1. Objectifs

Au laboratoire, le diagnostic mycologique des dermatophytoses inclus les étapes suivantes :

- **Le recueil des d'informations cliniques** lors de l'examen du patient (contexte épidémiologique, contact avec un animal infecté, facteurs de risque, évolution des lésions, traitements antérieurs, en particulier antifongiques)
- **Le prélèvement** des échantillons cliniques en quantité suffisante
- La détection des champignons dans les échantillons par **examen microscopique direct**
- **L'isolement du champignon** en culture sur milieu spécifique
- **L'identification du champignon** au genre et à l'espèce si possible
- **L'interprétation des résultats** particulièrement en cas de discordances entre l'examen direct et les cultures, ou quand des moisissures sont isolées en culture

Les objectifs du diagnostic biologique des dermatophytoses sont :

- **Confirmer le diagnostic de mycose** par l'examen microscopique direct des échantillons biologiques
- **Identifier le champignon responsable**, en particulier pour les teignes anthropophiles du cuir chevelu
- Inversement, en cas de résultat négatif de **permettre un diagnostic différentiel** (eczéma nummulaire, *pityriasis rosea*, psoriasis, …)

2. Le prélèvement

La qualité du prélèvement conditionne la qualité du diagnostic mycologique

Pré requis : Respecter un **délai minimum entre l'arrêt du traitement antifongique et le Prélèvement mycologique** (cf tableau ci-dessous).

Peau Squames	**10 jours** après l'arrêt du traitement **local**
Cheveux	**10 jours** après l'arrêt du traitement **local** **1 mois** après l'arrêt du traitement par **griséofulvine** (GRISEFULINE®) **3 mois** après l'arrêt du traitement par **terbinafine** (LAMISIL®)
Ongles	**3 mois** après l'arrêt du traitement par **filmogène (vernis)** (LOCERYL®, MYCOSTER®, AMYCOR ONYCHOSET® …) **3 mois** après l'arrêt du traitement *per os* par **terbinafine** (LAMISIL®)

Le prélèvement doit être le plus abondant possible.

Il doit être accompagné d'un bon de demande ou d'une ordonnance du médecin prescripteur. **Tout prélèvement doit être identifié.**

De plus, marquer sur le bon de demande :

LA VERSION ÉLECTRONIQUE FAIT FOI

- Nature et site du prélèvement
- Traitement antifongique : si oui préciser la nature, en cours ou arrêté, et depuis quand ?
- Pour les teignes et dermatophyties :
  - Contact ou non avec un animal de compagnie (chat, chien…), de loisir (chevaux, …) ou d'élevage (moutons…)
  - Présence de lésions identiques dans l'entourage ?
  - Origine géographique du patient
  - Voyage(s) effectué(s) hors France métropolitaine si pertinent

1. Recherche d'épidermophytie : squames

Prélever avec une curette de Brocq, un grattoir, une pointe lancéolée ou un vaccinostyle
- **En périphérie** de la lésion ou au niveau de toute la lésion si la lésion est de petite taille

- Recueillir les squames dans une boîte de Pétri préalablement identifiée.
- Prélever systématiquement en plus à l'aide d'un écouvillon humidifié avec de l'eau stérile

2. Recherche d'onyxis = ongles

Prélever avec une curette de Brocq, une pointe lancéolée ou un vaccinostyle
- Couper l'ongle atteint, le plus court possible
- Gratter sous la tablette de l'ongle jusqu'à la **limite entre zone saine et malade**
- Mettre les squames d'ongles dans une boîte de Pétri préalablement identifiée

Si les fragments d'ongles sont trop peu abondants ou s'ils sont mal prélevés, parce que trop "externes" ou trop "superficiels", il y a un risque d'avoir un prélèvement faussement négatif.

3. Recherche de teignes = cheveux

L'interrogatoire est essentiel : géographie, cas dans l'entourage, animaux, voyage, traitement ?
- Décrire les lésions sur l'ordonnance : taille des lésions, nombre de plaques

Aspect des cheveux : **La partie du cheveu atteinte intéressante pour le diagnostic mycologique se situe dans le follicule du cheveu jusqu'aux 5 premiers cm de pousse.**
- Si cassés et entourés d'une gaine blanchâtre, les arracher à la pince.

