

Université Pierre et Marie Curie-
Sorbonne Universités

MEMOIRE
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME
UNIVERSITAIRE
« ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE
DE BIOLOGIE MEDICALE »

VERIFICATION DE METHODE DE
L'IDENTIFICATION
DES LEVURES PAR SPECTROMETRIE DE
MASSE

GIROT Hélène
Année 2015

« Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire « Assurance qualité au laboratoire de biologie médicale » sont des travaux réalisés pendant l'année de formation.

Les opinions exprimées n'engagent que leurs auteurs.

Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication en tout, ou partie, sans l'accord de l'auteur et du responsable du DU concerné. »

AUTEUR :

GIROT Hélène

- Praticien attaché, laboratoire de parasitologie-mycologie
Pôle de Biologie Clinique, CHU de ROUEN
1 rue de Germont 76031 ROUEN Cedex

- Biologiste directeur adjoint
Laboratoire de l'Europe ROUEN
73 Boulevard de l'Europe 76100 ROUEN

Sommaire :

1	Introduction	5
1.1	Présentation du CHU-hopitaux de Rouen.....	5
1.2	Présentation du laboratoire de biologie médicale (LBM) du CHU :	5
1.3	Présentation de la démarche qualité au sein du pôle de biologie médicale :	6
1.4	Présentation de l'unité de parasitologie-mycologie :	8
1.5	Objectif du mémoire :	9
1.5.1	Contexte :	9
1.5.2	Cas particulier de la microbiologie :	10
1.5.3	Intérêt de la spectrométrie de masse pour l'identification des levures :	11
1.6	Objectifs :	13
1.6.1	Objectif technique :	13
1.6.2	Objectif qualité :	13
1.6.3	Calendrier du projet :	14
2	Vérification de méthode :	14
2.1	Formation du personnel :	14
2.2	Evaluation des besoins en matériel et réactifs :	14
2.3	Analyse de risques :	15
2.4	Rédaction du mode opératoire d'utilisation du SM :	18
2.5	Mise en place de CIQ "levure" :	18
2.5.1	Choix des souches servant de CIQ :	19
2.5.2	Détermination de la fréquence de passage des CIQ :	19
2.5.3	Processus analytiques testés :	19
2.5.4	Validation et analyses des CIQ :	20
2.6	Essais	20
2.6.1	Définition de la portée d'accréditation :	20
2.6.2	Répétabilité :	21
2.6.3	Reproductibilité ou fidélité intermédiaire :	22
2.6.4	Etude de la contamination :	22
2.6.5	Etude de la robustesse :	22
3	Discussion /conclusion :	28
4	Bibliographie :	30
4.1	Documents associés :	30
4.2	Bibliographie :	30
5	Annexes :	31

GLOSSAIRE :

CAN 2 :Gélose chromID Candida (milieu chromogène pour l'isolement sélectif des levures et l'identification direct de *Candida albicans*).

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

EEQ : Evaluation Externe de Qualité

GEDI : système documentaire du laboratoire

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

MO : Mode opératoire

PO : Procédure opératoire

QUAMIC : Comité Qualité de la Société française de microbiologie

REMIC : Référentiel en Microbiologie Médicale

SapaNet : logiciel de gestion de Stock, de gestion des équipements et de gestion des non conformités.

SIL : Système Informatique du Laboratoire

SFMM : Société française de mycologie médicale

SM : Spectromètre de Masse

SMQ : Système de Management de la Qualité

1 Introduction

1.1 Présentation du CHU-hopitaux de Rouen

Le CHU (Centre Hospitalier Universitaire) de Rouen est un établissement de santé publique.

L'établissement regroupe cinq établissements de soins et d'hébergement, pour une capacité d'accueil de 2441 lits et places (hors prestations à domicile et dialyses) :

Le site de Charles Nicolle avec 1298 lits et places, le site de Bois Guillaume avec 520 lits et place, le site de Saint Julien avec 342 lits et places, le site de Boucicaut avec 150 lits et places et le site de Oissel avec 131 lits et places.

Le CHU de Rouen comporte onze pôles cliniques et médico-techniques dont le pôle de biologie. Il participe directement à la formation des médecins et des pharmaciens en partenariat avec l'université de Rouen et la faculté de médecine et de pharmacie.

1.2 Présentation du laboratoire de biologie médicale (LBM) du CHU :

Le pôle de biologie assure la réalisation d'analyses de biologie médicale, d'anatomie et cytologie pathologiques, d'explorations en physiologie digestive, urinaire, respiratoire et sportive en vue de la prévention, du dépistage, du diagnostic et de l'évaluation du risque de survenue d'états pathologiques, ainsi que la réalisation de consultations, d'explorations fonctionnelles et d'actes thérapeutiques. Il a aussi pour objectif de mettre à la disposition des services cliniques les examens et explorations les plus innovants et de participer aux activités de recherche, tant dans le domaine du diagnostic que dans celui des activités thérapeutiques.

En 2014, l'activité du pôle de biologie a représenté 5 984 917 actes soit 164 034 601 B/P/K/Z totaux dont 35 763 295 B/P/K/Z HN (*données issues de la revue de processus 2014*).

Les laboratoires de biologie médicale, d'anatomie et de cytologie pathologiques et d'explorations fonctionnelles du CHU - Hôpitaux de Rouen fonctionnent en pôle

depuis 2004. Ce regroupement a été objectivé lors des élections de pôle de décembre 2008.

Le pôle regroupe onze laboratoires répartis sur cinq sites (Institut de Biologie Clinique, Pavillon Derocque, Pavillon Jacques Delarue, Faculté de Médecine et Pharmacie et Hôpital St Julien).

- Laboratoire d' anatomie et cytologie pathologiques
- Laboratoire de biochimie médicale
- laboratoire de biologie de la reproduction, Histologie
- Laboratoire de cytogénétique
- Laboratoire de génétique clinique et moléculaire
- Laboratoire d' hématologie
- Laboratoire d' immunopathologie clinique et expérimentale
- Laboratoire de microbiologie
- Laboratoire de neurophysiologie
- Laboratoire d'explorations fonctionnelles
- Laboratoire de pharmacologie
- Laboratoire de physiologie digestive, urinaire, respiratoire et sportive

Les effectifs non médicaux du pôle de biologie sont de 377,5 ETP affectés auxquels s'ajoutent 21 étudiants qui assurent des gardes. Le personnel médical est composé de 97,74 ETP de biologistes et médecins, 52,47 ETP internes (valeurs 2014 : données issues de la revue de processus 2014).

1.3 Présentation de la démarche qualité au sein du pôle de biologie médicale :

L'organisation du laboratoire en ce qui concerne la qualité est définie dans le manuel qualité (référence GEDI réf : 8045).

La politique qualité du pôle de biologie et l'engagement de sa direction ont pour finalité l'efficacité de la prise en charge du patient et l'amélioration de sa santé en assurant la fiabilité des résultats de biologie médicale.

La direction qualité du CHU définit la politique qualité à appliquer au laboratoire et participe aux revues de direction annuelles.

Le système management de la qualité (SMQ) mis en place au sein du pôle de biologie s'applique à l'ensemble de ses activités, sauf celle de la pharmacovigilance. Ce système qualité est mis en place conformément aux normes et référentiels suivants:

- ISO 15189 et ISO 22870 pour les activités d'analyses de biologie médicale,
- ISO 17025 pour l'activité de recherche et dénombrement des légionelles et l'activité de dosage des endotoxines.
- ISO 9001 pour les activités de physiologies digestive, urinaire, respiratoire et sportive,
- manuel de certification HAS.

L'organisation de la qualité dans le pôle suit une approche pyramidale :

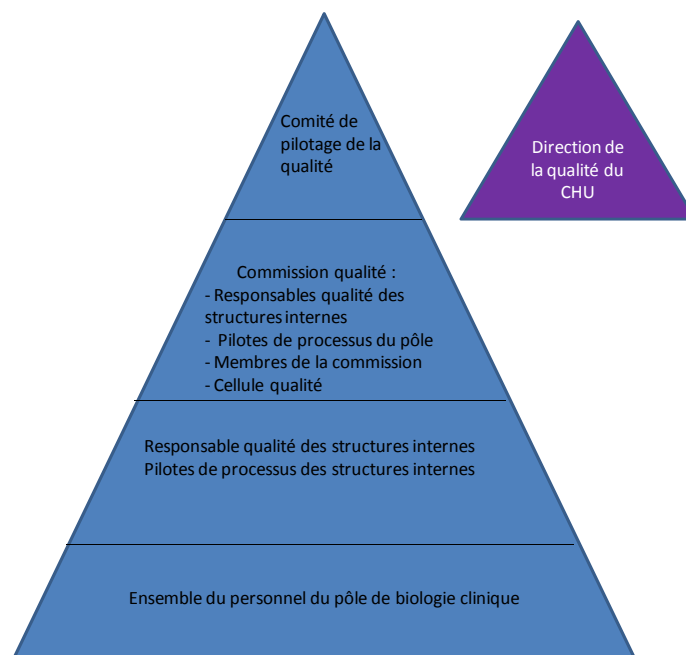


Figure 1 : Organisation de la qualité dans le pôle de biologie médicale du CHU de Rouen (manuel qualité document GEDI réf : 8045)

Le SMQ est basé sur une approche par processus. L'efficacité de chaque processus est évaluée grâce à des indicateurs qualité. Ces indicateurs qualité et leurs modes de suivi sont détaillés dans des fiches processus.

Le SMQ s'appuie sur une logique d'amélioration continue selon le principe de la roue de Deming ou PDCA.

Le bilan du SMQ et des activités du pôle est réalisé chaque année au cours de la revue de direction : elle permet de contrôler l'efficacité du SMQ et du système documentaire et de suivre les non-conformités et les actions associées. La direction du pôle préside cette revue qui a lieu annuellement en présence de représentants de la direction du CHU. La Revue de direction suit la procédure « Pôle Biologie : Procédure de Revue de Direction » (GEDI Réf : 5128).

