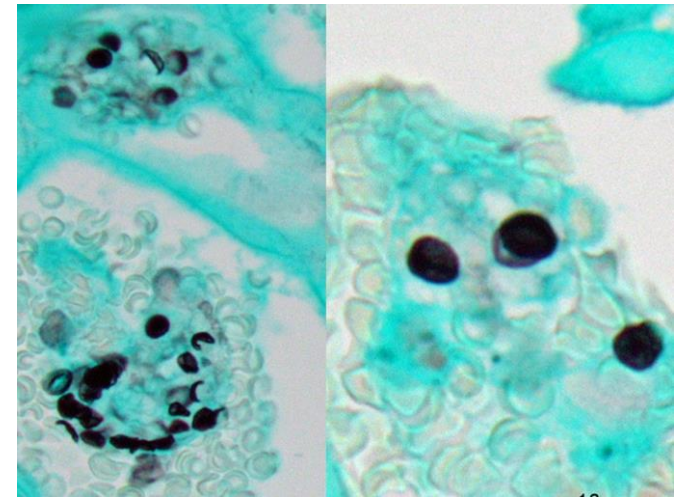


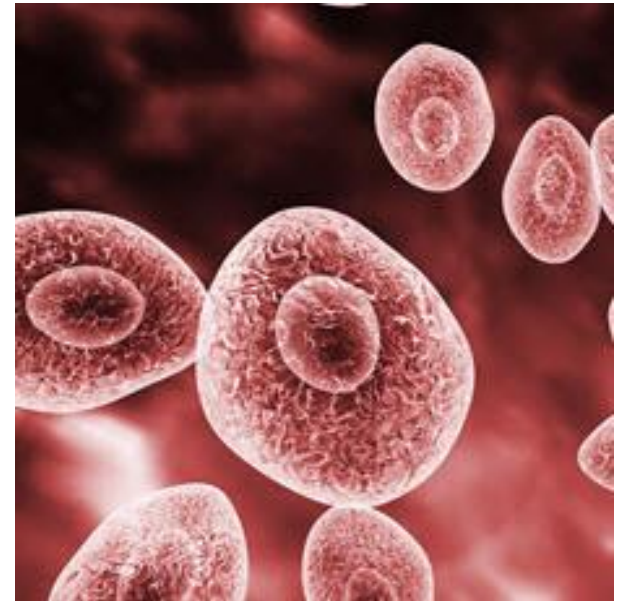
Pneumocystis jirovecii. ¿Colonización o infección?

Ana González González.
LE Microbiología y Parasitología.
Hospital de León. 18.04.2024



Índice

- Introducción
- Epidemiología
- Definición Infección por *Pneumocystis*
- Diagnóstico microbiológico
- Conclusiones



Introducción

- Conocido antiguamente como *Pneumocystis carinii* y clasificado como parásito protozoo, ***Pneumocystis jirovecii* (Pj)** es un hongo oportunista responsable de neumonía grave en pacientes inmunodeprimidos.
- El principal factor de riesgo para el desarrollo de neumonía por *Pneumocystis* (PCP) es la infección VIH avanzada con un recuento de linfocitos T **CD4 inferior a 200** células/mm³. La introducción de nuevos antirretrovirales que ha llevado a un mejor control de la infección en los últimos años ha disminuido la incidencia de PCP en esta población.
- Actualmente, es más común en personas inmunocomprometidas como pacientes con neoplasias malignas sólidas o hematopoyéticas y pacientes en tratamiento inmunosupresor prolongado (medicamentos biológicos). Estos pacientes desarrollan un cuadro clínico más agudo y grave y cargas fúngicas más bajas en sus tractos respiratorios en comparación con los pacientes VIH-positivos.

Introducción

- *Pneumocystis jirovecii* es un **colonizador fúngico transitorio** de los **alveolos** pulmonares en el ser humano. Aunque no se conoce de manera exacta el modo de adquisición de la infección, es probable que tenga lugar por la ruta aérea y se propague persona a persona.
- Los estudios seroepidemiológicos sugieren que el contacto primario con el organismo ocurre en la infancia sin apenas desarrollar sintomatología. No existe evidencia molecular de una infección verdaderamente latente y se cree que la enfermedad surge por colonización previa o por nueva infección. En pacientes inmunocomprometidos, el organismo puede proliferar y causar enfermedad pulmonar. Las manifestaciones extrapulmonares son raras y pueden estar asociadas a formas atípicas de *P. jirovecii*

Epidemiología

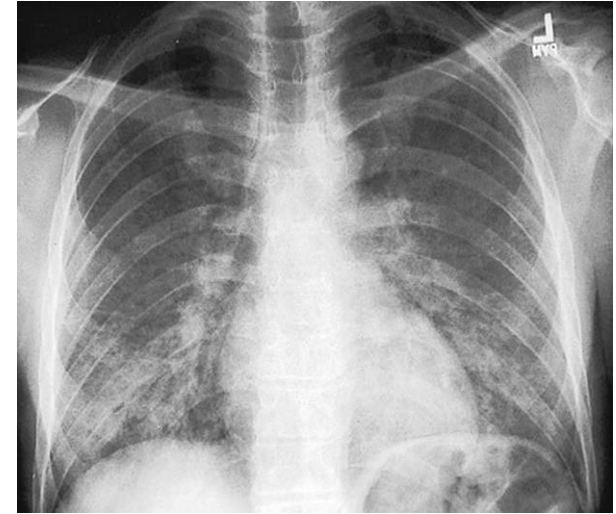
- *Pneumocystis jirovecii* se descubrió por primera vez como patógeno humano durante la Segunda Guerra Mundial donde se detectó como el agente causal de neumonías en orfanatos en Europa, revistiendo especial gravedad en aquellos niños con LLA.
- Su mayor desarrollo tuvo lugar durante la epidemia del VIH en los años 80. Se estima que en torno al 2/3 de la población con SIDA desarrolló PCP.
- La **mortalidad de la PCP** en pacientes hospitalizados varia del **7 al 20%** en función de los estudios y **es superior en pacientes con inmunosupresión no VIH-positivos** debido al retardo en el diagnóstico (en VIH profilaxis si $CD4 < 200$) y a la mayor proporción de células inflamatorias en estos pacientes en comparación con aquellos con VIH.

Epidemiología

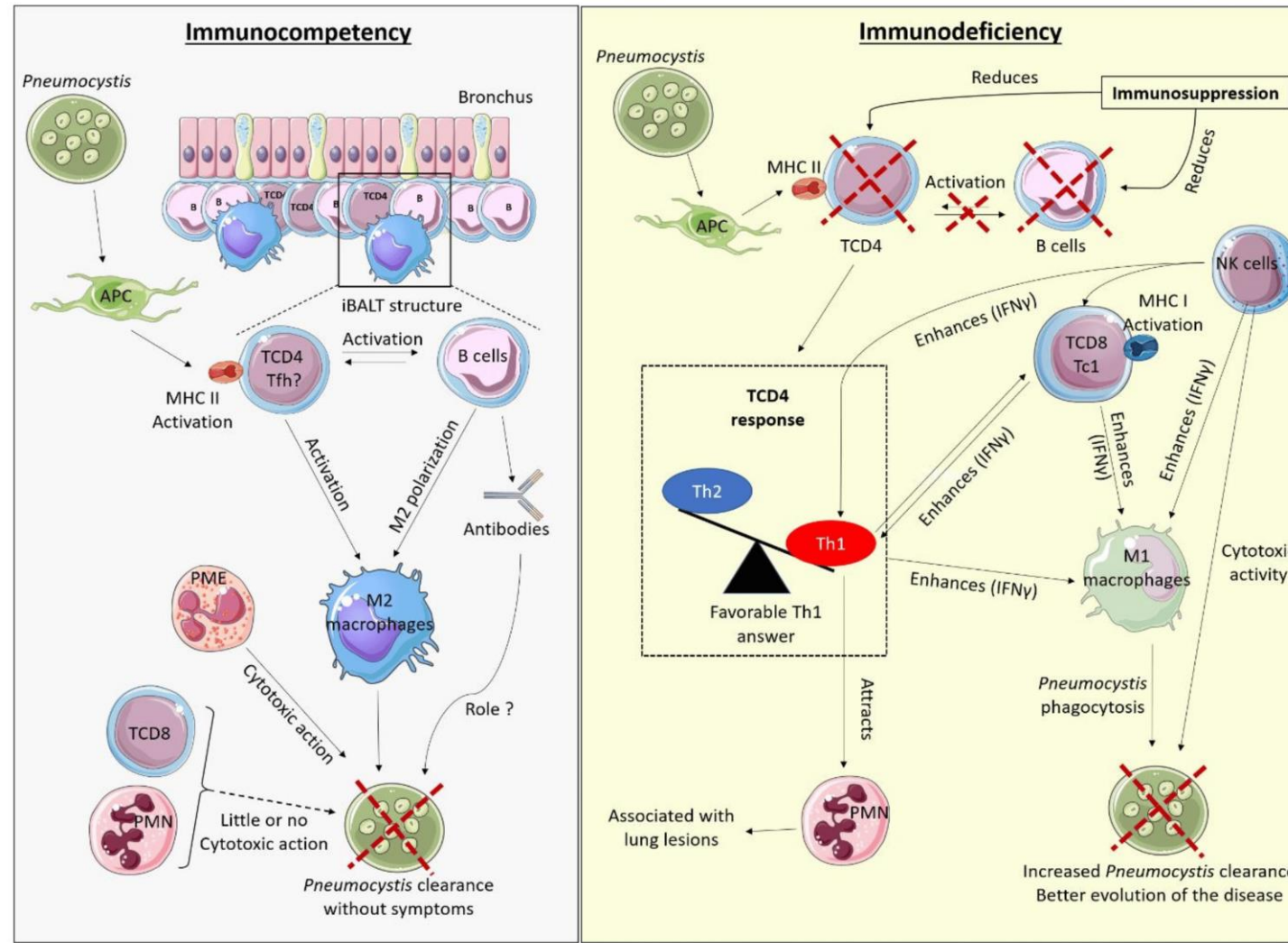
- Se estima que en torno al 20% de los niños y el 20-30% de adultos con cáncer hematológico o sarcoma pueden desarrollar una infección por *Pneumocystis*.
- En el caso de tumores cerebrales tratados con corticoides la incidencia es de en torno al 6%

Manifestaciones clínicas

- Bastante **inespecíficas**- Dificultad diagnóstica



- Disnea, fiebre de bajo grado, tos no productiva, neumonía bilateral.
- Los pacientes suelen presentarse taquipneicos y taquicárdicos.
- Sintomatología más aguda y grave en pacientes no VIH-positivos.



Criteria para definir infección por *Pneumocystis*

Clinical Infectious Diseases

SUPPLEMENT ARTICLE



Pneumocystis jirovecii Disease: Basis for the Revised EORTC/MSGERC Invasive Fungal Disease Definitions in Individuals Without Human Immunodeficiency Virus

Katrien Lagrou,^{1,2,a} Sharon Chen,^{3,a} Henry Masur,⁴ Claudio Viscoli,^{5,b} Catherine F. Decker,⁶ Livio Pagano,⁷ and Andreas H. Groll⁸

¹Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, KU Leuven, Leuven, Belgium, ²Department of Laboratory Medicine and National Reference Centre for Mycosis, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium, ³Centre for Infectious Diseases and Microbiology Laboratory Services, Institute of Clinical Pathology and Medical Research, New South Wales Health Pathology, Westmead Hospital and the University of Sydney, Sydney, Australia, ⁴Department of Critical Care Medicine, National Institutes of Health Clinical Center, Bethesda, Maryland, USA, ⁵Division of Infectious Diseases, University of Genoa (DISSAL) and Ospedale Policlinico San Martino, Genoa, Italy, ⁶Infectious Disease Division, Department of Medicine, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, Maryland, USA, ⁷Istituto di Ematologia, Policlinico Universitario A. Gemelli-IRCCS, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy, and ⁸Infectious Disease Research Program, Center for Bone Marrow Transplantation and Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Children's Hospital Muenster, Muenster, Germany

Pneumonía por *Pneumocystis*

Table 1. Host Factors, Clinical Criteria, and Microbiologic Criteria Used for the Definition of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia

Description	
Host factors	• Use of therapeutic doses of ≥ 0.3 mg/kg prednisone equivalent for ≥ 2 weeks in the past 60 days • Low CD4+ lymphocyte counts (observed or expected; < 200 cells/mm³) induced by a medical condition, anticancer, anti-inflammatory, and immunosuppressive treatment, including but not limited to: - Primary immunodeficiencies with numeric/functional T-cell deficiency - Acute leukemia, non-Hodgkin's lymphoma, solid tumors, allogeneic HSCT - Solid-organ transplantation - Autoimmune- and hyperinflammatory disorders, including treatment with agents that lead to functional T-cell deficiencies
Clinical criteria	• Fever • Respiratory symptoms including cough, dyspnea, or hypoxemia • Bilateral or diffuse GGO on X-ray with interstitial infiltrates as the predominant feature; alveolar, alveolar-interstitial, and unilateral infiltrates are less frequent • Extensive, mostly diffuse GGO on CT scans, which typically has an upper lobe and perihilar predominance, sometimes with peripheral sparing or a mosaic pattern; consolidations, small nodules, and unilateral infiltrates are less frequent
Microbiologic criteria	• Visualization of <i>P. jirovecii</i> by microscopy using conventional staining methods (Gomori methenamine silver, Toluidine Blue O, Giemsa, Calcofluor White) or immunofluorescence staining in tissue, BAL fluid, induced sputum, expectorated sputum, or oral wash • Amplification of <i>P. jirovecii</i> DNA by quantitative real-time PCR in BAL fluid, induced sputum, or oral wash • Detection of β-D-glucan in serum if another invasive fungal infection and a false-positive result can be ruled out

Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; CT, computed tomography; GGO, ground-glass opacity; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; PCR, polymerase chain reaction.

