-base-extension methodology. *J Clin Microbiol* 2011; **49**:1810-1815.
67. **Esteves F, Gaspar J, Tavares A, Moser I, Antunes F, Mansinho K, Matos O.** Population structure of *Pneumocystis jirovecii* isolated from immunodeficiency virus-positive patients. *Infect Genet Evol* 2010; **10**:192-199.
68. **Esteves F, Montes-Cano MA, de la Horra C, Costa MC, Calderon EJ, Antunes F, Matos O.** *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**:356-362.
69. **European Centre for Disease Prevention and Control / WHO Regional Office for Europe.** HIV/AIDS surveillance in Europe 2009. Stockholm: European Center for Disease Prevention and Control; 2010. Disponible sur : [http://ec.europa.eu/health/sti\\_prevention/docs/ecdc\\_hiv\\_aids\\_surveillance\\_in\\_europe\\_2009\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/sti_prevention/docs/ecdc_hiv_aids_surveillance_in_europe_2009_en.pdf)
70. **Expert, Group on Renal transplantation.** European best practice guidelines for renal transplantation. Section IV: Long-term management of the transplant recipient. IV.7.1 Late infections. *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Nephrol Dial Transplant* 2002; **17 Suppl 4**: 36-39.
71. **Finkelman MA.** *Pneumocystis jirovecii* infection: Cell wall (1→3)- $\beta$ -D-glucan biology and diagnostic utility. *Crit Rev Microbiol* 2010; **36**: 271-281.
72. **Frenkel JK.** *Pneumocystis jiroveci* n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. *Natl Cancer Inst Monogr* 1976; **43**:13-30.

73. **Frenkel JK.** *Pneumocystis* pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview. J Eukaryot Microbiol 1999; **46**:89S-92S.
74. **Gianella S, Haeberli L, Joos B, Ledergerber B, Wuthrich RP, Weber R, Kuster H, Hauser PM, Fehr T, Mueller NJ.** Molecular evidence of interhuman transmission in an outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among renal transplant recipients. Transpl Infect Dis 2010; **12**:1-10.
75. **Gigliotti F, Harmsen AG, Haidaris CG, Haidaris PJ.** *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. Infect Immun 1993; **61**:2886-2890.
76. **Green H, Paul M, Vidal L, Leibovici L.** Prophylaxis for *Pneumocystis* pneumonia (PCP) in non-HIV immunocompromised patients. Cochrane Database Syst Rev 2007 10.1002/14651858.CD005590.pub2:CD005590.
77. **Guillot J, Demanche C, Hugot JP, Berthelemy M, Wakefield AE, Dei-Cas E, Chermette R.** Parallel phylogenies of *Pneumocystis* species and their mammalian hosts. J Eukaryot Microbiol 2001; Suppl:113S-115S.
78. **Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, Agarwal SK, Samantaray JC, Kumar L, Kabra SK, Luthra K, Sreenivas V.** Genotyping and phylogenetic analysis of *Pneumocystis jirovecii* isolates from India. Infect Genet Evol 2010; **10**:712-719.
79. **Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, Agarwal SK, Samantaray JC, Kumar L, Kabra SK, Luthra K, Sreenivas V, Iyer VK.** Genotypic variation of *Pneumocystis jirovecii* isolates in India based on sequence diversity at mitochondrial large subunit rRNA. Int J Med Microbiol 2011; **301**:267-272.
80. **Gutierrez S, Respaldiza N, Campano E, Martinez-Risque MT, Calderon EJ, De La Horra C.** *Pneumocystis jirovecii* colonization in chronic pulmonary disease. Parasite 2011; **18**:121-126.
81. **Hachem RY, Kontoyiannis DP, Chemaly RF, Jiang Y, Reitzel R, Raad I.** Utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1,3) beta-D-glucan in diagnosis of invasive fungal infections: low sensitivity for *Aspergillus fumigatus* infection in hematologic malignancy patients. J Clin Microbiol 2009; **47**:129-133.
82. **Hanson KE, Pfeiffer CD, Lease ED, Balch AH, Zaas AK, Perfect JR, Alexander BD.** beta-D-glucan surveillance with preemptive anidulafungin for invasive candidiasis in intensive care unit patients: a randomized pilot study. PLoS One 2012; **7**:e42282.
83. **Harrison F.** Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. Microbiology 2007; **153**:917-923.

84. **Haute Autorité de Santé.** Le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France : état des lieux et perspectives après 5 ans de fonctionnement; 2009. Disponible sur : [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-04/rapport\\_depistage\\_neonatal\\_systematique\\_de\\_la\\_mucoviscidose\\_en\\_france.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-04/rapport_depistage_neonatal_systematique_de_la_mucoviscidose_en_france.pdf)
85. **Hauser PM.** The development of a typing method for an uncultivable microorganism: the example of *Pneumocystis jirovecii*. Infect Genet Evol 2004; **4**:199-203.
86. **Hauser PM, Blanc DS, Sudre P, Senggen Manoloff E, Nahimana A, Bille J, Weber R, Francioli P.** Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* in HIV-positive and -negative patients as revealed by PCR-SSCP typing. AIDS 2001; **15**:461-466.
87. **Hauser PM, Francioli P, Bille J, Telenti A, Blanc DS.** Typing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* by single-strand conformation polymorphism of four genomic regions. J Clin Microbiol 1997; **35**:3086-3091.
88. **Hauser PM, Nahimana A, Taffe P, Weber R, Francioli P, Bille J, Rabodonirina M.** Interhuman transmission as a potential key parameter for geographical variation in the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutations. Clin Infect Dis 2010; **51**:e28-33.
89. **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**:595-602.
90. **Helweg-Larsen J.** *Pneumocystis jiroveci*. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. Dan Med Bull 2004; **51**:251-273.
91. **Helweg-Larsen J, Benfield TL, Eugen-Olsen J, Lundgren JD, Lundgren B.** Effects of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS-associated *P. carinii* pneumonia. Lancet 1999; **354**:1347-1351.
92. **Helweg-Larsen J, Eugen-Olsen J, Lundgren B.** Rapid detection of dihydropteroate polymorphism in AIDS-related *Pneumocystis carinii* pneumonia by restriction fragment length polymorphism. Scand J Infect Dis 2000; **32**:481-483.
93. **Helweg-Larsen J, Lee CH, Jin S, Hsueh JY, Benfield TL, Hansen J, Lundgren JD, Lundgren B.** Clinical correlation of variations in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes in *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis*. AIDS 2001; **15**:451-459.
94. **Hernandez-Hernandez F, Frealle E, Caneiro P, Salleron J, Durand-Joly I, Accoceberry I, Bouchara JP, Wallaert B, Dei-Cas E, Delhaes L.** Prospective Multicenter Study of *Pneumocystis jirovecii* Colonization among Cystic Fibrosis Patients in France. J Clin Microbiol 2012; **50**:4107-4110.

95. Heyland D, Jiang X, Day AG, Laverdiere M. Serum beta-d-glucan of critically ill patients with suspected ventilator-associated pneumonia: preliminary observations. J Crit Care 2011; **26**:536.e1-9.
96. Hocker B, Wendt C, Nahimana A, Tonshoff B, Hauser PM. Molecular evidence of *Pneumocystis* transmission in pediatric transplant unit. Emerg Infect Dis 2005; **11**:330-332.
97. Hoover DR, Graham NM, Bacellar H, Schrager LK, Kaslow R, Visscher B, Murphy R, Anderson R, Saah A. Epidemiologic patterns of upper respiratory illness and *Pneumocystis carinii* pneumonia in homosexual men. Am Rev Respir Dis 1991; **144**:756-759.
98. Hosoya N, Takahashi T, Wada M, Endo T, Nakamura T, Sakashita H, Kimura K, Ohnishi K, Nakamura Y, Mizuochi T, Iwamoto A. Genotyping of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. Microbiol Immunol 2000; **44**:591-596.
99. Huang L, Beard CB, Creasman J, Levy D, Duchin JS, Lee S, Pieniazek N, Carter JL, del Rio C, Rimland D, Navin TR. Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. J Infect Dis 2000; **182**:1192-1198.
100. Huang L, Crothers K, Atzori C, Benfield T, Miller R, Rabodonirina M, Helweg-Larsen J. Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis* and sulfa resistance. Emerg Infect Dis 2004; **10**:1721-1728.
101. Huang L, Friedly J, Morris AM, Carter JL, Turner JR, Merrifield C, Navin TR, Beard CB. *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase genotypes in HIV-infected persons residing in San Francisco: possible implications for disease transmission. J Eukaryot Microbiol 2001; **Suppl**:137S-138S.
102. Hughes WT. Natural mode of acquisition for de novo infection with *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis 1982; **145**:842-848.
103. Hughes WT. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Seminars in Pediatric Infectious Diseases 2001; **12**:309-314.
104. Hughes WT. *Pneumocystis* pneumonitis in non-HIV-infected patients. In: Walzer PD, Cushion MT (ed.), *Pneumocystis* pneumonia, 3rd ed, New York: Marcel Dekker; 2005: 407-434.
105. Iliades P, Meshnick SR, Macreadie IG. Dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jiroveci* can affect sulfamethoxazole resistance in a *Saccharomyces cerevisiae* model. Antimicrob Agents Chemother 2004; **48**:2617-2623.

106. **Iliades P, Meshnick SR, Macreadie IG.** Mutations in the *Pneumocystis jirovecii* DHPS gene confer cross-resistance to sulfa drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**:741-748.
107. **Iliades P, Walker DJ, Castelli L, Satchell J, Meshnick SR, Macreadie IG.** Cloning of the *Pneumocystis jirovecii* trifunctional FAS gene and complementation of its DHPS activity in *Escherichia coli*. *Fungal Genet Biol* 2004; **41**:1053-1062.
108. **Institut de Veille Sanitaire.** Infection à VIH et sida, Base de données sida. [http://www.invs.sante.fr/surveillance/vih-sida/bdd\\_sida/index.htm](http://www.invs.sante.fr/surveillance/vih-sida/bdd_sida/index.htm).
109. **Kaplan JE, Masur H, Holmes KK, Usphs, Infectious Disease Society of A.** Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons--2002. Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep* 2002; **51**:1-52.
110. **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**:39-49.
111. **Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME.** beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2011; **52**:750-770.
112. **Kato K, Onoda S, Asano J, Fukaya S, Yoshida S.** Evaluation of the clinical cutoff level of serum (1 → 3)-beta-D-glucan in patients with connective tissue diseases complicated by deep fungal infections. *Mod Rheumatol* 2010; **20**:366-369.
113. **Kawagishi N, Miyagi S, Satoh K, Akamatsu Y, Sekiguchi S, Satomi S.** Usefulness of beta-D glucan in diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia and monitoring its treatment in a living-donor liver-transplant recipient. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007; **14**:308-311.
114. **Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, Motokura T, Hirai H, Ogawa S.** Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1→3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 2004; **42**:2733-2741.
115. **Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA, Burman W, Richardson J, Lee CH, Crane L, Katz J, Meshnick SR.** *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *J Infect Dis* 2000; **182**:551-557.
116. **Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, Lane BR, Bartlett MS, Smith JW, Cannon M, Meshnick SR.** *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. *AIDS* 1998; **12**:873-878.

117. Kazanjian PH, Fisk D, Armstrong W, Shulin Q, Liwei H, Ke Z, Meshnick S. Increase in prevalence of *Pneumocystis carinii* mutations in patients with AIDS and *P. carinii* pneumonia, in the United States and China. J Infect Dis 2004; **189**:1684-1687.
118. Keely SP, Fischer JM, Cushion MT, Stringer JR. Phylogenetic identification of *Pneumocystis murina* sp. nov., a new species in laboratory mice. Microbiology 2004; **150**:1153-1165.
119. Keely SP, Stringer JR, Baughman RP, Linke MJ, Walzer PD, Smulian AG. Genetic variation among *Pneumocystis carinii hominis* isolates in recurrent pneumocystosis. J Infect Dis 1995; **172**:595-598.
120. Kidney Disease: Improving Global Outcomes Transplant Work G. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. Am J Transplant 2009; **9 Suppl 3**:S1-155.
121. Koo S, Bryar JM, Page JH, Baden LR, Marty FM. Diagnostic performance of the (1-->3)-beta-D-glucan assay for invasive fungal disease. Clin Infect Dis 2009; **49**:1650-1659.
122. Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, Meshnick SR. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis 1997; **175**:482-485.
123. Latouche S, Lacube P, Maury E, Bolognini J, Develoux M, Girard PM, Godet C, Lebrette MG, Mayaud C, Guillot J, Roux P. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in French patients with pneumocystosis: a 1998-2001 prospective study. Med Mycol 2003; **41**:533-537.
124. Latouche S, Ortona E, Mazars E, Margutti P, Tamburini E, Siracusano A, Guyot K, Nigou M, Roux P. Biodiversity of *Pneumocystis carinii hominis*: typing with different DNA regions. J Clin Microbiol 1997; **35**:383-387.
125. Latouche S, Poirot JL, Bernard C, Roux P. Study of internal transcribed spacer and mitochondrial large-subunit genes of *Pneumocystis carinii hominis* isolated by repeated bronchoalveolar lavage from human immunodeficiency virus-infected patients during one or several episodes of pneumonia. J Clin Microbiol 1997; **35**:1687-1690.
126. Latouche S, Totet A, Lacube P, Bolognini J, Nevez G, Roux P. Development of an RT-PCR on the heat shock protein 70 gene for viability detection of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in patients with pneumocystosis and in air sample. J Eukaryot Microbiol 2001; **Suppl**:176S-177S.
127. Lee CH, Helweg-Larsen J, Tang X, Jin S, Li B, Bartlett MS, Lu JJ, Lundgren B, Lundgren JD, Olsson M, Lucas SB, Roux P, Cargnel A, Atzori C, Matos O, Smith JW. Update on *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* typing based on nucleotide

- sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. J Clin Microbiol 1998; **36**:734-741.
128. **Lee CH, Lu JJ, Bartlett MS, Durkin MM, Liu TH, Wang J, Jiang B, Smith JW.** Nucleotide sequence variation in *Pneumocystis carinii* strains that infect humans. J Clin Microbiol 1993; **31**:754-757.
129. **Leigh TR, Kangro HO, Gazzard BG, Jeffries DJ, Collins JV.** DNA amplification by the polymerase chain reaction to detect sub-clinical *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-positive and HIV-negative male homosexuals with and without respiratory symptoms. Respir Med 1993; **87**:525-529.
130. **Li K, He A, Cai WP, Tang XP, Zheng XY, Li ZY, Zhan XM.** Absence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations among samples from a group of AIDS patients in China. Scand J Infect Dis 2009; **41**:152-154.
131. **Li K, He A, Cai WP, Tang XP, Zheng XY, Li ZY, Zhan XM.** Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Chinese HIV-infected patients based on nucleotide sequence variations in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. Med Mycol 2013; **51**:108-112.
132. **Limper AH.** Interactions of *Pneumocystis* with alveolar macrophages and epithelial cells. In: Walzer PD, Cushion MT (ed.), *Pneumocystis pneumonia*, 3rd ed, New York: Marcel Dekker; 2005: 205-228.
133. **Lot F, Pillonel J, Pinget R, Cazein F, Bernillon P, Leclerc M, Benyelles L, Da Costa C, Semaille C.** Les pathologies inaugurales de sida, France, 2003-2010. Bull Epidemiol Hebd 2011;**43-44**: 454-458.
134. **Lu JJ, Bartlett MS, Shaw MM, Queener SF, Smith JW, Ortiz-Rivera M, Leibowitz MJ, Lee CH.** Typing of *Pneumocystis carinii* strains that infect humans based on nucleotide sequence variations of internal transcribed spacers of rRNA genes. J Clin Microbiol 1994; **32**:2904-2912.
135. **Lubis N, Baylis D, Short A, Stebbing J, Teague A, Portsmouth S, Bower M, Nelson M, Gazzard B.** Prospective cohort study showing changes in the monthly incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Postgrad Med J 2003; **79**:164-166.
136. **Ma L, Borio L, Masur H, Kovacs JA.** *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim-sulfamethoxazole or dapsone use. J Infect Dis 1999; **180**:1969-1978.
137. **Ma L, Kovacs JA, Cargnel A, Valerio A, Fantoni G, Atzori C.** Mutations in the dihydropteroate synthase gene of human-derived *Pneumocystis carinii* isolates from Italy are infrequent but correlate with prior sulfa prophylaxis. J Infect Dis 2002; **185**:1530-1532.

138. **Ma L, Kutty G, Jia Q, Imamichi H, Huang L, Atzori C, Beckers P, Groner G, Beard CB, Kovacs JA.** Analysis of variation in tandem repeats in the intron of the major surface glycoprotein expression site of the human form of *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 2002; **186**:1647-1654.
139. **Magne D, Angoulvant A, Botterel F, Bouges-Michel C, Bougnoux ME, Bouree P, Chochillon C, Cornet M, Dannaoui E, Fekkar A, Galeazzi G, Yera H, Sarfati C, Roux P.** Pneumocystosis: a network survey in the Paris area 2003-2008. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; **30**:673-675.
140. **Maher N, Vermund S, Lasbury M, Lee C, Bartlett M, Unnasch TR.** Development and evaluation of a molecular viability assay for *Pneumocystis carinii*. *J Clin Microbiol* 2000; **38**:1947-1952.
141. **Maher NH, Vermund SH, Welsh DA, Dillon HK, Awooda A, Unnasch TR.** Development and characterization of a molecular viability assay for *Pneumocystis carinii* f sp *hominis*. *J Infect Dis* 2001; **183**:1825-1827.
142. **Marins JR, Jamal LF, Chen SY, Barros MB, Hudes ES, Barbosa AA, Chequer P, Teixeira PR, Hearst N.** Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *AIDS* 2003; **17**:1675-1682.
143. **Martin SI, Fishman JA.** *Pneumocystis* pneumonia in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; **9 Suppl 4**:S227-233.
144. **Marty FM, Koo S, Bryar J, Baden LR.** (1->3)beta-D-glucan assay positivity in patients with *Pneumocystis (carinii) jiroveci* pneumonia. *Ann Intern Med* 2007; **147**:70-72.
145. **Masur H.** Prevention and treatment of *Pneumocystis* pneumonia. *N Engl J Med* 1992; **327**:1853-1860.
146. **Masur H, Ognibene FP, Yarchoan R, Shelhamer JH, Baird BF, Travis W, Suffredini AF, Deyton L, Kovacs JA, Falloon J, et al.** CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* 1989; **111**:223-231.
147. **Matos O, Esteves F.** Epidemiology and clinical relevance of *Pneumocystis jirovecii* Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations. *Parasite* 2010; **17**:219-232.
148. **Matos O, Lee CH, Jin S, Li B, Costa MC, Goncalves L, Antunes F.** *Pneumocystis jiroveci* in Portuguese immunocompromised patients: association of specific ITS genotypes with treatment failure, bad clinical outcome and childhood. *Infect Genet Evol* 2003; **3**:281-285.
149. **Matsumoto Y, Matsuda S, Tegoshi T.** Yeast glucan in the cyst wall of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 1989; **36**:21S-22S.

