

PROCEDURE DE VERIFICATION DE LA TECHNIQUE :

Examen morphologique direct macroscopique et microscopique

**EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
RECHERCHE MYCOLOGIQUE PAR UN EXAMEN MICROSCOPIQUE DIRECT :
à l'état frais et/ou après préparation : concentration, fixation, coloration
(hors colorations spécifiques *Pneumocystis jirovecii*)**

METHODE QUALITATIVE PORTEE A

Mise en évidence de levures et de filaments mycéliens.

L'examen direct d'un prélèvement biologique comprend :

- Un examen à l'état frais entre lame et lamelle du prélèvement avec ou sans liquide de coloration (noir chlorazole, fungifluor)
- Pour certains prélèvements une coloration **Giemsa**

Une appréciation quantitative des éléments fongiques figurera sur le résultat rare, quelques, nombreux.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte/Mesurande :	<p>Analyse au microscope optique et au microscope à fluorescence :</p> <p>Recherche et orientation sur le type d'éléments fongiques</p> <p>appréciation quantitative : nombreux, rares...</p>
Principe de la Mesure :	Microscopie optique et à fluorescence
Méthode de mesure :	Lecture visuelle de lames à l'état frais et/ou après coloration
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) :	Tout prélèvement biologique nécessitant un examen mycologique
Type de récipient, Additifs (tubes, ...)	Flacon stérile, écouvillon sec sans gel
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution...)	<p>Centrifugation : LCR, liquide pleural, péricardique, ascite, LBA (cyto-centrifugation avant coloration).</p> <p>Vitesse de centrifugation : 5mn à 700g.</p> <p>Vitesse de cyto-centrifugation : 4 min à 110g</p> <p>Autres prélèvements : non</p>
Unités :	NA
Intervalles de référence ¹ :	Appréciation quantitative des éléments fongiques présents en fonction des examens avec orientation levure ou filamenteux
Marquage CE (Oui/Non) :	oui
Instrument (analyseur automatique, etc.) :	<p>Microscope objectif 10, 25,50, 100</p> <p>Microscope à fluorescence objectif 10, 20, 40</p>

Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :	Cf liste réactif en annexe
MISE EN OEUVRE	
Opérateurs (Habilitation) :	Techniciens de Parasitologie Mycologie Internes Biologiste : J.Guitard
Procédure de validation : EP-SA-PA-MYCO-ANA-PG-003	La vérification de la méthode porte sur la recherche d'éléments fongiques à l'examen direct. L'évaluation des performances de la méthode a porté sur: <ul style="list-style-type: none"> - la lecture de l'examen direct de divers prélèvements par plusieurs opérateurs (46 prélèvements) - la comparaison de la centrifugation classique des prélèvements et la cyto-centrifugation (16 prélèvements) - la comparaison des résultats de l'examen direct et de la culture (46 prélèvements) Période d'évaluation = 2013-2014 Résultats et conclusion : cf. Évaluation performances
Procédure de gestion de la portée flexible :	EP-HUEP-QUAL-SMQ-PG-007
Période d'évaluation :	Octobre 2013 – Mars 2014
Date de mise en service :	Antérieure à la demande d'accréditation
Autorisation mise en service :	C.Hennequin

Contrôle interne de qualité : contrôle de coloration correcte par Giemsa basée sur l'appréciation de la coloration des cellules (noyau rose et cytoplasme violet).

Mise en place d'un contrôle interlaboratoire pour l'examen direct depuis janvier 2015.
Pas de contrôle de qualité externe par OCIL.