Table 2. Diagnostic Criteria for Definition of Proven and Probable *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia

Description	
Proven PCP	• Clinical and radiologic criteria, plus: - Demonstration of <i>P. jirovecii</i> by microscopy using conventional or immunofluorescence staining in tissue or - Demonstration of <i>P. jirovecii</i> by microscopy using conventional or immunofluorescence staining in respiratory specimens
Probable PCP	• Appropriate host factors and clinical and radiologic criteria, plus: - Amplification of <i>P. jirovecii</i> DNA by quantitative real-time PCR in respiratory specimen or - Detection of β-D-glucan in serum (alternative method; another IFD and a false-positive result should be ruled out)

Abbreviations: IFD, invasive fungal diseases; PCP, *Pneumocystis jirovecii* pneumonia; PCR, polymerase chain reaction.

Diagnóstico microbiológico

- El diagnóstico de PCP no es sencillo porque no suele producir expectoración ni infecciones invasivas y en pacientes inmunocomprometidos es difícil discernirlo de otras enfermedades pulmonares
- Además no es un microorganismo que pueda ser cultivado y visualizado al microscopio mediante técnicas rutinarias
- Muestras adecuadas: Lavado Broncoalveolar, esputo inducido, tejido pulmonar/transbronquial

Diagnóstico microbiológico

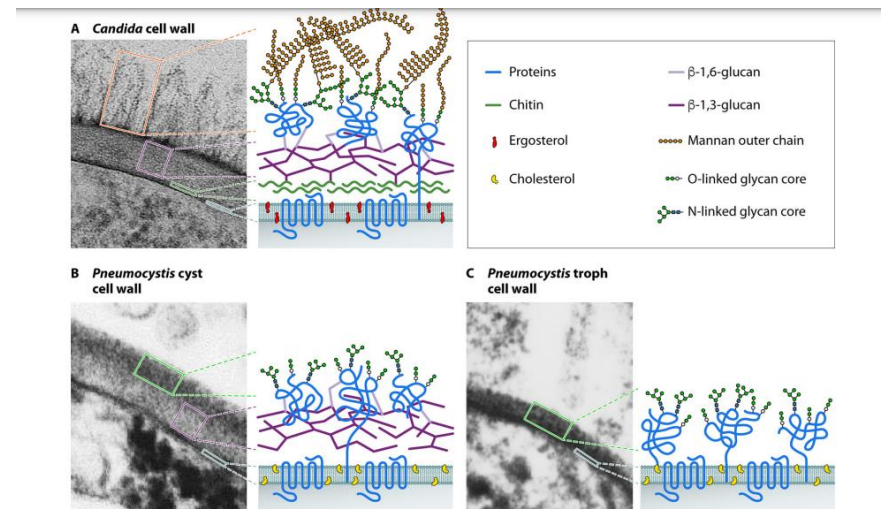
- **Serológico:** Detección de antígenos o anticuerpos frente al microorganismo
- **Molecular:** Detección de material genético. Técnica más sensible. No permite diferenciar colonización de infección.
- **Microscópico:** Técnica con menor sensibilidad. Necesidad de personal experto. Detecta infección.



Diagnóstico serológico

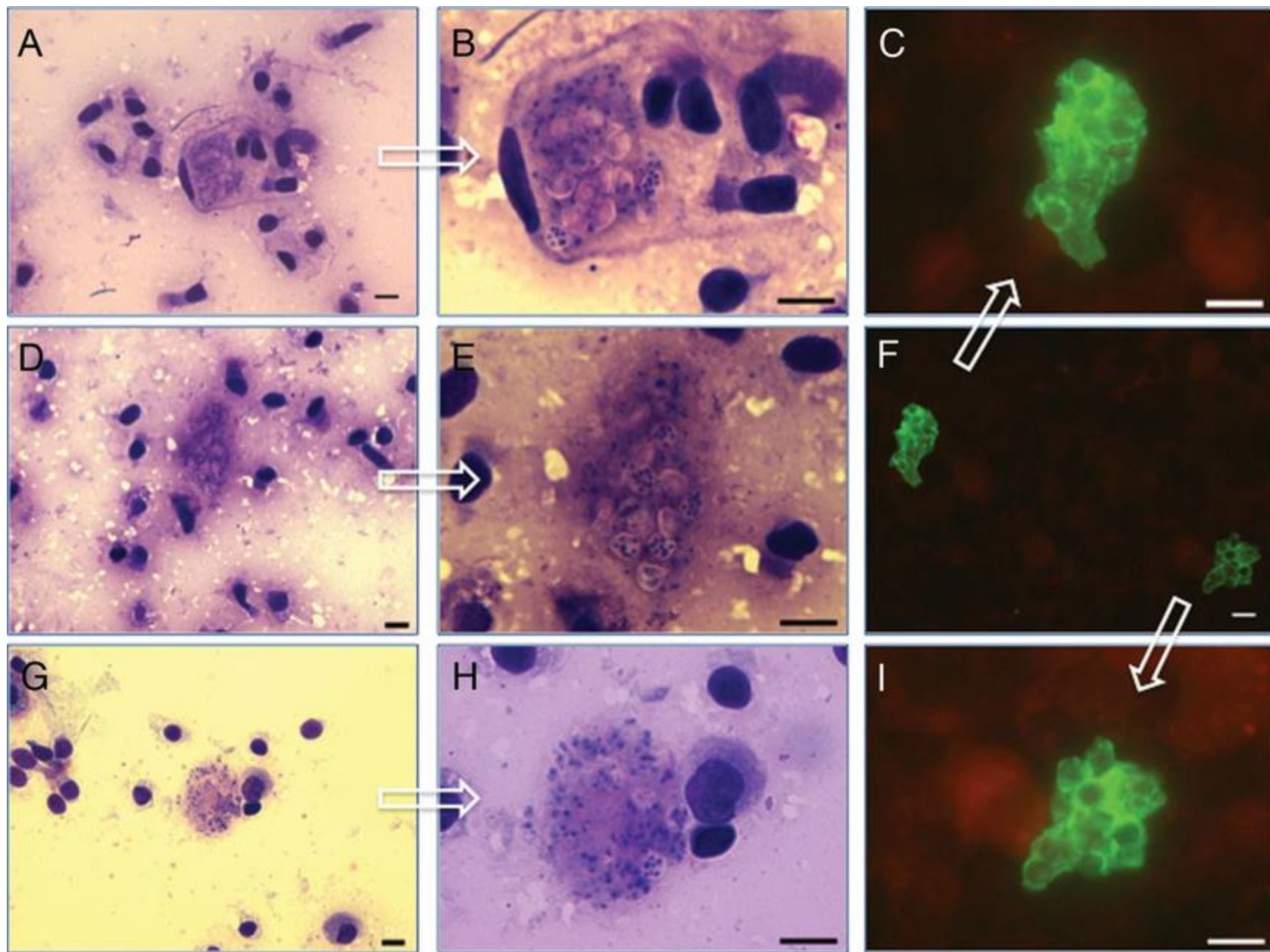
- Detección del antígeno (**β -D-Glucano en suero**): **No específico** de *Pneumocystis*. Presente en otras infecciones fúngicas como la Candidemia y la Aspergilosis
- Detección de anticuerpos (IgG e IgM): **No detecta infección activa**. Sensibilidad disminuida en pacientes inmunocomprometidos.
- Mayor sensibilidad en pacientes VIH
- Se usa por su valor predictivo negativo

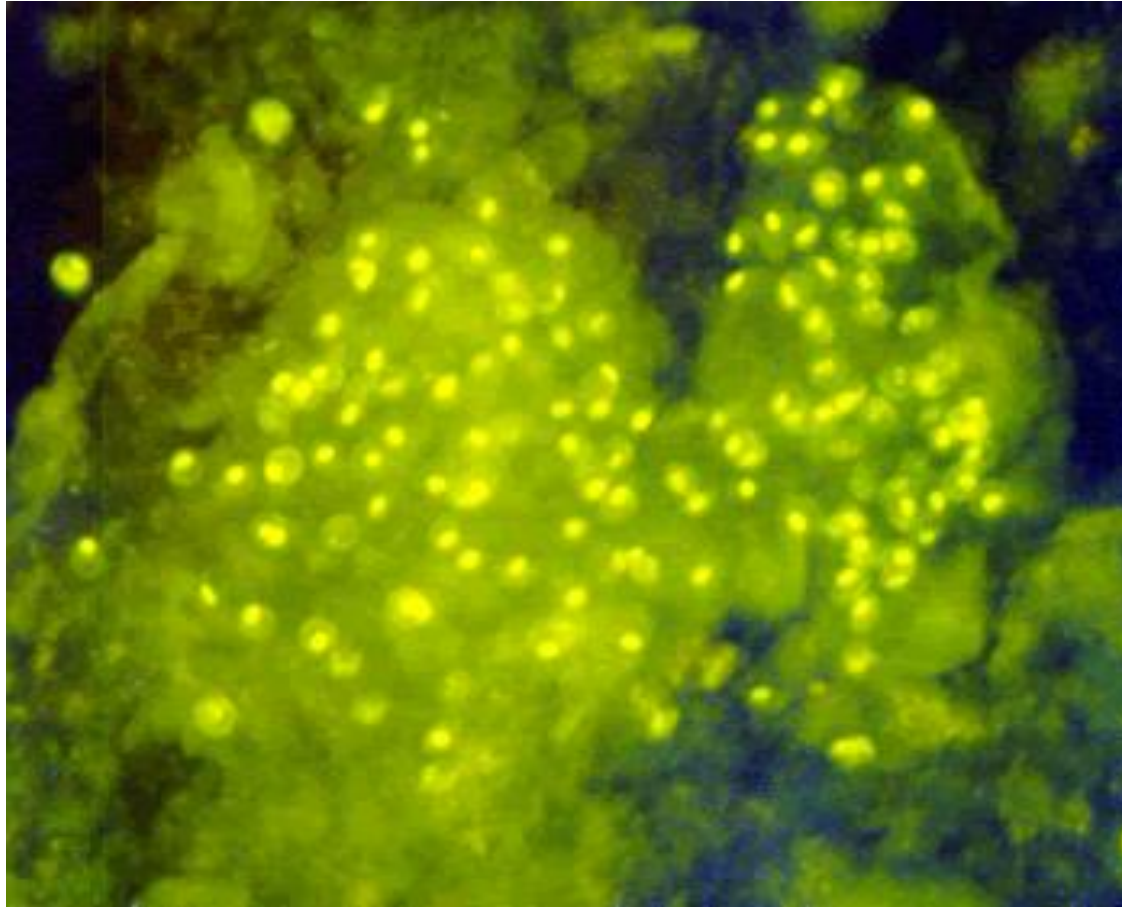
* β -D-Glucano es un polisacárido presente en la pared de la gran mayoría de hongos



Diagnóstico microscópico

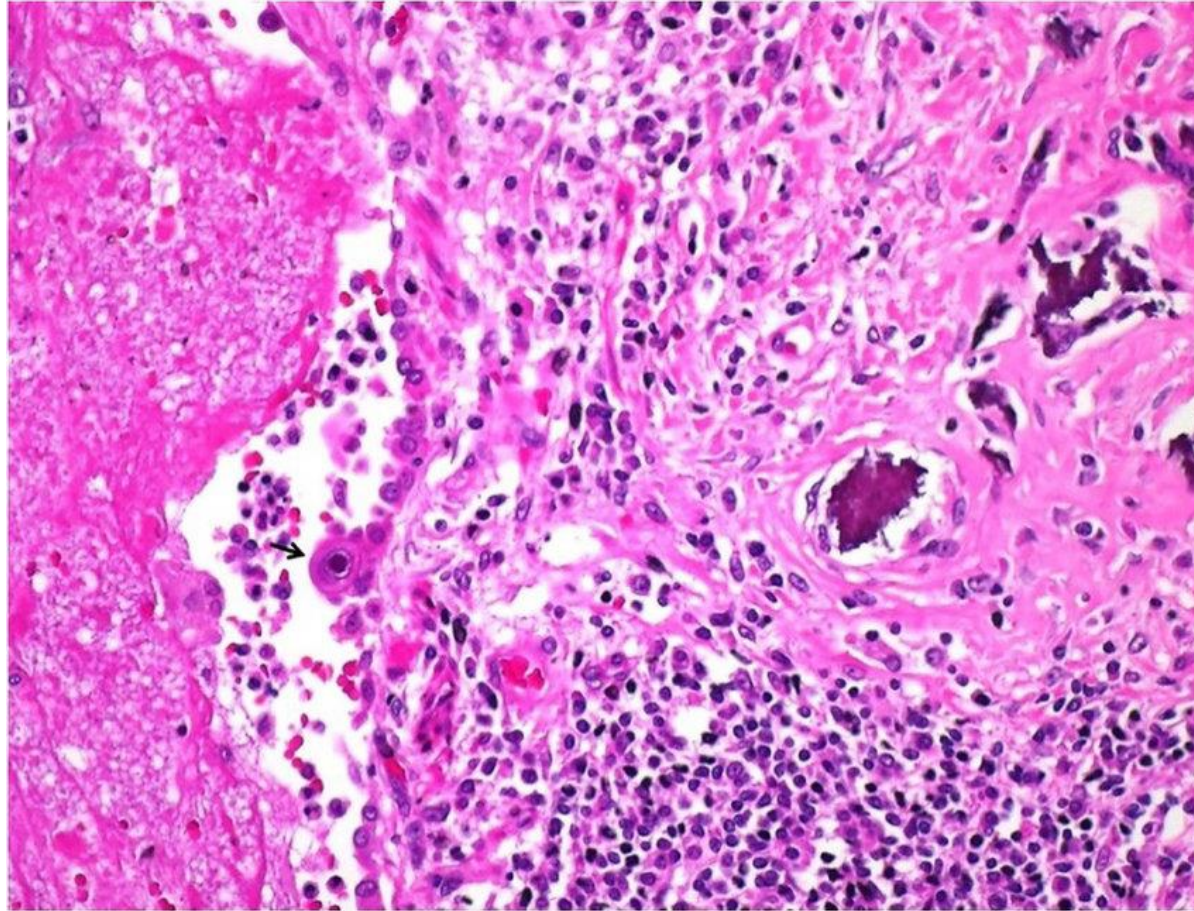
- Detección de anticuerpos marcados fluorescencia que se unen a los quistes y formas tróficas *de Pneumocystis*
- Detección mediante tinciones específicas: Gomori-Grocott (metenamina de plata), hematoxilina-eosina, giemsa . **Sensibilidad muy baja**
- Se requiere de **material específico y personal entrenado** para su detección.
- **Detecta infección activa**, pero su menor sensibilidad hace que un resultado negativo no descarte la infección. (Bajo Valor Predictivo Negativo)



