

**PTM-Prélèvement de cornée à visées :
Bactériologique, Virologique, Mycologique et Parasitologique**

Applicable au 09/03/2023

Approuvé par Denis FILISSETTI, *coordinateur du PTM le 02/03/2023*

Validé par Julie BRUNET, Valérie BRU, Céline Ménard, Floriane Gallais (Biologistes) & Tristan BOURCIER (*Ophthalmologue*)

Rédigé par Gabrielle GOMART (*Interne*), Marcela SABOU (*Biologiste*)

Processus de rattachement : Pré-analytique

1. OBJET/ DOMAINE D'APPLICATION

Ce document décrit les modalités de prélèvements d'un grattage de cornée pour des recherches de Bactériologie, de Virologie, de Mycologie et de Parasitologie dans le diagnostic des kératites présumées infectieuses.

Les examens standards en Bactériologie et en Mycologie consistent en un examen direct par coloration de GRAM dans les deux cas, associée à une culture sur milieux aérobie et anaérobie pour la Bactériologie, et sur milieu fongique pour la Mycologie.

L'examen standard en Virologie consiste en la recherche par PCR de la présence d'Herpès Simplex Virus (hors nomenclature).

L'examen standard en Parasitologie consiste en la recherche par PCR de la présence d'*Acanthamoeba* (amibes libres oculaires) associée à une culture.

L'indication d'examens simultanés à visée Bactériologique, Virologique, Mycologique et Parasitologique est laissée à l'appréciation du clinicien.

Pour la recherche de germes spécifiques, ou d'examens complémentaires il est nécessaire de l'indiquer sur la feuille de demande correspondante et de prendre contact avec le laboratoire.

Dans le cas de patients porteurs de lentilles il est conseillé de joindre celles-ci dans leur étui pour effectuer des cultures complémentaires en Bactériologie, Mycologie et Parasitologie. Cependant, l'analyse de ces lentilles n'est pas suffisante (recherche par PCR non-adaptée) et ne peut pas substituer le grattage de cornée.

En cas d'infection cornéenne consécutive à la présence d'un corps étranger végétal ou tellurique ou chirurgical (fil de suture, anneau intracornéen), celui-ci peut être mis en culture.

2. INSTRUCTIONS

A. MATERIEL

- Sérum Physiologique
- Gants stériles sans talc
- Scalpels stériles
- Pince microchirurgicale stérile
- 1 lame Cytoslid (et sa boîte de transport) pour l'examen direct par coloration de GRAM pour la Bactériologie et la Mycologie (une seule lame suffit pour les deux)
- Tube eppendorf de 1,5mL, contenant 200µl de S.T.A.R. Buffer (Ref : 03 335 208 001, Roche) pour la PCR d'amibes libres
- 1 Eau gélosée dans une petite boîte de Petri pour la culture d'amibes libres en Parasitologie
- 2 Ecouvillons E-swab® (bouchon rose) : 1 pour la culture de Mycologie, et 1 pour la culture de Bactériologie (suffisants pour cultures et examens complémentaires)
- 1 Ecouvillon UTM® (bouchon rouge) pour les examens de Virologie

Les conditions de conservation des milieux de transports, et les moyens d'approvisionnement sont décrits dans le tableau.

B. Préparation du patient

- Lavage de l'œil infecté avec 5ml de sérum physiologique. Elimination de toute la fluorescéine. Ne pas reinstaller de nouvelle goutte de collyre anesthésiant avant de procéder au prélèvement.

**PTM-Prélèvement de cornée à visées :
Bactériologique, Virologique, Mycologique et Parasitologique**

Applicable au 09/03/2023

Approuvé par Denis FLISSETTI, coordinateur du PTM le 02/03/2023

Validé par Julie BRUNET, Valérie BRU, Céline Ménard, Floriane Gallais (Biologistes) & Tristan BOURCIER (Ophtalmologue)

Rédigé par Gabrielle GOMART (Interne), Marcela SABOU (Biologiste)

Processus de rattachement : Pré-analytique

C. Mode opératoire du prélèvement

Avec des gants stériles et dans l'ordre suivant (**cas général, l'ordre pouvant être adapté en fonction de la clinique**):