L'accréditation à été obtenue pour les analyses suivantes :

- Domaine biologie médicale : sous domaine hématologie :

Numération-formule, Temps de Quick, VS, TCA, dosage du facteur 2, facteur 5, facteur 7, facteur 10, fibrinogène, antithrombine et activité de l'antithrombine, activité anti Xa (arixtra, orgaran, héparine, HBPM)

- Domaine biologie médicale sous domaine biochimie :

Dosage de : Troponine T, Potassium, sodium, protide, Créatinine kinase, Haptoglobine, cortisol, phosphatase alcaline, magnésium, chlore, estradiol (femme), lipase, calcium, T3 libre, T4 libre, urée, procalcitonine, thyrostimuline, NT proBNP, LDH, GGT, Amikacine, Plomb, vancomycine, théophylline, tobramycine, gentamicine, carbamazépine, acide valproïque, phénytoïne, phénobarbital, sirolimus, everolimus, mycophénolate, tacrolimus, rifampicine.

1.4 Présentation de l'unité de parasitologie-mycologie :

Le département de microbiologie est subdivisé en quatre unités : l'unité de bactériologie, l'unité de virologie, l'unité de parasitologie mycologie et l'unité d'hygiène hospitalière.

L'unité de parasitologie-mycologie est organisée selon le schéma suivant :

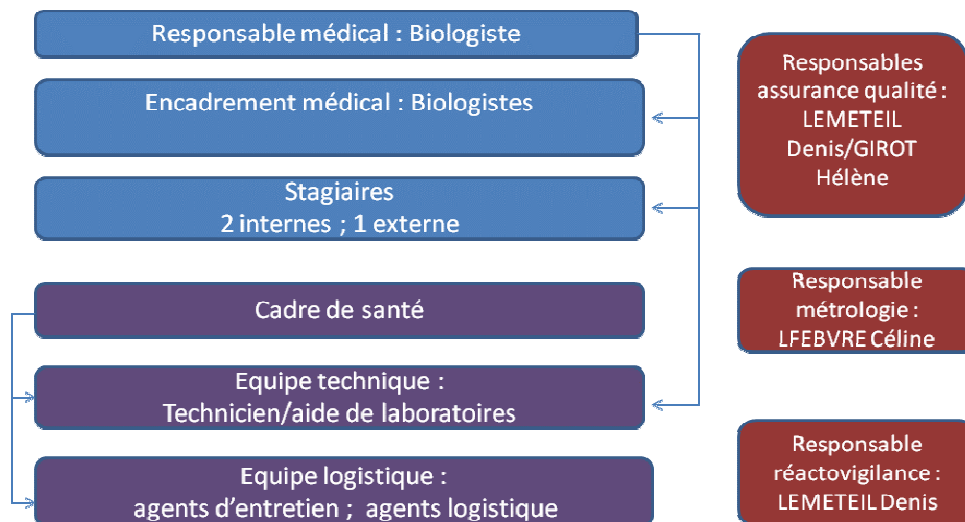


Figure n°2 : organisation du laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU de Rouen

L'unité de parasitologie-mycologie est subdivisée en trois secteurs :

- * le secteur de parasitologie : recherche de parasites par microscopie
- * le secteur de mycologie : recherche de champignons pathogènes par culture ou par biologie moléculaire
- * le secteur d'immunologie : recherche de marqueurs d'infections parasitaires ou fongiques (anticorps ou antigènes).

1.5 Objectif du mémoire :

1.5.1 Contexte :

Dès l'année 2008, le gouvernement français a souhaité faire une réforme de la biologie médicale. L'objectif global de la réforme de biologie médicale est de permettre à chacun d'avoir accès à une biologie médicale de qualité prouvée payée à son juste prix dans un contexte européen.

L'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la réforme de la biologie a concrétisé l'obligation d'accréditation des laboratoires de biologie médicale par le COFRAC (instance nationale d'accréditation et selon les normes NF EN ISO 15189 et 22870).

Selon la norme 15189 : Laboratoire de biologie médicale : Exigences concernant la qualité et les compétences :

* chapitre 5.1 : "Le laboratoire doit sélectionner les procédures analytiques qui ont été validées pour leur utilisation prévue" et "Les procédures d'examen validées utilisées sans modification doivent faire l'objet d'une vérification indépendante par le laboratoire avant d'être utilisée régulièrement".

* chapitre 5.6 : "Le laboratoire doit concevoir des procédures de contrôle de qualité permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats soit bien obtenue".

Selon le SH REF 02 : Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF ISO 15189 : 2012 :

* chapitre 5.5 : "Dans le cas de méthode reconnue, la validation de méthode utilisée par le LBM est réduite à une vérification sur site pour s'assurer que les performances attendues sont atteintes dans les conditions de travail du LBM. Le LBM peut dans ce cas revendiquer une portée flexible standard de type A

* chapitre 5.6.1 : "Le LBM doit utiliser régulièrement les contrôles internes de qualité (CIQ). A cet effet, il doit définir sa stratégie (fréquence de passage, niveaux, bornes d'acceptabilité, règle de validation et exigences de performance en terme de fidélité)".

1.5.2 Cas particulier de la microbiologie :

En ce qui concerne la microbiologie, nous disposons majoritairement de méthodes qualitatives car les notions de justesse, d'intervalle de mesure et d'incertitude sont difficiles, voire impossibles, à déterminer en fonction d'un facteur supplémentaire de variabilité qui n'existe pas dans les autres disciplines : un micro-organisme est vivant. En effet, ce dernier présente une variabilité multifactorielle imprévisible (espèce, souche, état métabolique, nature de l'échantillon, traitement antibiotique, par exemple). Il en résulte une incertitude sur le résultat dont l'estimation est en pratique impossible.

L'analyse microbiologique ne peut être systématiquement encadrée par des contrôles internes de qualité fréquents et réguliers. La validation des méthodes en microbiologie se fait majoritairement sur un mode qualitatif, la maîtrise des risques repose essentiellement et avant tout sur l'habilitation et la gestion du contrôle de qualité [1].

1.5.3 Intérêt de la spectrométrie de masse pour l'identification des levures :

1.5.3.1 Principes généraux de la spectrométrie de masse :

Un spectromètre de masse est composé de trois éléments principaux :

- une source d'ions dans laquelle se produisent le passage à l'état gazeux, l'ionisation et la décomposition des ions
- un analyseur où sont triés les ions en fonction de leur rapport m/z
- un détecteur dont le rôle est de compter les ions

Les spectromètres de masse utilisés en biologie médicale pour l'identification de micro-organismes sont de type MALDI TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight).

La matrice est capable de transférer les protons des protéines et d'absorber les rayons UV. Un laser UV intégré au spectromètre irradie ensuite le composite matrice-échantillon, entraînant l'évaporation rapide et la libération de protéines chargées positivement. Ces ions sont accélérés électrostatiquement sur une courte distance et entrent dans le tube de vol à une vitesse dépendant de la masse. Les protéines ionisées présentant différentes masses, leurs ions arrivent au détecteur après différentes périodes de temps (temps de vol). La mesure du temps (échelle en nanoseconde) entre l'accélération en impulsion et les signaux correspondants du détecteur, peut alors être convertie en rapport masse/charge (noté m/z), et en masse moléculaire pour les ions monovalents majoritaires [2].

La spectrométrie de masse permet de quantifier avec précision et en quelques secondes la masse et l'abondance des protéines comprises entre 2000 et 15000 Da présentes dans le microorganisme. Les protéines détectées correspondent aux protéines les plus représentées dans la cellule fongique, à savoir les protéines ribosomales mais aussi différents types de protéines structurales. Chaque micro-organisme va donc présenter un spectre protéique spécifique qui sera comparé à une base de données.

1.5.3.2 Spectrométrie de masse et identification des levures :

Les levures sont des champignons microscopiques, unicellulaires. Les levures pathogènes d'intérêt médical représentent une flore variée dominée par le genre *Candida* principalement *Candida albicans* suivie d'une vingtaine d'autres espèces (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, etc...). Les mycoses dues à ces champignons levuriformes sont de plus en plus fréquentes en médecine ; leur incidence a fortement augmenté ces dernières décennies, notamment chez les patients fragilisés ou à haut risque et en particulier dans les unités de soins intensifs et en onco-hématologie. L'identification des genres et espèces fongiques est fondamentale pour l'instauration, d'un traitement adapté le plus précocement possible [3].

L'identification est réalisée à partir d'une petite quantité de levures prélevée à partir d'une gélose. L'échantillon (avec ou sans extraction préalable) est transféré sur une position de la cible MALDI (porte-échantillon). Après séchage à l'air, la totalité de l'échantillon est recouverte de matrice qui cristallise en séchant à l'air ambiant. La préparation de l'échantillon est alors terminée et il peut être analysé.

Le spectromètre de masse est couplé à un logiciel dédié à l'interprétation des spectres protéiques obtenus. Le logiciel analyse le spectre des protéines intrinsèques des micro-organismes. Le profil protéique (spectre de masse) de la souche étudiée est comparé aux entrées référencées dans la base de données. L'identification est établie en terme de niveau de fiabilité biostatistique sur la base d'une corrélation entre le spectre acquis et les spectres de référence. La congruence des spectres est représentée par une valeur numérique (« log(score) » = score) entre 0 et 3, par un pourcentage de similitude ou par un pourcentage de degré de confiance [4].

1.5.3.3 Place de la spectrométrie de masse dans la stratégie d'identification mycologique du laboratoire :

Les méthodes d'identification actuelles des levures au sein de notre laboratoire sont basées sur des caractères phénotypiques :

- La couleur des colonies sur milieu chromogène : Gélose chromID Candida[®] (CAN 2[®])
- L'assimilation ou la fermentation des sucres (galerie d'identification API32C[®])
- Des réactions d'agglutination de billes de latex recouvertes d'anticorps monoclonaux spécifiques d'espèces (Bichro-latex albicans[®]).

La spectrométrie de masse présente de nombreux avantages :

- simplicité d'utilisation
- rapidité des résultats
- faible coût de fonctionnement après acquisition de l'automate : l'intégration du MALDI-TOF peut réduire les coûts de réactifs et du travail d'identification de plus de 50 % en 12 mois. Chaque test ne revient qu'à quelques centimes d'euros [4].
- fiabilité des résultats : en effet selon les études, il est possible d'identifier avec exactitude au niveau de l'espèce 99 à 99,5 % des levures testée en comparaison avec l'identification classique par galerie API32C [5].