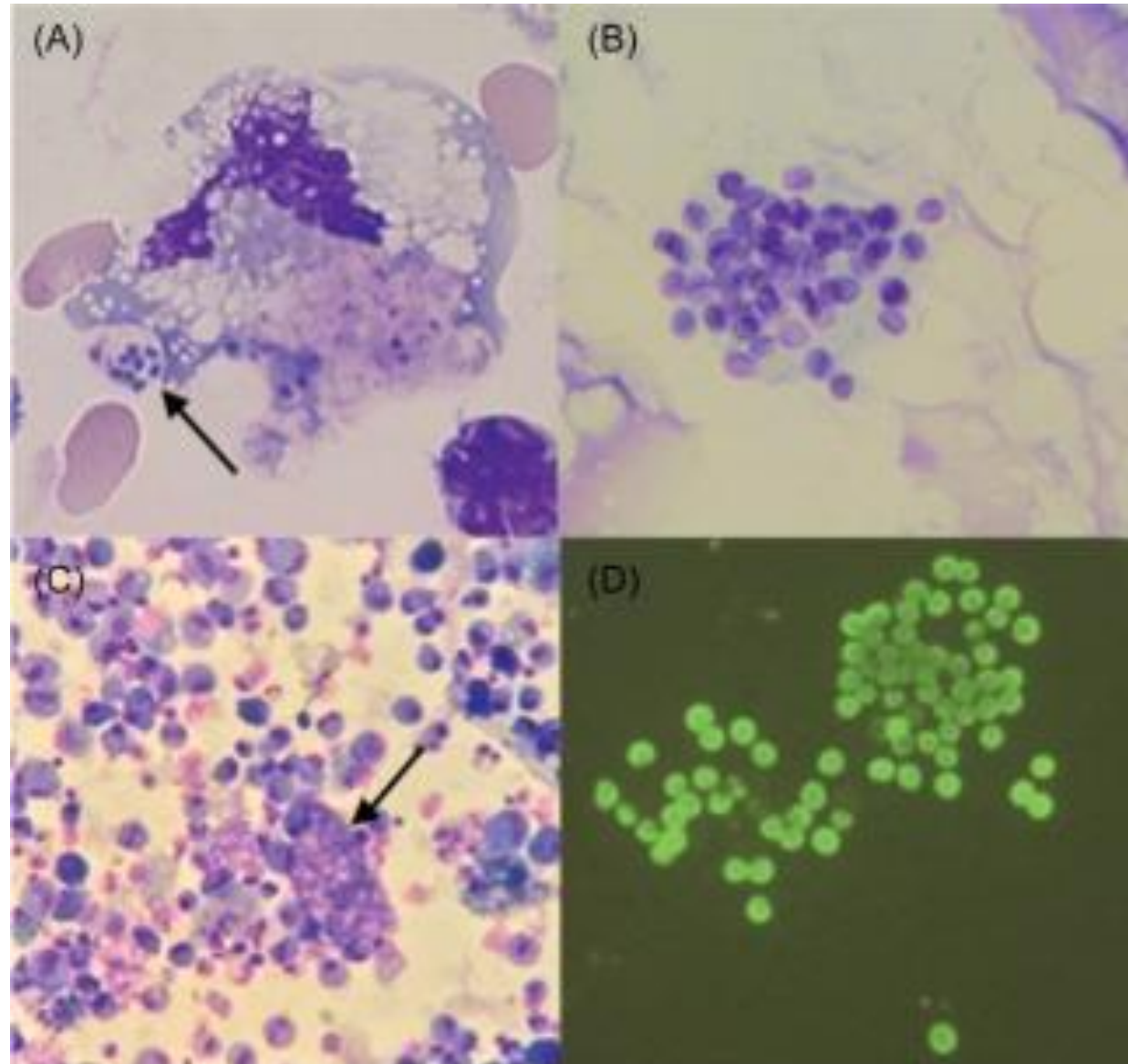


Quistes de *P.jirovecii* al microscopio de fluorescencia

Pulmón infectado con *Pneumocystis*



Tinción hematoxilina-eosina



Diagnóstico molecular

- Detección de material genético de *Pneumocystis* mediante PCR
- **Dificultad para establecer un punto de corte universal** que diferencie colonización de infección. Alta variabilidad de técnicas utilizadas (extracción, amplificación...) Necesidad estandarización
- Ensayos a lo largo de los años han visto que la misma PCR repetida en diferentes laboratorios no da resultados exactos. La detección del genoma completo y del gen mitocondrial *mtSSU* es el que proporciona una mayor exactitud en los resultados

Diagnóstico molecular

- Técnica **más sensible y específica**
- Valor predictivo negativo cercano al 100%
- **Detección** de material genético **no equivale a infección**





Article

Interest of a Commercialized *Pneumocystis jirovecii* Quantitative PCR to Discriminate Colonization from *Pneumocystis* Pneumonia according to the Revised EORTC/MSGERC Criteria

Florian Lussac-Sorton ^{1,*} , Tara Fleur ¹, Thibault Voisin ^{1,2}, Nahéma Issa ³ , Élodie Blanchard ⁴,
Éléna Charpentier ^{1,†} and Laurence Delhaes ^{1,†}

¹ Service de Parasitologie-Mycologie, Groupe Hospitalier Pellegrin, CHU de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France

² Eurofins, Polyclinique Bordeaux Nord, 18 Rue Henri Guillemin, 33300 Bordeaux, France

³ Réanimation Médicale, Groupe Hospitalier Saint-André, CHU de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France

⁴ Service de Pneumologie, Hôpital Haut-Lévêque, Groupe Hospitalier Sud, CHU de Bordeaux, 33600 Pessac, France

* Correspondence: florian.lussac-sorton@u-bordeaux.fr

† These authors are co-last authors.

Abstract: Quantitative PCR (qPCR) is highly sensitive to diagnose *Pneumocystis jirovecii* (Pf) pneu-

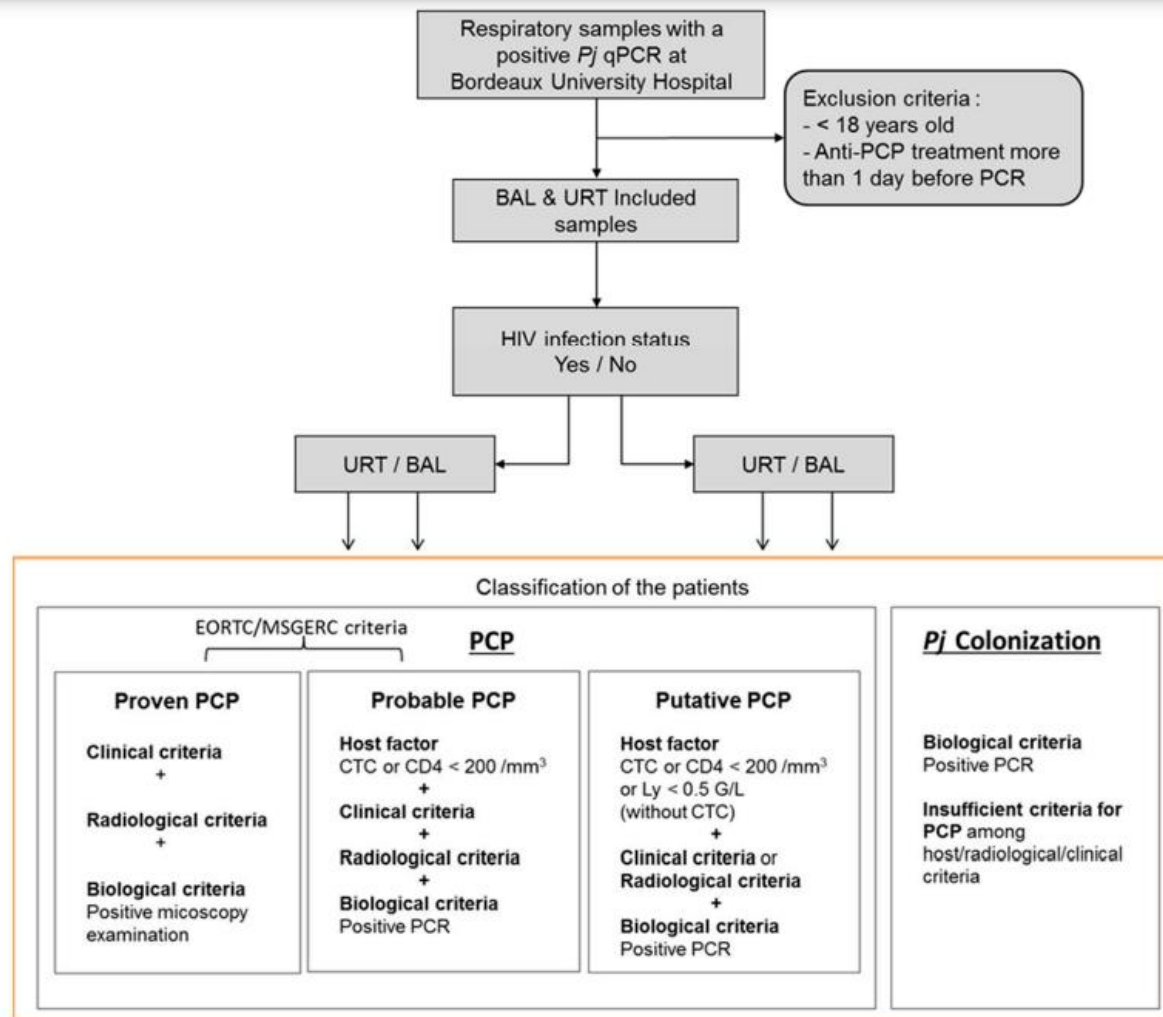


Figure 1. Flow chart of patients' inclusion and classification. *Pj*: *Pneumocystis jirovecii*; PCP: *Pneumocystis pneumonia*; BAL: bronchoalveolar lavages; URT: upper respiratory tract; CTC: corticosteroids;

Features	Distribution of Patients According to Respiratory Sample Type and <i>Pj</i> Status (PCP or Colonization)					
	BAL (<i>n</i> = 66)			URT (<i>n</i> = 104)		
	Colonization (<i>n</i> = 34)	PCP (<i>n</i> = 32)	<i>p</i>	Colonization (<i>n</i> = 36)	PCP (<i>n</i> = 68)	<i>p</i>
Median age in years [min–max]	61 [21–87]	68 [37–83]	0.01	72 [42–88]	70 [30–94]	0.86
Sex ratio M/W (n/n)	2.09 (23/11)	0.88 (15/17)	0.09	1.60 (22/14)	1.29 (37/31)	0.51
Immunosuppressive condition (n (%))	20 (58.8)	32 (100)	0.0004	22 (61)	68 (100)	0.015
SOT	3 (8.8)	6 (18.8)	0.30	6 (16.7)	23 (33.8)	0.06
Hematologic malignancy	3 (8.8)	7 * (21.8)	0.20	7 (19.4)	9 ** (13.2)	0.40
Solid malignancy	10 (29.4)	15 (46.9)	0.14	2 (5.6)	18 (26.5)	0.01
Inflammatory disease	4 (11.8)	3 (9.4)	1.0	5 (13.9)	11 (16.2)	0.76
Other	0 (0)	1 (3.1)	0.48	2 (5.6)	7 (10.3)	0.49
Total lymphocytes count G/L [IQR]	1.26 [0.92–1.64]	0.53 [0.30–0.76]	<0.001	0.96 [0.61–1.43]	0.71 [0.39–1.11]	0.09
CD4 T lymphocytes count < 200 cells/mm ³ (n/total (%))	1/9 (11.1)	7/11 (63.6)	0.03	0/6 (0)	12/25 (48)	0.06
Use of CTC (n (%))	5 (14.7)	23 (71.9)	<0.0001	13 (36.1)	45 (66.2)	0.003
Clinical/radiological features (n, (%))						
Hypoxemia	9 (26.5)	19 (59.4)	0.007	10 (27.8)	39 (57.4)	0.004
Dyspnea	18 (52.9)	23 (71.9)	0.11	19 (52.8)	57 (83.8)	<0.0001
Fever (>38.3 °C)	13 (38.2)	21 (65.6)	0.01	16 (44.4)	46 (67.6)	0.02
Dry cough	5 (14.7)	8 (25)	0.29	8 (22.2)	20 (29.4)	0.43
Typical radiological pattern	10 (29.4)	26 (81.3)	0.14	14 (38.9)	56 (82.4)	0.62
<i>Pj</i> biological criteria						
Positive microscopic examination (n (%))	0 (0.0)	4 (12.5)	0.11	0 (0.0)	3 (4.4)	0.55
Median fungal load (Cq) [IQR]	33.4 [32.0; 35.3]	30.8 [25.2; 34.7]	0.01	35.4 [33.2; 36.9]	31.2 [28.1; 33.9]	<0.0001
Median fungal load (genome copies/mL) [IQR]	5481 [1267; 13,898]	32,179 [4695; 2,499,000]	0.0079	1256 [644; 4677]	26,714 [4826; 322,155]	<0.0001
Anti-<i>Pj</i> treatment after sampling (n (%))						
Curative	9 (26.5)	26 (81.3)	<0.0001	10 (27.8)	55 (80.9)	<0.0001
Prophylactic	6 (17.6)	2 (6.3)	0.26	5 (13.9)	6 (8.8)	0.42
Outcome (number of deaths, (%))	6 (17.6)	13 (40.6)	0.10	4 (11.1)	12 (17.6)	0.57