MAITRISE DES RISQUES + 5M intégrés

1 : criticité forte 2 : criticité moyenne 3 : criticité faible

Type de risque	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise et documentation	Criticité
Echantillon	Flacon stérile	Catalogue des analyses EP-SA-PA-PLUS-THEM-IT-001	1
	Conformité de la demande : <ul style="list-style-type: none"> • identité du patient • informations cliniques 	Procédure non-conformité EP-SA-PA-PRE-PRE-PT-003	2
	Qualité de l'échantillon	Catalogue des analyses	3
	Délai de transmission		
Réactifs	Date de péremption	Fiche de suivi des lots de réactifs et date de péremption EP-SA-PA-MYCO-ANA-DE-004	1
Main d'oeuvre	Compétence du personnel	Formation, habilitation, maîtrise des compétences EP-SA-PA-CADRE-ORP-PG-003 EP-SA-PA-PLUS-ORP-DE-008 EP-SA-PA-PLUS-ORP-DE-009 EP-SA-PA-PLUS-ORP-DE-010 EP-SA-PA-PLUS-ORP-DE-014 EP-SA-PA-PLUS-POS-DE-001	1
Matériel	PSM Microscope Centrifugeuse Cytospin Petit matériel (lames-lamelles- ôses....)	Maintenance /Nettoyage EP-SA-PA-EHS-THEM-DÉ-002 Marquage CE / matériel à usage unique	1
Méthode	Réalisation des examens directs et des colorations	Modes opératoires EP-SA-PA-MYCO-ANA-DE-001 EP-SA-PA-MYCO-ANA-IT-001 EP-SA-PA-MYCO-ANA-PT-004 EP-SA-PA-PLUS-ANA-IT-002 EP-SA-PA-PLUS-ANA-IT-003	1
Phase post analytique	Saisie et Transmission des résultats Validation biologique Archivage	Procédure et mode opératoire EP-SA-PA-PLUS-POS-DE-001 EP-SA-PA-PLUS-POS-MT-001 EP-SA-PA-PLUS-POS-PG-002	2

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA TECHNIQUE

Il est important de souligner que l'évaluation des performances d'un examen direct manuel repose en grande partie sur l'**habilitation des techniciens à cet examen.**

Etat frais (Noir chlorazole – fungifluor) / Giemsa

Comparaison lecture entre deux opérateurs (biologiste et interne/techniciens /biologiste)

	Technique	N° échantillon	Nature prélèvement	Date 1ere lecture	Lecteur 1	Résultat 1	Date 2ème lecture	Lecteur 2	Résultat 2	conclusion	Résultat culture
1	Giemsa	3102444131	ecouvillon	24/10/13	FB	Rares levures bourgeonnantes	25/10/13	JG	Qq levures bourgeonnantes	conforme	C. albicans et krusei
2	Noir chlorazole ou fungifluor /giemsa	3102545296	biopsie	25/10/13	FB	Nombreux fil mycéliens	25/10/13	JG	Nombreux fil mycéliens	conforme	neg
3	Giemsa	3102952213	ecouvillon	31/10/13	JG	neg	31/10/13	DR	Neg	conforme	C. albicans
4	Giemsa	3102952197	ecouvillon	31/10/13	JG	Levures	31/10/13	DR	Levures	conforme	C. albicans
5	Giemsa	3102851409	ecouvillon	31/10/13	JG	neg	31/10/13	DR	Neg	conforme	neg
6	Etat frais /Giemsa	3103155615	LBA	31/10/13	FB	Neg	31/10/13	JG	Neg	conforme	C. albicans
7	Giemsa	3110562497	ecouvillon	06/11/13	DR	Neg	06/11/13	JG	Neg	conforme	neg
8	Giemsa	3110562495	ecouvillon	06/11/13	DR	bacteries	06/11/13	JG	bacteries	conforme	neg
9	Giemsa	3111274139	ecouvillon	14/11/13	DR	Qq levures bourgeonnantes	14/11/13	JG	Rares levures bourgeonnantes	conforme	C. albicans
10	Giemsa	3111376441	ecouvillon	14/11/13	DR	Neg	14/11/13	JG	Neg	conforme	neg
11	Giemsa	3111274086	ecouvillon	14/11/13	DR	Neg	14/11/13	JG	Neg	conforme	neg
12	Giemsa	3111375968	ecouvillon	14/11/13	DR	Neg	14/11/13	JG	Neg	conforme	neg
13	Giemsa	3111274090	ecouvillon	14/11/13	DR	Neg	14/11/13	JG	Neg	conforme	neg
14	Giemsa	3111376520	ecouvillon	14/11/13	DR	Neg	14/11/13	JG	Neg	conforme	neg
15	Noir chlorazole ou fungifluor / Giemsa	4021970087	Biopsie	25/02/14	YS	Neg	21/02/14	MD	Neg	conforme	A. fum
16	Giemsa	4021970080	ecouvillon	25/02/14	YS	Tres rares levures filamenteuses	26/02/14	PF	Neg	conforme	C. albicans
17	Etat frais /Giemsa	4031725286	LBA	17/03/14	YS	PJ kyste	17/03/14	JG	PJ Kyste	conforme	C. albicans, IF pos, PCR pos
1	Etat frais	3100303611	expectoration	03/10/13	FB	Neg	03/10/13	JG	Neg	conforme	A. fum
2	Etat frais	3100303836	Expectoration	03/10/13	FB	Rares levures filamenteuse	03/10/13	JG	Qq lev fil	conforme	A. fum, C. Glabrata, C. tropicalis
3	Etat frais	3100303846	expectoration	03/10/13	FB	Neg	03/10/13	JG	Neg	conforme	A. fum
4	Etat frais	3100203859	expectoration	03/10/13	FB	Neg	03/10/13	JG	Neg	conforme	A. fum
5	Etat frais	3100303982	aspiration	03/10/13	FB	Neg	03/10/13	JG	Neg	conforme	neg
6	Etat frais	3100303985	Expectoation	03/10/13	FB	Neg	03/10/13	JG	Neg	conforme	neg