L'acquisition d'un spectromètre de masse par le service de microbiologie du CHU de Rouen semblait donc tout à fait adaptée aux besoins du laboratoire.

Le choix de l'appareil s'est porté sur l'appareil commercialisé par la société Bruker en raison du niveau de performance annoncé et des références de la société pourcentage d'identification excellent de 99,5% [5]. Après l'installation de l'appareil, le personnel a suivi une formation à l'utilisation de l'appareil.

1.6 Objectifs :

1.6.1 Objectif technique :

L'objectif de ce travail est de démontrer que le SM est capable d'atteindre les performances requises et qu'il est conforme aux spécifications attendues afin d'assurer la qualité de l'identification des levures au sein du laboratoire.

1.6.2 Objectif qualité :

L'objectif final de ce travail est la rédaction d'un dossier de validation de méthode (SH FORM 44) qui pourra être présenté au COFRAC en vue d'une accréditation en 2016.

1.6.3 Calendrier du projet :

Etape 1 : Formation du personnel

Etape 2 : Evaluation des besoins en matériels et réactifs

Etape 3 : Rédaction de l'analyse des risques

Etape 4 : Rédaction du mode opératoire d'utilisation du SM

Etape 5 : Mise en place de CIQ

Etape 6 : Début de la vérification technique

Etape 7 : Rédaction d'une procédure de vérification analytique des résultats

2 Vérification de méthode :

2.1 Formation du personnel :

Le SM a été installé dans le service en octobre 2014, lors de son installation des formations ont été proposées aux personnes du service par la société BRUKER.

Deux types de formation ont été proposés :

- Formation utilisateur
- Formation référent

Des attestations de formation ont été remises à chaque personne ayant suivi la formation. Ces attestations ont été enregistrées dans le dossier individuel du personnel

Au total :

Sur les 4 techniciens du service, 3 ont été formés dont 1 en tant que référent

Sur les 4 biologistes du service, 2 ont été formés dont 1 en tant que référent

2.2 Evaluation des besoins en matériel et réactifs :

Les solvants et produits chimiques requis sont définis dans la notice fournie par le fabricant "IVD_MALDI_Biotyper" [6]. Un tableau récapitulatif des besoins en matériels et réactifs à été réalisé (cf. annexe I). Les Fiches de Données de Sécurité

pour les produits à risques sont disponibles sur le disque partagé G: parasito sur minerve – FDS – Spectro de masse

2.3 Analyse de risques :

Une analyse de risques permet de mettre en évidence les points critiques de la méthode devant être maîtrisés afin d'assurer la qualité des résultats.

L'exigence : obtenir une identification correcte et fiable pour les levures isolées dans le laboratoire et appartenant à la base de données fournisseur.

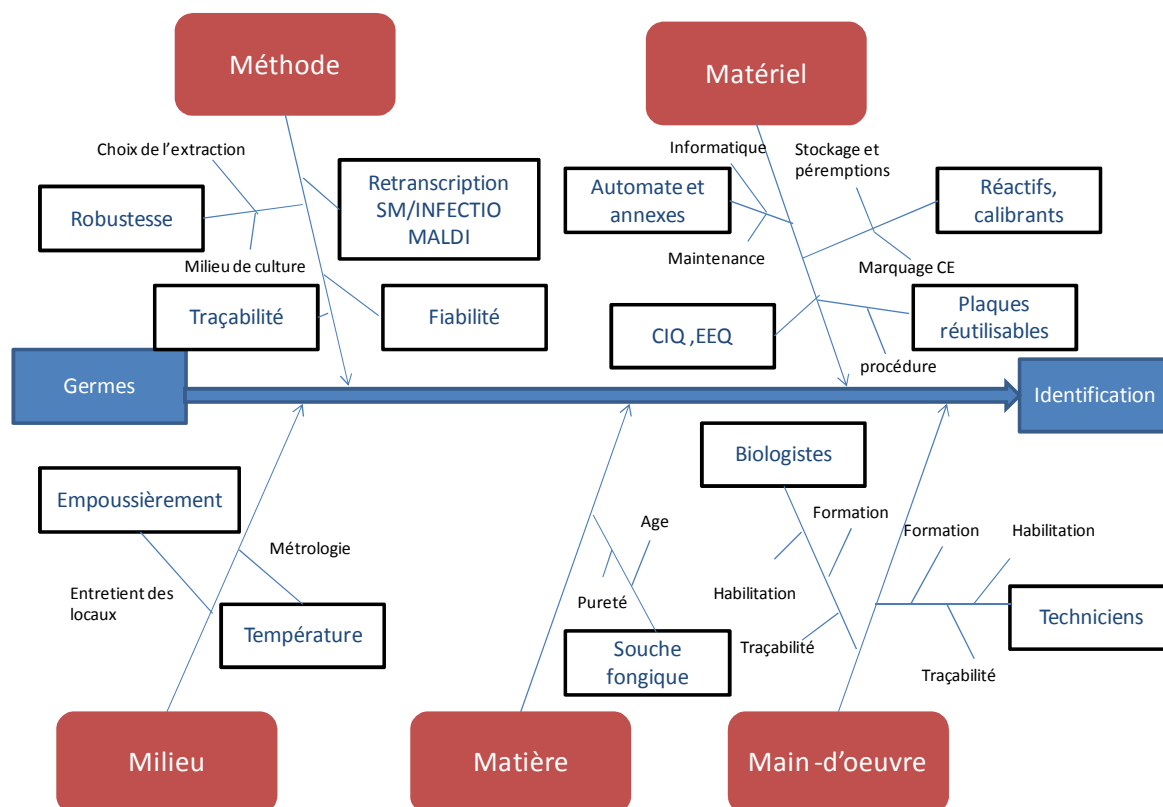


Figure 3 : diagramme d'Ichikawa : analyse des risques : identification des levures par SM

Exigences	Risques associés	Maitrise
Méthode		
Adéquation du milieu de culture utilisé à l'automate	Perturbation des résultats attendus	Evaluation lors de la vérification de méthode
Choix de la technique d'extraction adaptée	Perturbation des résultats attendus	Evaluation lors de la vérification de méthode
Fiabilité	Perturbation des résultats attendus	Evaluation grâce aux EEQ et aux CIQ
Traçabilité	Mauvaise identification de l'opérateur en cas d'erreur	Paraphe sur feuille de travail + login informatique
Connexion informatique SM/INFECTIO MALDI	Erreur de retranscription de l'identification fongique	Evaluation sur site
Matière		

Délais d'incubation de l'inoculum	Perturbation des résultats attendus	Evaluation sur site lors de la vérification de méthode
Pureté de l'inoculum	Inoculum non pur pouvant entrainer un résultat faux	Isolement de contrôle de l'inoculum en cas de doute sur la pureté
Main d'œuvre		
Connaissance de la base de données du fournisseur	Absence de résultat	Base de données disponible sur parasito sur minerve : résultat MALDI + habilitation du personnel
Connaissance du manuel utilisateur	Mauvaise utilisation de l'automate	Manuel disponible sur parasito sur minerve : résultat MALDI + habilitation du personnel
Lavage des plaques	Contamination entrainant un résultat faux	Habilitation du personnel et/ou formation initiale
Bon dépôt de la matrice et de la colonie sur la cible	Résultats erronés	Formation initiale et/ou Habilitation du personnel + CIQ (grille d'habilitation du technicien en mycologie GEDI réf :17128)
Changement d'embout entre les cibles	Contamination pouvant entrainer des résultats erronés	Formation initiale et/ou habilitation du personnel (grille d'habilitation du technicien en mycologie GEDI réf : 17128)
Ne pas toucher la surface de la cible	Contamination pouvant entrainer des résultats erronés	Formation initiale et/ou habilitation du personnel (grille d'habilitation du technicien en mycologie GEDI réf : 17128)
Saisie des résultats dans le Système Informatique du Laboratoire (SIL)	Mauvaise saisie informatique des résultats	Vérification de la saisie manuelle lors de la validation biologiques (validation biologique réalisé avec la feuille de travail)
Connaissance des conditions de vérification analytique et de validation biologique.	Résultats erronés	Habilitation du personnel (grille d'habilitation du technicien en mycologie GEDI réf : 17128 ; habilitation GEDI réf : 15347)
Traçabilité	Pas d'identification du technicien ou du biologiste en cas de problème de résultat	Mise en place de code personnel
Milieu		
Température de la pièce	Détérioration des performances du SM	Métrologie : mise en place d'une sonde d'ambiance
Contrôle de l'empoussièrement de la pièce	Détérioration des performances du SM	Protocole de nettoyage des pièces du pôle, fermeture de la porte (Mode Opérateur (MO) 106 : entretien des locaux du pôle de biologie clinique)
Matériel		
Maintenance du SM	Détérioration des performances du SM	Traçabilité des maintenances par l'unité de bactériologie (utilisation du SapaNet)
Réactifs	Détérioration des performances du SM	Marquage CE

Calibrant	Détérioration des performances du SM	Marquage CE
CIQ	Mauvaise évaluation des performances du SM	Souche ATCC + 1 souche provenant d'un EEQ
EEQ	Mauvaise évaluation des performances du SM	UKNEQAS Biologie prospective
Rupture de Stock	Retard du délai de rendu des résultats	Logiciel de gestion de stock (SapaNet)
Qualité des réactifs utilisés	Dégradation des performances	Surveillance régulière des dates de péremption (logiciel SapaNet), CQI une fois toutes les deux semaines
Respect des conditions de stockage des réactifs	Dégradation des performances	Métrie et connaissance des conditions de stockage par le personnel
Respect des dates de péremption	Dégradation des performances	Surveillance régulière des réactifs périmés (logiciel de gestion des stocks)

Nous avons également réalisé une Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticités (AMDEC) :

F : fréquence (1 = rare ; 5 = fréquent)

G : indice de gravité (1 = aucune ; 5 = importante)

D : indice de détection (1 = infaillible ; 5 = difficile à détecter)