SOT: solid organ transplant recipients; IQR: interquartile range; CTC: corticosteroids; Cq: quantification cycle; *:

Bajo nº de pac VIH +, fueron excluidos del análisis final debido a la no significancia de resultados obtenidos

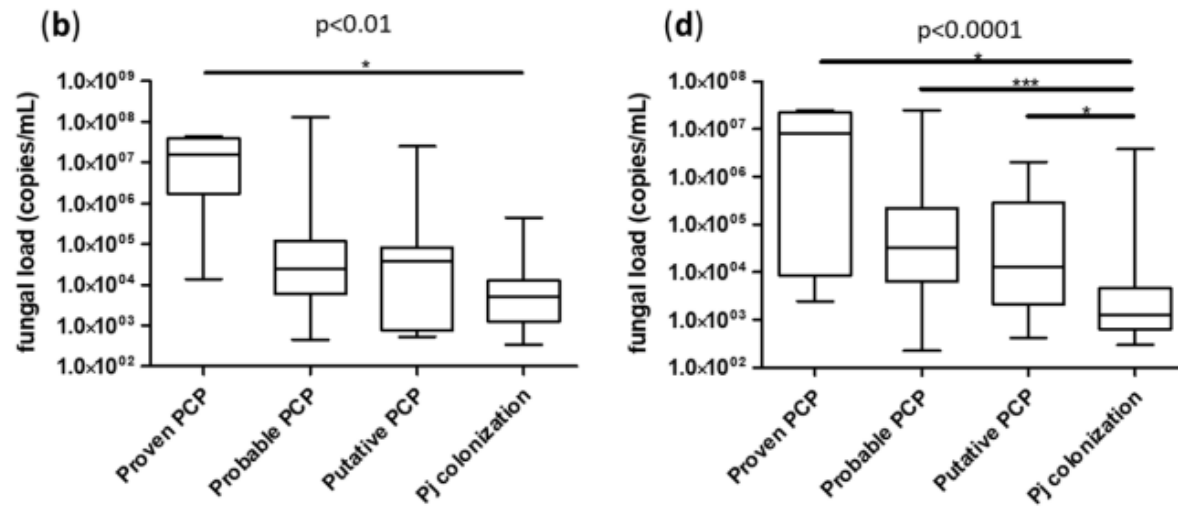


Figure 3. Median fungal loads according to patient classification with EORTC/MSGERC criteria, sample types: BAL (a,b) and URT (c,d) and expressed in Cq (a,c) or in *Pj* genome copies/mL (b,d). Cq: quantification cycle. *: $p < 0.05$ in Dunn's test; ***: $p < 0.001$ in Dunn's test. Only significant differences are represented by lines.

Table 2. qPCR threshold values with corresponding performances.

Sample Type	Cq	Fungal Load (Genome Copies/mL)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
BAL	25.43	1,860,000	25.0	100
	31.45	8275	59.4	82.4
	37.08	396	100	2.9
URT	22.55	4,120,000	7.4	100
	32.33	8130	63.2	88.9
	38.21	264	100	2.6

Cq: quantification cycle.

- En conclusión, cuantificación de cargas fúngicas utilizando MycoGENIE® *Pneumocystis jirovecii*.qPCR ayuda a discriminar PCP de la colonización en este estudio, con **cargas > 8275 copias del genoma/ml** para BAL y **cargas > 8130 copias copias/mL**) para muestras URT que son indicativas de PCP.
- Sin embargo, detección de una baja carga fúngica, posiblemente asociado a colonización, debe interpretarse con precaución, de acuerdo con los signos clínicos y radiológicos.

- La carga fúngica no se correlaciona de manera directa con la gravedad de la infección. Si bien cargas elevadas indican infección, cargas bajas pueden asociarse con infección en pacientes con sintomatología compatible.
- BAL presenta cargas más elevadas que esputo inducido
- Importante abordaje multidisciplinar. Evaluación de diferentes criterios para diagnóstico final

- Colonización en pacientes inmunodeprimidos puede ser indicación de tratamiento para evitar posibles futuras infecciones?
- Controversia de nuevo en este punto

Ability of quantitative PCR to discriminate *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from colonization

Thomas Perret^{1†}, Antonios Kritikos^{1†}, Philippe M. Hauser², Malcolm Guiver³, Alix T. Coste², Katia Jaton² and Frederic Lamothe^{1,2,*}

Estudio hospital de Suiza incluye pacientes con diagnóstico mediante lavado broncoalveolar de infección por *Pneumocystis* en un periodo de diez años (2007-2017)

Host factors:

HIV infection
Haematological malignancies
Long-term use of corticosteroids
Immunosuppressive therapies associated with
T-cell dysfunction or low CD4 lymphocyte count
(<200 cell/mm³)

Radiological criteria:

Compatible lesions on radiography or CT scan

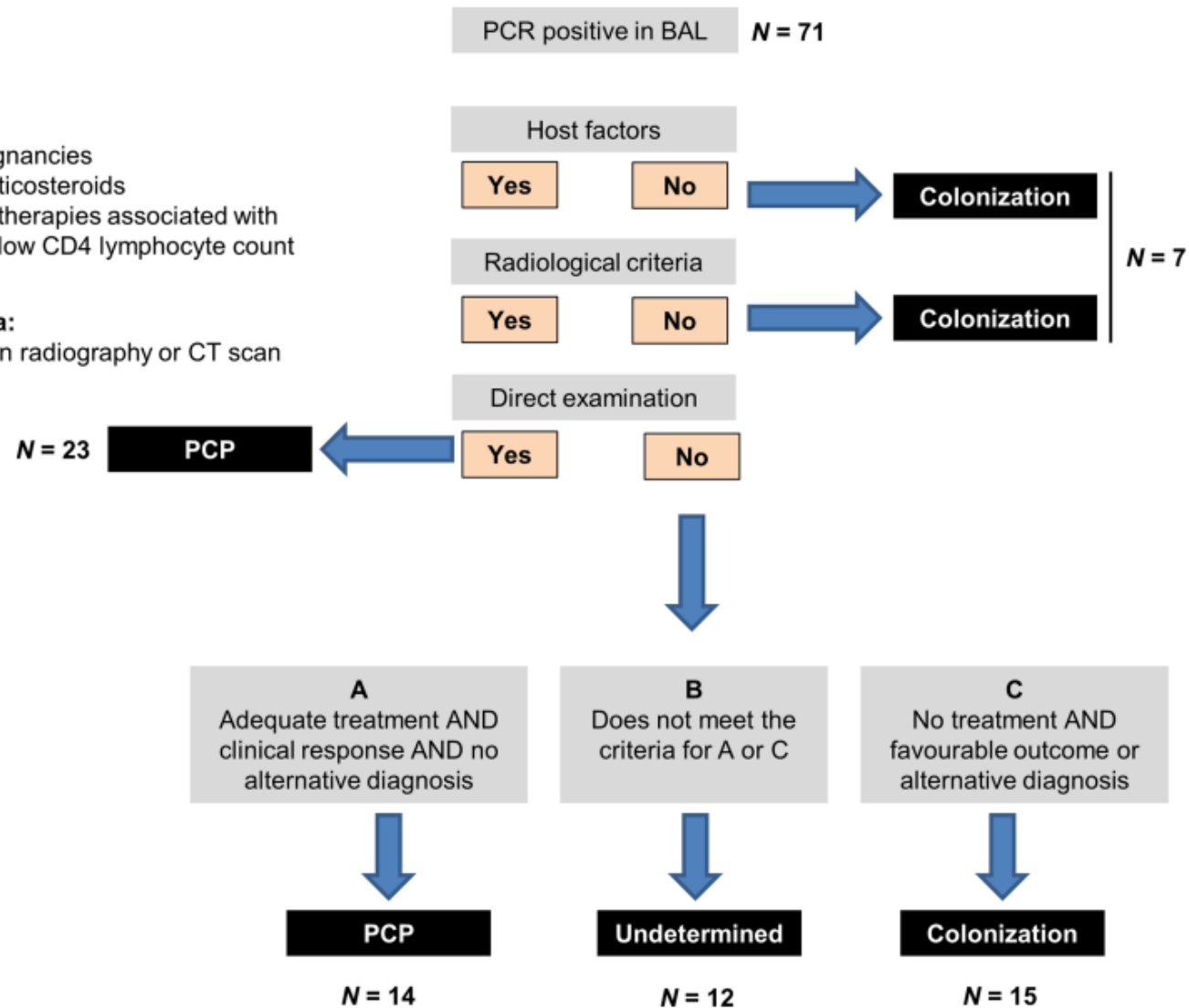


Fig. 1. Algorithm for classification of cases as PCP, colonization or undetermined. BAL, bronchoalveolar lavage fluid.

- Total de pacientes desarrollaron PCP: 37.
- Pacientes con diagnóstico indeterminado: 12
- Pacientes sugestivos de colonización: 34
- Todos los pacientes con infección y aquellos con resultado indeterminado fueron tratados con cotrimoxazol. También 18 de los que presentaban colonización.
- La mayoría de los pacientes eran VIH-negativos.

Table 2. Diagnostic performance of *P. jirovecii* PCR for the discrimination between PCP and colonization

Cut-off	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	LR +	LR -	DOR
10 ²	1	0.05	0.64	1	1.05	0	NC
5×10 ²	1	0.23	0.69	1	1.29	0	NC
10 ³	1	0.36	0.73	1	1.57	0	NC
5×10 ³	0.97	0.82	0.90	0.95	5.35	0.03	162
10 ⁴	0.95	0.82	0.90	0.90	5.20	0.07	78.75
5×10 ⁴	0.81	0.91	0.94	0.74	8.92	0.21	42.86
10 ⁵	0.76	0.95	0.97	0.70	16.65	0.25	65.33
5×10 ⁵	0.62	1	1	0.61	NC	0.38	NC
10 ⁶	0.51	1	1	0.55	NC	0.49	NC
5×10 ⁶	0.30	1	1	0.46	NC	0.70	NC
10 ⁷	0.30	1	1	0.46	NC	0.70	NC

DOR, diagnostic odds ratio; LR+, positive likelihood ratio; LR-, negative likelihood ratio; NC, not calculated; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

- Se estableció como punto de corte **5×10^3 copias/ml** con una sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo de 97, 82, 90 y 95%, respectivamente.

Table 3. Comparative performance of quantitative *P. jirovecii* PCR in various studies

Study first author, year (reference)	PCR target	No. of PCP cases* HIV / HM / others [%]	PCP classification†	Results
Alanio, 2011 [13]	Mitochondrial large-subunit rRNA gene	16 56/19/25	High vs low probability	<120 TFEq/ml: 100% NPV >1900 TFEq/ml: 100% PPV
Botterel, 2012 [14]	Mitochondrial large-subunit rRNA gene	17 47/35/18	Proven vs IFA-negative	$\leq 2.6 \log_{10}$ copies/ μ l: 100% NPV $\geq 4 \log_{10}$ copies/ μ l: 100% PPV
Matsumura, 2016 [17]	Dihydropteroate synthase gene	53 9/17/74	(a) Proven vs colonization (b) proven/probable vs colonization	(a) 1300 copies/ml: 100% NPV, 79% PPV (b) 340 copies/ml: 44% NPV, 91% PPV
Robert-Gangneux, 2014 [18]	Mitochondrial large-subunit rRNA gene	35 12/37/51	Proven/probable vs possible vs colonization	Significant differences of fungal load (Ct value between groups). Large distribution, no cut-off proposed.
Maillet, 2014 [16]	Major surface glycoprotein	11 18/73/9	Proven/probable vs possible/colonization	≤ 3160 copies/ml: 100% NPV ≥ 31600 copies/ml: 100% PPV
Fauchier, 2016 [15]	Mitochondrial large-subunit rRNA gene	73 41/26/33	Proven/probable vs colonization (no possible category)	Ct 32:72% sen, 75% spe Ct >35: exclusion PCP (80%sen/63%spe)
Kritikos, 2020 (present study)	Mitochondrial 26S rDNA	37 19/51/30	Proven/probable vs colonized (possible excluded)	$\leq 10^3$ copies/ml: 100% NPV 5×10^3 copies/ml: 95% NPV, 90% PPV $\geq 5 \times 10^5$ copies/ml: 100% PPV

*Patients with PCP classified as proven or probable.

†Nomenclature for PCP classification: proven: IFA positive, probable: IFA negative / PCR positive, with defined clinical criteria for PCP diagnosis, possible: IFA negative / PCR positive, without fulfilling all clinical criteria for PCP diagnosis. Colonization: IFA negative / PCR positive, and no PCP diagnosis retained on the basis of clinical assessment.

HIV, human immunodeficiency virus; HM, haematologic malignancies; IFA, immunofluorescence assay; NPV, negative predictive value; PCP, *P. jirovecii* pneumonia; Sen, sensitivity; Spe, specificity; TFEq, trophic form equivalents.