150. **Matsumura Y, Ito Y, Iinuma Y, Yasuma K, Yamamoto M, Matsushima A, Nagao M, Takakura S, Ichiyama S.** 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**:591-597.
151. **Matsumura Y, Shindo Y, Iinuma Y, Yamamoto M, Shirano M, Matsushima A, Nagao M, Ito Y, Takakura S, Hasegawa Y, Ichiyama S.** Clinical characteristics of *Pneumocystis* pneumonia in non-HIV patients and prognostic factors including microbiological genotypes. BMC Infect Dis 2011; **11**:76.
152. **Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gasch A, Perez-Lozano MJ, Varela JM, Calderon EJ.** *Pneumocystis jirovecii* in general population. Emerg Infect Dis 2005; **11**:245-250.
153. **Mei Q, Gurunathan S, Masur H, Kovacs JA.** Failure of co-trimoxazole in *Pneumocystis carinii* infection and mutations in dihydropteroate synthase gene. Lancet 1998; **351**:1631-1632.
154. **Melian L, Develoux M, Marteau-Miltgen M, Magne D, Barbu V, Poirot JL, Roux P.** Real time quantitative PCR assay for *Pneumocystis jirovecii* detection. J Eukaryot Microbiol 2003; **50 Suppl**:651.
155. **Meneau I, Sanglard D, Bille J, Hauser PM.** *Pneumocystis jiroveci* dihydropteroate synthase polymorphisms confer resistance to sulfadoxine and sulfanilamide in *Saccharomyces cerevisiae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; **48**:2610-2616.
156. **Metan G, Koc AN, Atalay A, Kaynar LG, Ozturk A, Alp E, Eser B.** What should be the optimal cut-off of serum 1,3-beta-D-glucan for the detection of invasive pulmonary aspergillosis in patients with haematological malignancies? Scand J Infect Dis 2012; **44**:330-336.
157. **Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE.** *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. J Clin Microbiol 2001; **39**:3877-3882.
158. **Miller RF, Grant AD, Foley NM.** Seasonal variation in presentation of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Lancet 1992; **339**:747-748.
159. **Miller RF, Lindley AR, Ambrose HE, Malin AS, Wakefield AE.** Genotypes of *Pneumocystis jiroveci* isolates obtained in Harare, Zimbabwe, and London, United Kingdom. Antimicrob Agents Chemother 2003; **47**:3979-3981.
160. **Miller RF, Lindley AR, Copas A, Ambrose HE, Davies RJ, Wakefield AE.** Genotypic variation in *Pneumocystis jirovecii* isolates in Britain. Thorax 2005; **60**:679-682.

161. **Miller RF, Wakefield AE.** *Pneumocystis carinii* genotypes and severity of pneumonia. Lancet 1999; **353**:2039-2040.
162. **Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, Tanaka K, Ishikawa N, Hara K.** Plasma (1-->3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. J Clin Microbiol 1995; **33**:3115-3118.
163. **Mokaddas E, Burhamah MH, Khan ZU, Ahmad S.** Levels of (1-->3)-beta-D-glucan, *Candida* mannan and *Candida* DNA in serum samples of pediatric cancer patients colonized with *Candida* species. BMC Infect Dis 2010; **10**:292.
164. **Mokaddas E, Khan ZU, Ahmad S, Nampoory MR, Burhamah M.** Value of (1-3)-beta-d-glucan, *Candida* mannan and *Candida* DNA detection in the diagnosis of candidaemia. Clin Microbiol Infect 2011; **17**:1549-1553.
165. **Montagna MT, Lovero G, De Giglio O, Iatta R, Caggiano G, Montagna O, Laforgia N, Group AP.** Invasive fungal infections in neonatal intensive care units of Southern Italy: a multicentre regional active surveillance (AURORA project). J Prev Med Hyg 2010; **51**:125-130.
166. **Montes-Cano MA, de la Horra C, Martin-Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N, Medrano FJ, Calderon EJ.** *Pneumocystis jiroveci* genotypes in the Spanish population. Clin Infect Dis 2004; **39**:123-128.
167. **Mori T, Ikemoto H, Matsumura M, Yoshida M, Inada K, Endo S, Ito A, Watanabe S, Yamaguchi H, Mitsuya M, Kodama M, Tani T, Yokota T, Kobayashi T, Kambayashi J, Nakamura T, Masaoka T, Teshima H, Yoshimaga T, Kohno S, Hara K, Miyazaki S.** Evaluation of plasma (1-->3)-beta-D-glucan measurement by the kinetic turbidimetric Limulus test, for the clinical diagnosis of mycotic infections. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1997; **35**:553-560.
168. **Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, Huang L, Beard CB, Kaplan JE.** Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. Emerg Infect Dis 2004; **10**:1713-1720.
169. **Morris A, Norris KA.** Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. Clin Microbiol Rev 2012; **25**:297-317.
170. **Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L.** Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. J Infect Dis 2008; **197**:10-17.
171. **Moukhlis R, Boyer J, Lacube P, Bolognini J, Roux P, Hennequin C.** Linking *Pneumocystis jiroveci* sulfamethoxazole resistance to the alleles of the DHPS gene using functional complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. Clin Microbiol Infect 2010; **16**:501-507.

172. **Mularoni A, Furfaro E, Faraci M, Franceschi A, Mezzano P, Bandettini R, Viscoli C, Castagnola E.** High Levels of beta-D-glucan in immunocompromised children with proven invasive fungal disease. *Clin Vaccine Immunol* 2010; **17**:882-883.
173. **Munoz C, Zuluaga A, Restrepo A, Tobon A, Cano LE, Gonzalez A.** Molecular diagnosis and detection of *Pneumocystis jirovecii* DHPS and DHFR genotypes in respiratory specimens from Colombian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; **72**:204-213.
174. **Nahimana A, Rabodonirina M, Bille J, Francioli P, Hauser PM.** Mutations of *Pneumocystis jirovecii* dihydrofolate reductase associated with failure of prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**:4301-4305.
175. **Nahimana A, Rabodonirina M, Helweg-Larsen J, Meneau I, Francioli P, Bille J, Hauser PM.** Sulfa resistance and dihydropteroate synthase mutants in recurrent *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Emerg Infect Dis* 2003; **9**:864-867.
176. **Nahimana A, Rabodonirina M, Zanetti G, Meneau I, Francioli P, Bille J, Hauser PM.** Association between a specific *Pneumocystis jiroveci* dihydropteroate synthase mutation and failure of pyrimethamine/sulfadoxine prophylaxis in human immunodeficiency virus-positive and -negative patients. *J Infect Dis* 2003; **188**:1017-1023.
177. **Nakamura H, Tateyama M, Tasato D, Haranaga S, Yara S, Higa F, Ohtsuki Y, Fujita J.** Clinical utility of serum beta-D-glucan and KL-6 levels in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Intern Med* 2009; **48**:195-202.
178. **Nakamura T, Morita T, Iwanaga S.** Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in Limulus hemocytes. Isolation and characterization. *Eur J Biochem* 1986; **154**:511-521.
179. **Navin TR, Beard CB, Huang L, del Rio C, Lee S, Pieniazek NJ, Carter JL, Le T, Hightower A, Rimland D.** Effect of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of *P. carinii* pneumonia in patients with HIV-1: a prospective study. *Lancet* 2001; **358**:545-549.
180. **Neumann S, Krause SW, Maschmeyer G, Schiel X, von Lilienfeld-Toal M.** Primary prophylaxis of bacterial infections and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with hematological malignancies and solid tumors : guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol* 2013; **92**:433-442.
181. **Nevez G, Chabe M, Rabodonirina M, Virmaux M, Dei-Cas E, Hauser PM, Totet A.** Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* infections. *Parasite* 2008; **15**:359-365.

182. **Nevez G, Jounieaux V, Totet A.** *Pneumocystis jirovecii*, not *Pneumocystis jiroveci*. Chest 2006; e-letter, 6 March
183. **Nevez G, Magois E, Duwat H, Gouilleux V, Jounieaux V, Totet A.** Apparent absence of *Pneumocystis jirovecii* in healthy subjects. Clin Infect Dis 2006; **42**:e99-101.
184. **Nevez G, Raccourt C, Jounieaux V, Dei-Cas E, Mazars E.** Pneumocystosis versus pulmonary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients. AIDS 1999; **13**:535-536.
185. **Nevez G, Totet A, Jounieaux V, Schmit JL, Dei-Cas E, Raccourt C.** *Pneumocystis jiroveci* internal transcribed spacer types in patients colonized by the fungus and in patients with pneumocystosis from the same French geographic region. J Clin Microbiol 2003; **41**:181-186.
186. **Nevez G, Totet A, Pautard JC, Raccourt C.** *Pneumocystis carinii* detection using nested-PCR in nasopharyngeal aspirates of immunocompetent infants with bronchiolitis. J Eukaryot Microbiol 2001; **Suppl**:122S-123S.
187. **Ng VL, Yajko DM, Hadley WK.** Extrapulmonary pneumocystosis. Clin Microbiol Rev 1997; **10**:401-418.
188. **Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, Salomoni MA, Hao B, Press EG, Shields RM, Cheng S, Mitsani D, Vadnerkar A, Silveira FP, Kleiboeker SB, Clancy CJ.** Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, beta-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. Clin Infect Dis 2012; **54**:1240-1248.
189. **Nimri LF, Moura IN, Huang L, del Rio C, Rimland D, Duchin JS, Dotson EM, Beard CB.** Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* based on variations in nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes. J Clin Microbiol 2002; **40**:1146-1151.
190. **Obayashi T, Negishi K, Suzuki T, Funata N.** Reappraisal of the serum (1-->3)-beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections--a study based on autopsy cases from 6 years. Clin Infect Dis 2008; **46**:1864-1870.
191. **Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A, Iwasaki H, Teshima H, Kohno S, Horiuchi A, Ito A, et al.** Plasma (1-->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet 1995; **345**:17-20.
192. **Obeid KM, Aguilar J, Szpunar S, Sharma M, del Busto R, Al-Katib A, Johnson LB.** Risk factors for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with lymphoproliferative disorders. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2012; **12**:66-69.

193. **Odabasi Z, Mattuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ketchum PA, Finkelman MA, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L.** Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; **39**:199-205.
194. **Ognibene FP, Shelhamer JH, Hoffman GS, Kerr GS, Reda D, Fauci AS, Leavitt RY.** *Pneumocystis carinii* pneumonia: a major complication of immunosuppressive therapy in patients with Wegener's granulomatosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; **151**:795-799.
195. **Olsson M, Lidman C, Latouche S, Bjorkman A, Roux P, Linder E, Wahlgren M.** Identification of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* gene sequences in filtered air in hospital environments. *J Clin Microbiol* 1998; **36**:1737-1740.
196. **Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Morinobu A, Nishimura K, Kumagai S.** Diagnostic accuracy of serum 1,3-beta-D-glucan for *Pneumocystis jiroveci* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2012; **50**:7-15.
197. **Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, Ketchum PA, Wingard J, Schiff R, Tamura H, Finkelman MA, Rex JH.** Multicenter clinical evaluation of the (1-->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* 2005; **41**:654-659.
198. **Pazos C, Ponton J, Del Palacio A.** Contribution of (1->3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol* 2005; **43**:299-305.
199. **Pederiva MA, Wissmann G, Friaza V, Morilla R, de La Horra C, Montes-Cano MA, Goldani LZ, Calderon EJ, Prolla JC.** High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. *Med Mycol* 2012; **50**:556-560.
200. **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**:1009-1013.
201. **Peterson JC, Cushion MT.** *Pneumocystis*: not just pneumonia. *Curr Opin Microbiol* 2005; **8**:393-398.
202. **Phipps LM, Chen SC, Kable K, Halliday CL, Firacative C, Meyer W, Wong G, Nankivell BJ.** Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: lessons from a cluster in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2011; **92**:1327-1334.

203. **Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL.** Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2005; **43**:5957-5962.
204. **Posteraro B, De Pascale G, Tumbarello M, Torelli R, Pennisi MA, Bello G, Maviglia R, Fadda G, Sanguinetti M, Antonelli M.** Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1-->3)-beta-D-glucan assay, Candida score, and colonization index. *Crit Care* 2011; **15**:R249.
205. **Presterl E, Parschalk B, Bauer E, Lassnigg A, Hajdu S, Graninger W.** Invasive fungal infections and (1,3)-beta-D-glucan serum concentrations in long-term intensive care patients. *Int J Infect Dis* 2009; **13**:707-712.
206. **Rabodonirina M, Pariset C, Fabry J.** Connaissances actuelles sur l'épidémiologie de la pneumocystose et propositions pour une limitation du risque de transmission nosocomiale. *Hygiènes* 1997; **5**:260-262.
207. **Rabodonirina M, Vanhems P, Couray-Targe S, Gillibert RP, Ganne C, Nizard N, Colin C, Fabry J, Touraine JL, van Melle G, Nahimana A, Francioli P, Hauser PM.** Molecular evidence of interhuman transmission of *Pneumocystis* pneumonia among renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. *Emerg Infect Dis* 2004; **10**:1766-1773.
208. **Redhead SA, Cushion MT, Frenkel JK, Stringer JR.** *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. *J Eukaryot Microbiol* 2006; **53**:2-11.
209. **Réseau National de Santé Publique.** Surveillance du SIDA en France. *Bull Epidemiol Hebd* 1996; **10**:45-52.
210. **Respaldiza N, Montes-Cano MA, Dapena FJ, de la Horra C, Mateos I, Medrano FJ, Calderon E, Varela JM.** Prevalence of colonisation and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11**:1012-1015.
211. **Ripamonti C, Orenstein A, Kutty G, Huang L, Schuhegger R, Sing A, Fantoni G, Atzori C, Vinton C, Huber C, Conville PS, Kovacs JA.** Restriction fragment length polymorphism typing demonstrates substantial diversity among *Pneumocystis jirovecii* isolates. *J Infect Dis* 2009; **200**:1616-1622.
212. **Roberts FJ, Chalkley LJ, Weyer K, Goussard P, Liebowitz LD.** Dihydropteroate synthase and novel dihydrofolate reductase gene mutations in strains of *Pneumocystis jirovecii* from South Africa. *J Clin Microbiol* 2005; **43**:1443-1444.
213. **Roberts FJ, Liebowitz LD, Chalkley LJ.** Genotyping and coalescent phylogenetic analysis of *Pneumocystis jirovecii* from South Africa. *J Clin Microbiol* 2004; **42**:1505-1510.

214. **Robberts FJ, Liebowitz LD, Chalkley LJ.** Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jiroveci*: evaluation of 9 assays. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; **58**:385-392.
215. **Rodriguez M, Fishman JA.** Prevention of infection due to *Pneumocystis* spp. in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev 2004; **17**:770-782, table of contents.
216. **Sassi M, Ripamonti C, Mueller NJ, Yazaki H, Kutty G, Ma L, Huber C, Gogineni E, Oka S, Goto N, Fehr T, Gianella S, Konrad R, Sing A, Kovacs JA.** Outbreaks of *Pneumocystis* pneumonia in 2 renal transplant centers linked to a single strain of *Pneumocystis*: implications for transmission and virulence. Clin Infect Dis 2012; **54**:1437-1444.
217. **Sax PE, Komarow L, Finkelman MA, Grant PM, Andersen J, Scully E, Powderly WG, Zolopa AR.** Blood (1->3)-beta-D-glucan as a diagnostic test for HIV-related *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Clin Infect Dis 2011; **53**:197-202.
218. **Schmoldt S, Schuhegger R, Wendler T, Huber I, Sollner H, Hogardt M, Arbogast H, Heesemann J, Bader L, Sing A.** Molecular evidence of nosocomial *Pneumocystis jirovecii* transmission among 16 patients after kidney transplantation. J Clin Microbiol 2008; **46**:966-971.
219. **Scotet V, Gillet D, Dugueperoux I, Audrezet MP, Bellis G, Garnier B, Roussey M, Rault G, Parent P, De Braekeleer M, Ferec C.** Spatial and temporal distribution of cystic fibrosis and of its mutations in Brittany, France: a retrospective study from 1960. Hum Genet 2002; **111**:247-254.
220. **Senn L, Robinson JO, Schmidt S, Knaup M, Asahi N, Satomura S, Matsuura S, Duvoisin B, Bille J, Calandra T, Marchetti O.** 1,3-Beta-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. Clin Infect Dis 2008; **46**:878-885.
221. **Sepkowitz KA.** Opportunistic infections in patients with and patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome. Clin Infect Dis 2002; **34**:1098-1107.
222. **SFHH (Société Française d'Hygiène Hospitalière).** Surveiller et prévenir les infections liées aux soins. Hygiènes 2010; **18**:1-175.. Surveiller et prévenir les infections liées aux soins 2010.
223. **SFHH (Société Française d'Hygiène Hospitalière), Comité Technique National des Infections Nosocomiales.** Recommandations d'isolement septique dans les établissements de santé: Ministère de l'Emploi et de la Solidarité, Secrétariat d'Etat à la Santé; 1998. Disponible sur : <http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/isolement.pdf>

224. Shimizu A, Oka H, Matsuda T, Ozaki S. (1-->3)-beta-D glucan is a diagnostic and negative prognostic marker for *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with connective tissue disease. Clin Exp Rheumatol 2005; **23**:678-680.
225. Shimizu Y, Sunaga N, Dobashi K, Fueki M, Fueki N, Makino S, Mori M. Serum markers in interstitial pneumonia with and without *Pneumocystis jirovecii* colonization: a prospective study. BMC Infect Dis 2009; **9**:47.
226. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. Am J Infect Control 2007; **35**:S65-164.
227. Sing A, Geiger AM, Hogardt M, Heesemann J. *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. J Clin Microbiol 2001; **39**:2717-2718.
228. Sing A, Roggenkamp A, Autenrieth IB, Heesemann J. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. J Clin Microbiol 1999; **37**:3409-3410.
229. Sing A, Schmoldt S, Laubender RP, Heesemann J, Sing D, Wildner M. Seasonal variation of *Pneumocystis jirovecii* infection: analysis of underlying climatic factors. Clin Microbiol Infect 2009; **15**:957-960.
230. Siripattanapipong S, Leelayoova S, Mungthin M, Worapong J, Tan-Ariya P. Study of DHPS and DHFR genes of *Pneumocystis jirovecii* in Thai HIV-infected patients. Med Mycol 2008; **46**:389-392.
231. Siripattanapipong S, Worapong J, Mungthin M, Leelayoova S, Tan-ariya P. Genotypic study of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-positive patients in Thailand. J Clin Microbiol 2005; **43**:2104-2110.
232. Soulez B, Palluault F, Cesbron JY, Dei-Cas E, Capron A, Camus D. Introduction of *Pneumocystis carinii* in a colony of SCID mice. J Protozool 1991; **38**:123S-125S.
233. Sowden E, Carmichael AJ. Autoimmune inflammatory disorders, systemic corticosteroids and *Pneumocystis* pneumonia: a strategy for prevention. BMC Infect Dis 2004; **4**:42.
234. Stringer JR, Beard CB, Miller RF. Spelling *Pneumocystis jirovecii*. Emerg Infect Dis 2009; **15**:506.
235. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. Emerg Infect Dis 2002; **8**:891-896.