1. Grattage de cornée avec un scalpel et étalement sur la lame Cytoslid pour coloration de GRAM et examen direct de Bactériologie et de Mycologie : prélèvement à étaler du côté de la lame avec l'inscription "Thermo shandon" lisible (étiquette patient à coller du même côté), puis conditionnement dans la boîte de transport. **Attention, la lame Cytoslid n'étant pas stérile le scalpel doit être éliminé après l'étalement.**
2. Grattage de cornée avec l'écouvillon E-swab® et réinsertion dans son tube d'origine pour la culture en Bactériologie (+/- réalisation d'examen complémentaires).
3. Grattage de cornée avec l'écouvillon E-swab® et réinsertion dans son tube d'origine pour la culture en Mycologie.
4. Grattage de cornée avec un 2^{ème} scalpel et dépôt du scalpel dans le tube eppendorf contenant le Buffer pour la recherche d'amibes libres par PCR. Agitation du tube pendant 10 secondes, **ELIMINATION DU SCALPEL à l'aide la pince micorchirurgicale, CONSERVER LE TUBE EPPENDORF AVEC LE BUFFER POUR LE LABORATOIRE.**
5. Grattages de cornée avec les écouvillons stériles à usage unique et ensemencement [...] de la petite gélose nécessaire à la culture d'*Acanthamoeba sp.* Jeter l'écouvillon après l'ensemencement.
6. Grattage de cornée avec l'écouvillon UTM® et réinsertion dans son tube d'origine pour les examens de Virologie.
7. Sceller la petite gélose destinée à la recherche d'amibes libres. **Coller l'étiquette SUR LA TRANCHE DE LA BOITE SANS RECOUVRIR LE FOND ou le couvercle (l'observation des amibes libres au laboratoire se fait à travers la boîte).**
8. Identifier tous les prélèvements, et remplir une ordonnance pour chaque discipline concernée (Bactériologie + Virologie + Parasito-Mycologie) en indiquant les renseignements cliniques (description des lésions, traitement antibiotique, **porteur de lentilles et traumatisme cornéen**, etc...). Dans le cas d'un patient porteur de lentilles, faire de même avec celles-ci (à transmettre au laboratoire dans leur boîtier d'origine, ou dans un pot stérile avec du sérum physiologique).
9. Dans l'heure qui suit leur réalisation, envoi des prélèvements au laboratoire (lame, tube eppendorf, géloses, écouvillons, +/- lentilles, corps étranger) accompagnés de leurs ordonnances.

Remarque :

Sources :

- utilisation systématique de l'E-swab® pour les examens Bactériologiques:
- K. PAKZAD-VAEZI *et al*, The Corneal Ulcer One-Touch Study: A Simplified Microbiological Specimen Collection Method. Am J Ophthalmol 2014.
- utilisation du S.T.A.R. buffer et retrait du scalpel pour la recherche d'amibes libres par PCR : Etude interne au LPMM.

**PTM-Prélèvement de cornée à visées :
Bactériologique, Virologique, Mycologique et Parasitologique**


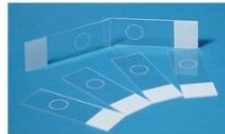



Applicable au 09/03/2023

Approuvé par Denis FILISSETTI, *coordinateur du PTM le 02/03/2023*

Validé par Julie BRUNET, Valérie BRU, Céline Ménard, Floriane Gallais (Biologistes) & Tristan BOURCIER (*Ophthalmologue*)

Rédigé par Gabrielle GOMART (*Interne*), Marcela SABOU (*Biologiste*)

Processus de rattachement : Pré-analytique

Micro-organismes	Laboratoire	Prescription	Milieu de transport	Conservation	Commande matériel aux HUS
Bactéries	Bactériologie (tel : 49839)	 Verso	1 E-swab® (écouvillon fourni) + 1 lame Cytoslid (dans sa boîte) 	E-swab® : T° ambiante Lame : T° ambiante	HUS APPRO Code produit : - E-swab® : 6102372 - Lames Cytoslid : 6048590
Champignons	Mycologie (tel : 51428)		1 E-swab® (écouvillon fourni) + 1 lame Cytoslid (dans sa boîte) en l'absence d'analyse bactériologique demandée	E-swab® : T° ambiante Lame : T° ambiante	HUS APPRO Code produit : - E-swab® : 6102372 - Lames Cytoslid : 6048590
Acanthamoeba (Amibes libres)	Parasitologie (tel: 51424)	Recto (mycologie) + Verso (parasitologie)	1 tube Eppendorf (S.T.A.R. Buffer) + 1 eau gélosée 	Buffer: T° ambiante Gélose : 5+/-3°C (/!\ préemption rapide)	S'adresser au Laboratoire de Parasitologie : - Buffer (tel: 51414) - Gélose (tel: 51424)
Herpes virus	Virologie (tel : 50342)	Feuille « Virologie Moléculaire et COVID-19 » HUS APPRO CP 4055504 Recto	1 tube UTM® (écouvillon fourni) ou 1 E-swab® (écouvillon fourni) 	UTM® : T° ambiante E-swab® : T° ambiante	HUS APPRO Code produit : - UTM® : 6105806 - E-swab® : 6102372

Après réception par le laboratoire et réalisation des examens prescrits, conservation possible à 5+/-3°C