Criticité C : F*D*G

Facteur de risque	AMDEC				Maîtrise des risques
	F	G	D	C	
Méthode					
Mauvaise traçabilité	3	1	1	3	Mode opératoire (GEDI Réf 17585) ; habilitation du personnel (GEDI réf : 17128)
Erreur de retranscription informatique	1	5	5	25	Evaluation lors de la vérification de méthode
Matière					
Contamination de l'inoculum	2	2	2	8	Isolement de contrôle de l'inoculum ; utilisation de milieux chromogènes
Main d'oeuvre					
Mauvaise connaissances des conditions d'utilisation du SM	2	5	3	30	Mode opératoire (GEDI Réf 17585) ; habilitation du personnel (GEDI réf : 17128)

Mauvaise saisie des résultats dans le SIL (retranscription manuelle)	2	5	2	20	Vérification de la saisie manuelle lors de la validation biologiques
Milieu					
Variation importante de température	1	3	1	3	Sonde d'ambiance surveillée par l'unité de métrologie
Empoussièrément trop important	1	3	1	3	Nettoyage quotidien selon MO GEDI réf : 106
Matériel					
Absence de maintenance du SM	1	3	1	3	Gestion des fiche de vie automate par logiciel "vigilia"
Mauvaise qualité ou absence de réactifs	2	5	3	30	Date de péremption et rupture de stock géré par le logiciel de stock Condition de conservation surveillées par l'unité de métrologie

2.4 Rédaction du mode opératoire d'utilisation du SM :

Le technicien référent du SM a rédigé un MO d'utilisation du SM suite à sa formation initiale. Ce MO à été mis dans la base documentaire (GEDI réf 17585) dès les conclusions de la vérification de méthode. Ce document a suivi le cycle classique de notre base documentaire : document à deux signatures qui a été diffusé à l'ensemble du personnel du laboratoire. Ce MO sera révisé dans un délai maximum de deux ans.

2.5 Mise en place de CIQ "levure" :

Dans la sous unité mycologie médicale aucun CIQ n'avait été mis en place, l'arrivée du SM et la décision de réaliser la vérification de méthode nous a incités à résoudre ce problème.

Selon la norme ISO 15189 : 2012 : "Le laboratoire doit concevoir des procédures de contrôle de qualité permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue."

Selon le SH REF 02 : "Le LBM doit utiliser régulièrement les CIQ. A cet effet, il doit définir sa stratégie (fréquence de passage, niveaux, bornes d'acceptabilité, règle de validation et exigences de performance en terme de fidélité).

2.5.1 Choix des souches servant de CIQ :

Le QUAMIC recommande l'utilisation de souches (ATCC, CIP...) que l'on doit se procurer auprès d'organismes ou de fabricants garantissant par un certificat l'origine des souches, les souches d'origine clinique ou conservées à l'occasion des EEQ offrent moins de garantie [1].

Au sein du laboratoire, le choix s'est donc porté sur trois souches de levures :

- Deux souches ATCC : une souche de *Candida albicans* (souche ATCC 90028) et une souche de *Candida parapsilosis* (souche ATCC 22019) qui sont les levures les plus fréquemment isolées.
- Une souche fournie par un organisme de EEQ : *Cryptococcus neoformans* (souche n°2226). Il n'existe pas de souche ATCC commercialisée pour cette levure alors qu'il s'agit d'une levure critique d'un point de vue clinique (agent de la cryptococcose neuroméningée).

2.5.2 Détermination de la fréquence de passage des CIQ :

Dans le SH GTA 06, cette fréquence ne devrait pas être inférieure à deux contrôles mensuels même s'il n'y a pas de recommandations formelles.

Selon le QUAMIC concernant la fréquence de passage des CIQ : "Elle est à fixer par le biologiste selon son activité. Le CIQ doit être réalisé à chaque changement de lot de réactif et à chaque grosse opération de maintenance ou après résolution d'une panne machine. Un contrôle toutes les 2 semaines paraît souhaitable et, au minimum, une fois par mois."

La fréquence de passage d'une souche toutes les deux semaines nous permet de tester l'ensemble des lots de réactifs (milieux de culture, réactifs du SM...), c'est donc cette fréquence qui a été adoptée. En cas de panne du SM, une souche de CIQ devra être analysée après la remise en service de l'automate.

2.5.3 Processus analytiques testés :

Les contrôles doivent être instaurés à chaque étape du processus analytique, nous avons donc profité de la mise en place des CIQ pour l'identification par spectrométrie

de masse pour les tester sur l'ensemble des processus analytiques permettant l'identification et l'étude de la résistance aux antifongiques (la mise en culture, le contrôle du milieu chromogène, l'identification par spectrométrie de masse et l'antifongigramme).

A ce titre un document de gestion des CIQ à été référencé dans la base documentaire GEDI réf : 19323 (cf. annexe II) pour faciliter le rendu des résultats.

2.5.4 Validation et analyses des CIQ :

Les CIQ doivent être visés par le biologiste à la fin de toutes les étapes analytiques. Il évaluera la conformité de l'identification fongique et de l'antifongigramme en fonction :

- des certificats pour les souches ATCC
- des résultats fournis par l'organisme d'EEQ pour la souche issue d'un EEQ.

En cas de non conformité du CIQ, une fiche de non conformité devra être rédigée ainsi qu'une analyse des causes et une éventuelle analyse d'impact.

La mise en place des CIQ a donné lieu à la rédaction d'une procédure de gestion des CIQ et des EEQ en mycologie. Cette procédure a été référencée dans la base documentaire GEDI réf : 16854).

L'unité de parasitologie-mycologie était déjà inscrite à 2 programmes d'EEQ : UKNEQAS et Biologie Prospective ce qui correspond à l'identification de dix isolats fongiques par an. Ces isolats, s'il s'agit de levures seront désormais identifiés par SM.

2.6 Essais

2.6.1 Définition de la portée d'accréditation :

Selon le QUAMIC : "Il ressort que pour la microbiologie, à l'exception de la cytologie urinaire automatisée et de la détermination de la charge virale (en biologie moléculaire), nous ne disposons que de méthodes qualitatives" [1].

La méthode répond donc à la définition d'une méthode qualitative. Il s'agit d'une méthode commercialisée marquée CE-IVD. Nous réalisons une vérification de méthode selon la portée A d'accréditation, celle-ci est réduite à une vérification sur

site pour s'assurer que les performances annoncées sont atteintes dans les conditions de travail du laboratoire.

Selon le SH GTA 04 la vérification de méthode nécessite au minimum des essais de fidélité, de justesse, des facteurs de variabilités et une comparaison de la nouvelle méthode avec une méthode déjà utilisée au laboratoire.

Si on se réfère aux lignes de portée décrite dans le document SH INF 50 notre méthode appartient au Sous-domaine : Microbiologie ; Famille : Parasitologie-Mycologie (PARASITOMYCO)

Code	Nature de l'échantillon biologique	Nature de l'examen/analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarque (Limitation, paramètres critiques...)
PM4	Culture fongique	Recherche et identification du genre et/ou de l'espèce fongique	Spectrométrie de masse	Portée A	IVD MALDI BIOTYPER (BRUKER)

Un protocole de vérification analytique à été rédigé et présenté aux techniciens lors d'une réunion de service mensuelle. Ce protocole ainsi que les résultats retrouvés ont été tracé dans la base documentaire (GED I réf : 18408)

Pour l'étude de la répétabilité, de la reproductibilité, de la contamination inter-série et de la robustesse nous avons travaillé sur les souches fongiques utilisées au laboratoire pour réaliser les CIQ.

2.6.2 Répétabilité :

Souche	Exigence	Mise en oeuvre	Conclusion
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Identification correcte et répétable	N=10	Conforme
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	Identification correcte et répétable	N=10	Conforme
<i>Cryptococcus neoformans</i> (2226)	Identification correcte et répétable	N=10	Conforme

2.6.3 Reproductibilité ou fidélité intermédiaire :

Souche	Exigence	Mise en oeuvre	Conclusion
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Identification correcte et reproductible	N=10	Conforme
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	Identification correcte et reproductible	N=10	Conforme
<i>Cryptococcus neoformans</i> souce 2226	Identification correcte et reproductible	N=10	Conforme

2.6.4 Etude de la contamination :

L'étude de la contamination d'un puits par le puits suivant a été étudiée selon le protocole suivant : Passage d'une souche de *Candida albicans* (souche qui a en général le signal le plus fort) puis analyse de deux puits adjacents dans lesquels nous avons seulement déposé la matrice (Protocole : EBB EBB EBB sachant que E = Echantillon + matrice et B= matrice seule)

Souche	Exigence	Mise en oeuvre	Conclusion
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Absence de pic résiduel lors du dépôt de la matrice seule	N=3	Conforme

L'étude de la contamination montre l'absence de pic résiduel de protéines fongiques pour les puits ne contenant que la matrice.

Les plaques où sont déposés les isolats fongiques ne sont pas à usage unique : elles sont nettoyées par le technicien selon un protocole fourni par le laboratoire. Un contrôle de ce nettoyage est réalisé puisque chaque série, comporte un contrôle négatif.

2.6.5 Etude de la robustesse :

2.6.5.1 Etude de la performance en fonction de l'âge de la culture :

Les recommandations du fournisseur sont les suivantes :

"Une culture fraîche doit être utilisée (culture de la nuit ou dans le cas de levures à croissance lente, une culture de plusieurs jours)".

Le délai de culture étant assez imprécis nous avons étudié l'influence du délai de culture sur les résultats, nous avons utilisé pour cela des souches de 24, 48 et 72 heures [7].

Souche		Mise en oeuvre	Résultats	Conclusion
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	24 heures	N=3	2.169 ; 2.151 ; 2.138	Conforme
	48 heures	N=3	2.109 ; 2.047 ; 2.105	
	72 heures	N=3	1.984 ; 2.154 ; 2.155	
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	24 heures	N=3	1.922 ; 1.926 ; 1.979	Conforme
	48 heures	N=3	2.039 ; 1.937 ; 2.086	
	72 heures	N=3	1.956 ; 1.891 ; 1.855	
<i>Cryptococcus neoformans</i> souche 2226	24 heures	Pas de culture		Conforme
	48 heures	N=3	2.123 ; 1.892 ; 1.794	
	72 heures	N=3	1.750 ; 1.639 ; 1.900	

2.6.5.2 Comparaison des différentes techniques d'extraction :

Recommandation du fournisseur : "La méthode de préparation par extraction rapide est mise en œuvre si les résultats obtenus par dépôt direct ne donnent pas satisfaction. Il est notamment préconisé pour les levures, les filaments mycéliens faciles à prélever ou les bactéries difficiles à identifier."