236. **Stringer SL, Hudson K, Blase MA, Walzer PD, Cushion MT, Stringer JR.** Sequence from ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* compared to those of four fungi suggests an ascomycetous affinity. *J Protozool* 1989; **36**:14S-16S.
237. **Struijk GH, Gijsen AF, Yong SL, Zwinderman AH, Geerlings SE, Lettinga KD, van Donselaar-van der Pant KA, Ten Berge IJ, Bemelman FJ.** Risk of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in patients long after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2011; **26**:3391-3398.
238. **Takahashi T, Endo T, Nakamura T, Sakashita H, Kimurat K, Ohnishit K, Kitamura Y, Iwamoto A.** Dihydrofolate reductase gene polymorphisms in *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in Japan. *J Med Microbiol* 2002; **51**:510-515.
239. **Takahashi T, Hosoya N, Endo T, Nakamura T, Sakashita H, Kimura K, Ohnishi K, Nakamura Y, Iwamoto A.** Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan and resistance to sulfonamide therapy. *J Clin Microbiol* 2000; **38**:3161-3164.
240. **Tasaka S, Tokuda H.** *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. *J Infect Chemother* 2012; **18**:793-806.
241. **Taylor SM, Meshnick SR, Worodria W, Andama A, Cattamanchi A, Davis JL, Yoo SD, Byanyima P, Kaswabuli S, Goodman CD, Huang L, International HIVaOPS.** Low prevalence of *Pneumocystis pneumonia* (PCP) but high prevalence of *Pneumocystis* dihydropteroate synthase (dhps) gene mutations in HIV-infected persons in Uganda. *PLoS One* 2012; **7**:e49991.
242. **Taylor SM, Meshnick SR, Worodria W, Andama A, Davis JL, Cattamanchi A, den Boon S, Yoo SD, Goodman CD, Huang L.** Low prevalence of *Pneumocystis jirovecii* lung colonization in Ugandan HIV-infected patients hospitalized with non-*Pneumocystis* pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; **72**:139-143.
243. **Thompson GR, 3rd, Bays DJ, Johnson SM, Cohen SH, Pappagianis D, Finkelman MA.** Serum (1->3)-beta-D-glucan measurement in coccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 2012; **50**:3060-3062.
244. **Tiley SM, Marriott DJ, Harkness JL.** An evaluation of four methods for the detection of *Pneumocystis carinii* in clinical specimens. *Pathology* 1994; **26**:325-328.
245. **Totet A.** Impact épidémiologique de l'infection à *Pneumocystis jirovecii* chez le nourrisson, apport des études moléculaires. Université de Picardie Jules Verne, Amiens; 2004, 207p.
246. **Totet A, Gresillon K, Matos O, Lundgren B, Larsen HH, Roux P, Hauser P, Racourt C, Nevez G.** *Pneumocystis jirovecii* genotypes in European patients with

- chronic obstructive pulmonary diseases. J Eukaryot Microbiol 2006; **53 Suppl 1**:S102-103.
247. **Totet A, Latouche S, Lacube P, Pautard JC, Jounieaux V, Raccourt C, Roux P, Nevez G.** *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in immunocompetent infants and immunosuppressed adults, Amiens, France. Emerg Infect Dis 2004; **10**:667-673.
248. **Totet A, Meliani L, Lacube P, Pautard JC, Raccourt C, Roux P, Nevez G.** Immunocompetent infants as a human reservoir for *Pneumocystis jirovecii*: rapid screening by non-invasive sampling and real-time PCR at the mitochondrial large subunit rRNA gene. J Eukaryot Microbiol 2003; **50 Suppl**:668-669.
249. **Totet A, Pautard JC, Raccourt C, Roux P, Nevez G.** Genotypes at the internal transcribed spacers of the nuclear rRNA operon of *Pneumocystis jiroveci* in nonimmunosuppressed infants without severe pneumonia. J Clin Microbiol 2003; **41**:1173-1180.
250. **Totet A, Respaldiza N, Pautard JC, Raccourt C, Nevez G.** *Pneumocystis jiroveci* genotypes and primary infection. Clin Infect Dis 2003; **36**:1340-1342.
251. **Triglia T, Cowman AF.** Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; **91**:7149-7153.
252. **Triglia T, Menting JG, Wilson C, Cowman AF.** Mutations in dihydropteroate synthetase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; **94**:13944-13949.
253. **Tsolaki AG, Beckers P, Wakefield AE.** Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*: high genotype similarity with contemporary isolates. J Clin Microbiol 1998; **36**:90-93.
254. **Tsolaki AG, Miller RF, Underwood AP, Banerji S, Wakefield AE.** Genetic diversity at the internal transcribed spacer regions of the rRNA operon among isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia. J Infect Dis 1996; **174**:141-156.
255. **Tsolaki AG, Miller RF, Wakefield AE.** Oropharyngeal samples for genotyping and monitoring response to treatment in AIDS patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. J Med Microbiol 1999; **48**:897-905.
256. **Tyagi AK, Mirdha BR, Guleria R, Mohan A, Luthra K, Singh UB.** Study of dihydropteroate synthase (DHPS) gene mutations among isolates of *Pneumocystis jiroveci*. Indian J Med Res 2008; **128**:734-739.

257. **Tyagi AK, Mirdha BR, Luthra K, Guleria R, Mohan A, Singh UB, Samantaray JC, Dar L, Iyer VK, Chaudhry R.** Dihydropteroate synthase (DHPS) gene mutation study in HIV-Infected Indian patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. J Infect Dev Ctries 2010; **4**:761-766.
258. **Tyagi AK, Mirdha BR, Luthra K, Guleria R, Mohan A, Singh UB, Samantaray JC, Dar L, Iyer VK, Sreenivas V.** *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase (DHPS) genotypes in non-HIV-immunocompromised patients: a tertiary care reference health centre study. Med Mycol 2011; **49**:167-171.
259. **Valerio A, Tronconi E, Mazza F, Fantoni G, Atzori C, Tartarone F, Duca P, Cargnel A.** Genotyping of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in Italian AIDS patients. Clinical outcome is influenced by dihydropteroate synthase and not by internal transcribed spacer genotype. J Acquir Immune Defic Syndr 2007; **45**:521-528.
260. **van Hal SJ, Gilgado F, Doyle T, Barratt J, Stark D, Meyer W, Harkness J.** Clinical significance and phylogenetic relationship of novel Australian *Pneumocystis jirovecii* genotypes. J Clin Microbiol 2009; **47**:1818-1823.
261. **van Oosterhout JJ, Laufer MK, Perez MA, Graham SM, Chimbiya N, Thesing PC, Alvarez-Martinez MJ, Wilson PE, Chagomerana M, Zijlstra EE, Taylor TE, Plowe CV, Meshnick SR.** *Pneumocystis* pneumonia in HIV-positive adults, Malawi. Emerg Infect Dis 2007; **13**:325-328.
262. **Vanhems P, Hirschel B, Morabia A.** Seasonal incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Lancet 1992; **339**:1182.
263. **Varela JM, Regordan C, Medrano FJ, Respaldiza N, de La Horra C, Montes-Cano MA, Calderon EJ.** Climatic factors and *Pneumocystis jiroveci* infection in southern Spain. Clin Microbiol Infect 2004; **10**:770-772.
264. **Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, Ulloa AV, Ponce CA, Cabrera CE, Cumisille F, Gigliotti F.** Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. Clin Infect Dis 2001; **32**:855-861.
265. **Vargas SL, Pizarro P, Lopez-Vieyra M, Neira-Aviles P, Bustamante R, Ponce CA.** *Pneumocystis* colonization in older adults and diagnostic yield of single versus paired noninvasive respiratory sampling. Clin Infect Dis 2010; **50**:e19-21.
266. **Vargas SL, Ponce CA, Gigliotti F, Ulloa AV, Prieto S, Munoz MP, Hughes WT.** Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. J Clin Microbiol 2000; **38**:1536-1538.
267. **Vargas SL, Ponce CA, Sanchez CA, Ulloa AV, Bustamante R, Juarez G.** Pregnancy and asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci*. Emerg Infect Dis 2003; **9**:605-606.

268. **Vedantam G, Nichols BP.** Characterization of a mutationally altered dihydropteroate synthase contributing to sulfathiazole resistance in *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist* 1998; **4**:91-97.
269. **Visconti E, Ortona E, Mencarini P, Margutti P, Marinaci S, Zolfo M, Siracusano A, Tamburri E.** Mutations in dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis carinii* in HIV patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 2001; **18**:547-551.
270. **Volpe F, Ballantine SP, Delves CJ.** The multifunctional folic acid synthesis fas gene of *Pneumocystis carinii* encodes dihydroneopterin aldolase, hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase and dihydropteroate synthase. *Eur J Biochem* 1993; **216**:449-458.
271. **Wakefield AE.** DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J Clin Microbiol* 1996; **34**:1754-1759.
272. **Wakefield AE.** Genetic heterogeneity in *Pneumocystis carinii*: an introduction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; **22**:5-13.
273. **Wakefield AE, Fritscher CC, Malin AS, Gwanzura L, Hughes WT, Miller RF.** Genetic diversity in human-derived *Pneumocystis carinii* isolates from four geographical locations shown by analysis of mitochondrial rRNA gene sequences. *J Clin Microbiol* 1994; **32**:2959-2961.
274. **Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, Hopkin JM.** Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 1990; **336**:451-453.
275. **Walzer PD, Cushion MT.** *Pneumocystis* pneumonia. New York: Marcel Dekker; 2005.
276. **Watanabe T, Yasuoka A, Tanuma J, Yazaki H, Honda H, Tsukada K, Honda M, Gatanaga H, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S.** Serum (1-->3) beta-D-glucan as a noninvasive adjunct marker for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 2009; **49**:1128-1131.
277. **Wissmann G, Alvarez-Martinez MJ, Meshnick SR, Dihel AR, Prolla JC.** Absence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian AIDS patients. *J Eukaryot Microbiol* 2006; **53**:305-307.
278. **Wynckel A, Toucas D, Noel N, Toupance O, Rieu P.** Outbreak of *Pneumocystis* pneumonia occurring in late post-transplantation period. *Nephrol Dial Transplant* 2011; **26**:2417; author reply 2418.

279. **Yazaki H, Goto N, Uchida K, Kobayashi T, Gatanaga H, Oka S.** Outbreak of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in renal transplant recipients: *P. jiroveci* is contagious to the susceptible host. *Transplantation* 2009; **88**:380-385.
280. **Yéni P.** Rapport 2010 sur la prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH. Recommandations du groupe d'experts. Ministère de la santé et des sports; 2010: 417p.
281. **Zhao L, Wang Y, Zhou Y, Li B, Chen J, Xue H, Tang J.** Prospective fungal antigen testing in high-risk pediatric patients. *J Clin Pediatr* 2010; **28**:1-6.

## **Annexes**

## Annexe 1

### Principaux travaux portant sur la fréquence des mutants DHPS de *Pneumocystis jirovecii* publiés jusqu'en 2012.

Auteurs de l'étude [référence]	Pays	Période de l'étude	Nb et caractéristiques des patients	Nombre de mutants (%)	Nb patients infectés par mutants/ Nb patients exposés aux sulfamides	Nb patients infectés par mutants/Nb patients non exposés aux sulfamides	Association prophylaxie par sulfamides et mutants DHPS *	Lien entre mutants et échec thérapeutique	Lien entre mutants et décès
Kazanjian et al. 1998 [116]	Etats-Unis	1976-1997	20 patients VIH+ 7 patients immunodéprimés VIH-	7 (26%)	5/7 (71%)	2/20 (10%)	p=0,0032	ND	ND
Ma et al. 1999 [136]	Etats-Unis	1985-1998	26 patients VIH+ 6 patients immunodéprimés VIH- 3 patients à statut inconnu	18 (51%)	11/16 (69%)	3/15 (20%)	p=0,011	ND	Non
Helweg-Larsen et al. 1999 [91]	Danemark	1989-1999	144 patients VIH+ (152 prélevements)	31 (20%)	18/29 (62%)	13/123 (11%)	p<0,0001	Non	Oui
Diop Santos et al. 1999 [59]	France (Paris)	1993-1998	14 patients à statut inconnu (30 prélevements)	12 (40%)	5/5 (100%)	3/12 (25%)	p<0,01	ND	ND
Huang et al. 2000 [99]	Etats-Unis	1996-1999	111 patients VIH+	76 (68,5%)	57/71 (80%)	19/40 (48%)	p<0,001	ND	ND
Takahashi et al. 2000 [239]	Japon	1994-1999	16 patients VIH+ 8 patients immunodéprimés VIH-	6 (25%)	ND	ND	ND	Oui	ND
Kazanjian et al. 2000 [115]	Etats-Unis	1991-1999	97 patients VIH+	42 (43%)	28/37 (76%)	14/60 (23%)	p<0,001	Oui	Non
Beard et al. 2000 [15]	Etats-Unis	1995-1998	220 patients VIH+	152 (69%)	ND	ND	ND	ND	ND
Navin et al. 2001 [179]	Etats-Unis	1995-1999	136 patients VIH+	97 (71%)	ND	ND	ND	Non	Non

Notes : Nb, nombre ; ND, données non disponibles; VIH+, infecté par le VIH; VIH-, non infecté par le VIH

\* Analyse statistique des fréquences des mutants chez les patients exposés et non exposés aux sulfamides

Auteurs de l'étude [référence]	Pays	Période de l'étude	Nb et caractéristiques des patients	Nombre de mutants (%)	Nb patients infectés par mutants/ Nb patients exposés aux sulfamides	Nb patients infectés par mutants/Nb patients non exposés aux sulfamides	Association prophylaxie par sulfamides et mutants DHPS *	Lien entre mutants et échec thérapeutique	Lien entre mutants et décès
<b>Visconti et al. 2001 [269]</b>	Italie	1992-1997	18 patients VIH+ (20 prélèvements)	7/20 (35%)	4/5 (80%)	3/15 (20%)	p=0,031	Non	ND
<b>Ma et al. 2002 [137]</b>	Italie	1994-2001	107 patients VIH+	9 (8%)	6/31 (19,4%)	3/76 (4%)	p=0,017	Non	Non
<b>Nahimana et al. 2003 [176]</b>	France (Lyon)	1993-1996	120 patients VIH+ 38 patients immunodéprimés VIH-	57 (36%)	16/20 (80%)	41/138 (30%)	p<0,001	ND	Non
<b>Costa et al. 2003 [40]</b>	Portugal	1994-2001	83 patients VIH+ 6 patients VIH-	24 (27%)	6/17 (35,5%)	18/72 (25%)	p=0,39	ND	ND
<b>Miller et al. 2003 [159]</b>	Royaume-Uni	1992-1993 2000-2001	25 patients VIH+ 12 patients VIH+	9 (36%) 2 (16,5%)	5/9 (36%) 0/0	4/16 (25%) 2/12 (17%)	p<0,01 ND	ND	ND
<b>Miller et al. 2003 [159]</b>	Zimbabwe	1992-1993	14 patients VIH+	1 (7%)	0/0	1/14 (7,1%)	ND	ND	ND
<b>Latouche et al. 2003 [123]</b>	France	1998-2001	83 patients VIH+ 7 patients VIH- 2 patients avec statut VIH inconnu	16 (17%)	2/15 (13,3%)	12/73 (16,4%)	p=0,55	Non	Non
<b>Totet et al. 2004 [247]</b>	France (Amiens)	1996-2001	33 enfants immunocompétents avec une primo-infection 4 adultes immunodéprimés VIH- 9 adultes VIH+	4 (8,7%)	0/0	4/58 (7%)	ND	ND	ND
<b>Kazanjian et al. 2004 [117]</b>	Etats-Unis	1983-2001	145 patients VIH+	58 (40%)	38/56 (68%)	20/89 (22%)	ND	ND	ND
<b>Kazanjian et al. 2004 [117]</b>	Chine	1998-2001	15 patients VIH+	1(7%)	0/0	1/15	ND	ND	ND
<b>Montes-Cano et al. 2004 [166]</b>	Espagne	2001-2003	11 patients VIH+ 20 patients avec une affection respiratoire chronique	11 (35%)	ND	ND	ND	ND	ND

Notes : Nb, nombre ; ND, données non disponibles; VIH+, infecté par le VIH; VIH-, non infecté par le VIH

\* Analyse statistique des fréquences des mutants chez les patients exposés et non exposés aux sulfamides

Auteurs de l'étude [référence]	Pays	Période de l'étude	Nb et caractéristiques des patients	Nombre de mutants (%)	Nb patients infectés par mutants/ Nb patients exposés aux sulfamides	Nb patients infectés par mutants/Nb patients non exposés aux sulfamides	Association prophylaxie par sulfamides et mutants DHPS *	Lien entre mutants et échec thérapeutique	Lien entre mutants et décès
<b>Calderon et al. 2004 [23]</b>	Espagne	2001-2002	8 patients immunocompétents atteints de bronchite chronique 6 patients VIH+	4/14 (28,5%)	0/0	4/14 (28,5%)	ND	ND	ND
<b>Crothers et al. 2005 [41]</b>	Etats-Unis	1997-2002	215 patients VIH+	175 (81%)	65/72 (90%)	110/143 (77%)	p=0,021	Non	Non
<b>Robberts et al. 2005 [212]</b>	Afrique du sud	2000-2003	53 patients au statut VIH inconnu	2 (3,8%)	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Wissmann et al. 2006 [277]</b>	Brésil	1997-2004	57 patients VIH+	0	0/5	0/52	ND	ND	ND
<b>Valerio et al. 2007 [259]</b>	Italie	1994-2004	154 patients VIH+ 48 adultes VIH+	14 (9%)	4/38 (10,5%)	10/116 (8,6%)	p=0,74	Oui	Oui
<b>Esteves et al. 2008 [68]</b>	Portugal	2001-2004	4 enfants immunodéprimés VIH- (55 prélèvements)	4 (7%)	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Esteves et al. 2008 [68]</b>	Espagne	2001-2004	34 patients VIH- avec une affection respiratoire chronique 19 patients VIH+	8/36 (22%)	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Tyagi et al. 2008 [256]</b>	Inde	2006	4 patients VIH+	0	0/0	0/4	ND	ND	ND
<b>Siripattanapipong et al. 2008 [230]</b>	Thaïlande	1997-2003	17 patients VIH+	2 (11,7%)	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Van Hal et al. 2009 [260]</b>	Australie	2001-2007	7 patients immunodéprimés VIH- 53 patients VIH+	8 (13%)	2/8 (25%)	6/52 (12%)	ND	ND	Non
<b>Li et al. 2009 [130]</b>	Chine	2007-2008	10 patients VIH+	0	0/0	0/10	ND	ND	ND
<b>Alvarez-Martinez et al. 2010 [7]</b>	Espagne	1989-1995 2001-2004	43 patients VIH+ 55 patients VIH+	14 (33%) 3 (5,5%)	10/28 (36%)	7/70 (10%)	ND	ND	Non
<b>Dini et al. 2010 [58]</b>	Afrique du sud	2006-2007	151 patients avec statut VIH inconnu	81 (56%)	ND	ND	ND	ND	ND

