



Méthode(s) (numéro et version) : PR-PA-029 version 01

Note : le format de ce registre est à titre indicatif, il peut être modifié en fonction des besoins de la validation.

### Section 1 – Type de méthode

- Méthode normalisée (joindre un résumé des preuves de la vérification)
- Méthode interne qualitative dite descriptive (joindre un résumé des preuves de la vérification)
- Méthode interne qualitative (poursuivre à la section 2)
- Méthode interne quantitative ou semi-quantitative (poursuivre à la section 2)

### Section 2 – Sommaire de la validation

#### Méthodologie :

Trente spécimens de selles contenant différents parasites ont été sélectionnés pour les essais de validation (tableau 1). Ces spécimens proviennent de la collection : une recherche de parasites à l'aide de la coloration à l'hématoxyline et/ou une recherche de *Cryptosporidium* à l'aide de la coloration au Kinyoun a déjà été effectuée pour ces spécimens. Les résultats émis pour ces spécimens sont donc connus (résultats attendus). Des spécimens négatifs ont été inclus comme contrôles négatifs ainsi que des spécimens positifs (*D. fragilis* et oocystes de *Cryptosporidium* sp.) comme contrôles positifs.

Tableau 1 : Spécimens utilisés pour l'analyse de concordance entre les différentes colorations. Les résultats obtenus en routine lors de la recherche de parasites pour chacun des spécimens sont présentés.

# de spécimens	Résultats attendus	# de spécimens	Résultats attendus
PA089376	<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	PA097369	<i>Entamoeba coli</i> <i>Dientamoeba fragilis</i> <i>Blastocystis hominis</i>
PA095222	<i>Endolimax nana</i>	PA086816	<i>Cryptosporidium</i> sp.
PA089257	<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	PA093062 + PA084006	<i>Entamoeba coli</i> <i>Cryptosporidium</i> sp. <i>Blastocystis hominis</i>
PA100348	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	PA097753	<i>Cryptosporidium</i> sp.
PA093062	<i>Entamoeba coli</i> <i>Blastocystis hominis</i>	PA097076	<i>Giardia lamblia</i>
PA092133	<i>Dientamoeba fragilis</i> <i>Entamoeba polecki</i>	PA093066	<i>Entamoeba coli</i>
PA089456	<i>Iodamoeba butschlii</i> <i>Blastocystis hominis</i>	PA091461	<i>Chilomastix mesnili</i>
PA097751	<i>Cryptosporidium</i> sp.	PA097714	<i>Cryptosporidium</i> sp.
PA090456	<i>Entamoeba coli</i>	PA087145	<i>Cryptosporidium</i> sp.
PA092618	<i>Giardia lamblia</i>	PA092850	<i>Cryptosporidium</i> sp.

	<i>Dientamoeba fragilis</i> <i>Blastocystis hominis</i>		
PA093168	<i>Entamoeba hartmanni</i>	PA095222 + PA084005	<i>Endolimax nana</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.
PA092966	Aucun parasite observé	PA089376 + PA097714	<i>Cryptosporidium</i> sp. <i>Entamoeba</i> <i>histolytica/dispar</i>
PA091640	Aucun parasite observé	PA097076 + PA086816	<i>Giardia lamblia</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.
PA089257 + PA097751	<i>Entamoeba histolytica/dispar</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.	PA084005	<i>Cryptosporidium</i> sp.
PA095418	<i>Iodamoeba butschlii</i> <i>Endolimax nana</i> <i>Blastocystis hominis</i>	PA091706	<i>Cryptosporidium</i> sp. <i>Blastocystis hominis</i>