Le technique d'extraction rapide consiste à additionner 1 µl d'acide formique à 70% sur le dépôt.

Souche		Mise en oeuvre	Résultats
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Pas d'extraction	N=3	2.116 ; 2.169 ; 2.158
	Extraction rapide	N=3	2.105 ; 2.128 ; 2.114
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	Pas d'extraction	N=3	1.581 ; 1.674 ; 1.749
	Extraction rapide	N=3	1.932 ; 1.932 ; 1.863
<i>Cryptococcus neoformans</i> souche 2226	Pas d'extraction	N=3	1.949 ; 1.942 ; 2.049
	Extraction	N=3	1.959 ; 2.078 ; 2.102

L'extraction rapide semble permettre une meilleure identification des isolats de *Candida parapsilosis*.

Nous avons donc pris la décision de réaliser une extraction rapide préalablement à l'identification de l'ensemble des levures.

2.6.5.3 Etude de la performance en fonction du milieu de culture :

Les recommandations du fournisseur : "Généralement, les levures sont cultivées dans des boîtes de Pétri au glucose de Sabouraud. Les meilleurs résultats sont obtenus avec cette technique de culture et des conditions identiques ont été utilisées pour la culture des échantillons pour créer les entrées de référence de la base de données. Les variations ou alternatives de milieu doivent être contrôlées et validées par le client qui en assume l'entière responsabilité".

Dans l'unité nous sommes amenés à travailler sur des levures isolées à partir de milieux de culture différents du Sabouraud classique, notamment pour les souches qui ont été isolées par l'unité de bactériologie.

Nous avons donc comparé les résultats obtenus pour les souches de CIQ isolées sur milieu de Sabouraud avec les résultats obtenus avec les souches de CIQ cultivées sur des milieux classiquement utilisés au laboratoire : Milieu COH, milieu PVX, milieu CPS, milieu de Sabouraud additionné de gentamycine, milieu érythritol, milieu chromogène CAN ID 2.

Souche		Mise en oeuvre	Résultats	Conclusion
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Sabouraud	N=3	2.153 ; 1.215 ; 2.262	Conforme
	COH	N=3	2.049 ; 2.126 ; 2.152	
	PVX	N=3	2.149 ; 2.091 ; 2.106	
	CPS	N=3	2.153 ; 2.178 ; 2.069	
	Sabouraud- Gentamycine	N=3	2.081 ; 2.048 ; 2.046	
	Erythritol	N=3	2.109 ; 2.084 ; 2.111	
	CAN ID2	N=3	2.019 ; 2.025 ; 2.099	
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	Sabouraud	N=3	1.979 ; 1.729 ; 1.950	Conforme
	COH	N=3	2.004 ; 2.063 ; 2.050	
	PVX	N=3	2.143 ; 2.080 ; 2.055	

<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	CPS	N=3	2.042 ; 1.766 ; 2.130	Conforme
	Sabouraud-gentamycine	N=3	2.059 ; 2.014 ; 1.889	
	Erythritol	N=3	2.027 ; 2.010 ; 1.993	
	CAN ID 2	N=3	2.004 ; 2.063 ; 2.050	
<i>Cryptococcus neoformans</i> souche 2226	Sabouraud	N=3	1.932 ; 1.850 ; 2.066	
	COH	N=3	1.978 ; 2.164 ; 2.045	
	PVX	N=3	1.903 ; 1.700 ; 1.765	
	CPS	N=3	1.996 ; 2.030 ; 2.074	
	Sabouraud-gentamycine	N=3	1.843 ; 1.934 ; 1.926	
	Erythritol	N=3	1.975 ; 1.821 ; 1.988	
	CAN ID2	N=3	2.050 ; 1.840 ; 2.018	

Le milieu de culture utilisé pour isoler l'échantillon fongique n'a pas d'incidence sur l'identification.

2.6.5.4 Comparaison avec les méthodes déjà utilisées au laboratoire

Actuellement au laboratoire nous identifions les levures avec les techniques suivantes :

- Milieu chromogène CAN ID2[®] (seulement utilisé pour l'identification de *Candida albicans/Candida dubliniensis*)
- Galerie d'identification ID 32 C[®]
- Bichro-Latex[®] (seulement utilisé pour l'identification des *Candida albicans/Candida dubliniensis*)

Pour valider la méthode on se fixe un taux de concordance de 95 %

Pour cette comparaison de méthode, nous avons utilisé des souches congelées regroupant les souches fournies par les organismes d'EEQ et des souches d'intérêt médical que nous avons isolées de prélèvements reçus au sein de notre laboratoire et que nous avons déjà identifiées.

Nous avons testé au total : 70 échantillons :

Souche de levure	Nombre d'échantillon	Nombre de souches concordantes	Conclusion
<i>Candida albicans</i>	N=38	N=38	Conforme
	Latex N= 17	N=17	
	API 32 C N=10	N=10	
	CAN ID 2 N=11	N=11	
<i>Candida glabrata</i>	N=7	N=7	Conforme
<i>Candida parapsilosis</i>	N=9	N=8 + 1 souche discordante	Conforme (voir commentaire ci après)
<i>Candida tropicalis</i>	N=10	N=10	Conforme
<i>Candida dubliniensis</i>	N=1	N=1	Conforme
<i>Candida utilis</i>	N=1	N=1	Conforme
<i>Candida krusei</i>	N=2	N=2	Conforme
<i>Cryptococcus néoformans</i>	N=1	N=1	Conforme
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	N=1	N=1	Conforme

Sur 70 échantillons testés, il n'y a eu qu'une seule discordance aboutissant à une concordance de 98,6%.

Nous avons observé une discordance sur un isolat de *Candida parapsilosis* qui a été identifiée par le spectromètre de masse en *Candida metapsilosis*, ce résultat était rendu par le SM avec une valeur < 1.7. Ce résultat n'aurait donc pas donné lieu à une validation par le biologiste (cf. protocole de vérification analytique) et n'aurait donc eu aucun impact clinique.

2.6.5.5 Vérification de la connexion SM/INFECTIO-MALDI :

L'utilisation d'une clé USB étant interdite sur le Spectromètre de Masse, sur une semaine, nous avons retranscrit par écrit les données obtenues directement à partir du SM et nous avons vérifié visuellement la concordance de ces données avec celles retranscrites sur le logiciel MALDI.

Conclusion : bonne retranscription des données.

2.6.5.6 Mise en place d'un protocole de vérification analytique des résultats :

Le SM propose pour chaque souche à identifier dix résultats d'identification avec chacun un score d'identification (les identifications sont classées de 1 à 10 en fonction de leur score). Selon Bruker, seuls les scores obtenus supérieurs ou égaux à 2 sont interprétables pour l'identification. Cependant, on obtient généralement des scores d'identification moins importants avec les levures qu'avec les bactéries du fait de leur paroi plus résistante. Le fabricant précise également que les scores d'identification inférieurs à 1.7 présentent un degré de confiance insuffisant pour l'identification.

Le logigramme de vérification analytique pour l'identification microbiologique fournie par le fabricant ne faisant référence qu'à la bactériologie, il nous a donc été nécessaire de réaliser notre propre logigramme de vérification analytique. Ce logigramme a été réalisé au vu des résultats de la vérification de méthode et après concertation entre les biologistes de l'unité et d'autres biologistes spécialisés en parasitologie-mycologie, notamment les membres de la Société française de Mycologie Médicale (SFMM).

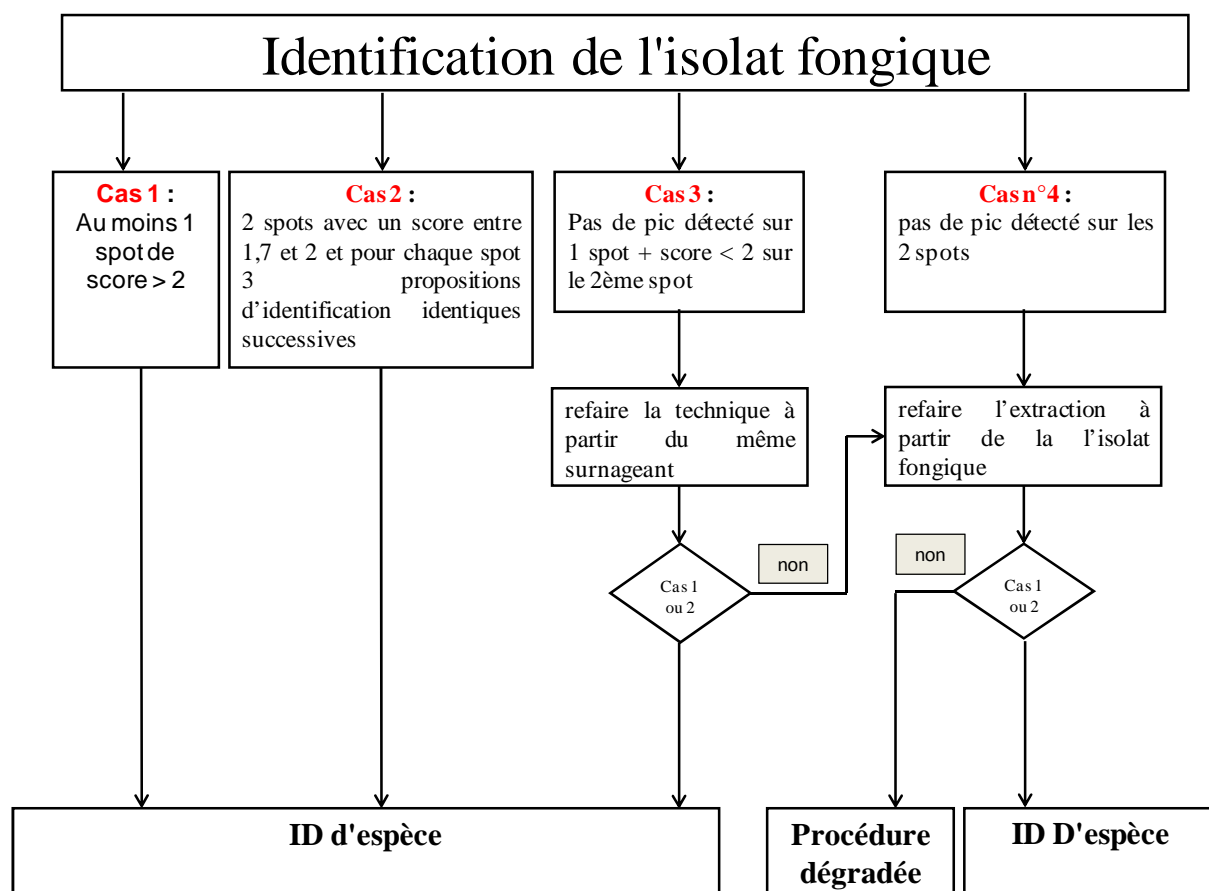


Figure 4 :Logigramme de vérification analytique de l'identification fongique par SM

3 Discussion /conclusion :

La mise en place du Spectromètre de Masse au sein de notre laboratoire et l'obligation de réaliser la vérification de méthode à été l'occasion d'entamer la mise en place de la démarche qualité au niveau du secteur de mycologie.