Notes : Nb, nombre ; ND, données non disponibles; VIH+, infecté par le VIH; VIH-, non infecté par le VIH

\* Analyse statistique des fréquences des mutants chez les patients exposés et non exposés aux sulfamides

Auteurs de l'étude [référence]	Pays	Période de l'étude	Nb et caractéristiques des patients	Nombre de mutants (%)	Nb patients infectés par mutants/ Nb patients exposés aux sulfamides	Nb patients infectés par mutants/Nb patients non exposés aux sulfamides	Association prophylaxie par sulfamides et mutants DHPS *	Lien entre mutants et échec thérapeutique	Lien entre mutants et décès
<b>Hauser et al. 2010 [88]</b>	Suisse	1990-2000	200 patients VIH+ et patients immunodéprimés VIH-	15 (7,5%)	8/14 (57%)	4/133 (0,75%)	oui	ND	ND
<b>Hauser et al. 2010 [88]</b>	France (Lyon)	1993-1997	194 patients VIH+ et patients immunodéprimés VIH-	64 (33%)	16/20 (80%)	41/138 (30%)	oui	ND	ND
<b>Esteves et al. 2010 [67]</b>	Portugal	2001-2007	67 patients VIH+	6/67 (9%)	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Tyagi et al. 2010 [257]</b>	Inde	2006-2009	16 patients VIH+	1/16 (6,2%)	0/3	1/13 (7,7%)	ND	ND	ND
<b>Tyagi et al. 2011 [258]</b>	Inde	2006-2009	24 patients immunodéprimés VIH-	1 (4%)	0/0	1/24	ND	ND	ND
328 prélèvements provenant de patients immunodéprimés VIH+ et VIH-									
<b>Magne et al. 2011 [139]</b>	France (Paris)	2003-2008	103 patients immunodéprimés (17% VIH+)	0	ND	ND	Non	ND	Non
<b>Beser et al. 2012 [19]</b>	Suède	1996-2003	13 patients VIH+	13 (100%)	11/11	2/2	ND	ND	ND
<b>Taylor et al. 2012 [241]</b>	Ouganda	2007-2008	45 prélèvements de patients VIH+ et VIH-	3 (6,6%)	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Munoz et al. 2012 [173]</b>	Colombie	2004-2005							

Notes : Nb, nombre ; ND, données non disponibles; VIH+, infecté par le VIH; VIH-, non infecté par le VIH

\* Analyse statistique des fréquences des mutants chez les patients exposés et non exposés aux sulfamides

## Annexe 2

**Score défini par Tsolaki et al. pour identifier les allèles ITS 1 [253].**

Allèles	Position des nucléotides				
	ITS 1	2	16	74-75	111-113
A <sub>2</sub>	C		T	—	TTA
A <sub>3</sub>	T		A	—	TTA
B <sub>1</sub>	T		T	AG	TTA
B <sub>2</sub>	T		A	AG	TTA
B <sub>3</sub>	C		T	AG	TTA
C	T		T	AG	—

— : délétion

**Score défini par Tsolaki et al. pour identifier les allèles ITS 2 [253].**

Allèles	Position des nucléotides						
	ITS 2	54-56	63	67-71	122	169-172	176
a <sub>1</sub>	TAA	—		AATAT	—	—	G
a <sub>2</sub>	TAA	—		AATAA	—	—	G
a <sub>3</sub>	TAA	—		AATAA	—	—	A
a <sub>4</sub>	TAA	—		AATAT	—	—	A
b <sub>1</sub>	TAA	—		AATAT	—	—AT	G
b <sub>2</sub>	TAA	—		AATAT	C	—AT	G
c <sub>1</sub>	—	A	----	—	—	—	A
c <sub>2</sub>	—	A	----	—	—	—	G
d	TAA	—		AATAT	—	ATAT	G

— : délétion

### Annexe 3

Score défini par Lee et al. [127] pour l'identification des allèles ITS1 et allèles décrits depuis la publication princeps.

Allèles ITS1	Positions des nucléotides											Publication	Numéro d'accession GenBank
	6	12	15	21	23-24	28	34	42	53-54	80-81	115-118		
A <sup>1</sup>	C	T	A	T	—	T	T	T	—	—	TTTA	Lee et al. [127]	AF013806
B <sup>1</sup>	C	—	A	T	—	T	T	T	—	—	TTTA	Lee et al. [127]	AF013807
C <sup>1</sup>	C	—	A	T	—	T	T	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [127]	AF013808
D <sup>1</sup>	C	T	A	T	—	T	T	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [127]	AF013809
E <sup>1</sup>	T	—	A	T	—	T	T	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [127]	AF013810
F <sup>1</sup>	T	—	A	T	—	T	T	T	—	AG	—	Lee et al. [127]	AF013811
G <sup>1</sup>	T	—	A	T	—	T	T	T	—	—	TTTA	Lee et al. [127]	AF013812
H <sup>1</sup>	T	—	A	T	—	C	T	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [127]	AF013813
I <sup>1</sup>	T	—	A	T	TT	C	T	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [127]	AF013814
J <sup>1</sup>	T	—	C	T	—	C	T	T	AT	AG	TTTA	Lee et al. [127]	AF013815
K <sup>1</sup>	T	—	C	T	—	C	T	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [127]	AF013816
L <sup>1</sup>	T	—	A	T	—	T	C	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [127]	AF013817
M <sup>1</sup>	T	—	A	T	—	T	T	C	—	AG	TTTA	Lee et al. [127]	AF013818
N <sup>1</sup>	T	—	A	A	—	T	T	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [127]	AF013819
O <sup>1</sup>	T	T	A	T	—	T	T	T	—	AG	TTTA	Lee et al. [127]	AF013820
P	T	—	A	A	—	T	T	T	—	—	TTTA	Matos et al. [148]	AY390601
Q	T	—	A	T	—	T	T	T	—	AA	TTTA	Siripattanapipong et al. [231]	AY550106

Positions des nucléotides													Publication	Numéro d'acquisition GenBank
Allèles ITS1	6	12	15	21	23-24	28	34	42	53-54	80-81	115-118	Autres variations		
<b>R</b>	T	_	A	T	TT	C	T	T	_	AG	TTTA	49 A→G 131 T→_	Siripattanapipong et al. [231]	AY550105
<b>U1</b>	T	_	A	A	CC	T	T	T	_	AG	TTTA		Hosoya et al. [98]	
<b>U2</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	AG	_TA		Hosoya et al. [98]	
<b>I</b>	T	_	A	A	_	T	T	T	_	AG	TTTA	154 T→C	Roberts et al. [213]	AY328043
<b>II</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	AG	TTTA	41 T→C	Roberts et al. [213]	AY328044
<b>III</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	AG	TTTA	130 T→C	Roberts et al. [213]	AY328045
<b>IV</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	GG	TTTA		Roberts et al. [213]	AY328046
<b>V</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	AG	TTTA	52 T→C 114 C→T	Roberts et al. [213]	AY328047
<b>VI</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	_	TTTA	110 A→T	Roberts et al. [213]	AY328048
<b>VII</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	_	TTTA	41 T→C	Roberts et al. [213]	AY328049
<b>VIII</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	AG	CTTA		Roberts et al. [213]	AY328050
<b>IX</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	_	TTTA	154 T→C	Roberts et al. [213]	AY328051
<b>X</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	AG	TTTA	152 A→G	Roberts et al. [213]	AY328052
<b>XI</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	AG	TTTA	159 T→C	Roberts et al. [213]	AY328053

Positions des nucléotides													Publication	Numéro d'acquisition GenBank
Allèles ITS1	6	12	15	21	23-24	28	34	42	53-54	80-81	115-118	Autres variations		
<b>10A</b>	T	_	A	T	T_	T	T	T	_	_	TTTA	5 A→C 82 G→_	Nimri et al. [189]	AF374238
<b>10B</b>	T	_	A	T	T_	T	T	T	_	_	TTTA	5 A→C 82 G→_	Nimri et al. [189]	AF374239
												insertion de A entre 50 et 51		
<b>11A</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	AG	___	71 T→_	Nimri et al. [189]	AF374240
<b>11D</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	AG	T__	45 T→_	Nimri et al. [189]	AF374241
<b>13A</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_C	AG	TTTA	45 T→_	Nimri et al. [189]	AF374242
<b>13B</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	AG	TTTA	45 T→_ 105 G→A	Nimri et al. [189]	AF374243
<b>15B</b>	T	T	A	T	_	T	T	T	_	_	TTTA	5 A→C	Nimri et al. [189]	AF374244
<b>17E</b>	T	T	A	A	_	T	T	T	_	AG	TTTA		Nimri et al. [189]	AF374245
<b>60A</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	_	___		Nimri et al. [189]	AF374246
<b>84C</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	AG	TTTT	58 T→C	Nimri et al. [189]	AF374247
<b>100B</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	AG	TTTC	70-71 TT→_	Nimri et al. [189]	AF374248
<b>137C</b>	T	_	A	T	_	T	T	T	_	AG	TTTA	69-71 TTT→__	Nimri et al. [189]	AF374249
<b>DEL1</b>	T	_	A	T	TT	C	T	T	_	AG	TTTA	95 T→_	Gupta et al. [78]	GU228517

Positions des nucléotides													Publication	Numéro d'acquisition GenBank
Allèles ITS1	6	12	15	21	23-24	28	34	42	53-54	80-81	115-118	Autres variations		
<b>SYD1</b>	T	_	A	T	__	T	T	T	__	AG	TTTA	71 T→_	van Hal et al. [260]	EU442879
<b>2<sub>D</sub></b>	C	_	A	T	__	T	T	T	__	—	TTTA	83 A→G	Li et al. [131]	EU709707
<b>4<sub>E</sub></b>	T	_	A	T	__	T	T	T	__	AG	TTTA	51 A→G 142 T→C	Li et al. [131]	EU709705
<b>5<sub>B</sub></b>	T	_	A	T	__	T	T	T	__	AG	TTTA	52 T→C	Li et al. [131]	EU709702
<b>9<sub>D</sub></b>	T	_	A	T	__	T	T	T	__	AG	TTTA	82 G→_	Li et al. [131]	EU709703
<b>20<sub>E</sub></b>	C	_	A	T	__	T	T	T	__	—	TTTA	142 T→C	Li et al. [131]	EU709708
<b>22<sub>A</sub></b>	T	_	A	T	__	T	T	T	__	AG	TTTA	13 T→C	Li et al. [131]	EU709701
<b>22<sub>D</sub></b>	T	_	A	T	__	T	T	T	__	AG	TTTA	154 T→C	Li et al. [131]	EU709706
<b>25<sub>B</sub></b>	T	_	A	T	__	T	T	T	__	AG	TTTA	110 A→G 19 A→G	Li et al. [131]	EU709704
<b>36<sub>D</sub></b>	T	_	A	T	TT	C	T	T	__	AG	TTTA	71 T→_ 95 T→_	Li et al. [131]	EU709709

\_ : délétion

<sup>1</sup> Allèles ITS1 décrits dans la publication princeps de Lee et al. [127]

## Annexe 4

Score défini par Lee et al. [127] pour l'identification des allèles ITS2 et allèles décrits depuis la publication princeps.

Allèles	Positions des nucléotides										Publication	N°d'accession GenBank	
	48-	52-57	62-66	68-72	76	122	160	166-171	173	177-183			
ITS2	48- 49	52-57	62-66	68-72	76	122	160	166-171	173	177-183	autres variations		
a <sup>1</sup>	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	ATATAT	G	_____	Lee et al. [127]	AF013821
b <sup>1</sup>	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	AT_AT	G	_____	Lee et al. [127]	AF013822
c <sup>1</sup>	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	C	G	AT_AT	G	_____	Lee et al. [127]	AF013823
d <sup>1</sup>	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	C	T	AT_AT	G	_____	Lee et al. [127]	AF013824
e <sup>1</sup>	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	__AT	G	_____	Lee et al. [127]	AF013825
f <sup>1</sup>	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	T	—	G	__AT	A	_____	Lee et al. [127]	AF013826
g <sup>1</sup>	—	TAA	—	AA_TA	AATAA	—	—	G	__AT	A	_____	Lee et al. [127]	AF013827
h <sup>1</sup>	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	__AT	A	_____	Lee et al. [127]	AF013828
i <sup>1,2</sup>	—	—	—	AATAA	—	—	G	__AT	A	_____	Lee et al. [127]	AF013829	
j <sup>1</sup>	—	—	—	AATAA	—	—	G	AT_AT	G	_____	Lee et al. [127]	AF013830	
k <sup>1</sup>	—	—	—	AATAA	—	—	G	__AT	A	CAAAATA	Lee et al. [127]	AF013831	
l <sup>1,2</sup>	—	—	AAATA	—	—	G	__AT	A	_____	Lee et al. [127]	AF013832		
m <sup>1</sup>	—	TAATAA	AA_TA	AATAA	—	—	G	__AT	A	CAAAATA	Lee et al. [127]	AF013833	
n <sup>1</sup>	—	TAA_AT	AA_TA	AATAT	—	—	G	____	A	_____	Lee et al. [127]	AF013834	
o (IT007)	—	TAA	—	AA_TA	AATAA	—	—	G	__AT	G	_____	Lee et al. [127]	AF013835

Allèles	Positions des nucléotides											Publication	N°d'accesion	
ITS2	48-49	52-57	62-66	68-72	76	122	160	166-171	173	177-183	autres variations		GenBank	
<b>p</b> (FR004) <sup>3</sup>	—	TAA	—	AA_TA	AATAA	—	—	G	AT_AT	G	_____	Lee et al. [127]	AF013836	
<b>q</b> (DK029) <sup>3</sup>	AA	TAA	—	AA_TA	AATAA	—	—	G	TT_AT	A	_____	Lee et al. [127]	AF013837	
<b>r</b> (DK594) <sup>3</sup>	—	TAA	—	AAATA	AATAT	T	—	G	ATATAT	G	_____	Lee et al. [127]	AF013838	
<b>s</b> (DK323)	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	T	AT_AT	G	_____	Lee et al. [127]	AF013839	
<b>t</b> (DK313)	—	TAA	—	AA_TA	AATAA	T	—	G	__AT	A	_____	Lee et al. [127]	AF013840	
<b>p<sup>3</sup></b>	A_	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	_____	A	_____	Siripattanapipong et al. [231]	AY550108	
<b>q<sup>3</sup></b>	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	GT_AT	G	_____	Siripattanapipong et al. [231]	AY550109	
<b>r<sup>3</sup></b>	A_	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	_____	A	_____	insertion de TA entre 60 et 61	Siripattanapipong et al. [231] AY550105	
<b>u</b>	—	TAA	—	AA_TA	AATAA	—	—	G	__AT	A	__ATA	Roberts et al. [213]	AY328054	
<b>u3</b>	A_	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	_____	A	_____	Hosoya et al. [98]		
<b>u4</b>	AA	TAA	—	AA_TA	AATAA	—	—	G	_T_TAT	A	_____	Hosoya et al. [98]		
<b>u5</b>	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	C	G	ATAT_T	T	_TAGATA	172 T→_	Hosoya et al. [98]	
<b>v</b>	A_	TAA	—	AA_TG	AATAT	—	—	G	_____	A	_____	28-29 AA→_ 165 T→_	Beser et al. [18] EU527019	
<b>del3</b>	—	—	—	AATAA	—	—	G	__AT	G	_____		Gupta et al. [78]	GU228519	

Allèles	Positions des nucléotides										Publication	N°d'accession GenBank	
	ITS2	48-49	52-57	62-66	68-72	76	122	160	166-171	173	177-183		
<b>syd2</b>	A_	TAA_AT	AA_TA	AATAT	_	_	G	_____	A	_____	insertion de G entre 32 et 33	van Hal et al. [260]	EU442880
<b>syd3</b>	_	TAA__	AA_TA	AATAA	_	_	G	___AT	A	_____	insertion de A entre 29 et 30	van Hal et al. [260]	EU442881
<b>syd4</b>	A_	TAA__	AA_TA	AATAA	_	_	G	___AT	A	_____		van Hal et al. [260]	EU442882
<b>1</b>	_	TGA__	AA_TA	AATAA	_	_	G	___AT	A	_____		Robberts et al. [213]	AY328055
<b>2</b>	_	TAA__	AA_TA	AATAT	_	_	G	___AT	A	_____	89 T→C	Robberts et al. [213]	AY328056
<b>3</b>	_	TAA__	AA_TA	AGTAA	_	_	G	___AT	A	_____		Robberts et al. [213]	AY328057
<b>4</b>	_	TAA__	AA_TA	AATAA	_	_	G	___AT	A	_____	83 T→C	Robberts et al. [213]	AY328058
<b>5</b>	_	TAA__	AA_TA	AATAA	_	_	G	___AT	A	_____	95 A→G	Robberts et al. [213]	AY328059
<b>6</b>	_	TAA__	AA_TA	AATAA	T	_	G	___AT	A	_____	insertion de A entre 76 et 77	Robberts et al. [213]	AY328060
<b>7</b>	_	TAA__	AA_TA	AATAA	_	_	G	___AT	A	_____	135 A→G	Robberts et al. [213]	AY328061
<b>8</b>	_	TAA__	AA_TA	AATAA	T	_	G	___AT	A	_____	insertion de A entre 76 et 77	Robberts et al. [213]	AY328062
<b>9</b>	_	TAA__	AA_TA	AATAA	T	_	G	___AT	A	_____	insertion de A entre 76 et 77 47 A→G	Robberts et al. [213]	AY328063
<b>10</b>	_	TAG__	AA_TA	AATAA	_	_	G	___AT	A	_____		Robberts et al. [213]	AY328064
<b>11</b>	_	TAA__	AA_TA	AATAA	_	_	G	___AT	A	CGTA		Robberts et al. [213]	AY328065
<b>12</b>	_	TAA__	AA_TA	AATAA	_	_	G	___AT	A	_____	102 A→G	Robberts et al. [213]	AY328066