LA VERSION ÉLECTRONIQUE FAIT FOI

- Si non cassés, les couper, les arracher à la pince.
- Prélever également les squames au niveau de la lésion.
- Mettre les cheveux **ARRACHES (et non coupés)** et les squames dans une boîte de Pétri préalablement identifiée.

4. Recherche de Malassezia sp (Pityriasis versicolor, dermite séborrhéique)

L'examen direct : en cas de positivité, il suffit au diagnostic

- **Lésions du tronc** : appliquer un morceau de scotch **transparent (non opaque)** de 1 cm environ sur 3 lésions différentes afin de récupérer les squames.
- **Lésions du cuir chevelu** : appliquer un scotch **transparent (non opaque)** et gratter également pour récupérer les squames.

Coller le scotch transparent sur une lame après avoir préalablement déposé une goutte de bleu lactique et identifier la lame. Placer la lame en boite de Pétri pour le transport.
En cas de demande de mise en culture : prélever en plus les squames avec une curette ou un vaccinostyle ou un grattoir et les recueillir dans une boîte de Pétri stérile préalablement identifiée.

3. L'examen direct

L'examen microscopique direct permet d'apporter une réponse rapide aux cliniciens sans attendre les résultats de la culture. La détection de filaments mycéliens confirme le diagnostic de mycose.

- **Dermatophytoses :**

Utilisation du kit Mycetcolor® : cette trousse contient un agent dissociant et un colorant (le rouge Congo). Ce réactif permet la dissociation des éléments qui composent les prélèvements (squames et lambeaux d'ongles) et la coloration par le rouge Congo en rose ou rouge des filaments mycéliens ou des spores.

Matériel nécessaire :

- Micropipette, lame porte-objet, lamelles, conteneur pour déchets contaminés

Précautions d'utilisation : manipuler sous la hotte (protection des yeux) et avec des gants

Mode opératoire :

Utiliser des échantillons de petites tailles et fins (risque de mauvaise coloration si trop gros morceaux)

Placer une lame sur la carte noire déposer sur la lame un ou plusieurs morceaux de cheveux/squames/ongles ajouter 25 µl de dissociant à l'aide d'une micropipette à l'aide d'un bâtonnet, tapoter sur les échantillons de façon à les immerger complètement dans le dissociant après 15 à 30 minutes, dissocier si nécessaire les gros morceaux d'échantillon en les écrasant à nouveau avec un bâtonnet par tapotage ajouter 50 µl de colorant 1 et bien homogénéiser l'ensemble à l'aide du bâtonnet puis recouvrir d'une lamelle après 15

VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

minutes d'incubation à température ambiante, observer au microscope (x100 ou x200 avec confirmation éventuelle à x400) avec une lumière blanche (une forte intensité lumineuse améliore le contraste entre les éléments fongiques colorés en rose/rouge et les kératinocytes peu ou pas colorés)

Remarques : l'observation de la préparation peut être retardée de 24h maximum ; en cas de dessèchement prématuré du montage ou de décollement de la lamelle à cause de gros morceaux d'échantillons, rajouter progressivement jusqu'à 50 µl de colorant 2 au bord de la lamelle pour éliminer les bulles d'air.

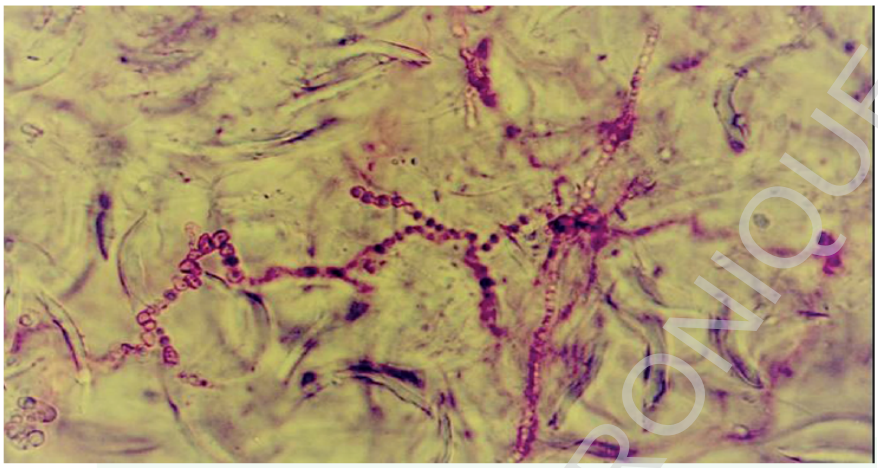


Figure 2 : Fragments d'ongles colorés au rouge Congo (Mycetcolor®) filaments mycéliens arthrosporés (Gr X 250)
sr2b@unimedia.fr

Contrôle de performance : à chaque ouverture de coffret : tester le coffret sur une culture de dermatophyte ou sur la souche ATCC Candida albicans 10231.