***Pneumocystis jirovecii* (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients**

M. Maillet • D. Maubon • J. P. Brion • P. François •
L. Molina • J. P. Stahl • O. Epaulard • A. Bosseray •
P. Pavese

Received: 3 July 2013 / Accepted: 12 August 2013 / Published online: 30 August 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Table 1 Diagnosis definitions used by the experts

Definite PCP	- clinical signs of progressive pneumonia - ground glass opacities in chest computed tomography - microscopical identification of <i>Pj</i> with Musto or RAL staining methods
Probable PCP	- clinical signs of progressive pneumonia - ground glass opacities in chest computed tomography - complete resolution of symptoms after a full course of anti-PCP treatment - absence of microscopical identification of <i>Pj</i> with staining methods
Possible PCP	- clinical signs of progressive pneumonia and: - either compatible radiological signs - or complete resolution of symptoms after anti-PCP treatment - absence of microscopical identification of <i>Pj</i> with staining methods
Other diagnosis	none of the above criteria

The “definite PCP” and “probable PCP” groups were then re-assigned to the “final diagnosis of PCP” group, and the “possible PCP” and “other diagnosis” groups were re-assigned to the “non-PCP” group in order to construct a receiver operating characteristic (ROC) curve

Criterios establecidos por un equipo multidisciplinar de especialistas no conocedores del resultado de la PCR

Table 2 Clinical features

Characteristics	Definite PCP ^a (<i>n</i> =7)	Probable PCP (<i>n</i> =4)	Possible PCP (<i>n</i> =5)	Other diagnosis ^d (<i>n</i> =19)	<i>p</i> -Value
Age, years	66 (47–69)	66 (52–75)	65 (60–67)	49 (42–66)	0.34
Male sex	3 (43 %)	1 (25 %)	2 (40 %)	9 (47 %)	0.874
Underlying disease					
Hematological malignancy	4 (57 %)	4 (100 %)	4 (80 %)	13 (68 %)	0.46
Solid malignancy	1 (14 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	0.68
Organ transplantation	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	4 (21 %)	0.28
HIV ^b infection	2 (29 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	0.2
Inflammatory disease	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (20 %)	0 (0 %)	0.1
Corticosteroids	2 (29 %)	1 (25 %)	2 (40 %)	4 (21 %)	0.85
Anti-tumor chemotherapy	2 (29 %)	2 (50 %)	2 (40 %)	11 (58 %)	0.59
Immunosuppressive agents other than corticosteroids or chemotherapy	1 (14 %)	1 (25 %)	2 (40 %)	3 (16 %)	0.64
PCP prophylaxis	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	0.83
Hypoxia	7 (100 %)	3 (75 %)	5 (100 %)	11 (58 %)	0.19
Stay in ICU ^c	2 (29 %)	2 (50 %)	0 (0 %)	5 (26 %)	0.39
Anti-PCP treatment	7 (100 %)	4 (100 %)	5 (100 %)	12 (63 %)	0.06
Mechanical ventilation	2 (29 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	5 (26 %)	0.38
Laboratory findings					
Leucocytes, /mm ³	2,100 (1,700–9,825)	7,150 (6,600–8 750)	9,100 (750–10 025)	3,700 (2,325–5,900)	0.4
Neutrophils, /mm ³	1,400 (1,125–5,650)	5,850 (5,200–7,250)	4,650 (1,800–8,150)	2,600 (2,200–5,525)	0.28
Lymphocytes, /mm ³	400 (225–600)	950 (450–1,300)	400 (350–2,150)	500 (225–800)	0.77
C-reactive protein, mg/dl	11.8 (2.6–17.9)	10.5 (4.95–14.1)	10.7 (4.5–20)	9.3 (3.9–6.2)	0.99
Creatinine, mg/dl	0.8 (0.61–1)	0.84 (0.74–1.37)	0.71 (0.6–1.3)	0.97 (0.63–1.1)	0.91
Death	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (16 %)	0.43

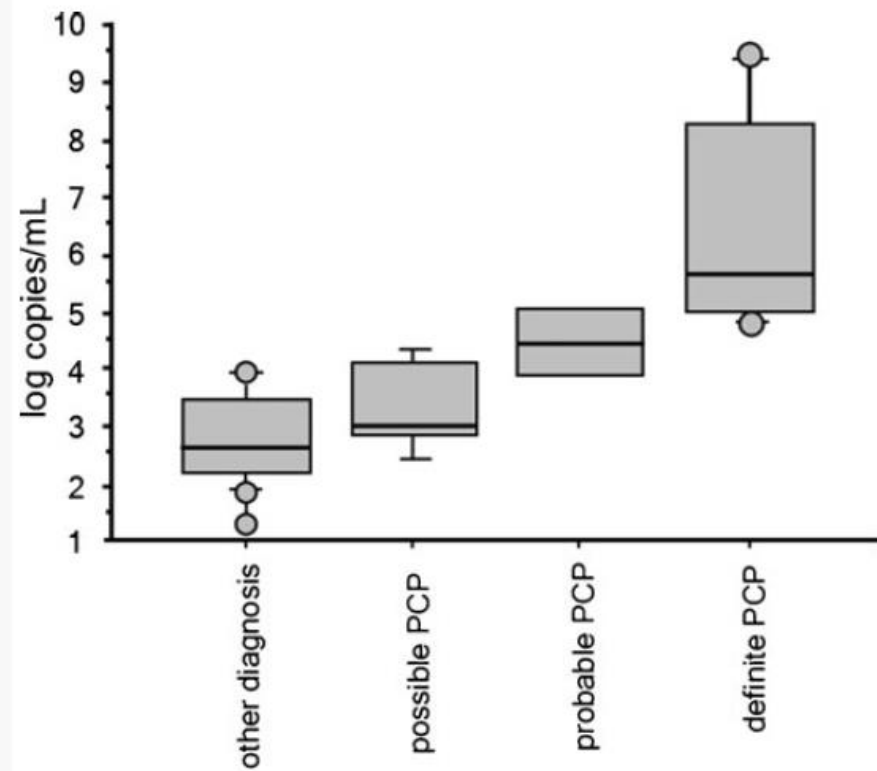


Fig. 1 Box and whisker plots of *Pneumocystis jirovecii* copy numbers according to patient group. The boxes contain 50 % of the sample data, with the median value indicated by a horizontal bar

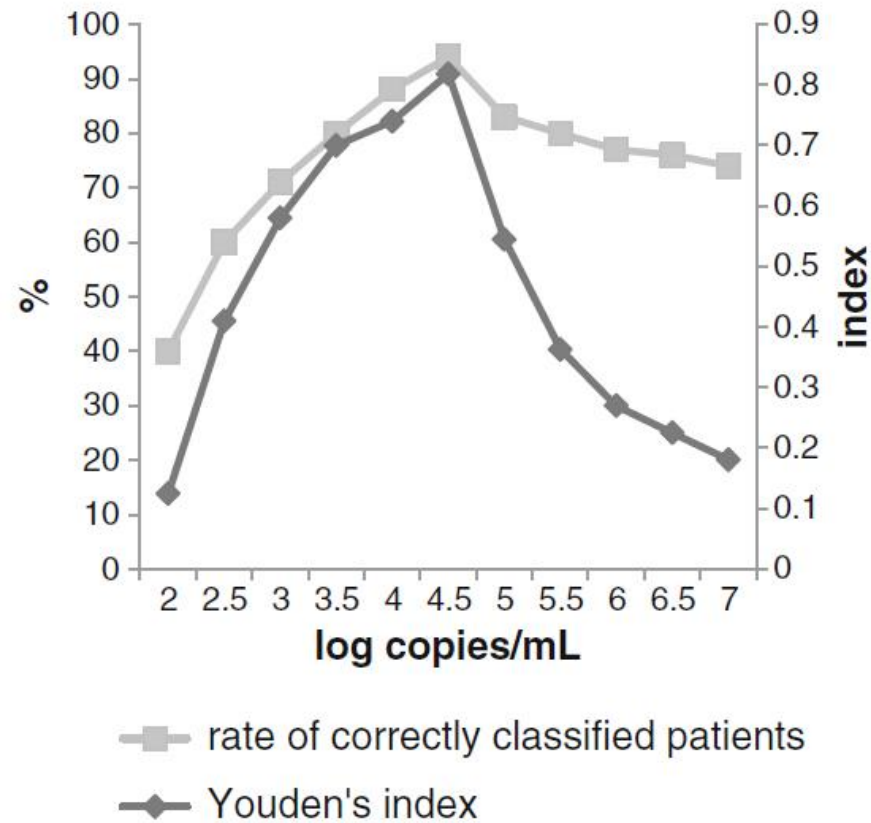


Fig. 3 Rate of correctly classified patients and Youden's index for each cut-off value

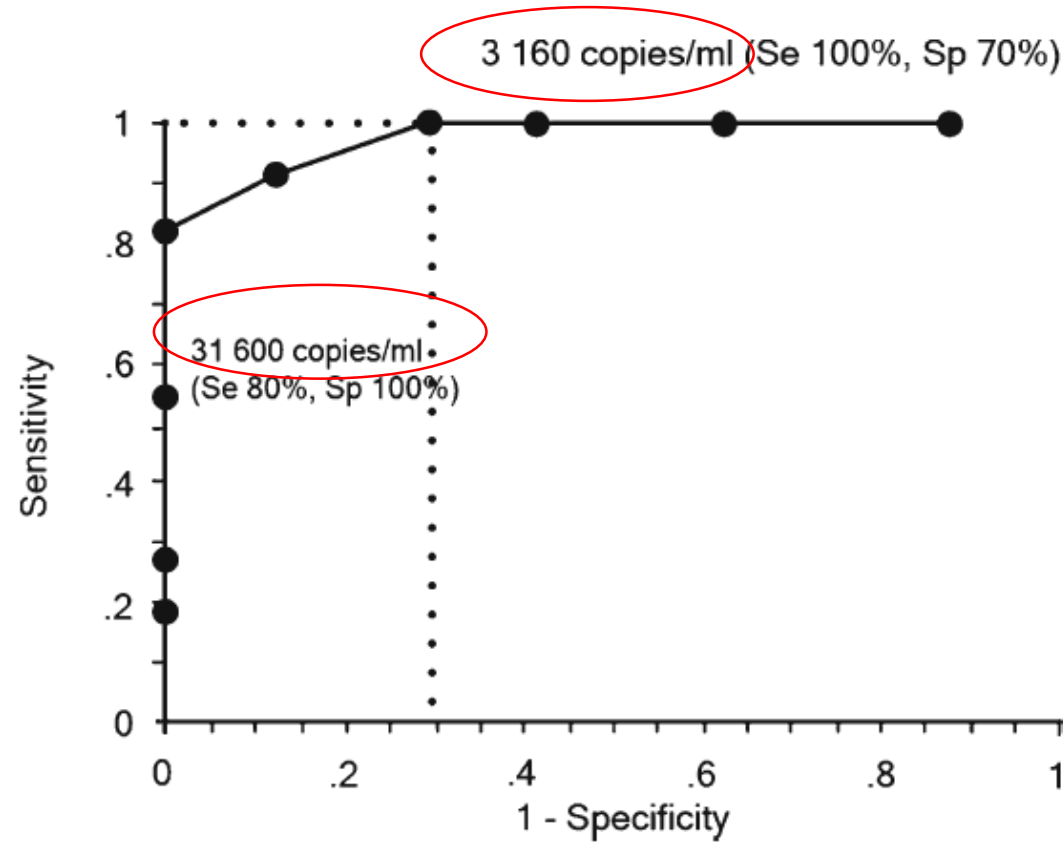


Fig. 2 Receiver operator characteristic (ROC) curve of *P. jirovecii* copy numbers for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia (PCP). The arrows indicate cut-off values of 3,160 copies/ml, and 31,600 copies/ml



Article

Determining *Pneumocystis jirovecii* Colonisation from Infection Using PCR-Based Diagnostics in HIV-Negative Individuals

Anna Louise Watson ^{1,2,*}, John Woodford ³ , Sumudu Britton ¹, Rita Gupta ⁴, David Whiley ^{4,5} and Kate McCarthy ¹

¹ Infectious Diseases, Royal Brisbane & Women's Hospital, Metro North Health, Herston, QLD 4006, Australia

² Herston Infectious Diseases Institute, Herston, QLD 4006, Australia

³ Infectious Diseases, Ipswich Hospital, Ipswich, QLD 4305, Australia

⁴ Pathology Queensland, Herston, QLD 4006, Australia

⁵ The University of Queensland, Herston, QLD 4006, Australia

* Correspondence: anna.watson2@health.qld.gov.au

Table 1. Demographics stratified by clinical diagnosis.

