



# FICHE TYPE QUALITATIF

## VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION :

DATE D'APPLICATION :

Note : le laboratoire se réfèrera 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 B<sup>1</sup>) et complètera **une fiche par examen de biologie médicale**

### EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :

#### Recherche de *Pneumocystis jirovecii* dans les liquides de lavage broncho-alvéolaires par coloration au May Grünwald Giemsa (variante rapide)

#### DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte/Mesurande :	Recherche de <i>Pneumocystis jirovecii</i> sur <b>liquide de lavage broncho-alvéolaire</b>
Principe de la Mesure :	Détection microscopique de <i>P. jirovecii</i> et identification des différents stades (trophozoïtes, pré-kystes, kystes) après coloration
Méthode de mesure :	Méthode qualitative (portée A) : coloration par le MGG (kit de coloration rapide) d'une lame de cyto centrifugation de LBA et lecture au microscope optique
Marquage CE (Oui/Non)	OUI
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA

#### MISE EN OEUVRE

Opérateurs (Habilitation) :	Noms et fonctions
Procédure de validation :	Référence
Procédure de gestion de la portée flexible :	Référence
Période d'évaluation :	Dates
Date de mise en service :	Date postérieure à la précédente
Autorisation par :	Nom et fonction

<sup>1</sup> 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) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION :

DATE D'APPLICATION :

### MAITRISE DES RISQUES (trame SH FORM 44)

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
<b>Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs) :</b>	LBA (expectorations induites, autres ??), poudrier sec stérile	- catalogue des analyses (ext.) - Manuel de prélèvements (int.) - fiche de demande
<b>Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :</b>	Digestion enzymatique Centrifugation – Cytocentrifugation	- MO : digestion, centrifugations - cahier de vie centrifugeuses
<b>Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.</b>	Formation et habilitation (coloration, lecture)	- fiche de poste - MO technique - procédures d'habilitation et suivi - Fiches d'habilitation
<b>Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :</b>	Kit de coloration à température ambiante	Suivi des températures des locaux
<b>Référence du réactif (référence fournisseur, version) :</b>	- Kit de digestion enzymatique (Sputolysine, Digester) - Kit de coloration RAL 555 pour frottis sanguins VWR 720-0351	-marqué CE -notice -suivi des versions des notices -contrôle à réception (date de péremption, validité du lot) -respect des conditions de conservation
<b>Matériau de référence (témoins) :</b>	Lames témoins et CQI « maison »	MO : préparation, contrôle et conservation des témoins et CQI
<b>Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques</b>	Pipettes à piston Minuteur Microscope optique  Saisie des résultats	-cahiers de vie : pipettes, minuteur, microscope - MO : utilisation microscope et minuteur -vérification à la validation biologique

\* item à renseigner si nécessaire



# FICHE TYPE QUALITATIF

## VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION :

DATE D'APPLICATION :

### MAITRISE DES RISQUES (trame 5M)

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
<b>Phase pré-analytique</b> (prélèvement, transport-stockage, réception-enregistrement, prétraitement)		
<b>Matière (matériau)</b>	- Liquide de lavage alvéolaire sans multiplication bactérienne - poudrier sec stérile	- catalogue des analyses (ext.) - manuel de prélèvement (int.)
<b>Main d'œuvre</b>	- fibroscopiste, infirmière - transporteur - technicien	- habilitation du personnel - contrat transporteur
<b>Méthodes</b>	- LBA : lavage alvéolaire protégé, pooling et homogénéisation des fractions prélevées - conditions et délai de transport - prétraitement : digestion enzymatique, centrifugations	- catalogue des analyses (ext.) - manuel de prélèvement (int.) - contrat transporteur - MO : digestion, centrifugations - cahier de vie centrifugeuses
<b>Matériel</b>	- centrifugeuses - kit de digestion enzymatique	- MO : digestion, centrifugations - cahier de vie centrifugeuses - kit : marqué CE, notice et suivi des versions, contrôle à réception (date de péremption, validité du lot), respect des conditions de conservation
<b>Milieu</b>	-transport/stockage à 4°C	- catalogue des analyses (ext.) - manuel de prélèvement (int.) - contrat transporteur
<b>Phase analytique</b> (réalisation, stockage et gestion des réactifs, CQ, lecture/interprétation, validation technique)		
<b>Matière</b>	- Kit de coloration RAL 555 pour frottis sanguins VWR 720-0351 - Lames témoins et CQI « maison »	- kit : marqué CE, notice et suivi des versions, contrôle à réception (date de péremption, validité du lot), respect des conditions de conservation -MO : préparation, contrôle et conservation des témoins et CQI
<b>Main d'œuvre</b>	Formation et habilitation (coloration, lecture)	- fiche de poste - MO technique - procédures d'habilitation et suivi - Fiches d'habilitation
<b>Méthodes</b>	Qualité de la coloration Reconnaissance microscopique	- MO technique - validation quotidienne : lames témoins « maison » - CQI « maison » - EEQ
<b>Matériel</b>	Pipettes à piston Minuteur Microscope optique	- cahiers de vie : pipettes, minuteur, microscope - MO : utilisation microscope et minuteur