7	Etat frais	310030398 6	aspiration	03/10/13	FB	Neg	03/10/13	DR	Neg	conforme	aureobasidium
8	Etat frais	310030399 4	expectoration	03/10/13	FB	Neg	03/10/13	DR	Neg	conforme	C. albicans
9	Etat frais	310071048 2	aspiration	07/10/13	FB	Neg	07/10/13	DR	Neg	conforme	A. versicolor
10	Etat frais	310061048 6	expectoration	07/10/13	FB	Qq lev et pseudofil	07/10/13	DR	lev et pseudofil	conforme	C. albicans
11	Etat frais	310051049 2	expectoration	07/10/13	FB	Qq lev et pseudofil	07/10/13	DR	lev et pseudofil	conforme	C. albicans
12	Etat frais	310071049 5	expectoration	07/10/13	FB	Qq lev et pseudofil	07/10/13	DR	lev et pseudofil	conforme	C. albicans
13	Etat frais	310061050 0	expectoration	07/10/13	FB	Rares filaments	07/10/13	DR	Filaments	conforme	C. albicans
14	Etat frais / Giemsa	310223819 3	LBA	22/10/13	YS	Rares FM	22/10/13	DD	Rares FM	conforme	A. fum
15	Etat frais	310223867 0	aspiration	22/10/13	FB	Neg	22/10/13	YS	Neg	conforme	C. albicans
16	Etat frais	310213867 9	expectoration	22/10/13	FB	Neg	22/10/13	YS	Neg	conforme	A. fum
17	Etat frais	310254523 1	aspiration	25/10/13	DR	Neg	25/10/13	JG	Neg	conforme	C. albicans
18	Etat frais	310254541 4	expectoration	25/10/13	FB	Neg	25/10/13	JG	Neg	conforme	A. fum
19	Etat frais	310254541 5	expectoration	25/10/13	FB	rares FM	25/10/13	JG	Rares FM	conforme	A. fum
20	Etat frais	310254541 7	Aspiration	25/10/13	FB	Neg	25/10/13	JG	Neg	conforme	A fum, peni sp
21	Etat frais	310254541 8	Aspiration	25/10/13	FB	Neg	25/10/13	JG	Neg	conforme	Champignon fil. Stérile (CFS)
22	Etat frais	310315466 1	drain	31/10/13	JG	Neg	31/10/13	DR	Neg	conforme	neg
23	Etat frais	310305464 3	Aspiration	31/10/13	JG	Neg	31/10/13	DR	Neg	conforme	C. albicans, peni sp, A fum
24	Etat frais / Giemsa	310305465 9	LBA	31/10/13	JG	Neg	31/10/13	DR	Neg	conforme	neg
25	Etat frais	311045958 1	expectoration	04/11/13	NI	Neg	04/11/13	BA	Neg	conforme	A fum, C pararugosa
26	Etat frais	311045950 3	expectoration	04/11/13	NI	Nombreux pseudofil	04/11/13	BA	Nombreux pseudofil	conforme	C. dubliniensis et inconspicua
27	Etat frais	311045958 4	expectoation	04/11/13	NI	Neg	04/11/13	BA	Neg	conforme	A fum, A flavus, C pararugosa
28	Etat frais	311025951 3	expectoration	04/11/13	NI	Très nombreux pseudofil	04/11/13	BA	Très nombreux pseudofil	conforme	C. dublniensis, C. inconspicua
29	Etat frais	311045957 9	expectoration	04/11/13	NI	Neg	04/11/13	BA	Neg	conforme	C. albicans

Conclusion : Pas de variation interlecteur.

