

 <p>Hôpitaux de Toulouse</p>	<p>CHAPITRE</p>	<p>Date de création 20/03/2012 Ref</p>
<p>Pôle de BIOLOGIE</p> <p>Service Parasitologie-Mycologie Rangueil</p>	<p>MYCOLOGIE</p>	<p>Version : Versions indice : indicet</p>
		<p>Page : 1/6</p>

**EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :
ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE CHAMPIGNONS
METHODE QUALITATIVE PORTEE A**

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte/Mesurande :	Echantillons biologiques de patients ou milieux utilisés pour la conservation et /ou le transport de spécimens/ Identification Mycologique
Principe de la Mesure :	Isolement et identification de levures ou champignons filamenteux à l'aide de caractérisation morphologiques, biochimiques et immunologiques (PMOP.MYCO.IDE...)
Méthode de mesure :	Méthodes manuelles et automatisées
Marquage CE (Oui/Non)	OUI (cf Annexe)
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	RYA (Dernière évaluation A)

MISE EN OEUVRE

Opérateurs (Habilitation) :	Technicien(ne)s Secteur Morphologie
Procédure de validation :	PPR.GEN.49
Procédure de gestion de la portée flexible :	PPR.GEN.71
Période d'évaluation :	Juin 2008
Date de mise en service :	Antérieur à la demande d'accréditation
Autorisation par :	Dr CASSAING

REDACTION et VERIFICATION date_verif	VALIDATION	APPROBATION date_approbation
redacteur	qui_valide	qui_approuve

MAITRISE DES RISQUES

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...),	Echantillons multiples (urines , échantillons pulmonaire...)	Catalogue des Analyses du Pôle de Biologie du CHU de TOULOUSE (avec consignes de prélèvement + Consignes de prélèvement pour les prélèvements réalisés en interne (PENR.HAB.INT.06)
Prétraitement de l'échantillon	Traitement différent en fonction de l'échantillon	PMOP.MYCO.PREL.....
Main d'œuvre (habilitation du personnel)	Habilitation du personnel	PPR.GEN.62 PENR.QUAL.12 PENR.HAB.INT.02
Conditions ambiantes requises	Zone close	Fermeture des portes et des fenêtres
Références des réactifs	Nombreux réactifs : Milieux de culture Tests rapides d'identification Souches ATCC	Vérification des versions des fiches techniques fournisseurs Respect des conditions de conservation Vérification des dates de péremption pour les réactifs achetés Dates de fabrication et de péremption pour les milieux fabriqués CIQ à la livraison ou fabrication (PMOP.MYCO.C.QUAL.02-03)
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	Microscopes Etuves PSM API 32®+ Logiciel Apiweb Densicheck Réfrigérateurs et congélateurs Centrifugeuses	Surveillance par une maintenance 1 fois/an Cartographie tous les 5ans + surveillance avec sondes étalonnées + Contrôles de l'air et des surfaces mensuel (PMOP.MYCO.C.STER.01) Contrôles de l'air et des surfaces Hebdomadaire (PMOP.MYCO.C.STER.01) + maintenance annuelle Maintenance du lecteur Mode opératoire (PF.AP.MYCO.21)+ Qualification (PENR.QUAL.05-1) surveillance avec sondes étalonnées maintenance annuelle

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

- Pour les levures API 32®

Performances (données fournisseurs) :

2697 souches contenues dans la base de données ont été testées :

- 89,4% ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires)
- 7,8 % n'ont pas été identifiées
- 2,9 % ont été mal identifiées

Limites du test :

La limite de la méthode est représentée par le contenu dans la base de données. **Les levures les plus rares n'y sont pas référencées et ne pourront pas être identifiées par cette méthode.**

Si nécessaire, un séquençage nucléotidique pourra être réalisé à partir de l'ADN extrait de la souche.

- CIQ d'identification mensuel (évaluation continue de la compétence des opérateurs) (PMOP.MYCO.C.QUAL.07)
- EEQ :
 - Contrôle régional du CTCB (bi-annuel, 1 échantillon)
 - Contrôle national AFSSAPS (annuel, 1 échantillon)
 - Contrôle AFSSAPS (Cornées) (bi-annuel, 4 échantillons)
 - Contrôle inter-laboratoires (trimestriel)

SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES

Pour les levures

		sensibilité	spécificité
Bichro-latex albicans®	Fumouze	99,8 % ^(1,5)	99,4 % ^(1,5)
Bichro-dubli®	Fumouze	98% ⁽¹⁾	100% ⁽¹⁾
Krusei-color®	Fumouze	98,8% ⁽¹⁾	100% ⁽¹⁾
Glabrata RTT®	Fumouze	93,8 à 97,9 % ⁽¹⁾	97,6 à 98,8 % ⁽¹⁾
Chromagar®	Becton-Dickinson	99% ^(2,3)	99% ^(2,3)
Candiselect 4®	Bio-Rad	80 % ^(1,3)	100 % ^(1,3)
PCB	Laboratoire	98,5% ^(3,4)	100% ^(3,4)

(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) déterminée pour *Candida albicans*

(4) déterminée au laboratoire, voir annexe 1

(5) ce test permet l'identification de *C. albicans*/*C. dubliniensis*. Ces 2 espèces sont très proches.

Deux études ont montré que la prévalence de *C. dubliniensis*

au sein de la population *albicans/dubliniensis* est comprise entre 2,6%* et 4%**.

* Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale. S. Cassaing et al.

Etude sur 200 souches au CHU Toulouse. 2005 (Annexe3)

** Congrès de l'ISHAM (International Society for Human and Animal Mycology). F. Grenouillet et al. Etude multicentrique sur 2725 souches. 2006 (Annexe 4).