Characteristics	Colonisation (n = 24)	Uncertain PCP (n = 30)	High-Probability PCP (n = 28)	3-Way Comparison	2-Way Comparison (High-Probability PCP vs. Colonised)
Sex (male)	70.8% (17/24)	66.6% (20/30)	57.1% (16/28)	0.5641	0.3911
Age (median, IQR)	57 (42–66)	68 (62–73)	63 (53–74)	0.0192	0.1137
Sample type (BAL)	25% (6/24)	43.3% (13/30)	35.7% (10/28)	0.3748	0.5487
qPCR (median, IQR)	40,500 (11,800–147,500)	101,500 (16,500–885,000)	280,000 (63,750–2,525,000)	0.0093	0.0013
BAL qPCR	32,500 (11,650–160,750)	15,000 (8000–280,000)	230,000 (66,000–665,000)	0.1913	0.0978
Sputum qPCR	43,000 (13,000–127,500)	140,000 (49,000–990,000)	385,000 (76,750–3,200,000)	0.0113	0.0056
Co-morbidities Haem. cancer	25% (6/24)	30% (9/30)	42.9% (12/28)	0.3589	0.2452
Non-haem. cancer	29.2% (7/24)	50% (15/30)	39.3% (11/28)	0.2943	0.4615
Solid organ transplant	4.2% (1/24)	0% (0/30)	0% (0/28)	0.2978	0.5622
Chronic lung disease	41.7% (10/24)	40% (12/30)	35.7% (10/28)	0.8997	0.7772
Diabetes	16.7% (4/24)	16.7% (5/30)	21.4% (6/28)	-	>0.9999
Diabetes and concurrent steroid use	25% (1/4)	20% (1/5)	66.7% (4/6)		
Chronic liver disease	4.2% (1/24)	6.7% (2/30)	3.6% (1/28)	0.8453	>0.9999
Autoimmune/CTD	20.8% (5/24)	16.7% (5/30)	28.6% (8/28)	0.5426	0.749
Immunosuppression medications	58.3% (14/24)	80% (24/30)	67.9% (19/28)	0.2222	0.5685

Llamativo CF más alta en Espudo inducido que en BAL en este estudio (sesgo procedimiento centros)

Cutoff of 2.5×10^5 copies/mL– sensitivity 50%- specificity 83%

Cutoff of 6.5×10^4 copies/mL, sensitivity 75%- specificity 66%

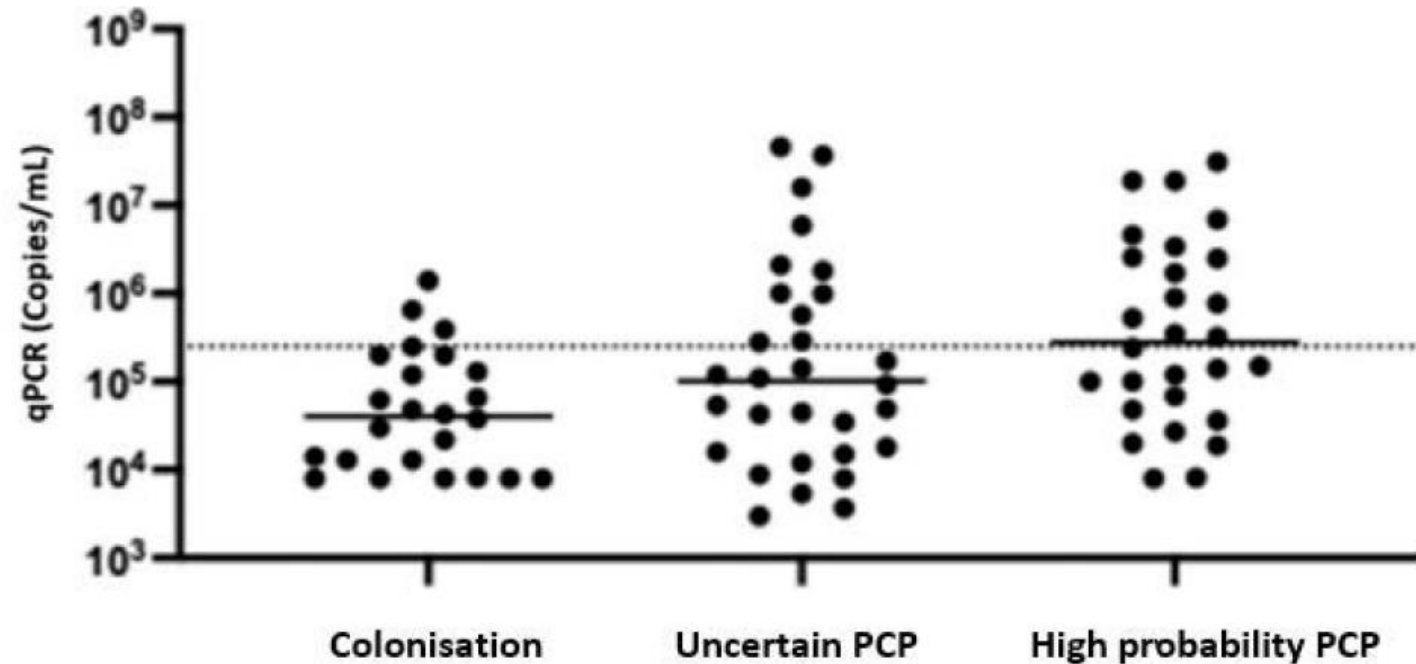


Figure 2. qPCRs on any sample stratified by diagnosis. Bars at median. Kruskal–Wallis Test. Dotted line is existing cutoff.

Article

Is It Possible to Differentiate *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia and Colonization in the Immunocompromised Patients with Pneumonia?

Yudy A. Aguilar ^{1,2,*}, Zulma Vanessa Rueda ^{2,3} , María Angélica Maya ^{1,4} , Cristian Vera ², Jenniffer Rodiño ¹, Carlos Muskus ⁵ and Lázaro A. Vélez ^{1,4}

¹ Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas-GRIPE, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín 050031, Colombia; mangelicamaya@gmail.com (M.A.M.); jmedarom_12@yahoo.es (J.R.); lazarovelezg@gmail.com (L.A.V.)

² Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín 050031, Colombia; zulmaruedav@gmail.com (Z.V.R.); cristian.vera.marin@hotmail.com (C.V.)

³ Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, MB R3E 0J9, Canada

⁴ Section of Infectious Diseases, Hospital Universitario San Vicente Fundación, Medellín 050010, Colombia

⁵ Unidad de Biología Molecular y Computacional, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín 050010, Colombia; carmusk@yahoo.com

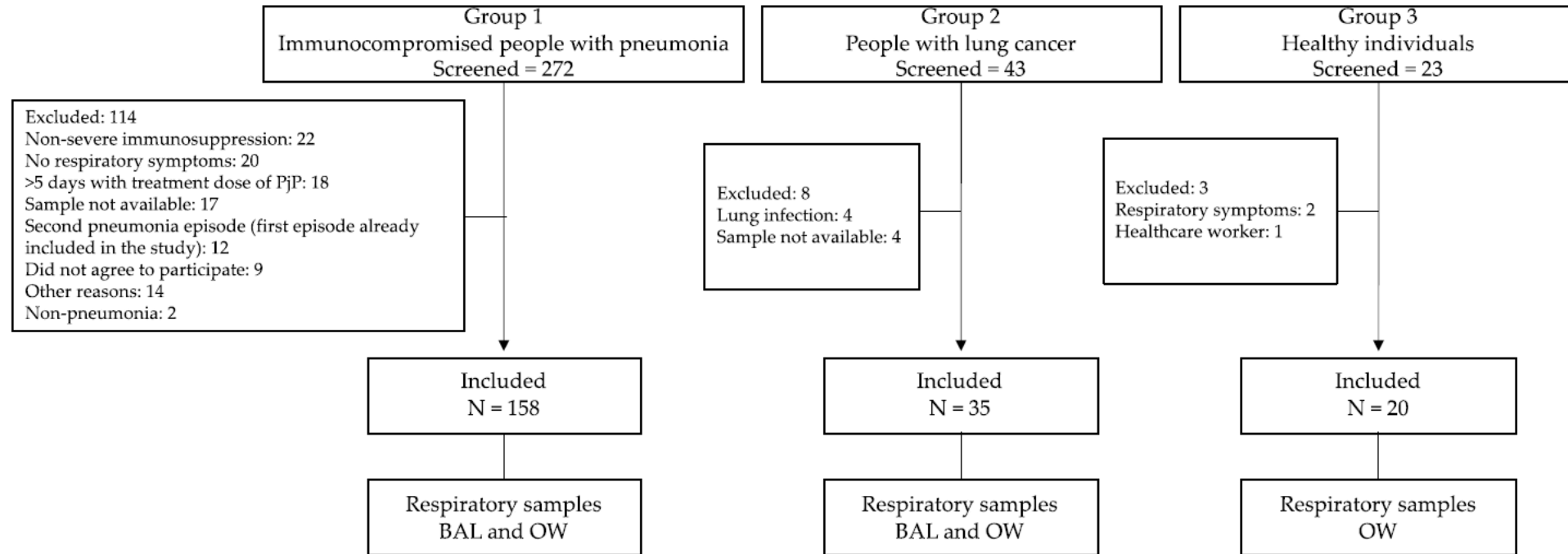


Figure 1. Flowchart of the study, including the type of respiratory samples analyzed in each group. BAL: Bronchoalveolar lavage. OW: Oral wash. PjP: *Pneumocystis jirovecii* pneumonia.

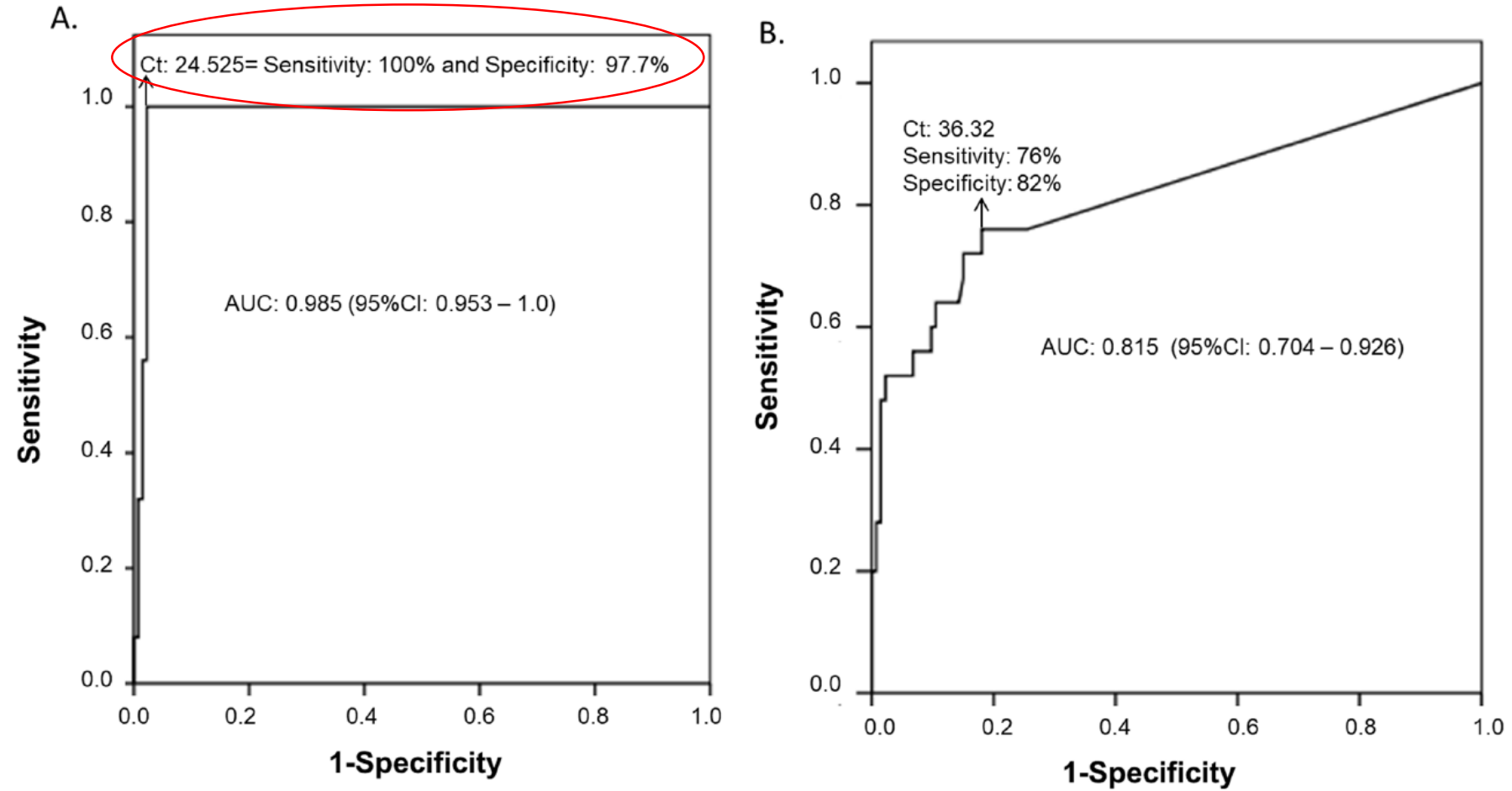
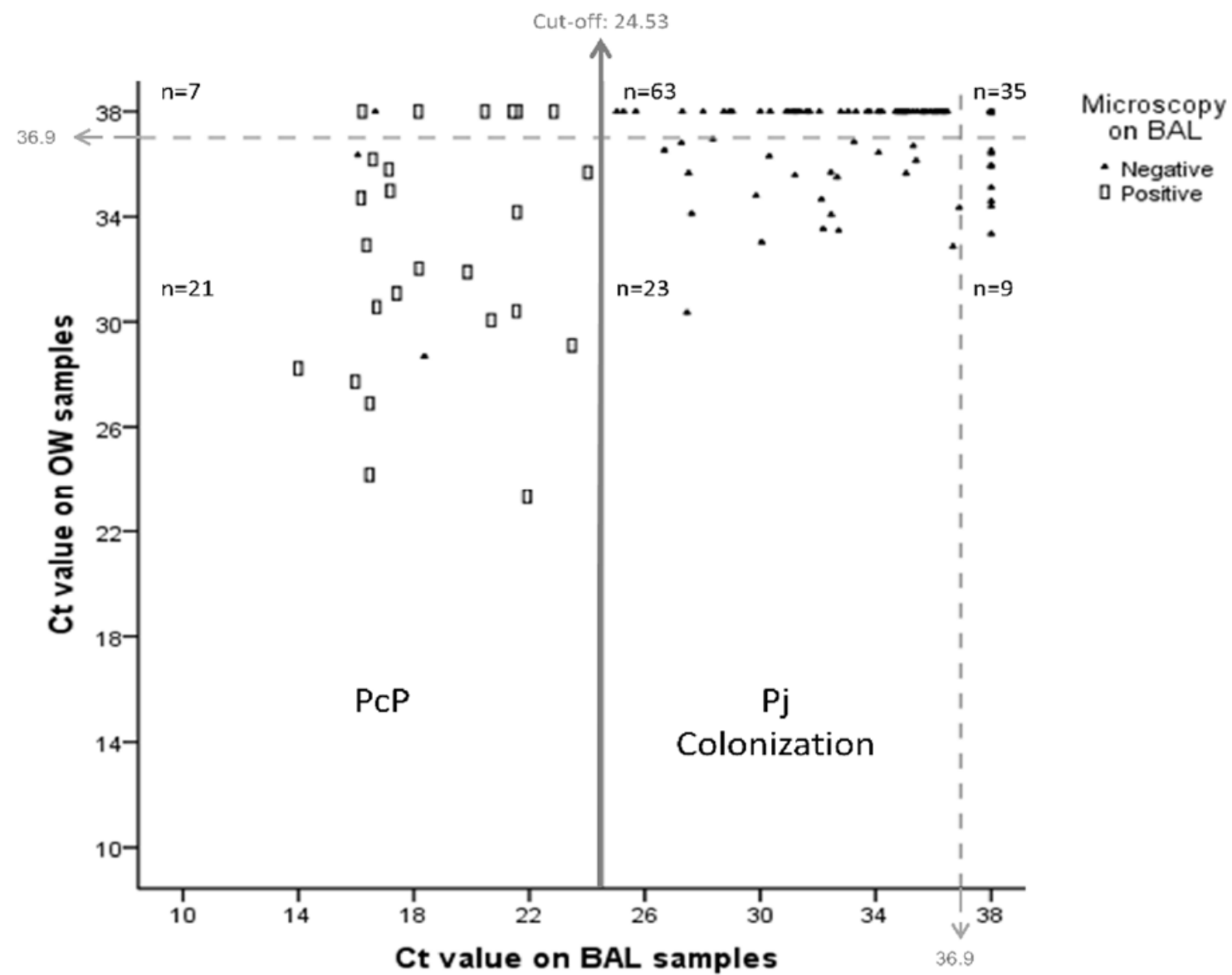