Stockage : coffret disponible sur la paillasse d'ensemencement

Interprétation et commentaires : Un examen microscopique détaillé permet de voir différents aspects morphologiques qui peuvent orienter vers un type de champignon : filaments mycéliens réguliers parfois dissociés en arthroconidies pour les dermatophytes ; filaments mycéliens irréguliers et mal colorés ou vésiculaires dans les infections dues aux moisissures ; blastospores accompagnées ou non de pseudomycélium dans les infections à levures.

Le diagnostic de dermatophytose sera posé quel que soit le résultat ultérieur des cultures si l'examen direct était positif.

Commentaires examen direct :

+ : EDMP : Filaments mycéliens : Présence de filaments mycéliens, dermatophytose probable

(Penser à signaler la présence de levures avec ou sans pseudofilaments !)

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

- : EDMN : Examen direct négatif

- **Malasseziose cutanée :**

La technique du scotch test : observer la lame colorée au bleu lactique à l'objectif 40.

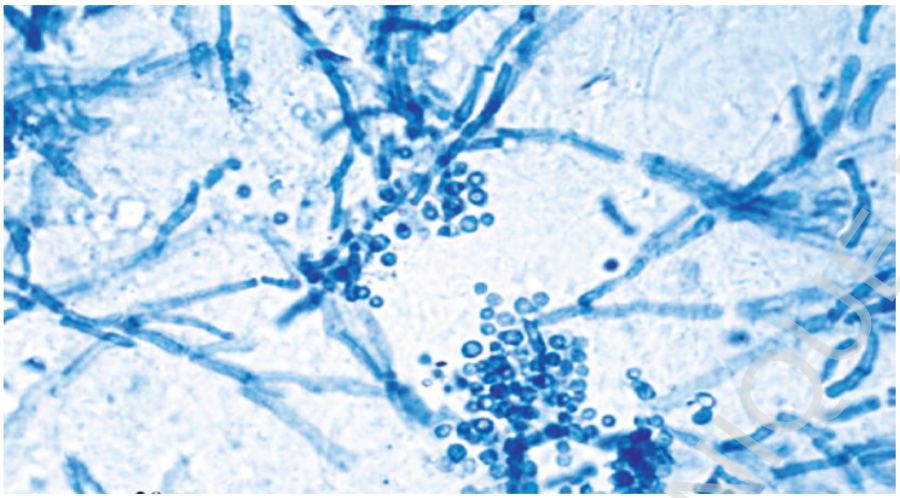


Figure 4 : Scotch test ou test à la cellophane adhésive sur lésion de Pityriasis versicolor. Levures disposées en "grappe" du Genre Malassezia coloration au bleu lactique (Gr 400)
Laboratoire de Parasitologie Mycologie (CHU Angers)

La culture pour la recherche de *Malassezia* n'est pas indispensable pour le diagnostic de pityriasis versicolor qui repose sur l'examen microscopique direct.

4. Culture

Milieux utilisés : les milieux suivants sont ensemencés :

- **un tube de gélose Sabouraud additionnée d'antibiotiques** (chloramphénicol et/ou gentamicine) et de cycloheximide (Actidione®)
- **un tube de gélose de Sabouraud additionnée d'antibiotiques sans cycloheximide** en parallèle (en effet, le cycloheximide inhibe ou limite la croissance de la plupart des moisissures contaminantes et quelques champignons sensibles au cycloheximide, telles que *Neoscytalidium dimidiatum* ou certaines levures pathogènes, peuvent être responsables d'infections de la peau ou des ongles).
- **une gélose sabouraud (boite ronde)** pour la recherche de levures.

