

FICHE TYPE QUALITATIF

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

PROCEDURE

VERSION

DATE D'APPLICATION

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :
**Recherche de *Pneumocystis jirovecii* dans les échantillons respiratoires
par immunofluorescence directe (Monofluokit® *P. jirovecii*)**

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte/Mesurande :	<i>Pneumocystis jirovecii</i> dans les échantillons respiratoires
Principe de la Mesure :	Détection morphologique directe de <i>P. jirovecii</i> après immunomarquage et identification des différents stades (trophozoites et kystes)
Méthode de mesure :	Lecture au microscope à fluorescence : présence ou absence du champignon
Marquage CE (Oui/Non)	OUI
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA

MISE EN OEUVRE

Opérateurs (Habilitation) :	<i>Noms et fonctions</i>
Procédure de validation :	Référence
Procédure de gestion de la portée flexible :	Référence
Période d'évaluation :	Dates : <i>celles du bilan ayant servi à la VDM</i>
Date de mise en service :	<i>Date théoriquement postérieure à la précédente, mais antérieure dans les faits</i>
Autorisation par :	<i>Nom et fonction du biologiste référent</i>

FICHE TYPE QUALITATIF

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

PROCEDURE

VERSION

DATE D'APPLICATION

MAITRISE DES RISQUES (trame SH FORM 44)

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	LBA, expectoration induite, aspiration bronchique. Tube ou flacon adéquat, stérile : indiquer le type de récipient accepté	- catalogue des analyses - manuel/procédure de prélèvements diffusé(e) aux services - fiche de demande - procédure de réception/vérification des échantillons - procédure de gestion des non conformités
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution)	Digestion enzymatique, centrifugation, cyto-centrifugation : préciser le(s) prétraitement(s) appliqué(s)	- notice du kit - Mode opératoire (MO) de prétraitement - centrifugeuse, cyto-centrifugeuse : qualification de l'installation, contrat de maintenance et cahier de vie, MO de l'utilisation
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Qualification/compétence et habilitation du personnel technique et des biologistes Maintien des compétences	- fiche de poste - procédures d'habilitation et suivi - fiches d'habilitation
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage, ...) :		
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	- Kit de digestion enzymatique (référence) - Monofluokit® <i>P. jirovecii</i> (Bio-Rad 72734)	- marquage CE - notice - suivi des versions des notices - contrôle à réception (date de péremption, validité du lot) - respect des conditions de conservation des réactifs - procédure de gestion des alertes de réacto-vigilance -- MO technique

FICHE TYPE QUALITATIF

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

PROCEDURE

VERSION

DATE D'APPLICATION

MAITRISE DES RISQUES (trame SH FORM 44)

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Matériau de référence (témoins) :	Lames témoins du kit CQI « maison » EEQ	MO : préparation, contrôle et conservation des témoins et CQI Procédure de gestion des contrôles de qualité
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	Kit de digestion : après reconstitution, stable 48h à 2-8°C Réactifs Monofluokit®: après ouverture, stables jusqu'à date de péremption entre 2 et 8°C Lames fixées à l'acétone : un mois à -20°C Incubation à 37°C =/ - 1°C Pipettes critiques Microscope à fluorescence (lampe à vapeur de mercure)	-suivi des températures réfrigérateur -cahiers de vie des pipettes - microscope à fluorescence : qualification de l'installation, contrat de maintenance et cahier de vie, MO de l'utilisation
Equipements : autres	Pipettes non critiques Minuteur	-cahiers de vie des pipettes et du minuteur

* item à renseigner si nécessaire

FICHE TYPE QUALITATIF

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

PROCEDURE

VERSION

DATE D'APPLICATION

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES (indispensable en portée B)

Spécificité	85% à 100% ¹⁻³ , 95.8% (fournisseur)
Sensibilité	30% à 100% ¹⁻³ , 100% (fournisseur)

La sensibilité et la spécificité de cette méthode de détection de *P. jirovecii* varient en fonction du type d'échantillon (Annexe 1). La variabilité de la sensibilité est particulièrement importante.

1/ Cregan P, Yamamoto A, Lum A, VanDerHeide T, MacDonald M, Pulliam L. Comparison of four methods for rapid detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 2432-6.

2/ Harris JR, Marston BJ, Sangrue N, DuPlessis D, Park B. Cost-effectiveness analysis of diagnostic options for *Pneumocystis pneumonia* (PCP). *PLoS One.* 2011; 6:e23158. doi: 10.1371/journal.pone.0023158.

3/ Procop GW, Haddad S, Quinn J, Wilson ML, Henshaw NG, Reller LB, Artymyshyn RL, Katanik MT, Weinstein MP. Detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory specimens by four staining methods. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 3333-5.