La vérification de méthode de l'identification fongique par SM nous a permis de vérifier que l'appareil que nous avons choisi atteignait les critères de performances souhaités par le laboratoire en ce qui concerne l'identification des levures.

Les performances du SM doivent maintenant être confirmées lors de son utilisation en "routine" et régulièrement réévaluées. Les biologistes du secteur doivent notamment suivre les enregistrements des CIQ et des EEQ et tracer les difficultés rencontrées lors de son utilisation par le biais de fiches de non conformité.

Lors de la mise en place du SM, un biologiste et un technicien référent ont été nommés. Les formations, qui leur ont été dispensées par la société Bruker leur ont permis à leur tour de donner des formations en interne. L'utilisation du SM à été intégrée à la fiche de poste du secteur de mycologie avec deux niveaux de compétence : référent et utilisateur. L'évaluation des compétences à été intégrée à la grille d'habilitation du technicien de mycologie et à celle des biologistes.

L'automate a fait l'objet d'un enregistrement dans notre logiciel de gestion des équipements "SapaNet" qui nous permettra de tracer l'ensemble des maintenances et des interventions qui auront été réalisées sur l'appareil. Les réactifs ont été intégrés au logiciel de gestion des stocks permettant de limiter les ruptures de stock, l'utilisation de réactifs périmés et, permettant de tracer les numéros de lots des réactifs .

L'évaluation du fournisseur sera effectuée idéalement à la fin de l'année afin de pouvoir être présentée au cours de la prochaine revue de direction. Nous participerons à une évaluation commune avec l'unité de bactériologie.

Suite à cette vérification de méthode, un SH FORM a été rédigé (document GEDI réf : 17048 (cf. annexe III) et il a été décidé d'utiliser le SM en pratique quotidienne en remplacement des autres techniques d'identification des levures.

Le SH FORM 44 : identification des levures ne comprend actuellement que l'identification par Spectrométrie de Masse puisqu'il a été décidé par le département de microbiologie d'arrêter l'utilisation des galeries d'identification API (arrêt de fabrication des galeries à la fin de l'année et panne de l'automate de lecture des galeries pour lequel il n'y a plus de maintenance en juillet 2015).

L'identification de *Candida albicans* par le biais d'un milieu de culture chromogène a fait l'objet d'une vérification de méthode intégrée au SH FORM 44 : ensemencement, culture et reconnaissance des colonies fongiques (document GEDI réf : 17049) car cette identification se fait par observation visuelle d'une colonie fongique (couleur bleue), après une phase d'ensemencement à partir de l'échantillon primaire. L'analyse de risque ainsi que les différents essais s'apparentaient donc plus à ceux de l'ensemencement.

Un audit interne a eu lieu dans l'unité de mycologie le 21/07/2015, le champ de l'audit était le suivant : "Recherche, identification et étude de la sensibilité de germes fongiques à partir d'échantillons urinaires" concernant l'identification par SM les auditeurs nous ont fait part de deux axes d'amélioration que nous avons clôturés (cf. annexe IV).

Notre travail s'est concentré uniquement sur l'identification des levures mais le SM peut également être utilisé pour identifier des champignons filamenteux.

Les champignons filamenteux sont plus complexes et constitués d'une paroi plus difficile à lyser nécessitant des techniques d'extraction complète [4]. De plus ils peuvent présenter des phénotypes correspondant à leurs différents stades de développement (mycélium, hyphes, basidiophores) qui influencent grandement l'allure du spectre. Un protocole d'évaluation des performances du SM pour ce type de champignon devra donc être mis en place en se référant à la procédure de gestion de la portée flexible (GEDI réf : 8157).

4 Bibliographie :

4.1 Documents associés :

- Norme NF EN ISO 15189, décembre 2012
- SH REF 02, Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 :2012, octobre 2013, COFRAC Section Santé humaine
- SH GTA 06, Guide technique d'accréditation contrôle de qualité en biologie médicale
- SH GTA 04, Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale, Avril 2011, COFRAC Section Santé humaine
- SH INF 50, Portées-types d'accréditation, juin 2011, COFRAC section Santé humaine
- SH GTA 01, Guide technique d'accréditation en biologie médicale, mai 2011, COFRAC Section Santé humaine

4.2 Bibliographie :

- 1) QUAMIC : Comité qualité de la société française de microbiologie (recommandation 2010 et 2014)
- 2) Ashutosh, P. *et al*, "MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers" J. Microbiol. Meth. 2015, 109 : 93-105.
- 3) Cahier de formation Bioforma : Les levures et levuroses 2010 page 5
- 4) REMIC : Référentiel en microbiologie médicale (5^{ème} édition 2015 : 5.1)
- 5) Alanio, A, " La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en mycologie clinique: avantage réel, recueils potentiels" . Journal des anti infectieux, 2013, 15 71-82
- 6) Notice IVD MALDI Biotyper
- 7) Lavigne, Jean-Philippe, "Place de la spectrométrie de masse en bactériologie" Annales de Biologie Clinique 2015, 73(1), 113-125

5 Annexes :

Annexe I : Tableau récapitulatif des besoins en matériels et réactifs . . 32

Annexe II : Fiche de suivi des CIQ (GEDI réf : 19323). 33

Annexe III : Extrait du SH FORM 44 (GEDI réf : 17048). 34

Annexe IV : Extrait du compte rendu d'audit interne du 21/07/2015. . . . 46

Annexe I : Tableau récapitulatif des besoins en matériels et réactifs :


Produit	Fournisseur	Référence
Matrice IVD (HCCA) (1)	Bruker	8290200
IVD Bacterial Test Standard (BTS) (1)	Bruker	8290190
Solution OS prête à l'emploi (50% acetonitrile, 47.5% d'eau, 2.5% d'eau) * (1)	Sigma	19182
Acide formique (1)	Sigma	56302
Acétonitril (pour extraction)* (1)	Sigma	14261
Acide Trifluoro acétique (TFA) * (1)	Sigma	T6508
Dispensette (0.5-5ml)	VWR	613-3343
Ethanol pur * (1)	Sigma	02860
Ethanol 70% * (1)	Sigma	02877
Eau distillée stérile	Versol	102597
Eau qualité HPLC chromasolv	Sigma	270733
Tubes Eppendorf (non colorés et sans traitement dnase, rnase free)	Eppendorf	0030120.086
Papier non pelucheux	VWR	115-2221
Gants à usage unique en nitrile non poudré		
Bain à ultrasons	VWR	142-6044
Bechers en verre	VWR	213-1125
Pipettes 0.1-2.5 µl	Eppendorf	3120000-011
TIPS 0.1-10 µl	Eppendorf	0030073363
TIPS 2-200 µl	Eppendorf	0030073428
TIPS 50-1000 µl	Eppendorf	0030073460
Microtubes à bouchon vissé	VWR	211-0121
Milieu Sabouraud glucose liquide pour culture de champignons	Becton Dickinson	221014
Portoirs à tubes Eppendorf	Eppendorf	0030123115
Agitateur à disque rotatif vitesse fixe SB2	VWR	445-2101
Support pour tubes pour l'agitateur à disque rotatif	VWR	445-2104
Vortex	VWR	444-0202

(1) produits présentant un risque lors de son utilisation pour lesquels les Fiche de Données de Sécurité sont disponible sur G: parasito sur minerve – FDS – Spectro de masse

Annexe II : Fiche de suivi des CIQ (GEDI réf : 19323) :

	Décongélation: date, visa	CAN2 : n° de lot, couleur, date, visa	Spectromètre de masse, date, visa N°de lot	Antifongogramme Date, N° de lot, visa	Visa bio, date
Candida albicans souche ATCC 90028				- Fluco : - Caspo : - Vorico : -Ampho B :	
Candida parapsilosis souche ATCC 22019				- Fluco : - Caspo : - Vorico : -Ampho B :	
Cryptococcus Néoformans souche n°2226				- Fluco : - 5FC : - Vorico -Ampho B	

Annexe III : Extrait du SH FORM 44 (GEDI réf : 17048) :

	<p>FICHE TYPE QUALITATIF Vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale</p>	<p>Référence : SH FORM 44 Indice de révision : 00 Date d'application : 15/04/11</p>
--	---	---

Note : le laboratoire se référera 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 B¹) et complètera **une fiche par examen de biologie médicale**

<p>EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE : IDENTIFICATION FONGIQUE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DE TYPE MALDI TOF Portée A <i>Unité Parasitologie-Mycoologie, Laboratoire de Microbiologie, Pôle de Biologie Clinique du CHU de Rouen</i></p>

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande :	Identification des levures
Principe de la Mesure :	Spectrométrie de masse : Comparaison d'un spectre protéique à une banque de données
Méthode de mesure :	Méthode automatisée
Marquage CE (Oui/Non)	OUI
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	Néant

MISE EN OEUVRE	
Opérateurs (Habilitation) :	Biologistes, techniciens (personnes habilitées)
Procédure de validation :	"Pôle Biologie: Procédure générale de validation des méthodes analytiques" (Réf 4544)
Procédure de gestion de la portée flexible :	"Pôle de Biologie Clinique: Procédure de gestion de la portée flexible" (Réf 8157)
Période d'évaluation :	Du 20/10/2014-31/12/2014
Date de mise en service :	01/04/2015
Autorisation par :	Pr FAVENNEC Loic

¹ 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.