Ensemencement : réalisé en respectant les règles de stérilité Les squames, fragments d'ongles ou de cheveux sont déposés à la surface de la gélose en exerçant une légère pression à l'aide d'une öese stérile. Ne pas visser complètement les tubes car les dermatophytes sont aérobies. Les cultures sont incubées à une température de **25 +/- 2°C** pendant **30 jours** et à **35 +/- 2°C** pendant **5 jours** pour la gélose sabouraud (boite ronde).

S'il n'y a assez de prélèvement pour l'examen direct ou pour ensemencer tous les milieux, privilégier la culture sur les tubes gélosés.

LA VERSION ÉLECTRONIQUE FAIT FOI

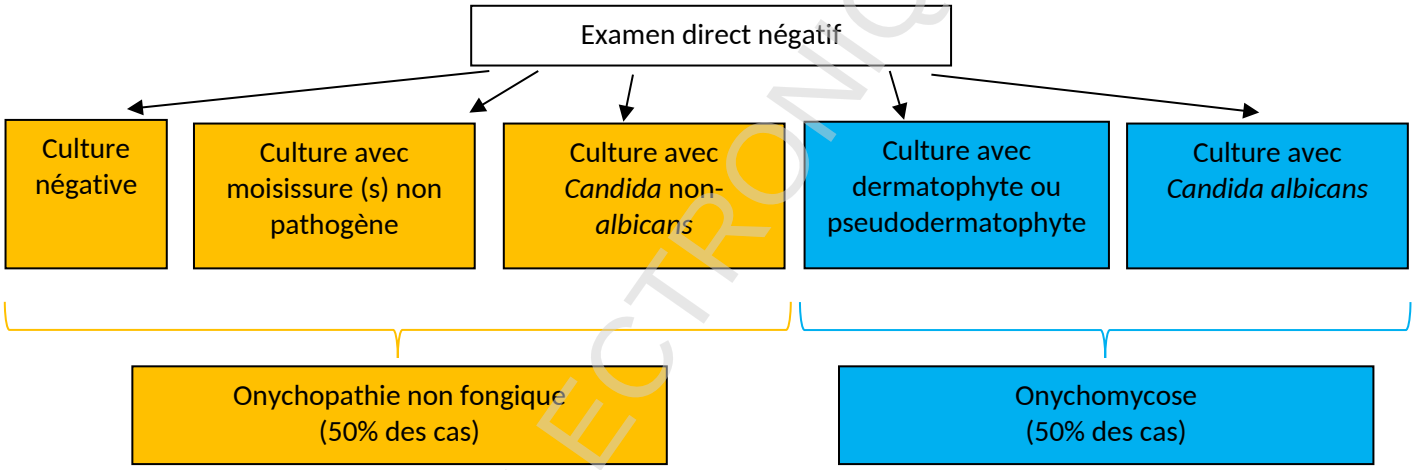
Fréquence de lecture : les cultures doivent être observées une à deux fois par semaine.

Milieux d'identification : la gélose de sabouraud est un milieu qui favorise la croissance du mycélium mais pas la sporulation. Aussi lorsque l'identification n'est pas possible à partir de la primo-culture, il peut être nécessaire de repiquer les dermatophytes sur des milieux pauvres (gélose au malt chloramphénicol biomérieux ou PDA difco). Nous utilisons uniquement la gélose MCA au laboratoire (malt chloramphenicol agar).