Allèles	Positions des nucléotides											Publication	N°d'accesion GenBank	
	ITS2	48-49	52-57	62-66	68-72	76	122	160	166-171	173	177-183	autres variations		
<b>10A</b>	—	TAA	__	AA	__	AATAT	—	—	G	__AT	A	_____	148 A→_	Nimri et al. [189] AF374250
<b>11A</b>	AA	TAA	__	AA_TA	AATAT	—	—	G	__AT	A	_____	148 A→_	Nimri et al. [189] AF374251	
insertion de G entre 32 et 33														
<b>11E</b>	—	TAA	__	AA_TA	AATAT	—	—	G	__AT	A	_____	139 C→T 148 A→_	Nimri et al. [189] AF374252	
<b>11G</b>	—	TAA	__	AA_TA	AATAT	—	—	G	____	—	_____	28 A→_ 148 A→_	Nimri et al. [189] AF374253	
<b>12A</b>	—	TAA	__	AA_TA	AATAA	—	—	G	__AT	G	_____		Nimri et al. [189] AF374254	
<b>13A</b>	—	TAA	__	AA_TA	AATAA	—	—	G	__AT	A	_____	148 A→_	Nimri et al. [189] AF374255	
<b>13B</b>	—	TAATAA	AA_TA	AATAA	—	—	G	__AT	A	_____	148 A→_	Nimri et al. [189] AF374256		
<b>15B</b>	—	—	AAATA	—	—	—	G	__AT	A	_____	148 A→_	Nimri et al. [189] AF374257		
<b>17A</b>	—	TAA	__	AA_TA	AATAT	—	—	G	__AT	G	_____	148 A→_	Nimri et al. [189] AF374258	
<b>59E</b>	—	TAA	__	AA_TA	AATAA	—	—	G	__AT	A	_____	148 A→_	Nimri et al. [189] AF374259	
<b>60A</b>	AA	TAA	__	AA_TA	AATAA	—	—	G	TT_AT	A	_____		Nimri et al. [189] AF374260	
<b>61A</b>	AA	TAA	__	AA_TA	AATAA	T	—	G	__AT	A	_____	148 A→_	Nimri et al. [189] AF374261	
<b>84C</b>	—	TA	__	AA_TA	AATAA	—	—	G	__TAT	A	_____	insertion de C entre 129 et 130	Nimri et al. [189] AF274262	
<b>100A</b>	—	TAA	__	AA_TA	AATAT	—	C	G	__AT	A	_____		Nimri et al. [189] AF374263	
<b>129A</b>	—	TAA	__	AA_TA	AATAT	—	—	G	ATATAT	G	_____	148 A→_	Nimri et al. [189] AF374264	
<b>137C</b>	—	TAA	__	AA_TA	AATAA	—	—	G	__AT	A	___ATA	148 A→_	Nimri et al. [189] AF374265	

Allèles ITS2	Positions des nucléotides											Publication	Nº d'accession GenBank			
	48-49	52-57	62-66	68-72	76	122	160	166-171	173	177-183	autres variations					
"f"	—	TAA	—	AA_TA	GATAT	—	T	—	G	—	AT	A	—	Totet et al. [249]	AY135712	
2 <sub>C</sub>	—	—	—	—	AATAA	—	—	G	—	AT	A	—	61 G→ 95 A→G	Li et al. [131]	EU709718	
4 <sub>B</sub>	—	TAA	—	AA_TA	AATAA	—	—	G	—	AT	A	—	81 T→C 84 A→G 93 T→C 135 A→G	Li et al. [131]	EU709714	
4 <sub>E</sub>	—	TAA	—	AA_TA	AATAA	—	—	G	—	AT	A	—	164 T→C	Li et al. [131]	EU709713	
9 <sub>B</sub>	—	TAA	—	AA_TA	AATAA	—	—	G	—	AT	A	—	92 C→T	Li et al. [131]	EU709711	
12 <sub>A</sub>	A	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	—	T	A	—	Insertion de TA entre 60 et 61 120 T→ —	Li et al. [131]	EU709719
13 <sub>A</sub>	—	TAA	—	AA_TA	AATAA	—	—	G	—	AT	A	—	136 A→G	Li et al. [131]	EU709712	
13 <sub>B</sub>	—	TAA	—	AA_TA	AATAA	—	—	G	—	AT	A	—	12 A→G	Li et al. [131]	EU709710	
20 <sub>C</sub>	—	—	—	A	AATAA	—	—	G	—	AT	A	—	—	Li et al. [131]	EU709717	
22 <sub>A</sub>	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	AT	AT	G	—	187 A→G	Li et al. [131]	EU709716	
22 <sub>C</sub>	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	AT	AT	G	—	7 T→A 10 T→C	Li et al. [131]	EU709715	
36 <sub>A</sub>	A	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	—	A	—	insertion TA entre 60 et 61 187 A→G	Li et al. [131]	EU709720	
36 <sub>E</sub>	A	—	TAA	—	AA_TA	AATAT	—	—	G	—	A	—	insertion TA entre 60 et 61 5 G→A	Li et al. [131]	EU709721	

— : délétion

<sup>1</sup> Allèles ITS2 décrits dans la publication princeps de Lee et al. [127]

<sup>2</sup> Les allèles ITS2 i et l sont en fait identiques (cf numéros d'accession GenBank)

<sup>3</sup> Les allèles ITS2 p, q, r décrits par Lee et al. [127] sont différents des allèles p, q, r décrits par Siripattanapipong et al. [231].

## **Annexe 5**

### **Publications non incluses dans le manuscrit**



## Molecular typing of *Pneumocystis jirovecii* in a patient from French Guiana

Solène Le Gal,<sup>1,2</sup> Céline Damiani,<sup>3</sup> Michèle Virmaux,<sup>1</sup> Bernard Carme,<sup>4</sup> Mathieu Nacher,<sup>4</sup> Christine Aznar,<sup>4</sup> Anne Totet<sup>3</sup> and Gilles Nevez<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Université européenne de Bretagne, Université de Brest, Faculté de Médecine, Brest, France, <sup>2</sup>CHU de Brest, Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, Brest, France, <sup>3</sup>Université de Picardie Jules Verne, CHU d'Amiens, Service de Parasitologie et Mycologie médicales, Amiens, France and <sup>4</sup>Université Antilles-Guyane, Faculté de médecine, et Hôpital de Cayenne, Cayenne, France

### Introduction

The transmissible fungus *Pneumocystis jirovecii* is the causative agent of severe pneumonia [Pneumocystis pneumonia (PCP)] in immunodeficient patients (Walzer PD, *Pneumocystis pneumonia*, 3rd edn, Marcel Dekker, New York, 2005). *Pneumocystis pneumonia* remains the most frequent AIDS-defining illness in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients in Metropolitan France (Anonymous. *Bull Epidémiol Hebd* 2007; **46–47**: 386–93). In French Guiana, tuberculosis and disseminated histoplasmosis are the two most frequent AIDS-defining illnesses, whereas PCP occupies the third position (Cabié A *et al.*, *Bull Epidémiol Hebd* 2005; **46**: 238–9; Nacher M *et al.*, *AIDS* 2006; **19**: 951–3; Huber F *et al.*, *AIDS* 2007; **22**: 1047–53). HIV/AIDS is a major public health issue in this overseas French territory in which AIDS incidence is 40 per 100 000 inhabitants vs. 2.5 in Metropolitan France (Nacher M *et al.*, *AIDS* 2005; **19**: 727–38). These data point out specific features of HIV infection and its related opportunistic microorganisms in French Guiana.

Until now, French *P. jirovecii* isolates that have been characterised by molecular typing are those obtained from Metropolitan France, while there are no data concerning molecular characteristics of *P. jirovecii* organisms from French Guiana (Latouche S *et al.*, *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 383–7; Totet A *et al.*, *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 1173–80; Nevez G *et al.*, *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 181–6). The present study is the first report of *P. jirovecii* type identification in an AIDS patient living in this overseas French territory.

Correspondence: Prof. Gilles Nevez, Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, 29609 Brest, France.  
Tel.: +33 2 9881 8283. Fax: +33 2 9822 3987.  
E-mail: gilles.nevez@chu-brest.fr

Accepted for publication 12 June 2010

### Case report

A 46-year-old man was admitted to Cayenne hospital in April 2002 and presented with cough, fever, severe dyspnoea and an alveolo-interstitial syndrome. The examination of a bronchoalveolar lavage (BAL) specimen using an immunofluorescence assay (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) resulted in the diagnosis of PCP, which revealed HIV infection. The CD4<sup>+</sup> T-cell count in the blood was 21 cells  $\mu\text{l}^{-1}$ . Treatment with cotrimoxazole led to improvement. Bronchoalveolar lavage sediment was stored at –20 °C for further typing.

The typing was based on PCR, cloning and sequence analysis of internal transcribed spacer (ITS) 1 and ITS 2 of the rRNA operon. First, DNA extraction of the BAL sample was performed using a commercially available kit (QIAamp DNA MiniKit; Qiagen, Courtaboeuf, France). A nested PCR was then performed with the two pairs of primers N18SF and N26SRX (first PCR round) and ITSF3 and ITS2R3 (second PCR round) (Tsolkali AG *et al.*, *J Infect Dis* 1996; **174**: 141–56; Tsolkali AG *et al.*, *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 90–93). The products of the second PCR round were cloned (pGEMT Vector System II; Promega France, Charbonnières-les-bains, France). Five clones were sequenced from the two strands. The ITS 1 and ITS 2 alleles were identified using the scores described by Tsolkali *et al.* (*J Infect Dis* 1996; **174**: 141–56 and *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 90–93) and Lee *et al.* (*J Clin Microbiol* 1998; **36**: 734–1). A *P. jirovecii* ITS type is defined by a combination of the alleles of the two loci.

Internal transcribed spacer 1 sequences were identical in five clones making it possible to identify allele B1 (corresponding to E as described by Lee *et al.*). In two clones, ITS2 sequences were identical to that of allele a<sub>3</sub> (corresponding to g as described by Lee *et al.*). In three clones, ITS2 sequences differ from that of allele a<sub>3</sub> by an insertion of residues ATAA at positions 169–172. These

sequences have not been initially reported by Tsolaki *et al.* (*J Infect Dis* 1996; **174**: 141–56 and *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 90–93) and Lee *et al.* (*J Clin Microbiol* 1998; **36**: 734–41), whereas they have been described and deposited by Robberts *et al.* (*J Clin Microbiol* 2004; **42**: 1505–10) (GenBank accession number AY328054) who designated this allele using the lowercase letter u. Thus, *P. jirovecii* types B<sub>1a3</sub> (Eg) and B<sub>1</sub> ‘AY328054’ (Eu) were identified in two and three clones respectively.

## Discussion

In this study, we obtained the first data concerning *P. jirovecii* types from a French territory of South America. To our knowledge, the patient from whom *P. jirovecii* organisms were obtained had no past history of travel out of French Guiana and the Caribbean region. For this reason, we considered that our typing results were related to *P. jirovecii* organisms, which had been acquired in this geographic location.

Type B<sub>1a3</sub> has been previously detected in one-third of PCP patients from other countries around the world including Metropolitan France (Totet A *et al.*, *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 1173–80; Nevez G *et al.*, *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 181–6; Beard CB *et al.*, *Emerg Infect Dis* 2004; **10**: 1729–35) whereas type B<sub>1</sub> ‘AY328054’ (Eu) has been detected in five of 83 clones (6%) and three of 19 PCP patients (15.78%) from South Africa by Robberts *et al.* (*J Clin Microbiol* 2004; **42**: 1505–10). Although only one isolate was typed in the present study, the identification of types B<sub>1a3</sub> (Eg) and B<sub>1</sub> ‘AY328054’ (Eu) suggests that there are no specific *P. jirovecii* types in French Guiana.

To our knowledge, there are little data on genomic characteristics of *P. jirovecii* from other parts of the Caribbean and tropical regions of South America. In 1994, Wakefield *et al.* examined in *P. jirovecii* specimens from eight Brazilian patients the gene encoding the mitochondrial large subunit rRNA. The sequences from these specimens were compared with those of *P. jirovecii* specimens from British patients (Wakefield AE *et al.*, *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 2959–61). No differences were observed. However, sequences of this locus are less

informative than those of the ITS loci. In 1997, Ortiz-Rivera *et al.* typed at the ITS loci *P. jirovecii* organisms obtained from a cancer patient and an AIDS patient who lived and had died in Puerto Rico (Ortiz-Rivera M *et al.*, *P R Health Sci J* 1997; **16**: 251–4). Identical sequences to those previously reported in the USA were observed. Wissmann *et al.* recently reported the typing of *P. jirovecii* organisms from 57 Brazilian patients at the dihydropteroate synthase locus (Wissmann G *et al.*, *J Eukaryot Microbiol* 2006; **53**: 305–7). No mutant type was observed. However, the objective of their study was essentially to assess the frequency of *P. jirovecii* mutant types, which are potentially resistant to sulfonamide-sulfone, and not to investigate the diversity of *P. jirovecii* organisms through examination of highly informative loci such as ITSs.

In conclusion, our typing results were obtained from a single case analysis. An extended study based on analysis of several isolates is probably required. Nonetheless, they represent the first data of *P. jirovecii* genomic characteristics in French Guiana. *Pneumocystis jirovecii* type B<sub>1a3</sub> that we identified in the present Guyanese case is commonly found in metropolitan France and other countries. B<sub>1</sub> ‘AY328054’ was previously described as a minor type in South Africa. These results do not plead in favour of specific characteristics of *P. jirovecii* to explain the less frequency of PCP compared with that of tuberculosis or histoplasmosis as causes of AIDS in HIV-infected patients. Further investigations to explain why PCP is not the most frequent opportunistic infection that defines AIDS in this overseas territory should be focused on specific features of patient populations infected with HIV rather than on a hypothetical role of the fungus.

## Acknowledgments

The results were presented in part at 3rd Trends in Medical Mycology, 28–31 October 2007, Torino, Italy, Abstr. No. 218, P133. The study was partly supported by the ‘Agence Française de Sécurité Sanitaire de l’environnement et du Travail (AFSSET)’; contract no. EST-2006/1/41.

# Pneumocystis : diagnostic biologique des infections à *Pneumocystis jirovecii*

S. Le Gal, C. Damiani, A. Totet, G. Nevez

*Pneumocystis jirovecii* est un champignon opportuniste transmissible spécifique de l'homme et responsable, chez les sujets présentant une immunodépression sévère, d'infections graves essentiellement pulmonaires, plus rarement disséminées, dont l'évolution spontanée est fatale. La pneumonie à *Pneumocystis* reste, dans les pays développés, la plus fréquente des infections opportunistes, classant les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine au stade de syndrome d'immunodéficience acquise. Elle concerne également les patients présentant des déficits immunitaires en rapport avec des traitements cytostatiques et immunomodulateurs. Des formes d'infections plus torpides sont possibles chez des patients présentant des maladies bronchiques et pulmonaires chroniques. Pour ces raisons, les infections à *P. jirovecii* demeurent un problème d'actualité en santé publique. Le lavage bronchoalvéolaire reste le prélevement essentiel pour le diagnostic des infections à *P. jirovecii*. L'association de techniques microscopiques, dont l'une doit être panoptique, est indispensable pour la détection du champignon qui doit s'intégrer dans une démarche globale de diagnostic parasitologique et mycologique. L'utilisation de la polymerase chain reaction apporte un gain de sensibilité et permet de détecter de faibles charges fongiques occultées par les techniques microscopiques. La détection des β-1,3-D-glucanes sériques est une technique de deuxième intention qui peut contribuer au diagnostic de la pneumonie à *Pneumocystis* chez les patients qui, par ailleurs, ne présentent pas d'autre infection fongique invasive.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots-clés :** *Pneumocystis jirovecii*; Pneumonie; PCR; Immunodétection; β-1,3-D glucanes

## Plan

■ Introduction	1
■ Classification	1
■ Habitat	2
■ Identification et cycle	2
■ Diagnostic biologique	2
Échantillons pulmonaires	2
Détection microscopique	3
Culture	4
Amplification par « polymerase chain reaction »	4
Diagnostic sérologique	5
Autres paramètres biologiques	5
Identification génotypique	5
■ Conclusion	5

spontanée est fatale [1]. La pneumonie à *Pneumocystis* (acronyme : PPC) [2] reste dans les pays développés la plus fréquente des infections opportunistes classant les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) au stade de syndrome d'immunodéficience acquise (sida). Dans ce contexte, on note 253 cas de PPC inaugurales du sida sur les 1 146 cas de sida déclarés à l'Institut de veille sanitaire (InVS) en France en 2006 [3]. La PPC concerne également les patients présentant d'autres déficits immunitaires en particulier en rapport avec des traitements cytostatiques et immunomodulateurs [4]. Les cas diagnostiqués dans ce contexte ne bénéficient pas d'un système national de déclaration mais, si l'on projette les données fournies par le réseau *Pneumocystis* de l'Assistance publique-Hôpitaux de Paris, leur nombre pourrait s'élever à 40 % du nombre de cas déclarés à l'InVS [5]. Pour ces raisons, la PPC représente un problème d'actualité en santé publique.

## Classification

Le genre *Pneumocystis* désigne des micromycètes qui se positionnent dans l'embranchement des *Ascomycota*, le sous-embranchement des *Taphrinomycotina*, la classe des *Pneumocystomycetes*, l'ordre des *Pneumocystidales* et la famille des *Pneumocystidaceae* [6-9]. Cinq espèces sont actuellement dénommées selon une nomenclature binominale et en fonction de leur

## ■ Introduction

*Pneumocystis jirovecii* est un champignon opportuniste transmissible spécifique de l'homme, responsable chez les sujets présentant une immunodépression sévère, d'infections graves essentiellement pulmonaires, plus rarement disséminées, dont l'évolution

espèce de mammifère hôte. Il s'agit de *P. carinii* et *P. wakefieldiae* chez le rat, *P. murina* chez la souris, *P. oryzistolagi* chez le lapin et *P. jirovecii* chez l'homme [10]. En 2002, il avait été proposé de retenir l'appellation *Pneumocystis jiroveci* (*P. jiroveci*) déjà proposée en 1976 par Frenkel pour désigner l'espèce retrouvée chez l'homme [2, 11, 12]. Ce nom, *P. jirovecii*, qui a été à l'origine publié sous une forme correcte avec un seul « i » selon le code international de nomenclature zoologique, mais incorrecte selon le code international de nomenclature botanique, a été corrigé et remplacé par *P. jirovecii* avec deux « i » terminaux [2, 13].