MAITRISE DES RISQUES

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	Choix de la colonie ; prélèvement et dépôt de la colonie ; dépôt de la matrice	Formation et habilitation du personnel
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Néant	Néant
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Biologistes, techniciens	* Habilitation du personnel médicale (secteur mycologie) : 15347 * Habilitation des techniciens (secteur mycologie) : 17128
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :	Appareil sensible aux variations de : - température - d'empoussièrement	Contrôle métrologique de la pièce (pièce 04A 020) (Fiche GEDI n°9268)
		Contrôle de l'empoussièrement par l'entretien des locaux (fiche GEDI MO 106)
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	Liste des réactifs (Annexe 1)	"Pôle de Biologie : procédure de gestion des réactifs et consommables" (Réf 11735) Gestion des stock par sapanet
Matériau de références (témoins) :	- Souche calibrant (1) - CIQ (2) - EEQ (3)	(1)Souche de calibrant marqué CE (2)Souches ATCC 90028 ; ATCC 22019 ; Souche UKNEQAS 22026 (3) UKNEQAS (2 pvts 3 fois/an) et biologie prospective (1 pvt 4 fois/an)
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	- Spectromètre de masse MALDI TOF Bruker	Maintenance du fournisseur fiche de vie de l'appareil sur logiciel "SapaNet"
	Etuves	Relevé journalier des températures sondes +cartographie tous les 5 ans (unité de métrologie)
	Réfrigérateur/congélateur	Relevé journalier des températures par sonde + cartographie tous les 5 ans (unité de métrologie) Fiche de vie sur "SapaNet"
	Pipettes	Suivi métrologique (unité de métrologie)
	- Plaque cible	Nettoyage de la cible selon protocole du fabricant, contrôle visuel de la cible avant utilisation. Contrôle négatif sur chaque série

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
	- Logiciel INFECTIO MALDI (3)	*Connaître la liste des espèces disponibles dans la base de donnée * Mise à jour prévue par le fournisseur ; impacts des modifications des bases, évalué(s) par le fabricant

* item à renseigner si nécessaire

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 :	NA

1) répétabilité :

Elle a été déterminée par l'analyse répétée dix fois sur une même série de deux souches de candida ATCC et d'une souche de cryptocoque issue d'un EEQ . L'identification a été réalisée sur des isolats fongique de 48 heures.

Candida albicans ATCC 90028 Intra-série				
Date	Standard	Matrice	Identification	Score 1
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.109
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.105
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.047
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.037
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.040
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	1.827
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.090
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.032
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.012
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.001
Candida parapsilosis ATCC 22019 Intra-série				
Date	Standard	Matrice	Identification	Score
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.757
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.893
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.887
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.722
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.843
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.875
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.760
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	2.002
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.933
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	2.005
Cryptococcus néoformans souche UKNEQAS n°2226 intra -série				
Date	Standart	Matrice	Identification	Score
11/12/2014	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	1.794
11/12/2014	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	1.776
11/12/2014	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	1.942
11/12/2014	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	1.973
11/12/2014	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	1.892
11/12/2014	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	1.888
11/12/2014	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	1.749
11/12/2014	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	2.060
11/12/2014	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	2.123
11/12/2014	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	1.852

2) Reproductibilité :

<i>Candida albicans</i> ATCC 90028 Inter-série				
Date	Standard	Matrice	Identification	Score 1
21/11/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.019
28/11/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.126
10/12/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.151
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.105
12/12/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	1.984
16/12/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.197
31/12/2014	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.153
22/01/2015	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	1.827
27/02/2015	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.029
06/03/2015	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.133
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 Inter-série				
Date	Standard	Matrice	Identification	Score
21/11/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	2.004
28/11/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	2.060
10/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.783
11/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.796
12/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.956
16/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	2.129
18/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	
31/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.950
04/02/2015	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	2.067
06/03/2015	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	2.016
<i>Cryptococcus néoformans</i> souche UKNEQAS n2226 Inter -série				
Date	Standart	Matrice	Identification	Score
11/12/2014	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	1.942
12/12/2014	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	1.900
18/12/2014	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	1.817
19/12/2014	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	2.282
31/12/2014	208356	208796	<i>Cryptococcus néoforman</i>	1.932
16/02/2015	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	2.056
06/03/2015	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	1.738
23/03/2015	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	1.872
11/05/2015	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformand</i>	1.71

Elle a été déterminée par l'analyse répétée dix fois sur dix séries différentes de deux souches de candida ATCC et d'une souche de cryptocoque issue d'un EEQ . L'identification a été réalisée sur des isolats fongiques de 48 heures.

La répétabilité et la reproductibilité sont conforme aux exigences du laboratoire.

CONTAMINATION	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles :	OUI

Test de contamination :

Protocole : EBB EBB EBB

E = Echantillon

B = Blanc

Date	Standart	Matrice	Identification	Score
31/12/2014	208356	208796	Candida albicans	2.076
31/12/2014	208356	208796	No peak found	0
31/12/2014	208356	208796	No peak found	0
31/12/2014	208356	208796	Candida albicans	2.059
31/12/2014	208356	208796	No peak found	0
31/12/2014	208356	20879	No peak found	0
25/02/2015	208356	20879	Candida parapsilosis	2.083
25/02/2015	208356	20879	No peak found	0
25/02/2015	208356	20879	No peak found	0

Conclusion : Après passage d'une souche fongique il n'y a pas de pic résiduel sur les cibles suivantes.

COMPARAISON DE METHODES	
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :	Comparaison avec l'API 20 E, Bichro-Latex albicans, CAN ID2 (techniques antérieurement utilisées au laboratoire)
Nombre de mesures :	68
Descriptif de l'échantillon étudié :	Identification des espèces de levure les plus fréquentes en routine
Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :	Similarité d'identification sup à 95%
Résultats et interprétations des discordances :	Résultats conformes (voir protocole de validation du SM)
Conclusions et dispositions² :	Conformité

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

ID patient	Type de prélèvement	Technique d'identification	Identification	Identification SM	Score	
14061217	Abcès abdominal	API	Candida glabrata	Candida glabrata	2,184	A
14061429	Hémoculture	API	Candida parapsilosis	Candida parapsilosis	1,955	B
14070177	Hémoculture	API	Candida glabrata	Candida glabrata	2,168	A
14070362	urine	API	Candida glabrata	Candida glabrata	2,07	A
14070183	Liquide péritonéal	API	Candida tropicalis	Candida tropicalis	1,938	B
14070819	Hémoculture	API ID Genre + blastèse	Candida albicans	Candida albicans	1,989	B
14070785	Fausses membranes	API (Excellente ID)	Candida parapsilosis	candida parapsilosis	1.986	B
14070862	Hémoculture	API	Candida albicans	Candida albicans	2,07	A
14070911	Hémoculture	API	Candida glabrata	Candida glabrata	1,932	B
14070911	Hémoculture	API	Candida dubliniensis	Candida dublinensis	2,1	A
14071092	Hémoculture	API	Candida albicans	Candida albicans	2,091	A
14071041	Nécrose abdomen droit	API	Candida glabrata	Candida glabrata	2,11	A
14071041	Nécrose abdomen droit	API	Candida tropicalis	Candida tropicalis	1,807	B
14071379	Hémoculture	API	Candida parapsilosis	Candida parapsilosis	2,006	A
14080402	Catheter central	API	Candida albicans	Candida albicans	2,069	A
14080403	Catheter central	API	Candida albicans	Candida albicans	2,046	A
1408752	Hémoculture	API	Candida tropicalis	Candida tropicalis	1,851	B
14080540	Liquide péritonéal	API	Candida utilis	Candida utilis	2,146	C
14080606	Hémoculture	API	Candida albicans	Candida albicans	2,118	B
1408431	Liquide biliaire	API	Candida glabrata	Candida glabrata	2,118	A
1408543	Hémoculture	API	Candida krusei	Candida krusei	1,914	B
1408691	Liquide d'ascite	API	candida krusei	Candida krusei	1,981	B
14081144	Liquide péritonéal	API (TBID)	Candida parapsilosis	Candida métapsilosis	1,661	C
14081062	Liquide péritonéal	API	Saccharomyces cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae	1,724	B
1409317	Hémoculture	API	Candida albicans	Candida albicans	2,082	A
14101002	Hémoculture	API	Candida parapsilosis	Candida parapsilosis	1,808	B
14101124	Hémoculture	API	Candida tropicalis	Candida tropicalis	2,012	A
14101052	Hémoculture	API	Candia troicalis	Candida tropicalis	1,903	B
14101219	Hémoculture	API	Candida parapsilosis	Candida parapsilosis	1,997	B
14101320	Abcès rein	API	Candida tropicalis	Candida tropicalis	1,782	B