COMPARAISON CENTRIFUGATION CLASSIQUE ET CYTOCENTRIFUGATION(cytospin)

Le but est de valider le prétraitement de l'échantillon par la cyto-centrifugation.

Les numéros de prélèvement sont les mêmes pour tous les lecteurs.

Comparaison par Lecteur 1

N° DOSSIER	N° DES LAMES	CLASSIQUE			N° DES LAMES	CYTO. CENTRI		COMMENTAIRE TECHNIQUE
		GIEMSA	IF/PJ	BM/PJ		GIEMSA		
40621	1	NEG	POS	POS	9	POS en PJ	TROUBLE 200µl	
43344	2	NEG	NEG	NEG	10	NEG peu d'élémnts (NI)	TROUBLE LEGE 200µl	
44814	3	NEG	NEG	NEG	11	NEG moins riche mais lisible (NI)	CLAIR MAIS QUE 50µl DE LBA	
49186	4	douteux	POS	POS	12	POS moins riche mais lisible	CLAIR MAIS QUE 50µl DE LBA	
49346	5	NEG	NEG	NEG	13	NEG	ROSE 200µl	
57201	6	POS à cryptocoq			14	POS(NI) crypto +++ fil++ et capsules	LBA ROUGE, UTILISATION DE SAPONINE 200µl. EF et GIEMSA BCP PLUS BEAU EN CYTO	
57199	7		NEG		15	NEG plus riche en cellules et élmts fig.	CLAIR 200µl	
57196	8		NEG	NEG	16	NEG plus riche en cellules et élmts fig.	TROUBLE LEGE 200µl	

Lecteur 2

LAMES	CLASSIQUE	LAMES	CYTO. CENTRI
1	ILLISIBLE TROP DE DEBRIS ET COLO TROP FONCE	9	COLO FONCEE CELLULE+++ POS EN PJ ET LEV
2	COLO OK PEU DE CELLULE	10	ETALEMT PAS NET CELLULE++ FOND FIBRINEUX (+DEBRIS)
3	COLO OKK LAME RICHE EN CELLULE PAS ASSEZ DISPERSEES	11	COLO OK CELLULES + (PAS RICHE +,?)
4	KYSTE ET TROPHO DE PJ+++ COLO OK CELLULES ++	12	COLO OK CELLULES++ POS EN PJ ++
5	COLO OK CELLULES++ (GR)	13	COLO OK CELLULES++ (GR)
6	COLO OK CELLULES++ POS EN LEVURES HALO +	14	COLO OK CELLULES++ BIEN ETALE CRYPTO+++ HALO FILAMENTS
7	COLO OK CELLULES++(DEBRIS)	15	COLO OK CELLULES+++ (DEBRIS)
8	COLO OK CELLULES+ (DEBRIS)	16	COLO OK RICHE EN CELLULES+++ BIEN ETALEES

Lecteur 3

LAMES	CLASSIQUE	LAMES	CYTO. CENTRI
1	POS EN PJ 1 AMAS GROS PAQUETS	9	POS EN PJ DENSE MAIS ETALE
2	NEG BIEN ETALE	10	NEG R A S
3	NEG DEBRIS	11	NEG BIENETALE CLAIR
4	POS EN PJ BIEN ETALE	12	POS EN PJ BIEN ETALE
5	NEG TAS RICHE	13	NEG BIEN ETALE
6	ELEMTS RONDS+OU- CAPSULES DEBRIS QQUE ZONES EN AMAS	14	POS EN CRYPTO++++ ET FIL TRES TASSE
7	NEG DEBRIS++ RARES AMAS	15	NEG BIEN ETALE DEBRIS
8	NEG DEBRIS QQUES AMAS ETALE MOYENNEMENT	16	NEG BIEN ETALE

Lecteur 4

LAMES	CLASSIQUE	LAMES	CYTO. CENTRI
1	PNEUMOCYSTIS ? TRES LAID+++	9	NEG PAS BEAU DU TOUT
2	NEG PAS BEAU	10	NEG PAS BEAU
3	NEG PAS BEAU	11	NEG BEAU MAIS SALETES ???
4	PNEUMOCYSTIS BEAU	12	PNEUMOCYSTIS BEAU
5	NEG LAID	13	NEG PAS TERRIBLE
6	CRYPTO ASSEZ LAID	14	CRYPTOCOQUES BEAU
7	NEG ASSEZ BEAU	15	NEG ASSEZ BEAU
8	NEG PAS BEAU	16	NEG BEAU+++

Conclusion :

Huit comparaisons concentration classique et par cytopspin ont été réalisées.
 Pour la détection de Pneumocystis : la cyto-centrifugation était meilleure que la centrifugation classique.
 Pour les levures : les deux techniques ont donné des résultats équivalents.
 L'étalement était meilleur à la cyto-centrifugation.