Trois frottis ont été préparés pour chaque spécimen pour un total de 90 frottis. Le premier (K) a été coloré à l'aide de la coloration au Kinyoun (PR-PA-011), le deuxième (H) à l'aide de la coloration à l'hématoxyline ferrique (PR-PA-008) et le troisième (KH) à l'aide de la coloration à l'hématoxyline ferrique modifiée incorporant une étape de carbol-fushine (PR-PA-029). Les spécimens ont été codés durant les procédures de coloration. Des codes similaires ont été donnés aux frottis K et H d'un même spécimen tandis que le frottis KH a été codé différemment des deux autres pour éviter que le lecteur puisse faire le lien entre les frottis K et H et le frottis KH. Chaque technologiste ou professionnel a examiné les trois frottis du même spécimen sans toutefois connaître le lien entre ces derniers. Cette façon de faire permet d'éliminer le biais qui pourrait survenir entre les différents technologistes. Deux questionnaires (voir annexe 1) ont été complétés pour chacun des spécimens, un pour la lecture des frottis H et K et un autre pour la lecture du frottis KH.

### Résultats et discussion

Les résultats sont présentés au tableau 2.

Tableau 2 : Comparaison des résultats obtenus lors de la lecture des frottis préparés à l'aide de la coloration à l'hématoxyline ferrique modifiée incorporant une étape de carbol-fushine (PR-PA-029) et des colorations au Kinyoun (PR-PA-011) et l'hématoxyline ferrique (PR-PA-008). Les résultats attendus sont aussi présentés. Les discordances observées entre les résultats attendus et/ou entre les deux procédures à l'étude sont surlignées en jaune.

# de spécimens	Résultats de la coloration combinée (PR-PA-029)	Résultats des colorations à l'hématoxyline et au Kinyoun (PR-PA-008 et PR-PA-011)	Résultats attendus
PA089376	<i>E. histolytica/dispar</i>	<i>E. histolytica/dispar</i>	<i>E. histolytica/dispar</i>
PA095222	<i>E. nana</i>	<i>E. nana</i> <i>I. butschlii</i>	<i>E. nana</i>
PA089257	<i>E. histolytica/dispar</i>	<i>E. histolytica/dispar</i>	<i>E. histolytica/dispar</i>
PA100348	<i>C. cayetanensis</i>	<i>C. cayetanensis</i>	<i>C. cayetanensis</i>
PA093062	<i>E. coli</i> <i>E. hartmanni</i> <i>B. hominis</i>	<i>E. coli</i> <i>E. hartmanni</i> <i>B. hominis</i>	<i>E. coli</i> <i>B. hominis</i>
PA092133	<i>D. fragilis</i> <i>E. polecki</i>	<i>D. fragilis</i> <i>E. polecki</i>	<i>D. fragilis</i> <i>E. polecki</i>

PA089456	<i>I. butschlii</i> <i>B. hominis</i>	<i>I. butschlii</i> <i>B. hominis</i>	<i>I. butschlii</i> <i>B. hominis</i>
PA097751	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp.
PA090456	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
PA092618	<i>G. lamblia</i> <i>D. fragilis</i> <i>B. hominis</i>	<i>G. lamblia</i> <i>D. fragilis</i> <i>B. hominis</i>	<i>G. lamblia</i> <i>D. fragilis</i> <i>B. hominis</i>
PA093168	<i>E. hartmanni</i>	<i>E. hartmanni</i>	<i>E. hartmanni</i>
PA092966	Aucun parasite observé	Aucun parasite observé	Aucun parasite observé
PA091640	Aucun parasite observé	Aucun parasite observé	Aucun parasite observé
PA089257 + PA097751	<i>E. histolytica/dispar</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>E. histolytica/dispar</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>E. histolytica/dispar</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.
PA084005	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp.
PA091706	<i>Cryptosporidium</i> sp. <i>B. hominis</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp. <i>B. hominis</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp. <i>B. hominis</i>
PA095418	<i>I. butschlii</i> <i>E. nana</i> <i>B. hominis</i>	<i>I. butschlii</i> <i>E. nana</i> <i>B. hominis</i>	<i>I. butschlii</i> <i>E. nana</i> <i>B. hominis</i>
PA097369	<i>E. coli</i> <i>D. fragilis</i> <i>B. hominis</i>	<i>E. coli</i> <i>D. fragilis</i> <i>B. hominis</i>	<i>E. coli</i> <i>D. fragilis</i> <i>B. hominis</i>
PA086816	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp.
PA093062 + PA084006	<i>E. coli</i> <i>B. hominis</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Entamoeba</i> sp. <i>B. hominis</i>	<i>E. coli</i> <i>B. hominis</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.
PA097753	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp.
PA097076	<i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i>
PA093066	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
PA091461	<i>E. nana</i> <i>C. mesnili</i>	<i>E. nana</i> <i>C. mesnili</i>	<i>C. mesnili</i>
PA097714	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp.
PA087145	<i>E. nana</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>E. nana</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp.
PA092850	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Cryptosporidium</i> sp.
PA095222 + PA084005	<i>E. nana</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>E. nana</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>E. nana</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.
PA089376 + PA097714	<i>Cryptosporidium</i> sp. <i>E. histolytica/dispar</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp. <i>E. histolytica/dispar</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp. <i>E. histolytica/dispar</i>
PA097076 + PA086816	<i>G. lamblia</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>G. lamblia</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>G. lamblia</i> <i>Cryptosporidium</i> sp.

