



FICHE TYPE QUALITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

Note : le laboratoire se référera au tableau du § 9.2.1 du Document Cofrac SH GTA 04 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B¹) et complètera **une fiche par examen de biologie médicale**

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :

Recherche de *PNEUMOCYSTIS JIROVECI* par Immuno Fluorescence Indirecte et coloration au May Grunwald Giemsa MGG (variante rapide)

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte/Mesurande :	Différents stades parasitaires : trophozoites, pré-kystes et kystes de <i>Pneumocystis jirovecii</i>
Principe de la Mesure :	Marquage des parasites permettant de les identifier par leur morphologie au microscope: 1. Optique après coloration au May Grünwald Giemsa : trophozoites, pré-kystes et kystes à 8 corps intra kystiques 2. A fluorescence en IFI par marquage des kystes
Méthode de mesure :	Microscopique
Marquage CE (Oui/Non)	OUI
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA

MISE EN OEUVRE

Opérateurs (Habilitation) :	M. Pillot et S. Richard : Techniciennes C.Kauffmann-lacroix et E. Cateau Biologistes
Procédure de validation :	BIOL-ANA-PR-001/ PARA -ANA-PR-001
Procédure de gestion de la portée flexible :	BIOL-ORG-PR-002 Gestion de la portée d'accréditation
Période d'évaluation :	2011-2012
Date de mise en service :	2012
Autorisation par :	Pr M.H.Rodier

¹ Dans le cadre d'une portée B, le laboratoire aura à sa charge d'établir un protocole d'évaluation propre aux items et aux examens concernés par la portée B.



FICHE TYPE QUALITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

MAITRISE DES RISQUES

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs) :	LBA, expectorations induites	- Manuel de prélèvements. - Service de soins Echantillons prélevés par un médecin
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Centrifugation - Cytocentrifugation	PARA-MAT-MO-002 Centrifugation des échantillons Contrôle des centrifugeuses par le tachymètre (Biomédical) PARA-MAT-MO-011 Cytocentrifugeuse Shandom cytospin4
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Formation et maintien des Habilitations en mycologie	PARA-RH-DF-001 Fiches d'habilitation du service de Parasitologie
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :	IFI : réfrigérateur, congélateur , incubation à l'étuve 37°C RAL à température ambiante	BIOL-MET-PR-003 Gestion des enceintes thermostatées
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	P.JIROVECII Détection directe MONOFLUOKIT Biorad 72734 <ul style="list-style-type: none"> Acétone réactif récent Enzyme Fluoprep Glycérine tamponnée KIT DE COLORATION 555 POUR FROTTIS SANGUINS VWR 720-0351	PARA-ANA-PR-190 Diagnostic de la pneumocystose à <i>Pneumocystis jirovecii</i> (<i>carinii</i>) PARA-ANA-MO-191 Diagnostic de la Pneumocystose à <i>Pneumocystis jirovecii</i> (<i>carinii</i>) : IFI <ul style="list-style-type: none"> Stockage dans petit flacon renouvelé Après reconstitution l'enzyme est stable 3 mois Utilisation de la glycérine du kit PARA-LOG-PR-001 Fiche d'instruction concernant les réactifs PARA-ANA-MO-190 Diagnostic de la Pneumocystose à <i>Pneumocystis jirovecii</i> (<i>carinii</i>) : Coloration de RAL <ul style="list-style-type: none"> Utilisation 3 mois après ouverture
Matériau de références (témoins) :	<i>P. Jirovecii</i> : lames contrôle positives (par 10) Biorad 72734 et CQi maison Pipettes à piston	PARA-ANA-MO-001 Préparation, contrôle et conservation des CQi
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	Minuteur Microscope optique et à fluorescence 495 – 520 nm Respect de la durée de vie de la lampe à vapeur de mercure :	BIOL-MET-PR-001 Suivi, maintenance, contrôle des pipettes automatiques BIOL-MET-PR-002 Identification, suivi et contrôle des minuteurs électroniques (Timers) BIOL-MAT-MO-003 Utilisation du microscope Compteur horaire

* item à renseigner si nécessaire



FICHE TYPE QUALITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES (indispensable en portée B)

Résultats de l'étude des courbes
ROC à partir d'une étude clinique :
PHRC régional / groupe GERICCO

- *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2005 Jun;3(3):435-44.
Management of Pneumocystis pneumonia in patients with inflammatory disorders.
Roblot F.
- *Scand J Infect Dis.* 2004;36(11-12):848-54.
Risk factors analysis for Pneumocystis jiroveci pneumonia (PCP) in patients with haematological malignancies and pneumonia.
Roblot F, Imbert S, Godet C, Kauffmann C, Ragot S, Le Moal G, Roblot P, Rodier MH, Robert R, Becq-Giraudon B, Guilhot F.
- *J Infect.* 2003 Jul;47(1):19-27.
Pneumocystis carinii pneumonia in patients with hematologic malignancies: a descriptive study.
Roblot F, Le Moal G, Godet C, Hutin P, Texereau M, Boyer E, Prazuck T, Lacroix C, Souala MF, Raffi F, Weinbreck P, Besnier JM, Garo B, de Gentile L, Becq-Giraudon B.
- *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002 Jul;21(7):523-31.
Analysis of underlying diseases and prognosis factors associated with Pneumocystis carinii pneumonia in immunocompromised HIV-negative patients.
Roblot F, Godet C, Le Moal G, Garo B, Faouzi Souala M, Dary M, De Gentile L, Gandji JA, Guimard Y, Lacroix C, Roblot P, Becq-Giraudon B.