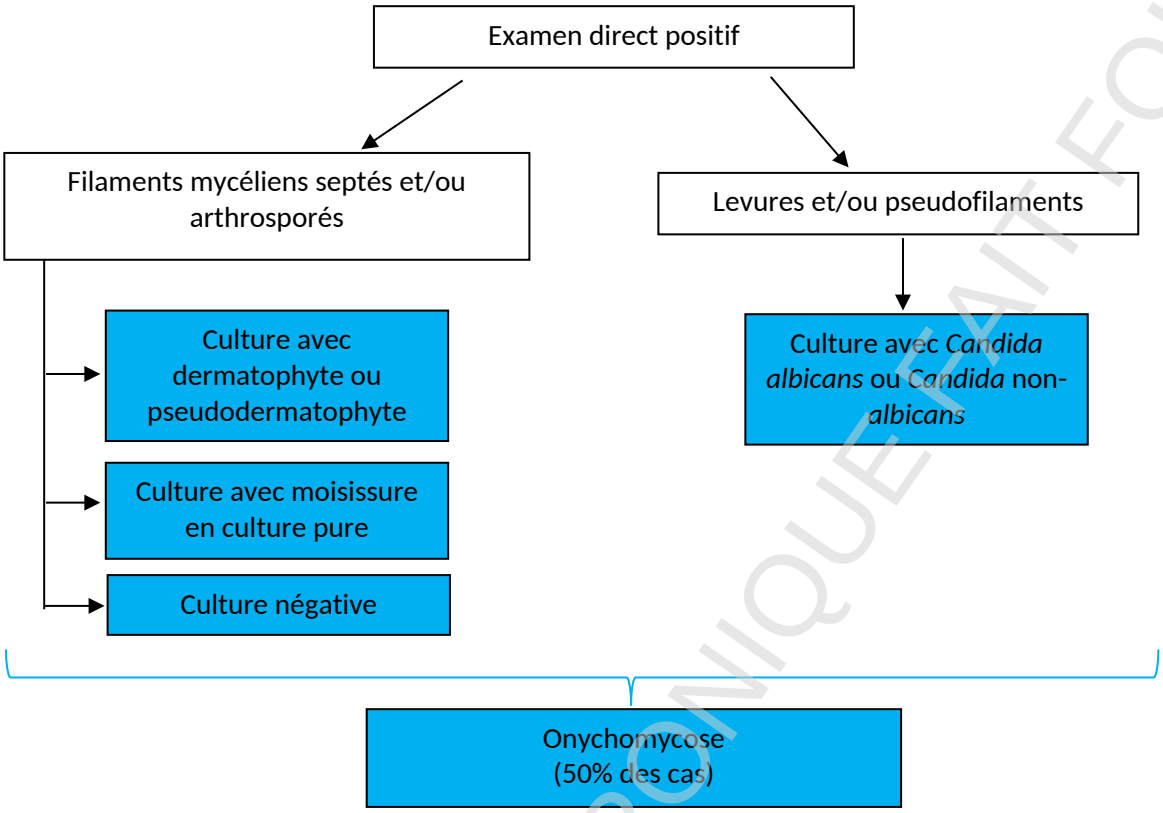
Identification des dermatophytes / champignons filamenteux : Identification sur l'aspect morphologique en culture et l'aspect microscopique au bleu lactique des colonies.

Identification des levures : Etat frais et galerie api

5. Interprétation et conclusion



LA VERSION ÉLECTRONIQUE FAIT FOI



Discordance examen direct-culture :

Malgré la présence de filaments mycéliens à l'examen direct, les primo-cultures sont fréquemment négatives. L'absence de pousse d'un dermatophyte ne doit cependant pas remettre en cause le diagnostic, ni attester d'une guérison clinique sur un prélèvement de contrôle, tant que l'examen direct demeure positif. Cette discordance peut s'expliquer par une quantité insuffisante de matériel collecté, la présence de filaments non viables dans des lésions anciennes, ou par un traitement récent. A l'inverse l'isolement d'un dermatophyte en culture doit toujours être pris en compte, même si l'examen direct est négatif.

Commentaires de conclusion :

- **Culture négative** :

Commentaire automatique : Culture sur gélose sabouraud négative à 30 jours : à confronter au contexte clinique.

Conclusion : CDMN : La négativité des cultures, du fait de l'ancienneté des lésions ou d'applications/prises antérieures insuffisantes ou mal adaptés d'antifongiques, n'infirme en rien le diagnostic. Elle n'a aussi aucune valeur de guérison après traitement d'une mycose documentée tant que l'examen direct reste positif.

- **Culture positive à dermatophyte** :

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

Conclusion : CDMP : Le diagnostic d'infection fongique de la peau ou des phanères est posé dès l'isolement d'un dermatophyte.

- **Culture positive à un champignon autre potentiellement pathogène** :

Conclusion : CDMA : Infection fongique de la peau ou des phanères probable : confrontation clinico-biologique nécessaire.

6. Références

REMIC 2018 – Infections fongiques de la peau et des phanères

Dermatophytes et dermatophytoses – Revue Francophone des Laboratoires – N°539 – février 2022

Cahier de formation biologie médicale – Bioforma – n°31 – 2004

LA VERSION ÉLECTRONIQUE FAIT FOI