Figure 2. ROC curve analysis of the BAL and OW samples from immunosuppressed patients. With the arrow, the Ct value corresponding to the cut-off at which the best value of sensitivity and specificity for a diagnostic test is indicated when it is compared with BAL microscopy, according to sample type: **(A)** BAL; **(B)** OW.



Characteristics	Group 1: Immunocompromised Patients with Pneumonia n = 158	Group 2: Individuals with Lung Cancer n = 35	Group 3: Healthy Individuals n = 20
Male sex, n (%)	113 (71.5)	26/35 (74.3)	11 (55)
Age in years, median (IQR)	37 (29–45)	63 (58–70)	39 (21–50)
Respiratory symptoms, n (%)			0
Cough	118 (75.2)	24 (70.6)	
Dyspnea	63 (40.1)	19 (55.9)	
Pleuritic pain	27 (17.2)	6 (17.6)	
Hemoptysis	14 (8.9)	9 (26.5)	
Fever $\geq 38^{\circ}\text{C}$	121 (77)	13 (38.2)	
Pleural effusion	24 (15.3)	14 (41.2)	
Past medical history (clinical condition at baseline), n (%)	158 (100)	0	0
AIDS	126 (79.7)		
CD4, cells/mm ³ , median (IQR)	53 (16–126)		
CD4 < 200, cells/mm ³ , n (%)	85 (88.5)		
Transplanted	22 (13.9)		
Connective tissue disease	5 (3.2)		
Hematologic malignancies	5 (3.2)		
Total leukocytes cell/mm ³ , median (IQR)	5760 (3700–7800)	11,860 (8300–14,800)	
PMN	4117 (2300–6175)	8449 (5218–10,962)	
Lymphocyte	835 (490–1460)	2075 (1540–2772)	
Pulmonary lung infection	**	0	N/A
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	25 (16)		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30 (19)		
<i>Cryptococcus neoformans</i>	6 (4)		
<i>Histoplasma capsulatum</i>	4 (2.5)		
Bacteria	11 (7)		
Unknown	84 (53)		
ICU admission	24 (15)	0	N/A
In-hospital mortality	18 (11)	1 (2.9)	N/A

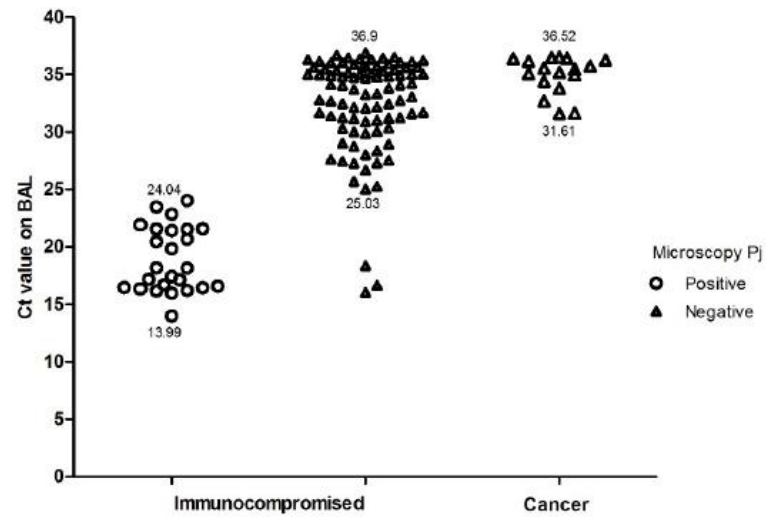
** In group 1, there were 6 patients with mixed infection: 1 with Pj and *M. tuberculosis* infection, 1 Pj + bacteria, 1 *M. tuberculosis* + bacteria,

114/158 (72%)- PCR POS BAL en grupo pac inmunocomprometidos. Cargas fúngicas más altas en los pacientes donde la microscopia fue POS

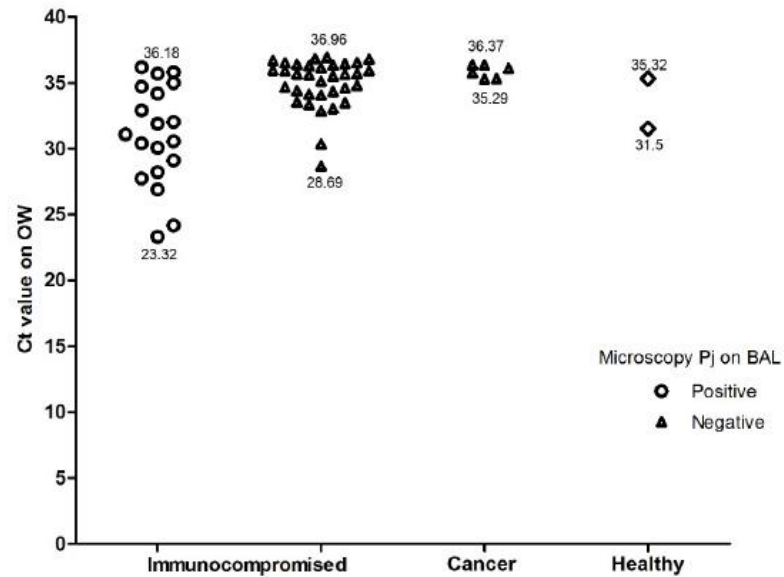
53/158 (33%)- PCR POS OW

25 microscopia POS (16% POS)

28 PCR POS CF Infección (18% POS)



(A)



(B)

Microscopia NO POS para ningún paciente grupo de Cáncer o Inmunocompetentes.
En el primer grupo 48% PCR POS BAL y 17% OW.-> CF COLONIZACIÓN

En el grupo de pacientes sanos un 10 % (2/20) tuvo PCR POS en OW con CF muy bajas

Table 3. Factors associated with *Pneumocystis jirovecii* (Pj) in 158 patients with severe immunosuppression with pneumonia.

Characteristics	PjP Ct < 24.5 N= 28	Colonized Ct 24.5–37 N= 86	Non-Infected Ct > 37 N= 44	PjP vs. Colonized Individuals * PR; (CI 95%)	PjP vs. Non-Infected Individuals ** PR; (CI 95%)	Colonized vs. Non-Infected Individuals ** PR; (CI 95%)
Males, <i>n</i> (%)	20 (71.4)	62 (72.1)	31 (70.5)	0.976 (0.479–1.99)	1.01; (0.75–1.37)	1.02; (0.81–1.29)
Past medical history (clinical condition at baseline)						
AIDS, <i>n</i> (%)	27 (96.4)	64 (74.4)	35 (79.5)	6.82 (0.98–47.62)	1.212; (1.03–1.43)	0.94; (0.77–1.14)
Prior ART treatment, <i>n</i> (%)	2/13 (15.4)	19/45 (42.2)	17/30 (56.7)	2.92 (0.71–12.06)	0.27; (0.07–1.01)	0.74; (0.47–1.18)
CD4 < 200, cells/mm ³ , <i>n</i> (%)	20/20 (100)	41/46 (89.1)	24/29 (82.8)	NE	1.21; (1.02–1.43)	1.08; (0.89–1.31)
HIV viral load > 50,000, <i>n</i> (%)	9/13 (69.2)	21/32 (65.6)	18/22 (81.8)	1.13 (0.41–3.06)	0.85; (0.56–1.28)	0.80; (0.58–1.10)
Transplanted, <i>n</i> (%)	1 (3.6)	17 (19.8)	4 (9.1)	0.23 (0.03–1.54)	0.39; (0.05–3.34)	2.17; (0.78–6.07)
Hematologic malignancies, <i>n</i> (%)	0	3 (3.5)	2 (4.5)	NE	0	0.77; (0.13–4.43)
Systematic lupus erythematosus, <i>n</i> (%)	0	2 (2.3)	3 (6.8)	NE	0	0.34; (0.06–1.97)
Prior corticosteroid therapy <i>n</i> /N (%)	0/1	5/18 (27.8)	4/5 (80)	0.18 (0.02–1.27)	0	0.35; (0.15–0.82)
Neutrophils < 1500 cells/mm ³	0/1	2/21 (9.5)	2/9 (22.2)	0.39 (0.06–2.54)	0	0.43; (0.07–2.59)
No history of prophylaxis with trimethoprim/sulfamethoxazole for >12 weeks	28/28 (100)	70/85 (82.4)	33/44 (75)	NE	1.33; (1.12–1.58)	1.09; (0.91–1.34)
Respiratory symptoms, <i>n</i> (%)						
Cough	27/28 (96.4)	59/85 (69.4)	32/44 (72.7)	8.47; (1.20–59.49)	1.33; (1.09–1.61)	0.95; (0.76–1.20)
Dyspnea	24/28 (85.7)	26/85 (30.6)	13/44 (29.5)	7.56; (2.80–20.37)	2.90; (1.79–4.69)	1.03; (0.59–1.81)
Pleuritic pain	3/28 (10.7)	5/85 (5.9)	7/44 (15.9)	1.58; (0.60–4.10)	0.67; (0.19–2.39)	0.37; (0.12–1.10)
Chest pain	7/28 (25)	12/85 (14.1)	8/44 (18.2)	1.65; (0.82–3.32)	1.38; (0.56–3.37)	0.78; (0.34–1.76)
Hemoptysis	1/28 (3.6)	7/85 (8.2)	6/44 (13.6)	0.49; (0.08–3.13)	0.26; (0.03–2.06)	0.60; (0.22–1.69)
Fever ≥ 38 °C	23/28 (82.1)	65/85 (76.5)	33/44 (75)	1.31; (0.55–3.09)	1.09; (0.86–1.39)	1.02; (0.83–1.26)
Pulse oximetry < 90	12/21 (57.1)	8/60 (13.3)	6/30 (20)	4.07; (2.02–8.2)	2.85; (1.28–6.39)	0.67; (0.25–1.75)

Table 3. Cont.