## ■ Habitat

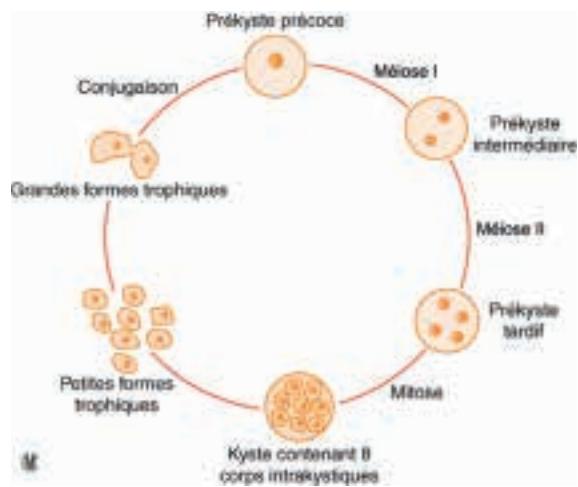
*Pneumocystis* se développe dans les alvéoles pulmonaires en contact étroit avec les pneumocytes de type I, mais reste extracellulaire. Les organes des mammifères infectés et en particulier les alvéoles pulmonaires sont les seuls lieux de multiplication connus au sein desquels le champignon peut être visualisé. Bien que de l'acide désoxyribonucléique (ADN) spécifique de *Pneumocystis* ait été détecté dans l'eau de bassin et que de l'ADN spécifique de *P. carinii* et de *P. jirovecii* ait été détecté dans l'air dans un verger de l'Oxfordshire [14, 15], aucun biotope n'a été identifié dans le milieu extérieur pour les espèces du genre *Pneumocystis*. En fait, les mammifères hôtes infectés constituent pour l'instant les seuls réservoirs formellement caractérisés. En même temps, l'étreinte spécificité d'hôte retrouvée chez les espèces de *Pneumocystis* justifie d'écartier les animaux comme sources infectieuses potentielles de *P. jirovecii* et de considérer l'infection chez l'homme comme une anthroposie avec l'homme infecté comme source essentielle de *P. jirovecii*.

## ■ Identification et cycle

Deux formes de *Pneumocystis* ont été principalement identifiées. Il s'agit des formes trophiques et des formes kystiques. Les kystes matures contiennent huit corps intrakystiques qui, après libération et selon un cycle hypothétique, donneront de petites formes trophiques, de plus grandes formes trophiques polymorphes, des prékystes précoces, intermédiaires et tardifs et de nouveaux kystes. Les corps intrakystiques et les petites formes trophiques sont sphériques et ont une taille de 1 à 2 µm. Des corps intrakystiques faliformes ou dits en « banane » de plus grande taille, de 2 à 3 µm, sont plus rarement observés. Les plus grandes formes trophiques apparaissent très irrégulières et ont une taille de 4 à 8 µm. Celles-ci sont très adhérentes entre elles ainsi qu'à la surface de pneumocytes de type I. Les prékystes sont ovoïdes et présentent une taille de 3,5 à 6 µm. Les kystes matures sont ovoïdes ou sphériques et présentent une taille de 4 à 7 µm ; la taille moyenne usuellement observée étant de 5 µm. La paroi des prékystes intermédiaires, des kystes tardifs et des kystes matures apparaît comme une couche dense en microscopie électronique et contient des β-1,3-D-glucanes [16]. Ces stades sont détectables par les colorations à l'argent et au bleu de toluidine (cf. infra).

L'hypothèse d'un cycle décrivant une multiplication via une reproduction sexuée (Fig. 1) a été basée sur la mise en évidence en microscopie électronique de complexes synaptonémaux [17]. Les complexes synaptonémaux sont caractéristiques de la prophase de la première méiose chez les eucaryotes. Cette observation est en faveur d'une reproduction résultant d'une conjugaison des formes trophiques pour former des kystes. *Pneumocystis* étant un ascomycète, il est légitime de proposer une nomenclature adaptée pour désigner, selon ce cycle, les kystes comme des asques, les corps intrakystiques comme des ascospores. Quo qu'il en soit, ce cycle hypothétique a l'avantage de situer dans un ordre logique les différentes formes qui sont effectivement détectées dans les prélèvements pulmonaires lors de la réalisation du diagnostic de routine au laboratoire.

La forme naturellement infectante n'est pas identifiée. Toutefois, il faut noter que les corps intrakystiques nouvellement libérés par les kystes matures présentent la même taille (1 à 3 µm) que



**Figure 1.** Cycle hypothétique de *Pneumocystis jirovecii* dans l'alvéole pulmonaire. Les kystes matures contiennent huit corps intrakystiques. Après libération, ces corps intrakystiques donnent de petites formes trophiques puis de plus grandes formes trophiques polymorphes. La conjugaison de ces grandes formes trophiques aboutit à la formation des prékystes précoces, intermédiaires et tardifs, et de nouveaux kystes. En considérant *P. jirovecii* comme un ascomycète, les kystes correspondent à des asques et les corps intrakystiques à des ascospores.

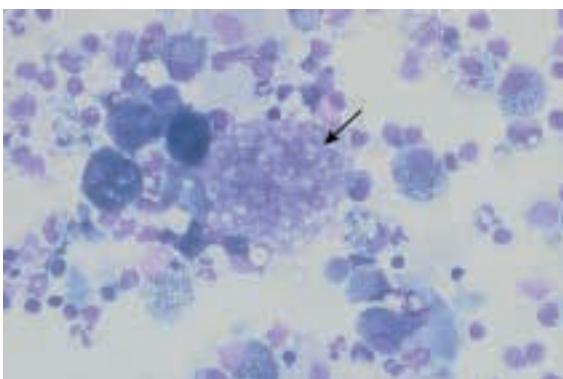
d'autres pathogènes tels que *Mycobacterium tuberculosis* dont la taille est compatible avec la diffusion profonde jusqu'aux alvéoles pulmonaires [18].

## ■ Diagnostic biologique

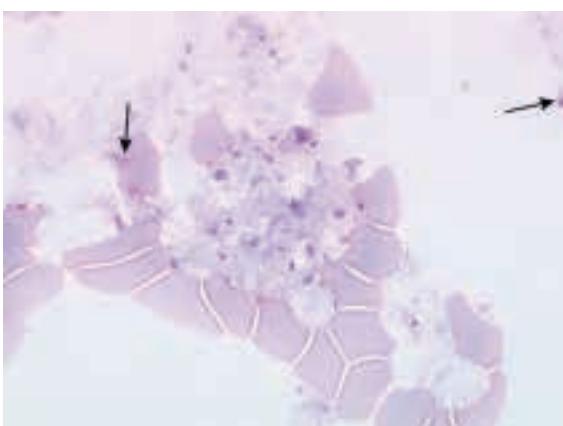
### Échantillons pulmonaires

La PPC est une pneumonie alvéolo-interstitielle bilatérale se révélant au scanner thoracique par des images en verre dépoli [19]. D'autres formes cliniques pulmonaires sont retrouvées telles que des pneumothorax, des pneumopathies en foyer et même systématisées, et des miliaires lors de PPC granulomateuses [20]. Des formes d'infections pulmonaires plus torpides surviennent chez des patients présentant des bronchopneumopathies chroniques obstructives [21], des sarcoïdoses [22], des mucoviscidoses [23]. Celles-ci sont encore mal caractérisées, mais il est légitime de considérer que le champignon peut contribuer pour une part à la symptomatologie pulmonaire chez ces patients. Les localisations extrapulmonaires sont exceptionnelles, mais connues [18].

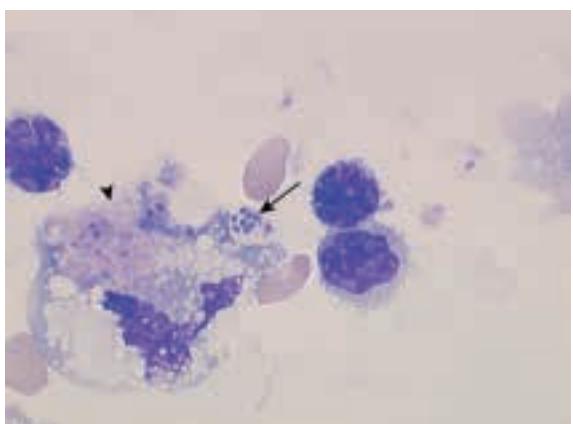
Dans ce contexte, le diagnostic biologique des infections à *P. jirovecii* repose essentiellement sur la détection du champignon dans des prélèvements pulmonaires, plus rarement dans d'autres échantillons biologiques lors de localisations extrapulmonaires. Ce diagnostic a été initialement posé par l'examen microscopique de tissus pulmonaires post-mortem [24, 25] puis d'aspirations nasopharyngées ou trachéales, en particulier chez les nourrissons [26], et d'expectorations [27]. D'autres prélèvements tels que les biopsies pulmonaires transpariétales, transbronchiques, et les brosses bronchiques ont été présentés comme des prélèvements permettant la détection microscopique du champignon [28-30]. Mais c'est le lavage bronchoalvéolaire (LBA) pratiqué au cours d'une fibroscopie bronchopulmonaire qui s'est avéré être le prélèvement essentiel pour le diagnostic de la PPC, en particulier chez les patients infectés par le VIH [31]. À la fin des années 1980, l'augmentation de l'incidence du sida et des infections à *Pneumocystis* et la place prépondérante de *P. jirovecii* dans l'étiologie des pneumonies interstitielles chez les sidéens ont conduit à proposer l'expectoration induite comme alternative au LBA [32]. Celle-ci



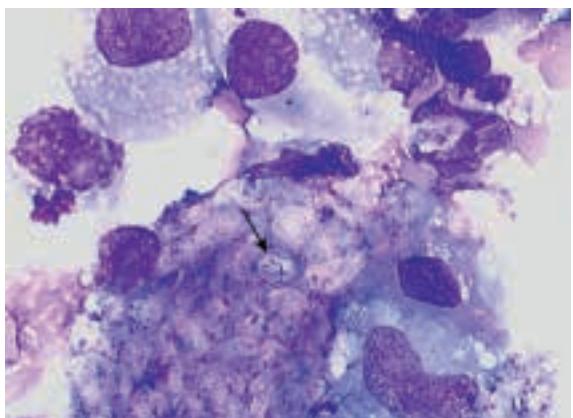
**Figure 2.** Amas de *P. jirovecii* constitué de formes trophiques et de kystes (May-Grünwald-Giemsa,  $\times 200$ ) (flèche).



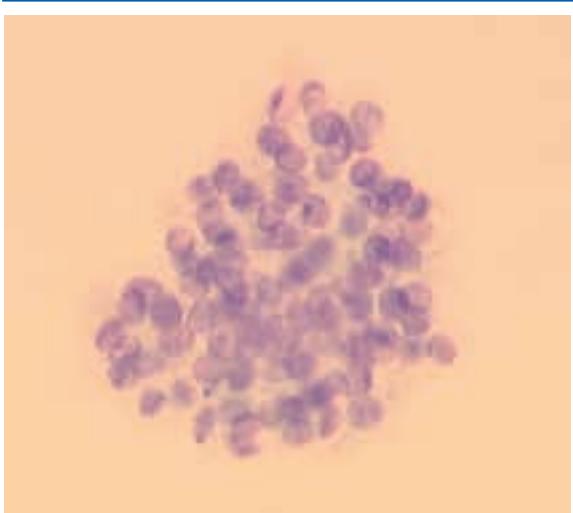
**Figure 3.** Formes trophiques isolées (flèches) (May-Grünwald-Giemsa,  $\times 1\ 000$ ).



**Figure 4.** Kyste mature contenant huit corps intrakystiques (flèche pleine) et amas de formes trophiques et de kystes adhérent à un macrophage (tête de flèche) (May-Grünwald-Giemsa,  $\times 1\ 000$ ).



**Figure 5.** Corps intrakystiques en forme de « banane » (flèche) (May-Grünwald-Giemsa,  $\times 1\ 000$ ).

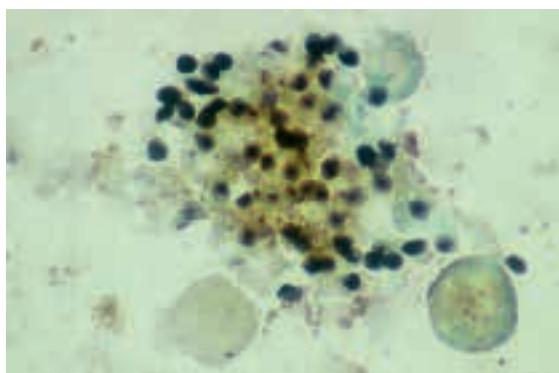


**Figure 6.** Amas de kystes dont la paroi est colorée en violet (Chalvardjian,  $\times 1000$ ).

170 doit être effectuée avec l'aide de kinésithérapie respiratoire après  
171 nébulisation d'un sérum hypertonique à 3 % pendant 20 minutes.  
172 L'examen d'une expectoration induite peut constituer une pre-  
173 mière approche, mais lorsqu'il est négatif, il doit être suivi d'un LBA pour confirmer l'absence de *P. jirovecii* et élargir le champ du  
174 diagnostic étiologique [33].  
175

## 176 Détection microscopique

177 La cytocentrifugation des échantillons de LBA avant colora-  
178 tion a été proposée pour améliorer le confort et la rapidité de  
179 lecture des lames [34]. La coloration au May-Grünwald-Giemsa est  
180 une coloration panoptique largement utilisée en biologie médi-  
181cale. Elle colore en bleu les composés basophiles tels que les  
182 cytoplasmes et en pourpre les composés acidophiles tels que les  
183 noyaux. Les amas de *P. jirovecii* constitués de formes trophiques  
184 et de kystes agglomérés sont aisément détectables à faible grossis-  
185 sement microscopique ( $20 \times 10$ ) (Fig. 2). Les formes trophiques  
186 isolées ainsi que les corps intrakystiques peuvent être visualisés à  
187 plus fort grossissement ( $100 \times 10$ ) (Fig. 3 à 5). La coloration de  
188 Chalvardjian [35] permet de détecter les kystes qui apparaissent  
189 colorés en violet par le bleu d'orthotoluidine (Fig. 6). Les formes  
190 trophiques ne sont pas colorées par cette technique. Les mêmes  
191 stades sont colorés par la coloration de Grocott dérivée de celle  
192 de Gomori [36] et sa variante d'exécution plus rapide décrite par  
193 Musto (Fig. 7) [37]. Ces colorations sont moins utilisées aujourd'hui  
194 en raison de leur potentielle toxicité. La coloration à l'acide péri-  
195odique (*periodic acid schiff* – PAS), celle de Papanicolaou et celle de



**Figure 7.** Amas de kystes dont la paroi est colorée en brun-noir (Musto,  $\times 400$ ).

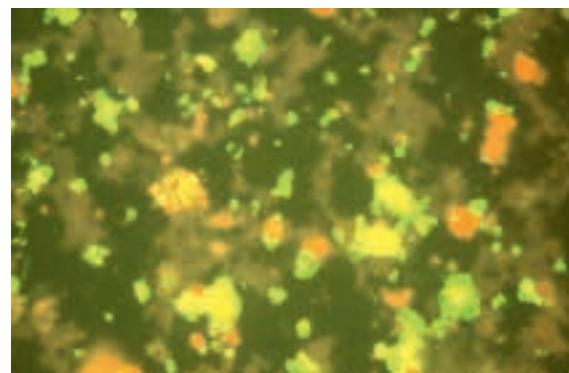


**Figure 8.** Amas de kystes (immunofluorescence indirecte, anticorps antikystes,  $\times 250$ ).

Gram-Weigert permettent respectivement de visualiser la paroi des kystes, les noyaux des corps intrakystiques, la paroi des kystes et les noyaux des corps intrakystiques [38]. Mais celles-ci ne sont pas utilisées couramment pour le diagnostic biologique des infections à *P. jirovecii*. En revanche, la coloration par l'hémalun éosine reste une coloration de base pour les examens en anatomie pathologique et permet de détecter les amas de *P. jirovecii* dont l'aspect en coupe a été classiquement décrit en « rayon de miel » [39].

Au milieu des années 1980 la production d'anticorps monoclonaux spécifiques de *Pneumocystis* a permis de développer des techniques d'immunodétection, en particulier par immunofluorescence qui sont applicables en routine. Ces techniques sont plus sensibles que les colorations pratiquées sur les LBA et les expectorations induites [40-43]. L'utilisation des anticorps spécifiques de kystes permet d'obtenir des images de bonne qualité avec un bruit de fond limité (Fig. 8) contrairement à celles mettant en œuvre des anticorps spécifiques à la fois des formes trophiques et des kystes (Fig. 9). En effet, les formes trophiques isolées qui sont très polymorphes doivent être rapidement distinguées du bruit de fond avant que l'extinction de fluorescence n'en limite l'observation. Cette observation rapide requiert une grande expérience.

Les colorations par des dérivés du stilbène révélant les copolymères de chitine-glucanes des champignons lors d'un examen microscopique en fluorescence ultraviolette ont été présentées comme une alternative aux colorations classiques et aux immuno-détections. Ces colorations sont répandues pour l'examen direct en mycologie, mais sont, en fait, peu utilisées pour la détection particulière de *P. jirovecii* [44].



**Figure 9.** Kystes et formes trophiques (immunofluorescence indirecte, anticorps antikystes et antiformes trophiques,  $\times 250$ ).

## Culture

La culture de *P. jirovecii* ne peut être réalisée en routine dans le cadre du diagnostic. Une équipe a obtenu expérimentalement la culture continue de *P. carinii* en milieu liquide acellulaire, mais ces résultats n'ont pu être reproduits [45].