## Discussion

La concordance entre les processus de coloration [la coloration (PR-PA-029) et les colorations standards (PR-PA-008 et PR-PA-011)] est généralement bonne. Sur les 30 spécimens évalués, quatre ont présenté des discordances soit entre les deux processus de coloration ou avec les

résultats attendus. Pour l'ensemble des discordances [PA095222 – PA093062 – PA091461 – (PA093062 + PA084006)], les parasites qui n'ont pas été rapportés sur l'ensemble des frottis étaient présents en faible quantité (moins de 5 parasites sur l'ensemble du frottis). En parasitologie, lorsque le parasite est présent dans le spécimen en très faible quantité, il est possible que ce dernier ne se retrouve pas sur l'ensemble des frottis préparés.

Pour les spécimens PA095222 et (PA093062 + PA084006), le résultat de la coloration combinée concorde avec celui attendu. Par contre, les résultats des colorations K et H ne concordent pas avec les résultats attendus. Le parasite non pathogène *I. butschlii* a été rapporté pour la lame colorée à l'hématoxyline (H) du spécimen PA095222. La lectrice a rapporté que des trophozoïtes d'*I. butschlii* étaient présents en faible quantité sur le frottis H. Elle spécifie aussi que le frottis H n'est pas beau et qu'il manque de clarté. Les trophozoïtes d'*I. butschlii* peuvent facilement être mépris pour des trophozoïtes d'*E. nana* particulièrement lorsqu'il n'y a pas de kystes dans le spécimen et que la coloration du frottis n'est pas optimale. Pour le spécimen PA087145, la lectrice a omis de rapporter les oocystes de *Cryptosporidium* sp. sur la lame K. Si on compare avec les résultats attendus, ces discordances sont survenues entre le processus de coloration standard (K et H) et non avec celui de la coloration KH. Cette discordance met donc en valeur la coloration combinée.

Pour les spécimens PA093062 et PA091461, les résultats de la coloration combinée (KH) et des colorations du processus standard (H et K) concordent entre eux, mais pas avec les résultats attendus. Les lectrices ont rapporté des parasites non pathogènes (*E. hartmanni* pour le spécimen PA093062 et *E. nana* pour le spécimen PA091461) qui n'avaient pas été rapportés par les lecteurs précédents (résultats attendus). Les deux parasites ont été quantifiés comme étant rares sur les frottis. La rareté des organismes peut expliquer que ces derniers n'avaient pas été observés lors de la lecture de routine (résultats attendus). Il est possible aussi que cette discordance s'explique en partie par le biais introduit par le lecteur dans le cas présent. D'une manière ou d'une autre, les deux processus de coloration ont donné les mêmes résultats ce qui confirme que la coloration KH est tout aussi performante pour la détection des parasites.