**FICHE TYPE QUALITATIF**  
VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE  
DE BIOLOGIE MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION :

DATE D'APPLICATION :

**MAITRISE DES RISQUES (trame 5M)**

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Milieu	Kit de coloration à température ambiante	Suivi des températures des locaux
<b>Phase post analytique</b> (validation biologique, expression/transmission des résultats)		
Main d'œuvre	Saisie des résultats	Vérification à la validation biologique



# FICHE TYPE QUALITATIF

## VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION :

DATE D'APPLICATION :

### VERIFICATION BIBLIOGRAPHIQUE *(peut être intégrée dans les différents items)*

<b>Spécificité analytique</b> (capacité d'un système de mesure, utilisant une procédure de mesure spécifiée, à produire des résultats de mesure, pour un ou plusieurs mesurandes, qui ne dépendent ni des uns ni des autres ni de toute autre grandeur dans le système soumis au mesurage)	Publications des équipes locales ? publications historiques ?
<b>Sensibilité diagnostique</b> (probabilité qu'un dispositif donne un résultat positif en présence du marqueur cible)	Publications des équipes locales ? publications historiques ?
<b>Robustesse</b> (capacité d'une méthode à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthode, et qui fournit une indication sur sa fiabilité dans les conditions normales d'utilisation)	Publications des équipes locales ? publications historiques ?
<b>Contamination entre échantillons</b>	NA
<b>Stabilité des réactifs</b>	Notice d'utilisation du kit de coloration
<b>Comparaison avec une méthode de référence</b>	NA



# FICHE TYPE QUALITATIF

## VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION :

DATE D'APPLICATION :

### 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<sup>ère</sup> 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 :	NA
Inter réactif si nécessaire :	NA
Vérification bibliographique :	NA
Vérification sur site :	NA



**FICHE TYPE QUALITATIF**  
VERIFICATION (PORTEE A) D'UNE METHODE  
DE BIOLOGIE MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION :

DATE D'APPLICATION :

**COMPARAISON DE METHODES :**

<b>Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :</b>	<b>IFI/ MGG et PCR</b>
<b>Nombre de mesures :</b>	
<b>Descriptif de l'échantillon étudié :</b>	Etude du 3/11/2010 au 3/5/2011 Tous les patients ayant eu un diagnostic de pneumocystose au laboratoire
<b>Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :</b>	
<b>Résultats et interprétations des discordances :</b>	
<b>Conclusions et dispositions<sup>2</sup> :</b>	<b>Sensibilité PCR &gt; IFI &gt; MGG</b>

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

	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) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION :

DATE D'APPLICATION :

	PCR Pj	IFI Pj	Justification discordance
<b>2011</b>			
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
<b>2012</b>			
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<sup>ère</sup> 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) D'UNE METHODE  
DE BIOLOGIE MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION :

DATE D'APPLICATION :

**ROBUSTESSE**

Données bibliographiques :

???

Résultats :

Conclusions et dispositions<sup>2</sup> :

**STABILITE**

Données bibliographiques :

???

Résultats :

Conclusions et dispositions<sup>2</sup> :

Commentaires éventuels :