La cyto-centrifugation est apte à être utilisée au laboratoire.

CONTAMINATION

Non applicable

COMPARAISON DE METHODE

L'examen direct comparé aux résultats de la culture (cf tableau précédent) montre une moindre sensibilité de l'examen direct comme décrit dans la littérature.

Un seul prélèvement est positif à l'examen direct et négatif en culture conformément à ce qui est décrit dans la littérature concernant la mauvaise sensibilité de la culture pour les biopsies (1).

CONCLUSION

**Les tests réalisés confirment l'absence de difficulté à la lecture de l'examen direct.
Tous les examens directs positifs sont concordants avec les cultures.
Ce test est applicable dans notre laboratoire.**

BIBLIOGRAPHIE

- (1) données fournisseur
- (2) Odds F. Chromagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important
Candida species.
Journal of Clinical Microbiology, 1994, 1923-1929
- (3) ANOFEL (fascicule et CDRom)
- (4) Rickerts et Al. CID 2005
- (5) Mycopathologia. 2013 Dec;176(5-6):377-85. doi: 10.1007/s11046-013-9657-9. Epub 2013 Sep 18.
Use of mycological, nested PCR, and real-time PCR methods on BAL fluids for detection of Aspergillus fumigatus and A. flavus in solid organ transplant recipients.
Zarrinfar H¹, Mirhendi H, Makimura K, Satoh K, Khodadadi H, Paknejad O.
- (6) Mycoses. 2005;48 Suppl 1:12-7. Clinical evaluation of Aspergillus-PCR for detection of invasive aspergillosis in immunosuppressed patients.
Lass-Flörl C¹, Gunsilius E, Gastl G, Freund M, Dierich MP, Petzer A.

ANNEXE

LISTE LOTS ET REFERENCES REACTIFS UTILISES POUR LES TESTS

	Fungifluor		Encre de chine		Noir chlorazole		Giemsa			
	référence	lot	référence	lot	référence	lot	référence	lot		
juil-12	17442A		261194		C1144-25G	70H0369/ 015K0956/	FR09265	B02911		
oct-13										
nov-13										
février 2014		656034						2192304		
mars-14										

Liste matériel

Pièce	Matériel	Code labo	N°inventaire
Réserve 1	Réfrigérateur	RR3	113224
Réserve 1	Réfrigérateur	RR4	EP10.2 116861
Réserve 1	Congélateur -35	RC1	502981 T
Réserve 1	Congélateur -35	RC2	116619
Réserve 1	Congélateur -35	RC4	116887
Réserve 1	congélateur -80	RC3	76094
Réserve 1	Etuve	Bactec	84619
Divers	Réfrigérateur	DiR1	113225
Divers	Réfrigérateur	DiR2	26844
Myco	Réfrigérateur	MR1	26843
Myco	Etuve	ME1	76865
Myco	Etuve	ME2	3586
Myco	Hotte	MH1	79584
Myco	Microscope	M10	78450
Myco	Microscope	M13	8595
Myco	Imprimante		5005468
Myco	Densitometre		84184
Dermato	Hotte	DH1	72153
Dermato	Hotte	DH2	16117
Dermato	Microscope	M6	80581
Dermato	Microscope	M7	80586
Dermato	Microscope	M9	79569
Dermato	Loupe		3550
Laverie	Réfrigérateur	LaR1	971171 T

Parasitologie	Centrifugeuse	PCent1	33760
Parasitologie	Centrifugeuse	PCent2	3570
Parasitologie	Microscope	M2	80584
Parasitologie	Microscope	M4	75393
Parasitologie	Microscope	M14	75394
Parasitologie	Microscope	M3	79570
Parasitologie	Microscope	M5	3552
Parasitologie	Imprimante		5013188
Couloir / Séro	Réfrigérateur	SR1	971172 T
Couloir	etuve	CE4	76864
Couloir	etuve	CE5	3587
Couloir	etuve	CE7	3588
Couloir	etuve	CE8	34249

Liste matériel critique

EP-SA-PA-METRO-MAT-DE-002