Characteristics	PjP Ct < 24.5 N= 28	Colonized Ct 24.5–37 N= 86	Non-Infected Ct > 37 N= 44	PjP vs. Colonized Individuals * PR; (CI 95%)	PjP vs. Non-Infected Individuals ** PR; (CI 95%)	Colonized vs. Non-Infected Individuals ** PR; (CI 95%)
Respiratory frequency > 20 breaths/min	22/28 (78.6)	26/85 (30.6)	18/43 (41.8)	4.97; (2.18–11.3)	1.88; (1.26–2.81)	0.73; (0.45–1.18)
Tachycardia	17/28 (60.7)	31/85 (36.5)	13/44 (70.6)	2.09; (1.08–4.05)	2.05; (1.19–3.54)	1.23; (0.72–2.11)
Lymphocytes < 750 cells/mm ³	15/28 (53.6)	39/84 (46.4)	15/44 (34.1)	1.239 (0.65–2.36)	1.57; (0.91–2.69)	1.36; (0.85–2.18)
LDH > 450 UI/L (n = 118)	16/24 (66.7)	19/62 (30.6)	10/32 (31.2)	2.91 (1.40–6.06)	2.13; (1.19–3.84)	0.98; (0.52–1.85)
Radiographic features, n (%)						
Normal radiographic	4/28 (14.3)	26/81 (32.1)	12/44 (27.3)	0.44; (0.166–1.16)	0.53; (0.188–1.46)	1.18; (0.66–2.10)
Interstitial opacities	23/28 (82.1)	39/81 (48.2)	21/44 (47.7)	3.49; (1.43–8.49)	1.72; (1.21–2.45)	1.01; (0.69–1.48)
Pleural effusion	2/28 (7.1)	15/85 (17.6)	7/44 (15.9)	0.43; (0.11–1.66)	0.45; (0.10–2.01)	1.11; (0.49–2.52)
Ground-glass pattern	13/16 (81.3)	11/53 (20.8)	5/31 (16.1)	8.13; (2.56–25.75)	5.04; (2.18–11.63)	1.29; (0.49–3.36)
Complications and clinical outcomes						
Acute respiratory distress syndrome	9/28 (32.1)	7/85 (8.2)	2/44 ((4.6)	2.87; (1.59–5.19)	7.07; (1.65–30.36)	1.81; (0.39–8.36)
Pneumothorax	0/28 (0)	2/85 (2.4)	1/44 (2.3)	NE	0	1.04; (0.09–11.11)
ICU admission	9/28 (32.1)	11/85 (12.9)	4/44 (9.1)	2.20; (1.17–1.13)	3.54; (1.20–10.39)	1.42; (0.48–4.213)
Mechanical ventilation required	6/28 (21.4)	10/85 (11.8)	4/44 (9.1)	2.20; (1.17–4.13)	2.36; (0.73–7.62)	1.29; (0.43–3.89)
In-hospital mortality	4/28 (14.3)	10/86 (11.6)	4/44 (9.1)	1.19 (0.49–2.92)	1.57; (0.43–5.78)	1.28; (0.43–3.85)

Ct: cycle threshold. PR: prevalence ratio. CI: confidence interval PjP: *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. ART: HIV antiretroviral therapy. * The reference group is individuals colonized with *Pneumocystis jirovecii*.

** The reference group is the non-infected by Pj. NE: Not estimated when one of the group has either no cases or all cases had PjP.

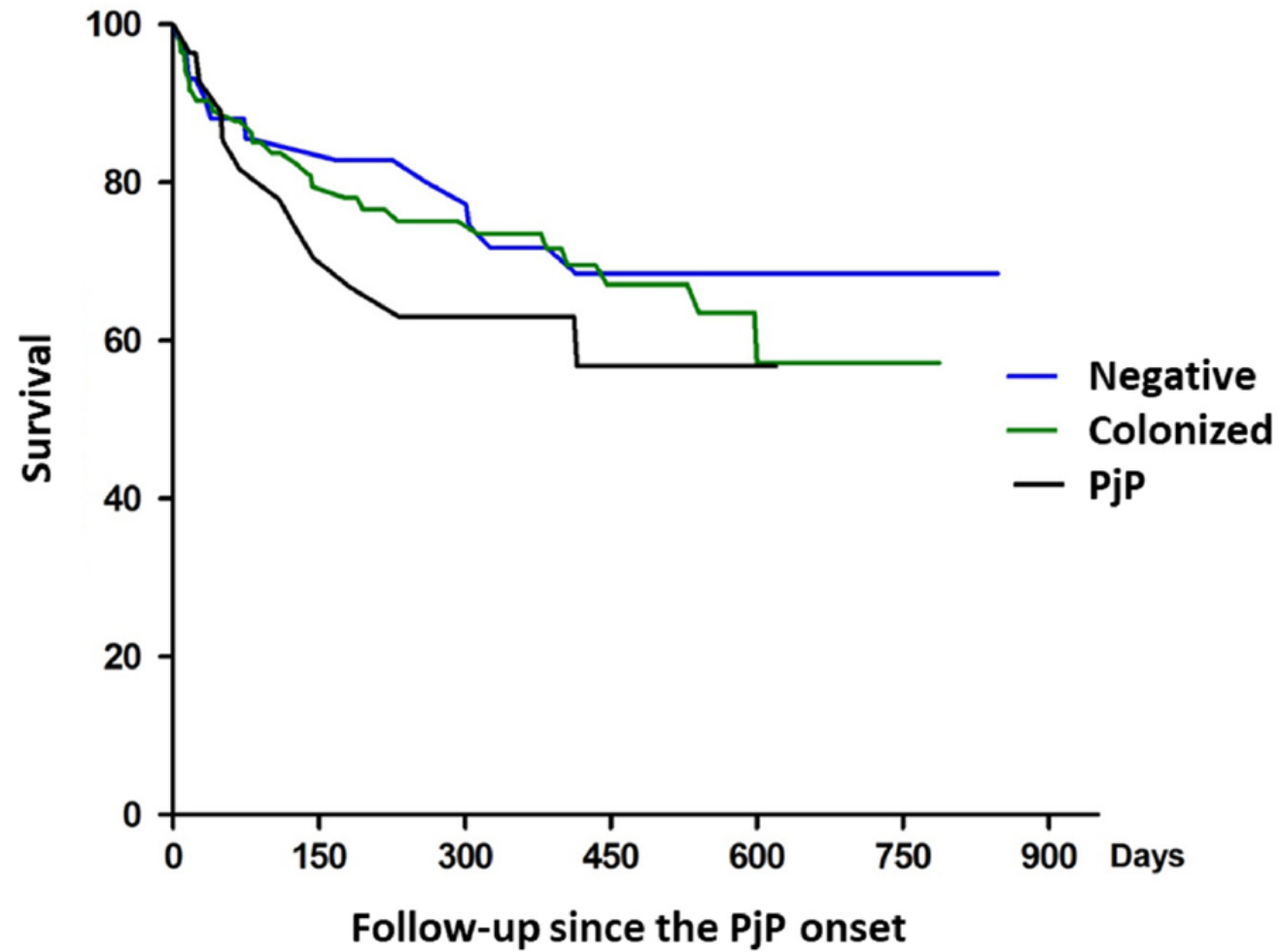


Figure 5. Survival of people with severe immunosuppression (28 with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PjP), 86 colonized by Pj and 44 non-infected by Pj) at 1 year of follow-up.

- Frotis nasofaríngeos no son útiles para diferenciar colonización de infección.
- Según este estudio no detectan ni la mitad de los casos diagnosticados mediante BAL



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Journal of
Clinical Microbiology

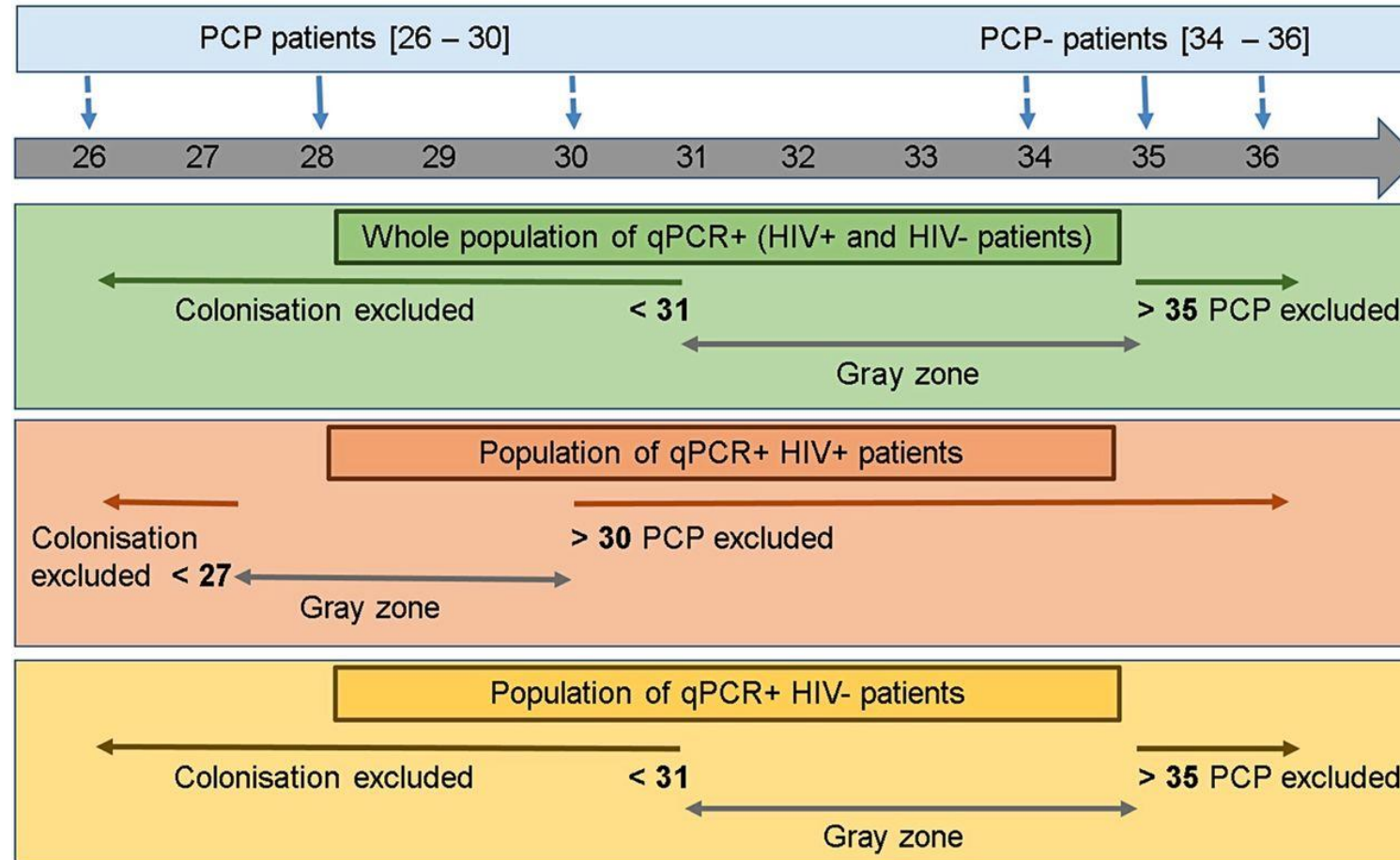


CrossMark
click for updates

Detection of *Pneumocystis jirovecii* by Quantitative PCR To Differentiate Colonization and Pneumonia in Immunocompromised HIV-Positive and HIV-Negative Patients

 T. Fauchier,^a L. Hasseine,^a M. Gari-Toussaint,^a V. Casanova,^b P. M. Marty,^{a,c,d} C. Pomares^{a,c,d}

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU l'Archet 2, Nice, France^a; Département d'Information Médicale, Hôpital Cimiez, CHU Nice, Nice, France^b; INSERM, U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, C3M, Toxines Microbiennes dans la Relation Hôte-Pathogènes, Nice, France^c; Université de Nice Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, France^d



Punto de corte variable en función de presencia o no de infección VIH

Epidemiología CAULE

- Nº muestras analizadas 2020-2023: 366
- Técnica empleada: Diagnóstico molecular mediante PCR
- Nº de muestras NEGATIVAS: 298 (81,4%)
- Nº de muestras POSITIVAS: 67 (18,3%)
- Nº de muestras INDETERMINADAS: 1 (0,3%)



Epidemiología CAULE

ASPIRADOS TRAQUEALES	4
BRONCOASPIRADOS	20
LAVADO BRONCOALVEOLAR	308
CATÉTER TELESCOPADO	3
ESPUTO INDUCIDO	30
LÍQUIDO PLEURAL	1

NEUMOLOGIA	150
U.C.INTENSIVOS	78
MEDICINA INTERNA	32
HEMATOLOGIA	30
BRONCOSCOPIAS	25
ONCOLOGIA	12
C. EXTERNAS	6
NO CONSTA	4
H.MONTE SAN ISIDRO	4
REANIMACION CARDIACA	4
SIN DATOS	3
UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS	3
NEFROLOGIA	3
URGENCIAS	2
CARDIOLOGIA	2
UCI PEDIATRIA	2
REUMATOLOGIA	2
TRAUMATOLOGIA	1
ASTORGA	1
UNIDAD CORONARIA	1
DIGESTIVO	1
(en blanco)	
Total general	366

Epidemiología CAULE

- TOTAL MUESTRAS POSITIVAS: 67 (54 BAL, 9 ESP, 4 BAS)
- Muestras POS CF $< 10^3$: 32 → COLONIZACIÓN (47,7%)
- Muestras POS CF $> 5 \cdot 10^3$: 23 → INFECCIÓN (34,3%)
- Muestras POS CF $10^3 - 5 \cdot 10^3$: 9 → INFECCIÓN PROBABLE (13,6%)
- Muestras POS sin especificar CF: 3 (4,4%)

Epidemiología CAULE

	2020	2021	2022	2023
POSITIVAS	4	25	20	18
TOTALES	29	118	122	96
% POSITIVIDAD	13,79	21,19	16,39	18,75

NEUMOLOGIA	31
MEDICINA INTERNA	11
HEMATOLOGIA	6
ONCOLOGIA	5
U.C.INTENSIVOS	4
BRONCOSCOPIAS	3
NO CONSTA	1
H.MONTE SAN ISIDRO	1
SIN DATOS	1
UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS	1
CARDIOLOGIA	1
ASTORGA	1
NEFROLOGIA	1
(en blanco)	
Total general	67

Conclusiones

- Integración de triple criterio: clínico, radiológico y microbiológico
- Petición sólo en caso de sospecha clínica y factores predisponentes
- Interpretar con precaución el resultado microbiológico. Cargas fúngicas más altas en pacientes VIH +
- Valores superiores a **10^3 copias/mL** sugestivos de neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, siempre acompañado de criterios clínicos y radiológicos.

Reflexiones finales

- Valorar si tratamiento en pacientes colonizados con factores de riesgo para desarrollar infección
- Estandarización de valores para diferentes PCR utilizadas (unificación de diana y técnica diagnóstica)
- Necesidad de más estudios



GRACIAS POR SU ATENCIÓN