1. Dans les années 1990 lors de l'épidémie de pneumocystose chez les patients VIH+ les techniques de références étaient les colorations au MGG pour la mise en évidence des trophozoïtes, pré-kystes et kystes à 8 corps intra kystiques et à la méthénamine argent (Gomorii-Grocott) pour celle des kystes
2. Dans les années 2000 l'immunofluorescence par le marquage plus sensible des kystes a permis de mettre en évidence cette infection, au cours de différentes pathologies, chez les patients VIH négatif.
3. La PCR, technique plus sensible et d'une valeur prédictive négative élevée, permet un dépistage plus rapide de ces mêmes patients mais elle semble avoir l'inconvénient de détecter des colonisations. Lors de la mise en route de la PCR en temps réel le seuil de positivité (CT) a été défini < à 35.
Si la PCR est positive, une technique complémentaire par IFI est réalisée à la demande des cliniciens.
4. En urgence, la coloration de MGG (RAL) peut-être effectuée en 1^{ère} intention.
5. La notion de colonisation/ infection est actuellement contestée, l'IFI peut donc encore être considérée comme la technique de référence du diagnostic de l'infection.

CONTAMINATION

Inter échantillon pour les paramètres sensibles :	Traitement unitaire de chaque échantillon, une lame dans une boîte de pétri
Inter réactif si nécessaire :	NA
Vérification bibliographique :	NA
Vérification sur site :	NA



FICHE TYPE QUALITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

COMPARAISON DE METHODES :

Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :	IFI/ MGG et PCR
Nombre de mesures :	
Descriptif de l'échantillon étudié :	Etude du 3/11/2010 au 3/5/2011 Tous les patients ayant eu un diagnostic de pneumocystose au laboratoire
Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :	
Résultats et interprétations des discordances :	
Conclusions et dispositions² :	Sensibilité PCR > IFI > MGG

² Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation **transitoire et documentée** d'un facteur de correction).



FICHE TYPE QUALITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

	MGG	IFI	Ct PCR	Dg PCP	Prélèvement	Ct moyen
MGG+/IFI+/PCR+	Positive	Positive	25,62	Oui	LBA	25,62
MGG-/IFI+/PCR+	Négative	Positive	34,5	Oui	LBA	30,33
	Négative	Positive	30,75	Oui	LBA	
	Négative	Positive	37,51	Oui	LBA	
	Négative	Positive	22,89	Oui	LBA	
	Non effectuée	Positive	26	Oui	Aspiration bronchique	
MGG-/IFI-/PCR+	Négative	Négative	39	Oui	LBA	35,80
	Négative	Négative	35,32	Non	LBA	
	Négative	Négative	30,77	Non	LBA	
	Négative	Négative	38,14	?	LBA	
MGG-/IFI NE/PCR+	Négative	Non effectuée	34,33	Non	LBA	33,25
	Négative	Non effectuée	33,63	Non	LBA	
	Négative	Non effectuée	30,05	Non	Expectoration	
	Négative	Non effectuée	35	Non	LBA	
MGG NE/IFI NE/PCR+	Non effectuée	Non effectuée	29,91	Oui	Aspiration trachéale	30,55
	Non effectuée	Non effectuée	20,04	Oui	LBA	
	Non effectuée	Non effectuée	33,24	?	Aspiration trachéale	
	Non effectuée	Non effectuée	39	Non	LBA	

Tableau 15 : Résultats des dix-huit prélèvements positifs en PCR

MGG : coloration de May-Grünwald-Giemsa, IFI : immunofluorescence indirecte, NE : non effectuée, Dg : diagnostic, « ? » : deux patients sont décédés avant le diagnostic



FICHE TYPE QUALITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

	PCR Pj	IFI Pj	Justification discordance
2011			
1105_191322	+	+	
1106_141366	+	+	
1107_211314	+	+	
1108_191541	+	+	
1111_181184	+	+	
1112_191349	+	+	
1105_120678	+	-	PcP
1106_101343	+	-	PcP
1105_092000	+	-	Bactrim
1112_201068	+	-	Aspiration bronchique Pneumopathie pas PJ
1105_231436	+	-	Colonisation
1108_191267	+	Non-interprétable	Prophylaxie Bactrim
1109_091343	+	Non effectuée	Crachat
1112_211082	+	Non effectuée	LBA / Signes pulmonaires résolutifs sous ATB pas PJ
1112_301284	+	Non effectuée	Expectoration induite
1106_201734	+	Non effectuée	Aspiration bronchique
1107_042063	+	Non effectuée	Crachat
1105_110976	+	Non effectuée	Aspiration bronchique
2012			
1202_011910	+	+	
1202_031608	+	+	
1203_221261	+	+	
1208_221509	+	+	
1209_071538	+	+	
1207_251526	+	-	Signes pulmonaires résolutifs sous ATB pas PJ
1206_191553	+	-	Aspiration bronchique
1206_130389	+	-	Bactrim probabiliste
1207_301290	+	-	Bactrim
1207_311117	+	-	Wellvone
1208_281149	+	-	Bactrim
1201_271735	+	Non effectuée	Crachat
1202_271279	+	Non effectuée	Expectoration induite

En vert les cas de Pneumocystose . En 2012, la PCR est la technique de 1^{ère} intention pour tous les prélèvements d'origine pulmonaire, en cas de positivité seuls les LBA bénéficient d'une confirmation par IFI. La coloration de RAL est effectuée en urgence pour ne pas attendre le lendemain selon les circonstances.



FICHE TYPE QUALITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

ROBUSTESSE (indispensable en portée B)

Données bibliographiques :	
Résultats :	
Conclusions et dispositions ² :	

STABILITE (indispensable en portée B)

Données bibliographiques :	
Résultats :	
Conclusions et dispositions ² :	

Commentaires éventuels :

Méthode d'analyse conforme et validée - C.Kauffmann-lacroix – E. Cateau : Biologistes