Finalement, la discordance observée pour le spécimen PA087145 ne devrait pas être comptabilisée comme une discordance en soi. En effet, seulement un frottis au Kynioun avait été effectué lors de l'examen de routine ce qui ne permettait pas la détection d'*E. nana* au moment de l'émission du rapport. Ce qui est important dans le cas présent est que les deux processus de coloration donnent des résultats similaires.

Il est aussi important de préciser que les technologistes et la professionnelle qui ont participé à la validation ont jugé la coloration à l'hématoxyline ferrique modifiée incorporant une étape de carbol-fushine acceptable. Le contrôle positif de *D. fragilis* est beau et il est facile d'observer la fragmentation du caryosome. Cette coloration à l'avantage de détecter les parasites intestinaux en plus des coccidies de façon simultanée.

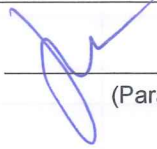
## Conclusion

La méthode de coloration à l'hématoxyline ferrique modifiée incorporant une étape de carbol-fushine sera implantée au LSPQ en remplacement des deux colorations actuelles (coloration au Kynioun et à l'hématoxyline ferrique). La méthode de coloration KH (PR-PA-029) permet l'identification des parasites intestinaux et des coccidies de façon combinée.

**Commentaire**

Les données cumulées lors de la validation permettent de confirmer que la méthode est prête à l'emploi :

2015-07-29  
(Date - aaaa/mm/jj)

 Jean Longtin  
(Paraphe)

Vérifié par le responsable d'activité :


2015-07-29  
(Date - aaaa/mm/jj)

(Paraphe)

Approuvé par le cadre responsable :

(Date - aaaa/mm/jj)

(Paraphe)



### Section 3 – Actualisation

Date (aaaa/mm/jj)	Paraphe	Commentaire

**Annexe 1: Questionnaire pour le diagnostic microscopique****Name of the technologist:****Date:****1. Number of the specimen:**

- 2. Type of stain:**
- 1) Iron hematoxylin stain                       2) Kinyoun's acid-fast stain
- 3) Modified iron hematoxylin stain

**Note:** Quantification of Protozoa:

- Few (+): ≤ 2 protozoa per 10 oil immersion fields (x1,000)
- Moderate (++) : 3 to 9 per oil immersion fields (x 1,000)
- Many (+++) : ≥ 10 per 10 oil immersion fields (x 1,000)

**3. Diagnosis and Quantification:**

- |  |                       |                              |                                   |                               |
|--|-----------------------|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| 1) <i>Enatamoeba histolytica/ dispar</i> | <input type="radio"/> | 1. Few <input type="radio"/> | 2. Moderate <input type="radio"/> | 3. Many <input type="radio"/> |
| 2) <i>Entamoeba coli</i>                 | <input type="radio"/> | 1. Few <input type="radio"/> | 2. Moderate <input type="radio"/> | 3. Many <input type="radio"/> |
| 3) <i>Entamoeba hartmanni</i>            | <input type="radio"/> | 1. Few <input type="radio"/> | 2. Moderate <input type="radio"/> | 3. Many <input type="radio"/> |
| 4) <i>Iodamoeba butschlii</i>            | <input type="radio"/> | 1. Few <input type="radio"/> | 2. Moderate <input type="radio"/> | 3. Many <input type="radio"/> |
| 5) <i>Endolamix nana</i>                 | <input type="radio"/> | 1. Few <input type="radio"/> | 2. Moderate <input type="radio"/> | 3. Many <input type="radio"/> |
| 6) <i>Giardia lamblia</i>                | <input type="radio"/> | 1. Few <input type="radio"/> | 2. Moderate <input type="radio"/> | 3. Many <input type="radio"/> |
| 7) <i>Chilomastix mesnili</i>            | <input type="radio"/> | 1. Few <input type="radio"/> | 2. Moderate <input type="radio"/> | 3. Many <input type="radio"/> |
| 8) <i>Enteromonas hominis</i>            | <input type="radio"/> | 1. Few <input type="radio"/> | 2. Moderate <input type="radio"/> | 3. Many <input type="radio"/> |
| 9) <i>Retoramonas hominis</i>            | <input type="radio"/> | 1. Few <input type="radio"/> | 2. Moderate <input type="radio"/> | 3. Many <input type="radio"/> |
| 10) <i>Trichomonas hominis</i>           | <input type="radio"/> | 1. Few <input type="radio"/> | 2. Moderate <input type="radio"/> | 3. Many <input type="radio"/> |
| 11) <i>Blastocystis hominis</i>          | <input type="radio"/> | 1. Few <input type="radio"/> | 2. Moderate <input type="radio"/> | 3. Many <input type="radio"/> |
| 12) <i>Balantidium coli</i>              | <input type="radio"/> | 1. Few <input type="radio"/> | 2. Moderate <input type="radio"/> | 3. Many <input type="radio"/> |
| 13) <i>Cryptosporidium</i> sp            | <input type="radio"/> | 1. Few <input type="radio"/> | 2. Moderate <input type="radio"/> | 3. Many <input type="radio"/> |
| 14) <i>Cyclospora cayetanensis</i>       | <input type="radio"/> | 1. Few <input type="radio"/> | 2. Moderate <input type="radio"/> | 3. Many <input type="radio"/> |
| 15) <i>Isospora belli</i>                | <input type="radio"/> | 1. Few <input type="radio"/> | 2. Moderate <input type="radio"/> | 3. Many <input type="radio"/> |