Champignons filamenteux

Référence Cf bibliographie §	Levures	Filamenteux	Caractères morphologiques	Caractères biochimiques
(1)		+	+	+
(2)	+	+		
(3)	+	+		
(4)		+	+	
(5)		+	+	
(6)		+	+	
(7)	+	+	+	+
(8)	+	+		
(9)	+	+		
(10)	+	+	+	+
(11)	+	+	+	
Référence Cf bibliographie §	Levures	Filamenteux	Caractères morphologiques	Caractères biochimiques
(12)		+	+	
(13)		+	+	
(14)		+	+	
(15)	+		+	+
(16)		+	+	
(17)		+	+	
(18)		+	+	
(19)		+	+	
(20)	+	+	+	
(21)	+	+	+	

CONTAMINATION

Inter échantillon pour les paramètres sensibles :	NA tests individuels
Inter réactif si nécessaire :	
Vérification bibliographique :	
Vérification sur site :	

COMPARAISON DE METHODES

La corrélation entre les résultats (positif/négatif) de l'examen direct et de la culture a été étudiée sur une série de 75 échantillons (Annexe 2). Cette étude de corrélation permet d'évaluer les performances de l'isolement en culture.

Les résultats sont corrélés dans **76% des cas** (57/75).

Parmi **les cas discordants** (n=18) il s'agit d'un résultat "**examen direct négatif, culture positive**" dans **88,9% des cas** (16/18) :

- Dans le cas d'une **culture peu abondante**, ceci peut s'expliquer par une sensibilité moindre de l'examen direct (n=8/16).
- Dans le cas d'une culture abondante, il peut s'agir d'un échantillon non homogène ce qui est fréquent dans les échantillons de la sphère respiratoire (6/16) ou d'un champignon filamenteux issu de l'environnement dans le cas d'échantillons tels qu'une expectoration (2/16).

Enfin, une **discordance "examen direct positif/culture négative"** (2/18) peut s'expliquer par un traitement antifongique en cours chez le patient sous réserve que les conditions d'analyse requises aient été respectées.

Les causes de discordance ont été étudiées dans le **PMOP.MYCO.CI.AR.01**.

Commentaires

Chaque fois que le contexte le justifie, c'est-à-dire lorsqu'il existe un critère de gravité lié au patient (statut immunologique, état clinique, pathologie sous-jacente) et/ou à la nature du champignon isolé et/ou au site d'isolement du champignon, le résultat est discuté avec le clinicien en charge du patient ou le cas échéant avec la banque de tissus. Ceci, soit par communication téléphonique, soit pour certains services au cours de réunions multidisciplinaires hebdomadaires (services de Réanimation Respiratoire et service de Transplantation d'organes). Tout résultat ayant motivé un appel téléphonique est notifié dans le dossier informatique du patient.

Cette méthode est validée et il est essentiel de rappeler que l'identification finale tient compte des caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques du champignon

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Les Dermatophytes. Cahiers Bioforma, N°31, Formation continue des Biologistes en biologie médicale, 2004.
- (2) Parasitoses et Mycoses courantes de la peau et des phanères, Coordinateurs D. Chabasse et E. Caumes, 2003, Guides Médi Bio, Elsevier.
- (3) Mycoses d'importation. Coordinateurs D. Chabasse et M. Develoux, 2003, Guides Médi Bio, Elsevier.
- (4) Les moisissures d'intérêt médical. Cahiers Bioforma, N°25, Formation continue des Biologistes en biologie médicale, 2002.
- (5) Identification of common Aspergillus species. MA. Klich, 2002, CBS.
- (6) Introduction to food and Airborne Fungi, R. Samson, ES. Hoekstra, JC Frisvad, O Filtenborg, 6^{ème} édition, 2002, CBS.
- (7) Atlas of Clinical Fungi, GS. de Hoog, J. Guarro, J. Gené et MJ. Figueras. 2^{ème} édition, 2000, CBS.
- (8) Mycologie médicale, D. Chabasse, C. Guiguen et N. Contet-Audonnet, 1999. Abrégés Masson.
- (9) Les Mycoses humaines, R. Grillo, 1997, Collection option bio. Elsevier éditeur.
- (10) Guide de Mycologie Médicale, H. Koenig, 1995, Ellipse.
- (11) Medical Mycology. KJ. Kwon-Chung et JE. Bennett, 1992, Lea et Febiger.
- (12) Les Dermatophytes. Atlas clinique et biologique, G. Badillet, 3^{ème} édition, 1991, Editions Varia Paris.
- (13) Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. J. Botton et al. 2^{ème} édition, 1990, Masson.
- (14) Champignons contaminants des cultures. Champignons opportunistes. Atlas clinique et biologique. Tomes I et II. G. Badillet, C. de Bièvre et E. Gueho, 1987, Editions Varia Paris.
- (15) Yeasts: Characteristics and identification, JA. Barnett, RW. Payne, D. Yarrow, 2^{ème} édition, 1983, Cambridge University Press.
- (16) The Genus Penicillium. JI. Pitt, 1979, Academic Press.
- (17) More Dematiaceous Hyphomycetes, MB. Ellis, 1976, Commonwealth Agricultural Bureaux.
- (18) The Genus Aspergillus,. KB. Raper, 1973, Academic Press.
- (19) Dematiaceous Hyphomycetes, MB Ellis, 1971, Commonwealth Agricultural Bureaux.
- (20) CD-Rom ANOFEL-3, Banque d'images numérisées de Parasitologie et de Mycologie, Association Française des Enseignants et Praticiens Hospitaliers titulaires de Parasitologie et Mycologie Médicale, SILK Informatique
- (21) Mycologic : Encyclopédie multimedia de Mycologie Médicale, 1998. CDRom Logi tel-France Med.