CONTAMINATION

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

COMPARAISON DE METHODES

Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :	Colorations/marquages, Immunofluorescence, PCR Ex: Laboratoire de Parasitologie, CHU Poitiers : comparaison MGG (RAL 555[®]) /IF Monofluokit[®] P. jirovecii / RT PCR (Annexe 2).
Nombre de mesures :	Au moins 30 échantillons.
Descriptif de l'échantillon étudié :	Ex : Poitiers : tous les échantillons reçus pour diagnostic de pneumocystose entre le 03/11/2010 et le 03/05/2011 (Annexe 2).
Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :	
Résultats et interprétations des discordances :	Ex : Poitiers : Sensibilité PCR > IF > MGG (Annexe 2).

FICHE TYPE QUALITATIF

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

PROCEDURE

VERSION

DATE D'APPLICATION

Conclusions et dispositions¹ :	<i>Ex : Poitiers : La PCR est la technique de première intention pour tous les échantillons pulmonaires. En cas de positivité, seuls les LBA bénéficient d'une confirmation par IF. La coloration MGG est effectuée en urgence pour ne pas attendre le lendemain selon les circonstances (Annexe 2).</i>
--	--

ROBUSTESSE (indispensable en portée B)	
Données bibliographiques :	
Résultats :	
Conclusions et dispositions ²	

STABILITE (indispensable en portée B)	
Données bibliographiques :	
Résultats :	
Conclusions et dispositions ²	

<p>Commentaires éventuels</p> <p>Conclusion : L'ensemble des performances est vérifié. La méthode est déclarée apte par rapport aux besoins du laboratoire et à l'utilisation prévue des résultats.</p>
--

¹ Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation **transitoire et documentée** d'un facteur de correction).

ANNEXE 1

**Sensibilité et spécificité des méthodes de détection de *P. jirovecii*
en fonction du type d'échantillon**

(Harris et al., *PLoS One*. 2011; 6:e23158. doi: 10.1371/journal.pone.0023158)

Diagnostic	Specimen collection	Sensitivity	Specificity	Cost (USD)
CXR	None	0.86	0.40	\$40.00
DQ	Oral wash	0.30	1.00	\$2.32
	Expectorated sputum	0.60	1.00	\$2.22
	Induced sputum	0.75	1.00	\$8.72
	Bronchoalveolar lavage	0.75	1.00	\$77.12
GMS	Oral wash	0.30	1.00	\$4.21
	Expectorated sputum	0.52	0.95	\$4.11
	Induced sputum	0.70	0.96	\$10.61
	Bronchoalveolar lavage	0.82	0.98	\$79.01
TBO	Oral wash	0.30	1.00	\$0.93
	Expectorated sputum	0.71	1.00	\$0.83
	Induced sputum	0.75	1.00	\$7.33
	Bronchoalveolar lavage	0.80	1.00	\$75.73
CW	Oral wash	0.30	1.00	\$2.94
	Expectorated sputum	0.33	1.00	\$2.84
	Induced sputum	0.57	1.00	\$9.34
	Bronchoalveolar lavage	0.78	1.00	\$77.74
IFA	Oral wash	0.30	1.00	\$20.79
	Expectorated sputum	0.50	1.00	\$20.69
	Induced sputum	0.81	1.00	\$27.19
	Bronchoalveolar lavage	1.00	1.00	\$95.59
PCR	Oral wash	0.71	0.99	\$8.78
	Expectorated sputum	0.85	0.99	\$8.68
	Induced sputum	0.94	0.99	\$15.18
	Bronchoalveolar lavage	1.00	0.94	\$83.58
nPCR	Oral wash	0.83	1.00	\$10.32
	Expectorated sputum	0.91	1.00	\$10.22
	Induced sputum	1.00	1.00	\$16.72
	Bronchoalveolar lavage	1.00	0.89	\$85.12
rtPCR	Oral wash	0.89	0.94	\$13.84
	Expectorated sputum	0.92	0.94	\$13.74
	Induced sputum	0.95	0.90	\$20.24
	Bronchoalveolar lavage	0.99	0.80	\$88.64

CXR: Chest x-ray; DQ: Diff-Quick; GMS: Grocott's Methenamine Silver Stain; TBO: Toluidine Blue O; CW: Calcofluor white stain; IFA: Immunofluorescence; PCR: Polymerase chain reaction; nPCR: nested PCR; rtPCR: real-time (quantitative) PCR.

doi:10.1371/journal.pone.0023158.t001

ANNEXE 2

Comparaisons de méthodes, Laboratoire de Parasitologie, CHU Poitiers

	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	22,09	Oui	LBA	
	Non effectuée	Positive	2	Oui	Aspiration bronchique	
MGG-/IFI-/PCR+	Négative	Négative	3	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	29,01	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

PROCEDURE

VERSION

DATE D'APPLICATION

	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.