## Amplification par « polymerase chain reaction »

Depuis la publication princeps de Wakefield et al. [46], des techniques de *polymerase chain reaction* (PCR) manuelle en une étape, nichée, en temps réel ou quantitative faisant appel à des sondes d'hydrolyse ou à des sondes d'hybridation, ont été développées pour amplifier l'ADN de *P. jirovecii*. Les cibles génomiques retenues sont les gènes et loci codant pour : l'ARN de la grande sous-unité du ribosome de la mitochondrie (mtLSUrRNA) [46-48], l'ARN de la petite sous-unité du ribosome de la mitochondrie [49], la major surface glycoprotein (MSG) [50,51], la thymidilate synthétase (TS) [52], la dihydroptéroate synthétase (DHPS) [53-55], la dihydrofolate réductase [56,57], l'ARN de la petite sous-unité du ribosome (ARNr 18S) [58], l'ARN 5S du ribosome [59,60], la  $\beta$  tubuline [61,62], les internal transcribed spacers (ITS) 1 et 2 de l'opéron nucléaire de l'ARN ribosomique [63-65], une protéine fonctionnelle du cycle de division cellulaire (Cdc2) [66], la heat shock protein (HSP) 70 [67] et une sérine endopréotéase [68]. La cible la plus fréquemment choisie pour le diagnostic reste le gène mtLSUrRNA. Les techniques de PCR amplifiant cette cible sont décrites comme les plus sensibles et spécifiques [69,70]. En revanche, des amorces décrites pour l'amplification du gène de la TS, de l'ARNr 18S et des ITS 1 et 2 peuvent amplifier de l'ADN de *Candida* et de *Saccharomyces* [58,64].

La spécificité et la sensibilité d'une méthode diagnostique basée sur la PCR varient en fonction de la cible amplifiée, de la technique, ainsi que de la qualité des prélevements analysés. Une méta-analyse des données publiées sur une période de 10 ans permet de retrouver des valeurs de sensibilité et de spécificité de la PCR de 99,1% et 92,6% sur des LBA et de 87% et 96% sur des expectorations [71]. En somme, c'est une valeur prédictive négative proche de 100% qui fait tout l'intérêt de la PCR sur LBA.

La PCR permet de détecter le champignon alors que celui-ci est occulté par les techniques microscopiques. Dans la mesure où il est admis que les infections à *P. jirovecii* résultent de l'acquisition de novo du champignon et non de la réactivation d'un portage chronique de stades quiescents, un résultat de PCR positif doit être a priori interprété comme le reflet d'une infection évolutive [72-74]. Toutefois, de faibles charges fongiques peuvent être détectées chez des patients présentant un diagnostic alternatif à la PPC et une amélioration clinique malgré l'absence de traitement spécifique

contre le champignon. Dans ce contexte, le diagnostic de colonisation pulmonaire par *P. jirovecii* est souvent retenu a posteriori. Il peut également s'agir de formes d'infections torpides en particulier chez des patients présentant des maladies bronchiques et pulmonaires chroniques. La différenciation entre la PPC et la colonisation fondée sur la quantification de la charge fongique présente dans les échantillons pulmonaires à l'aide d'une PCR quantitative a été proposée [47, 51, 56, 67, 75, 76]. Bien qu'il semble exister un lien entre la charge fongique et la gravité de l'infection, il reste difficile d'établir une telle corrélation puisqu'il n'est pas possible de standardiser l'échantillon pulmonaire initial faisant l'objet de la PCR quantitative.

Un autre avantage de la PCR est de détecter de faibles charges fongiques dans les échantillons de LBA chez des patients développant des PPC granulomateuses pour lesquelles le diagnostic mycologique direct est généralement négatif [77].

Des trousses diagnostiques prêtes à l'emploi seront prochainement commercialisées et pourront remplacer les techniques « faites maison » actuellement utilisées par les laboratoires spécialisés. Leur utilisation permettra de limiter les variations interlaboratoires.

## Diagnostic sérologique

La détection des anticorps dirigés contre des fractions de la MSG pourrait représenter une approche pour le diagnostic sérologique de la PPC mais celle-ci n'a pas été développée pour une pratique de routine [78]. La détection des b-1, 3-D-glucanes sériques pour le diagnostic des infections fongiques profondes a trouvé des applications pour le diagnostic de la PPC. Un taux supérieur à 80-100 pg/ml est en faveur d'une PPC chez les patients qui, de plus, ne présentent pas d'autre infection fongique invasive [79, 80]. Cependant, ce test représente une méthode de diagnostic de deuxième intention car la mise en œuvre du diagnostic mycologique direct reste prioritaire.

## Autres paramètres biologiques

La PaO<sub>2</sub> est abaissée. Une valeur inférieure à 70 mmHg est un signe de gravité. Près de 80% des patients développant une PPC présentent une élévation des lactates déshydrogénases (LDH) sériques [19]. Toutefois, il est difficile d'utiliser l'élévation de ces enzymes sériques comme marqueur diagnostique spécifique de la PPC [19]. La majorité des patients infectés par le VIH qui développent une PPC présentent un déficit des lymphocytes CD4<sup>+</sup> caractérisé par une valeur inférieure à 200/mm<sup>3</sup> [81].

## Identification génotypique

Plusieurs approches ont été développées pour aborder l'identification génotypique de *P. jirovecii*. Il s'agit de méthodes fondées sur l'analyse d'un gène ou de plusieurs gènes ou loci avec ou sans séquençage [82, 83]. Les gènes ou loci les plus fréquemment retenus sont ceux codant l'ARN de la grande sous-unité du ribosome de la mitochondrie [84-87], les ITS1 et ITS2 [63, 65, 88, 89], la DHPS [54] et la MSG [90, 91]. Le polymorphisme du gène mtLSUrRNA est limité. Sept types ont été effectivement identifiés à partir du polymorphisme de ces positions [84-87]. Le polymorphisme des ITS1 et 2 est plus important. Un type ITS de *P. jirovecii* résulte de l'association d'un allèle ITS1 avec un allèle ITS2. Environ 60 types ont été décrits mais les types Eg et Ne représentent près de 50 % des types identifiés [63, 82].

L'analyse du locus DHPS occupe une place singulière dans les techniques de génotypage, car la DHPS est l'enzyme cible des sulfamides qui sont largement utilisés comme traitement préventif et curatif des infections à *P. jirovecii*. Le polymorphisme du locus DHPS est faible, mais deux principales mutations non synonymes ont été détectées en positions 165 et 171 [54, 92]. L'analyse des séquences incluant ces positions permet d'identifier de simples mutants ou des doubles mutants. Les facteurs de risques principaux pour développer une infection par des mutants sont les antécédents de traitement par les sulfamides ainsi que le lieu de résidence des patients [93, 94]. Ces deux facteurs sont compatibles

avec l'hypothèse que le champignon est transmis des patients infectés traités aux patients susceptibles non traités soit directement, soit via une hypothétique source environnementale. Pour ces raisons, l'analyse du locus DHPS peut servir de marqueur de circulation de *P. jirovecii* [95].

Par analogie avec d'autres micro-organismes tels que *Plasmodium* [96], mais aussi en raison de résultats de tests *in vitro* [97], il est admis que les mutants DHPS présentent une moindre sensibilité aux sulfamides. La présence de mutants DHPS chez les patients infectés a été corrélée aux échecs de prophylaxie par les sulfamides [94]. Toutefois, la présence de mutants DHPS chez les patients développant une PPC ne semble pas conduire en pratique à des échecs thérapeutiques patents.

Des techniques de *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) sur les gènes de la DHPS et de la MSG ont été développées [91, 98]. Les avantages de ces techniques sont leur moindre coût et leur rapidité car elles s'affranchissent du séquençage. Hauser et al. [83] ont développé une technique de *single strand conformation polymorphism* (SSCP) sur les gènes mtLSUrRNA, de l'ARN de la grande sous-unité du ribosome, de la β tubuline, et de l'ITS1. Cette technique multiloci est considérée comme la technique la plus discriminante [82, 99]. Elle est, en revanche, moins sensible que celle basée sur le séquençage des ITS1 et ITS2 pour le génotypage de *P. jirovecii* chez des patients infectés par de faibles charges fongiques. En outre, les résultats de génotypage obtenus à l'aide des techniques de PCR-RFLP sur la MSG et de SSCP par des laboratoires différents sont difficilement comparables, contrairement aux résultats obtenus par séquençage.

## “ Points essentiels

L'association de techniques microscopiques, dont l'une doit être panoptique, est indispensable pour la détection de *P. jirovecii* qui doit s'intégrer dans une démarche globale de diagnostic parasitologique et mycologique. La PCR est une technique sensible permettant de détecter de faibles charges fongiques qui peuvent être occultées par les techniques microscopiques. Dans la mesure où les infections à *P. jirovecii* résultent le plus souvent de l'acquisition de novo du champignon et non de la réactivation à partir d'un portage chronique de stades quiescents, un résultat de PCR positif doit être a priori interprété comme le reflet d'une infection évolutive. Ces faibles charges fongiques détectées par PCR peuvent également refléter des formes d'infections plus torpides, en particulier chez des patients présentant des maladies bronchiques et pulmonaires chroniques, pour lesquels un diagnostic alternatif à la pneumonie à *Pneumocystis* est possible. Dans ce contexte, le diagnostic de colonisation pulmonaire par *P. jirovecii* est souvent retenu a posteriori.

## Conclusion

Les infections à *P. jirovecii* restent d'actualité et les praticiens doivent conserver une expertise pour la pratique du diagnostic biologique. Celui-ci doit reposer sur l'examen microscopique comprenant une association de colorations panoptiques avec des colorations spécifiques ainsi qu'une technique de PCR. La détection des -1,3-D-glucanes sériques, encore peu utilisée pour le diagnostic de routine des mycoses profondes, se positionnera comme une technique complémentaire pour le diagnostic des infections à *P. jirovecii*.

## Références

- [1] Hughes W. Historical overview. In: Walzer P, Cushion M, editors. *Pneumocystis pneumonia*. New York: Marcel Dekker; 2005. p. 1–38.
- [2] Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis* 2002;8:891–6.
- [3] Institut de veille sanitaire. Infection à VIH et SIDA. <http://www.invs.sante.fr/bdd/index.htm>.
- [4] Sepkowitz KA. Opportunistic infections in patients with and patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clin Infect Dis* 2002;34:1098–107.
- [5] Magne D, Angoulvant A, Botterel F, Bouges-Michel C, Bougnoux ME, Chochillon C, et al. Surveillance de la pneumocystose dans 14 hôpitaux de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), France, 2003–2005. *Bull Epidémiol Hebdo* 2007;(n° 5):42–4.
- [6] Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* 1988;334:519–22.
- [7] Eriksson OE. *Pneumocystis carinii*, a parasite in lungs of mammals, referred to a new family and order (Pneumocystidaceae, Pneumocystidales, Ascomycota). *Systema Ascomycetorum* 1994;13:165–80.
- [8] Stringer SL, Hudson K, Blase MA, Walzer PD, Cushion MT, Stringer JR. Sequence from ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* compared to those of four fungi suggests an ascomycetous affinity. *J Protozool* 1989;36:14S–6S.
- [9] Ypmal-Wong MF, Fonzi WA, Sypherd PS. Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 1992;60:4140–5.
- [10] Redhead SA, Cushion MT, Frenkel JK, Stringer JR. *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. *J Eukaryot Microbiol* 2006;53:2–11.
- [11] Frenkel JK. *Pneumocystis jirovecii* n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. *Natl Cancer Inst Monogr* 1976;43:13–30.
- [12] Frenkel JK. *Pneumocystis* pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview. *J Eukaryot Microbiol* 1999;46:89S–92S.
- [13] Nevez G, Jounieaux V, Totet A. *Pneumocystis jirovecii*, not *Pneumocystis jirovecii*. *Chest* [letter]. 2006 6 march.
- [14] Casanova-Cardiel L, Leibowitz MJ. Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. *J Eukaryot Microbiol* 1997;44:28S.
- [15] Wakefield AE. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J Clin Microbiol* 1996;34:1754–9.
- [16] Dei-Cas E, Aliouat EM, Caillez J. *Pneumocystis* cellular structure. In: Walzer P, Cushion M, editors. *Pneumocystis pneumonia*. New York: Marcel Dekker; 2005. p. 61–94.
- [17] Matsumoto Y, Yoshida Y. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. *J Protozool* 1984;31:420–8.
- [18] Ng VL, Yajko DM, Hadley WK. Extrapulmonary pneumocystosis. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:401–18.
- [19] Huang L. Clinical presentation and diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-infected patients. In: Walzer P, Cushion M, editors. *Pneumocystis pneumonia*. New York: Marcel Dekker; 2005. p. 349–406.
- [20] Hartel PH, Shilo K, Klassen-Fischer M, Neafie RC, Ozbudak IH, Galvin JR, et al. Granulomatous reaction to *Pneumocystis jirovecii*: clinicopathologic review of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 2010;34:730–4.
- [21] Morris A, Scirba FC, Norris KA. *Pneumocystis*: a novel pathogen in chronic obstructive pulmonary disease? *COPD* 2008;5:43–51.
- [22] Nevez G, Totet A, Ganry O, Dorion I, Tabuteau S, Leclecq F, et al. *Pneumocystis jirovecii* detection using the polymerase chain reaction in patients with sarcoidosis. *J Med Mycol* 2002;12:183–6.
- [23] Le Gal S, Hery-Arnaud G, Ramel S, Virmaux M, Damiani C, Totet A, et al. *Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis in France. *Scand J Infect Dis* 2010;42:225–7.
- [24] Chagas C. Nova entidade morbid do homem: regimo general de estudos etiologicos e clinicos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1911;3:219–75.
- [25] Gajdusek DC. *Pneumocystis carinii*: Etiologic agent of interstitial plasma cell pneumonia of premature and young infants. *Pediatrics* 1957;19:543–65.
- [26] Tan-Vinh L, Cochard AM, Vu Trieu D, Solonar W. In Vivo Diagnosis of *Pneumocystis* Pneumonia. *Arch Fr Pediatr* 1963;20:773–92.
- [27] Fortuny IE, Tempero KF, Amsden TW. *Pneumocystis carinii* pneumonia diagnosed from sputum and successfully treated with pentamidine isethionate. *Cancer* 1970;26:911–3.
- [28] Finley R, Kieff E, Thomsen S, Fennessy J, Beem M, Lerner S, et al. Bronchial brushing in the diagnosis of pulmonary disease in patients at risk for opportunistic infection. *Am Rev Respir Dis* 1974;109:379–87.
- [29] Jacobs JB, Vogel C, Powell RD, DeVita VT. Needle biopsy in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Radiology* 1969;93:525–30.
- [30] Repsher LH, Schroter G, Hammond WS. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonitis by means of endobronchial brush biopsy. *N Engl J Med* 1972;287:340–1.
- [31] Ognibene FP, Shelhamer J, Gill V, Macher AM, Loew D, Parker MM, et al. The diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome using subsegmental bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1984;129:929–32.
- [32] Bigby TD, Margolskee D, Curtis JL, Michael PF, Sheppard D, Hadley WK, et al. The usefulness of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:515–8.
- [33] Roux P, Girard PM. Quels sont les indications, les impératifs techniques, la sensibilité et le bénéfice de l'expectoration induite dans le diagnostic de la pneumopathie à *Pneumocystis carinii*? *Med Mal Infect* 1990;20:339–46.
- [34] Gill VJ, Nelson NA, Stock F, Evans G. Optimal use of the cytocentrifuge for recovery and diagnosis of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage and sputum specimens. *J Clin Microbiol* 1988;26:1641–4.
- [35] Chalvardjian AM, Grawe LA. A new procedure for the identification of *Pneumocystis carinii* cyst in tissue section and smears. *J Clin Pathol* 1963;16:383–4.
- [36] Grocott RG. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *Am J Clin Pathol* 1955;25:975–9.
- [37] Musto L, Flanigan M, Elbadawi A. Ten-minute silver stain for *Pneumocystis carinii* and fungi in tissue sections. *Arch Pathol Lab Med* 1982;106:292–4.
- [38] Marty P, Dellamonica P, Le Fichoux Y, Bernard E, Pagliardini G, Villevieille J. *Pneumocystis carinii* Delanoe and Delanoe, 1912. The different methods of identification. *Ann Parasitol Hum Comp* 1981;56:363–74.
- [39] Van der Meer G, Brug LS. Infection à *Pneumocystis carinii* chez l'homme et chez les animaux. *Ann Soc Belge Med Trop* 1942;22:301–7.
- [40] Dournon E, Rajagopalan P, Albert F, Camus F, Marche C, McLauchlin J, et al. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by non-experts. *Lancet* 1989;1:107–8.
- [41] Kovacs JA, Gill V, Swan JC, Ognibene F, Shelhamer J, Parrillo JE, et al. Prospective evaluation of a monoclonal antibody in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 1986;2:1–3.
- [42] Kovacs JA, Ng VL, Masur H, Leoung G, Hadley WK, Evans G, et al. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 1988;318:589–93.
- [43] Linder E, Elvin K, Bjorkman A, Bergdahl S, Morfeldt-Mansson L, Moberg L, et al. Monoclonal antibody to detect *Pneumocystis carinii*. *Lancet* 1986;2:634.
- [44] Stratton N, Hryniwiewski J, Aarna SL, Tan G, de la Maza LM, Peterson EM. Comparison of monoclonal antibody and calcofluor white stains for the detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1991;29:645–7.
- [45] Merali S, Frevert U, Williams JH, Chin K, Bryan R, Clarkson Jr AB. Continuous axenic cultivation of *Pneumocystis carinii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2402–7.
- [46] Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 1990;336:451–3.
- [47] 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* 2010;doi:10.1111/j.1469-0991.2010.03400.x.
- [48] Meliani L, Develoux M, Marteau-Miltgen M, Magne D, Barbu V, Poirot JL, et al. Real time quantitative PCR assay for *Pneumocystis jirovecii* detection. *J Eukaryot Microbiol* 2003;50(suppl):S651.
- [49] Tsolaki AG, Beckers P, Wakefield AE. Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*: high genotype similarity with contemporary isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36:90–3.
- [50] Kovacs JA, Powell F, Edman JC, Lundgren B, Martinez A, Drew B, et al. Multiple genes encode the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J Biol Chem* 1993;268:6034–40.