**4. Clarity of the organism:**

- |   |                       |                                |                                    |
|---|-----------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 1) <i>Entamoeba histolytica/ dispar</i> | <input type="radio"/> | 1. Clear <input type="radio"/> | 2. Not clear <input type="radio"/> |
| 2) <i>Entamoeba coli</i>                | <input type="radio"/> | 1. Clear <input type="radio"/> | 2. Not clear <input type="radio"/> |
| 3) <i>Entamoeba hartmanni</i>           | <input type="radio"/> | 1. Clear <input type="radio"/> | 2. Not clear <input type="radio"/> |
| 4) <i>Iodamoeba butschlii</i>           | <input type="radio"/> | 1. Clear <input type="radio"/> | 2. Not clear <input type="radio"/> |
| 5) <i>Endolamix nana</i>                | <input type="radio"/> | 1. Clear <input type="radio"/> | 2. Not clear <input type="radio"/> |
| 6) <i>Giardia lamblia</i>               | <input type="radio"/> | 1. Clear <input type="radio"/> | 2. Not clear <input type="radio"/> |
| 7) <i>Chilomastix mesnili</i>           | <input type="radio"/> | 1. Clear <input type="radio"/> | 2. Not clear <input type="radio"/> |
| 8) <i>Enteromonas hominis</i>           | <input type="radio"/> | 1. Clear <input type="radio"/> | 2. Not clear <input type="radio"/> |
| 9) <i>Retoramonas hominis</i>           | <input type="radio"/> | 1. Clear <input type="radio"/> | 2. Not clear <input type="radio"/> |
| 10) <i>Trichomonas hominis</i>          | <input type="radio"/> | 1. Clear <input type="radio"/> | 2. Not clear <input type="radio"/> |
| 11) <i>Blastocystis hominis</i>         | <input type="radio"/> | 1. Clear <input type="radio"/> | 2. Not clear <input type="radio"/> |
| 12) <i>Balantidium coli</i>             | <input type="radio"/> | 1. Clear <input type="radio"/> | 2. Not clear <input type="radio"/> |
| 13) <i>Cryptosporidium sp</i>           | <input type="radio"/> | 1. Clear <input type="radio"/> | 2. Not clear <input type="radio"/> |
| 14) <i>Cyclospora cayetanensis</i>      | <input type="radio"/> | 1. Clear <input type="radio"/> | 2. Not clear <input type="radio"/> |
| 15) <i>Isospora belli</i>               | <input type="radio"/> | 1. Clear <input type="radio"/> | 2. Not clear <input type="radio"/> |

**5. Time taken to examine the specimen:****6. Comments:**