- 531 [51] Larsen HH, Masur H, Kovacs JA, Gill VJ, Silcott VA, Kogulan P, et al.  
532 Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time  
533 PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin*  
534 *Microbiol* 2002;**40**:490–4.
- 535 [52] Olsson M, Elvin K, Lofdahl S, Linder E. Detection of *Pneumocystis*  
536 *carinii* DNA in sputum and bronchoalveolar lavage samples by  
537 polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;**31**:221–6.
- 538 [53] Alvarez-Martinez MJ, Miro JM, Valls ME, Moreno A, Rivas PV, Sole  
539 M, et al. Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for  
540 the detection of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens. *Diagn*  
541 *Microbiol Infect Dis* 2006;**56**:153–60.
- 542 [54] Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, et al.  
543 Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J*  
544 *Infect Dis* 1997;**175**:482–5.
- 545 [55] Ndam NG, Dumont B, Demanche C, Chapel A, Lacube P, Guillot J,  
546 et al. Development of a real-time PCR-based fluorescence assay for  
547 rapid detection of point mutations in *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate  
548 synthase gene. *J Eukaryot Microbiol* 2003;**50**(suppl):658–60.
- 549 [56] Bandt D, Monecke S. Development and evaluation of a real-time  
550 PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii*. *Transpl Infect Dis*  
551 2007;**9**:196–202.
- 552 [57] Schluger N, Godwin T, Sepkowitz K, Armstrong D, Bernard E, Rifkin M, et al. Application of DNA amplification to pneumocystosis: presence of serum *Pneumocystis carinii* DNA during human and experimentally induced *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Exp Med* 1992;**176**:1327–33.
- 553 [58] Lu JJ, Chen CH, Bartlett MS, Smith JW, Lee CH. Comparison of six  
554 different PCR methods for detection of *Pneumocystis carinii*. *J Clin*  
555 *Microbiol* 1995;**33**:2785–8.
- 556 [59] Kitada K, Oka S, Kimura S, Shimada K, Serikawa T, Yamada J, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* sequences by polymerase chain reaction: animal models and clinical application to noninvasive specimens. *J Clin Microbiol* 1991;**29**:1985–90.
- 557 [60] Palladino S, Kay I, Fonte R, Flexman J. Use of real-time PCR and the LightCycler system for the rapid detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;**39**:233–6.
- 558 [61] Brancart F, Rodriguez-Villalobos H, Fonteyne PA, Peres-Bota D, Liesnard C. Quantitative TaqMan PCR for detection of *Pneumocystis*  
559 *jirovecii*. *J Microbiol Methods* 2005;**61**:381–7.
- 560 [62] Edlind TD, Bartlett MS, Weinberg GA, Prah GN, Smith JW. The beta-tubulin gene from rat and human isolates of *Pneumocystis carinii*. *Mol*  
561 *Microbiol* 1992;**6**:3365–73.
- 562 [63] Lee CH, Helweg-Larsen J, Tang X, Jin S, Li B, Bartlett MS, et al. Update on *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1998;**36**:734–41.
- 563 [64] Lu JJ, Bartlett MS, Shaw MM, Queener SF, Smith JW, Ortiz-Rivera M, et al. Typing of *Pneumocystis carinii* strains that infect humans based on nucleotide sequence variations of internal transcribed spacers of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1994;**32**:2904–12.
- 564 [65] Tsolaki AG, Miller RF, Underwood AP, Banerji S, Wakefield AE. Genetic diversity at the internal transcribed spacer regions of the rRNA operon among isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia. *J Infect Dis* 1996;**174**:141–56.
- 565 [66] Kaiser K, Rabdonirina M, Picot S. Real time quantitative PCR and RT-PCR for analysis of *Pneumocystis carinii hominis*. *J Microbiol*  
566 *Methods* 2001;**45**:113–8.
- 567 [67] Huggett JF, Taylor MS, Kocjan G, Evans HE, Morris-Jones S, Gant V, et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax* 2008;**63**:154–9.
- 568 [68] Rohner P, Jacome V, Studer R, Schrenzel J, Graf JD. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by two staining methods and two quantitative PCR assays. *Infection* 2009;**37**:261–5.
- 569 [69] Lundgren B, Wakefield AE. PCR for detecting *Pneumocystis carinii* in clinical or environmental samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998;**22**:97–101.
- 570 [70] Robberts FJ, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jirovecii*: evaluation of 9 assays. *Diagn*  
571 *Microbiol Infect Dis* 2007;**58**:385–92.
- 572 [71] Helweg-Larsen J. *Pneumocystis jirovecii*. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. *Dan Med Bull* 2004;**51**:251–73.
- 573 [72] Chen W, Gigliotti F, Harmsen AG. Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 1993;**61**:5406–9.
- 574 [73] Keely SP, Baughman RP, Smulian AG, Dohn MN, Stringer JR. Source of *Pneumocystis carinii* in recurrent episodes of pneumonia in AIDS patients. *AIDS* 1996;**10**:881–8.
- 575 [74] Peters SE, Wakefield AE, Sinclair K, Millard PR, Hopkin JM. A search for *Pneumocystis carinii* in post-mortem lungs by DNA amplification. *J Pathol* 1992;**166**:195–8.
- 576 [75] Flori P, Bellete B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, et al. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J Med Microbiol* 2004;**53**:603–7.
- 577 [76] Fujisawa T, Suda T, Matsuda H, Inui N, Nakamura Y, Sato J, et al. Real-time PCR is more specific than conventional PCR for induced sputum diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in immunocompromised patients without HIV infection. *Respirology* 2009;**14**:203–9.
- 578 [77] Wakefield AE, Miller RF, Guiver LA, Hopkin JM. Granulomatous *Pneumocystis carinii* pneumonia: DNA amplification studies on bronchoscopy alveolar lavage samples. *J Clin Pathol* 1994;**47**:664–6.
- 579 [78] Walzer PD, Djawie K, Levin L, Daly KR, Koch J, Kingsley L, et al. Long-term serologic responses to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein in HIV-positive individuals with and without *P. jirovecii* infection. *J Infect Dis* 2009;**199**:1335–44.
- 580 [79] Desmet S, Van Wijngaarden E, Maertens J, Verhaegen J, Verbeken E, De Munter P, et al. Serum (1-3)-beta-D-glucan as a tool for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection or hematological malignancy. *J Clin Microbiol* 2009;**47**:3871–4.
- 581 [80] Shimizu Y, Sunaga N, Dobashi K, Fueki M, Fueki N, Makino S, et al. Serum markers in interstitial pneumonia with and without *Pneumocystis jirovecii* colonization: a prospective study. *BMC Infect Dis* 2009;**9**:47.
- 582 [81] Masur H, Ognibene FP, Yarchoan R, Shelhamer JH, Baird BF, Travis W, et al. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* 1989;**111**:223–31.
- 583 [82] Beard CB, Roux P, Nevez G, Hauser PM, Kovacs JA, Unnasch TR, et al. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. *Emerg Infect Dis* 2004;**10**:1729–35.
- 584 [83] Hauser PM, Blanc DS, Bille J, Francioli P. Typing methods to approach *Pneumocystis carinii* genetic heterogeneity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998;**22**:27–35.
- 585 [84] Latouche S, Ortona E, Mazars E, Margutti P, Tamburini E, Siracusano A, et al. Biodiversity of *Pneumocystis carinii hominis*: typing with different DNA regions. *J Clin Microbiol* 1997;**35**:383–7.
- 586 [85] Lee CH, Lu JJ, Bartlett MS, Durkin MM, Liu TH, Wang J, et al. Nucleotide sequence variation in *Pneumocystis carinii* strains that infect humans. *J Clin Microbiol* 1993;**31**:754–7.
- 587 [86] Wakefield AE. Genetic heterogeneity in human-derived *Pneumocystis carinii*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998;**22**:59–65.
- 588 [87] Wakefield AE, Fritscher CC, Malin AS, Gwanzura L, Hughes WT, Miller RF. Genetic diversity in human-derived *Pneumocystis carinii* isolates from four geographical locations shown by analysis of mitochondrial rRNA gene sequences. *J Clin Microbiol* 1994;**32**:2959–61.
- 589 [88] Nevez G, Totet A, Jounieaux V, Schmit JL, Dei-Cas E, Raccourt C. *Pneumocystis jirovecii* internal transcribed spacer types in patients colonized by the fungus and in patients with pneumocystosis from the same French geographic region. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:181–6.
- 590 [89] Totet A, Pautard JC, Raccourt C, Roux P, Nevez G. Genotypes at the internal transcribed spacers of the nuclear rRNA operon of *Pneumocystis jirovecii* in nonimmunosuppressed infants without severe pneumonia. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:1173–80.
- 591 [90] Ma L, Kutty G, Jia Q, Imamichi H, Huang L, Atzori C, et al. Analysis of variation in tandem repeats in the intron of the major surface glycoprotein expression site of the human form of *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 2002;**186**:1647–54.
- 592 [91] Ripamonti C, Orenstein A, Kutty G, Huang L, Schuhegger R, Sing A, et al. Restriction fragment length polymorphism typing demonstrates substantial diversity among *Pneumocystis jirovecii* isolates. *J Infect Dis* 2009;**200**:1616–22.
- 593 [92] Ma L, Borio L, Masur H, Kovacs JA. *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim-sulfamethoxazole or dapsone use. *J Infect Dis* 1999;**180**:1969–78.
- 594 [93] Huang L, Beard CB, Creasman J, Levy D, Duchin JS, Lee S, et al. Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *J Infect Dis* 2000;**182**:1192–8.

- 684 [94] Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, Lane BR, Bartlett MS, Smith JW,  
685 et al. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone  
686 prophylaxis failures in AIDS patients. *AIDS* 1998;12:873–8.  
687 [95] Totet A, Latouche S, Lacube P, Pautard JC, Jounieaux V, Raccourt C, et al. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes  
688 in immunocompetent infants and immunosuppressed adults, Amiens,  
689 France. *Emerg Infect Dis* 2004;10:667–73.  
690 [96] Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE.  
691 Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria  
692 parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine.  
693 *Eur J Biochem* 1994;224:397–405.  
694 [97] Iliades P, Walker DJ, Castelli L, Satchell J, Meshnick SR, Macreadie IG. Cloning of the *Pneumocystis jirovecii* trifunctional FAS gene  
695 and complementation of its DHPS activity in Escherichia coli. *Fungal Genet Biol* 2004;41:1053–62.  
696 [98] Diop-Santos L, Lacube P, Latouche S, Kac G, Mayaud C, Marteau M,  
697 et al. Contribution of dihydropteroate synthase gene typing for *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis* epidemiology. *J Eukaryot Microbiol*  
698 1999;46:133S–4S.  
699 [99] Hauser PM, Blanc DS, Sudre P, Senggen Manoloff E, Nahimana A, Bille J, et al. Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* in HIV-positive and -negative patients as revealed by PCR-SSCP typing. *AIDS* 2001;15:461–6.

## Pour en savoir plus

- 700 Walzer P, Cushion M. *Pneumocystis pneumonia*. New York: Marcel Dekker;  
701 2005.  
702 Helweg-Larsen. *Pneumocystis jiroveci*. Applied molecular microbiology,  
703 epidemiology and diagnosis. *Dan Med Bull* 2004;51:251–73.  
704  
705  
706  
707

S. Le Gal.

Université européenne de Bretagne, Université de Brest, LUBEM-EA 3882, IFR 148, Faculté de médecine, 22, avenue Camille-Desmoulins, CS 93837, 29238 Brest cedex 3, France.

CHU de Brest, Laboratoire de parasitologie et mycologie, 5, avenue Foch, 29269 Brest cedex 9, France.

C. Damiani.

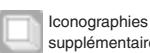
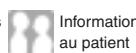
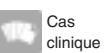
A. Totet.

Université de Picardie Jules Verne, CHU d'Amiens, Service de parasitologie et mycologie médicales, place Victor-Pauchet, 80054 Amiens cedex 1, France.

G. Nevez (Gilles.nevez@chu-brest.fr).

Université européenne de Bretagne, Université de Brest, LUBEM-EA 3882, IFR 148, Faculté de médecine, 22, avenue Camille-Desmoulins, CS 93837, 29238 Brest cedex 3, France.

CHU de Brest, Laboratoire de parasitologie et mycologie, 5, avenue Foch, 29269 Brest cedex 9, France.

Toute référence à cet article doit porter la mention : Le Gal S, Damiani C, Totet A, Nevez G. Pneumocystis : diagnostic biologique des infections à *Pneumocystis jirovecii*. EMC - Biologie médicale 2012;0(0):1-8 [Article 90-35-0098-A].713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723724  
725**Disponibles sur www.em-consulte.com**Arbres  
décisionnelsIconographies  
supplémentairesVidéos/  
AnimationsDocuments  
légauxInformation  
au patientInformations  
supplémentairesAuto-  
évaluationsCas  
clinique

## Résumé

Le genre *Pneumocystis* désigne un groupe de champignons opportunistes présentant une étroite spécificité d'hôte. Il détermine lors d'immunodépression sévère une infection pulmonaire grave, la pneumonie à *Pneumocystis* (PPC). La transmission de *Pneumocystis* par voie aérienne d'un hôte développant une PPC à un hôte susceptible a été démontrée à l'aide des modèles murins. Les travaux menés chez la souris ont montré également que des sujets immunocompétents colonisés par *Pneumocystis murina* peuvent transmettre le champignon à des souris immunodéprimées qui développeront une PPC ultérieurement. Les individus colonisés par *Pneumocystis* sp., ainsi que ceux développant une PPC, participeraient au réservoir du champignon. La survenue de cas groupés de PPC en milieu hospitalier est en faveur de la transmission interindividuelle de *Pneumocystis jirovecii* (*P.jirovecii*) chez l'homme. La détection de l'ADN de *P.jirovecii* dans l'air exhalé par les patients développant une PPC suggère que cette transmission se fait par voie aérienne.

La caractérisation des populations infectées par *P.jirovecii* et la caractérisation génotypique du champignon au sein de son réservoir humain constituent la base de ce travail de recherche. Nous avons montré que la prévalence de la colonisation par *P.jirovecii* est faible chez les patients atteints de mucoviscidose et suivis dans notre CHU. La participation de ces patients au réservoir de *P.jirovecii* à Brest serait donc marginale. Cette faible prévalence pourrait être le reflet d'une faible circulation du champignon dans les communautés humaines dans notre région. Nous avons évalué le dosage du  $\beta$ -1,3-D glucane sérique pour dépister les populations infectées. Ce dosage couplé à la détection de *P.jirovecii* dans les prélèvements respiratoires par la microscopie et la PCR, permet de différencier les patients développant une PPC et les patients présentant une colonisation pulmonaire par *P.jirovecii*. De plus, les premières données sur le  $\beta$ -1,3-D glucane au cours de la primo-infection chez le nourrisson ont été obtenues.

En termes de caractérisation de *P.jirovecii* dans notre région, l'analyse du locus dihydropteroate synthase (DHPS) a montré que: i) le lieu habituel de résidence plutôt que le lieu de diagnostic de l'infection à *P.jirovecii* serait un facteur prédictif d'infection par un mutant, ii) *P.jirovecii* pourrait circuler en France d'une région à une autre via des voyageurs infectés, iii) la prévalence de mutants potentiellement résistants chez les patients vivant effectivement à Brest était de 0%. L'analyse des séquences des "internal transcribed spacers" (ITS) 1 et 2 de *P.jirovecii* conforte l'hypothèse que les patients développant une PPC et les patients colonisés sont infectés par des populations fongiques présentant des caractéristiques identiques. Tous les patients, quelle que soit la présentation clinique de leur infection, constituerait un réservoir unique et commun de *P.jirovecii*. Les travaux de génotypage ont constitué l'étape préalable nécessaire à l'analyse de cas groupés d'infections à *P.jirovecii* survenus chez des patients transplantés rénaux au CHU de Brest. Nous avons apporté des données originales sur le rôle des patients colonisés en tant que source potentielle de *P.jirovecii* dans un contexte d'acquisition et de transmission nosocomiales du champignon. Par ailleurs, la concordance partielle ou complète des génotypes ITS et DHPS dans les couples "prélèvements d'air-LBA" réalisés chez des patients développant une PPC est compatible avec l'exhalation du champignon et sa diffusion aérienne dans l'environnement hospitalier. Ces données apportent des arguments pour l'application de mesures de prévention des infections nosocomiales à *P.jirovecii*. Les précautions "gouttelettes" recommandées par la Société Française d'Hygiène Hospitalière devraient être appliquées *a minima* aux patients développant une PPC. Nous proposons leur extension aux patients colonisés par le champignon.

## Summary

The genus *Pneumocystis* represents a group of opportunistic fungi that show strong host specificity. It is the cause of severe pneumonia (*Pneumocystis* Pneumonia [PCP]) in immunocompromised subjects. *Pneumocystis* transmission from a host with PCP to another susceptible host via the airborne route has been demonstrated in rodent models. Moreover, it has been established that *Pneumocystis murina* can be transmitted from immunocompetent mice, transiently colonized by the fungus, to immunocompromised susceptible mice that subsequently develop PCP. Colonized subjects and those developing PCP may be part of the fungus reservoir. Reports of PCP case cluster in hospital strongly suggest that *Pneumocystis jirovecii* (*P.jirovecii*) transmission in humans may also occur. *P.jirovecii* DNA detection in the air surrounding PCP patients is consistent with the transmission of *P.jirovecii* via the airborne route.

Our goals were to characterize human populations infected with *P.jirovecii* and to characterize *P.jirovecii* within its human reservoir. We showed that *P.jirovecii* was rarely involved in pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis monitored in the Brest Hospital. Thus this patient population was not part of the human reservoir of the fungus in our region (Brittany, Western France). This low prevalence of colonization may reflect a low level of *P.jirovecii* circulation within human communities in Brittany. In order to improve the identification of patients infected with *P.jirovecii*, we evaluated  $\beta$ -1,3-D glucan detection in serum samples. We showed that serum  $\beta$ -1,3-D glucan levels combined with *P.jirovecii* detection in pulmonary samples using microscopic examination and a PCR assay make it possible to distinguish between PCP and pulmonary colonization. Moreover the first data on  $\beta$ -1,3-D glucan levels during primary infection were obtained. In order to characterize *P.jirovecii* in our region, we performed the typing of *P.jirovecii* isolates from infected patients monitored at Brest hospital, using the dihydropteroate synthase (DHPS) and the internal transcribed spacer (ITS) 1 and 2 locus analysis. DHPS typing showed that i) the usual city of patient residence rather than the city in which the diagnosis of *P.jirovecii* infection has been made is a predictor of mutants, ii) mutants can be imported from one region to another through infected visitors, iii) the prevalence of mutants potentially resistant to sulfonamides was 0% in patients who effectively lived in the Brest geographic area. Results of ITS analysis in PCP patients and colonized patients are consistent with the hypothesis that these 2 patient groups are infected with similar *P.jirovecii* populations. All infected patients, whatever their clinical presentation, may be part of a common and unique reservoir of the fungus.

We investigated an outbreak of *P.jirovecii* infections in 18 renal transplant recipients using the same typing method combined with patient encounter analysis. The results provided evidence of the role of colonized patients as potential sources of *P.jirovecii*. The same typing method was applied to pairs of pulmonary samples and room air samples of PCP patients. Full or partial matches of *P.jirovecii* types in pulmonary and air sample pairs were observed. These results are consistent with *P.jirovecii* exhalation by PCP patients in their close environment. These data support arguments for applying droplet precautions, at least to PCP patients, to prevent *P.jirovecii* transmission, as recommended by the "Société française d'hygiène hospitalière". We suggest extending droplet precautions to colonized patients to achieve the prevention of *P.jirovecii* nosocomial infections.



n° d'ordre :  
Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé  
22 avenue Camille Desmoulins – CS 93837  
29238 Brest cedex 3