14101322	Catheter central	API	Candida tropicalis	Candida tropicalis	1,896	B
14101286	Liquide péritonéal	API	Candida tropicalis	Candida tropicalis	2,103	A
14110712	rectal	API	Candida glabrata	Candida glabrata	2,239	A
14111003	Aspiration bronchique	API	Candida parapsilosis	Candida parapsilosis	1,988	B
14111006	Aspiration bronchique	API	Candida parapsilosis	Candida parapsilosis	1,997	B
14111189	Catheter central	API	Candida tropicalis	Candida tropicalis	1,877	B
14111298	Catheter jugulaire	API	Candida albicans	Candida albicans	2,089	A
14111267	Liquide drain biliaire	API	Candida albicans	Candida albicans	2,091	A
14110975	Liquide péritonéal	API	Candida tropicalis	Candida tropicalis	1,94	B
CA 90028	Souche ATCC	API	Candida albicans	Candida albicans	2.007	A
CP 22019	Souche ATCC	API	Candida parapsilosis	Candida parapsilosis	2.017	A
UK CN2226	Souche EEQ	API	Cryptococcus neoformans	Cryptococcus neoformans	2.060	A
14090308	catheter fémoral	Latex	Candida albicans	Candida albicans	2,146	B
14061042	Fausses membranes	Latex	Candida albicans	Candida albicans	2,122	A
14101021	urine	Latex	Candida albicans	Candida albicans	2,058	A
14101019	Liquide gastrique	Latex	Candida albicans	Candida albicans	1,939	B
14101020	PBDP	Latex	Candida albicans	Candida albicans	2,123	A
14101523	urine	Latex	Candida albicans	Candida albicans	2,146	A
14111010	urine	Latex	Candida albicans	Candida albicans	2,153	A
14101164	urine	Latex	Candida albicans	Candida albicans	1,824	B
14101242	brosse	Latex	Candida albicans	Candida albicans	2,023	A
14101378	urine	Latex	Candida albicans	Candida albicans	2,016	A
14101383	urine	Latex	Candida albicans	Candida albicans	1,974	A
14101515	urine	Latex	Candida albicans	Candida albicans	2,095	A
14101516	Abcès CIP	Latex	Candida albicans	Candida albicans	2,119	A
14101517	Aspiration bronchique	Latex	Candida albicans	Candida albicans	2,091	A
14101520	urine	Latex	Candida albicans	Candida albicans	2,163	A
14101523	urine	Latex	Candida albicans	Candida albicans	2,122	A
14101376	Liquide amniotique	Latex	Candida albicans	Candida albicans	2,007	A
14061312	Liquide péritonéal	CAN2	Candida albicans	Candida albicans	2,006	B
14070856	Liquide péritonéal	CAN2	Candida albicans	Candida albicans	1,995	B
14080095	Liquide pleural	CAN2	Candida albicans	Candida albicans	2,042	A

14080462	Abcès abdominal	CAN2	Candida albicans	Candida albicans	2,043	A
14081159	Liquide péritonéal	CAN2	Candida albicans	Candida albicans	2,173	B
14090048	Liquide péritonéal	CAN2	Candida albicans	Candida albicans	2,16	A
14090293	Liquide péritonéal	CAN2	Candida albicans	Candida albicans	2,106	A
14080751	Liquide péritonéal	CAN2	Candia albicans	Candida albicans	2,136	B
14100794	Aspiration bronchique	CAN2	Candida albicans	Candida albicans	2,123	A
14100905	Flore fécale	CAN 2	Candida albicans	Candida albicans	2,152	A
14101414	Liquide gastrique	CAN 2	Candida albicans	Candida albicans	2,116	A

Comparaison avec le BICHRO-LATEX FUMOUE milieu chromogène :

Nombre d'échantillon = 17

Concordance 17/17

14 identifications ont un score > 2 ; 3 identifications ont un score compris entre 1.7 et 2

13 identifications ont une note de A ; 3 identifications ont un score de B

Conclusion : 100% de concordance : Conforme

Comparaison avec le milieu chromogène:

Nombre d'échantillon = 11

Concordance 11/11

10 identifications ont un score > 2 ; 1 identification a un score compris entre 1.7 et 2

7 identifications ont un score de A ; 3 identifications ont un score de B

Conclusion : concordance 100% : Conforme

Comparaison avec les galerie API 32C :

Nombre d'échantillon : 42

Concordance 41/42

22 identifications ont un score >2 ; 19 identifications ont un score entre 1.7 et 2 et 1 identification a un score < 1.7

20 identifications ont un score de A ; 20 identifications ont un score de B ; 2 identifications ont un score de C

Conclusion concordance : 97.6 % taux d'identification potentiellement rendu discordante : 97.62

Résultat conforme

Etude des discordances :

La souche discordance était identifiée par le SM avec un indice à 1.7 et avec une note de C, elle n'aurait donc pas donné lieu à un résultat (Cf protocole de validation en annexe 2).

ROBUSTESSE (indispensable en portée B)	
Données bibliographiques :	Notice fournisseur
Résultats :	- Pas d'impact de la durée d'incubation (24, 48 ou 72 heures) - Pas d'impact lié au milieu de culture utilisé - Pas d'impact de la technique d'extraction
Conclusions et dispositions² :	Conformité des pratique du laboratoire

Etude de l'impact sur l'identification de l'utilisation de colonies fongiques âgées de 48 et 72 heures :

Candida albicans ATCC 90028								
Date	Standard	Matrice	Ident.1	Score 1	Ident.2	Score 2	Ident. 3	Score 3
10/12/14 (24 heures)	208356	208796	Candida albicans	2.169	Candida albicans	2.151	Candida albicans	2.138
11/12/14 (48 heures)	208356	208796	Candida albicans	2.109	Candida albicans	2.105	Candida albicans	2.047
12/12/14 (72 heures)	208356	208796	Candida albicans	1.984	Candida albicans	2.134	Candida albicans	2.135
Candida parapsilosis ATCC 22019								
Date	Standard	Matrice	Ident.1	Score 1	Ident.2	Score 2	Ident.3	Score 3
10/12/14 (24 heures)	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.922	<i>Candida parapsilosis</i>	1.926	<i>Candida parapsilosis</i>	1.979
11/12/14 (48 heures)	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	2.039	<i>Candida parapsilosis</i>	1.937	<i>Candida parapsilosis</i>	2.086
12/12/14 (72 heures)	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.956	<i>Candida parapsilosis</i>	1.891	<i>Candida parapsilosis</i>	1.855
Cryptococcus néoformans souche UKNEQAS n°2226								
Date	Standard	Matrice	Ident.1	Score 1	Ident.2	Score 2	Ident.3	Score 3
PAS DE CULTURE								
11/12/14 (48 heures)	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformans</i>	2.123	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.892	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.794
12/12/14 (72 heures)	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.750	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.639	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.900

Conclusion : pas d'impact

Etude de l'impact sur l'identification de l'utilisation d'autres milieux de culture que le milieu recommandé par le fabricant:

Candida albicans ATCC 90028									
	Date	Standart	Matrice	Ident 1	Score 1	Ident 2	Score 2	Ident 3	Score 3
COH	28/11/14	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.049	<i>Candida albicans</i>	2.126	<i>Candida albicans</i>	2.152
PVX	28/11/14	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.149	<i>Candida albicans</i>	2.091	<i>Candida albicans</i>	2.106
CPS	28/11/14	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.153	<i>Candida albicans</i>	2.178	<i>Candida albicans</i>	2.069
Sabouraud	31/12/14	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.153	<i>Candida albicans</i>	2.215	<i>Candida albicans</i>	2.262
Sabouraud G	31/12/14	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.081	<i>Candida albicans</i>	2.048	<i>Candida albicans</i>	2.046
CAN ID 2	21/11/14	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.019	<i>Candida albicans</i>	2.025	<i>Candida albicans</i>	2.099
Erythritol	31/12/14	208356	208796	<i>Candida albicans</i>	2.109	<i>Candida albicans</i>	2.084	<i>Candida albicans</i>	2.111
Candida parapsilosis ATCC 22019									
	Date	Standard	Matrice	Ident.1	Score 1	Ident.2	Score 2	Ident.3	Score 3
COH	28/11/14	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	2.004	<i>Candida parapsilosis</i>	2.063	<i>Candida parapsilosis</i>	2.050
PVX	28/11/14	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	2.143	<i>Candida parapsilosis</i>	2.080	<i>Candida parapsilosis</i>	2.055
CPS	28/11/14	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	2.042	<i>Candida parapsilosis</i>	1.766	<i>Candida parapsilosis</i>	2.130
Sabouraud	31/12/14	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.979	<i>Candida parapsilosis</i>	1.729	<i>Candida parapsilosis</i>	1.950
Sabouraud G	31/12/14	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	2.059	<i>Candida parapsilosis</i>	2.014	<i>Candida parapsilosis</i>	1.889
CAN ID 2	28/11/14	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	2.004	<i>Candida parapsilosis</i>	2.063	<i>Candida parapsilosis</i>	2.050
Erythritol	31/12/14	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	2.027	<i>Candida parapsilosis</i>	2.010	<i>Candida parapsilosis</i>	1.993
Cryptococcus néoformans souche UKNEQAS n°2226									
	Date	Standard	Matrice	Ident.1	Score 1	Ident.2	Score 2	Ident.3	Score 3
COH	11/12/14	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.978	<i>Cryptococcus néoformans</i>	2.164	<i>Cryptococcus néoformans</i>	2.045
PVX	11/12/14	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.903	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.700	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.765
CPS	11/12/14	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.996	<i>Cryptococcus néoformans</i>	2.030	<i>Cryptococcus néoformans</i>	2.074
Sabouraud	31/12/14	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.932	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.850	<i>Cryptococcus néoformans</i>	2.066
Sabouraud G	31/12/14	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.843	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.934	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.926
CAN ID 2	31/12/14	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformans</i>	2.050	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.840	<i>Cryptococcus néoformans</i>	2.018
Erythritol	31/12/14	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.975	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.821	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.988

Conclusion : Pas d'influence des différents milieux de culture utilisés sur l'identification fongique.

Etude de l'impact sur l'identification de l'utilisation ou non d'une technique d'extraction :

Candida albicans ATCC 90028 colonies de 48 heures sur COH									
	Date	Standard	Matrice	Ident.1	Score 1	Ident.2	Score 2	Ident. 3	Score 3
Dépôt direct	05/12/2014	208356	208796	Candida albicans	2.116	Candida albicans	2.169	Candida albicans	2.158
Extraction rapide MALDI BIOTYPER	05/12/2014	208356	208796	Candida albicans	2.105	Candida albicans	2.128	Candida albicans	2.114
Candida parapsilosis ATCC 22019 Colonies de 48 heures sur COH									
	Date	Standard	Matrice	Ident.1	Score 1	Ident.2	Score 2	Ident.3	Score 3
Dépôt direct	16/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.581	<i>Candida parapsilosis</i>	1.674	<i>Candida parapsilosis</i>	1.749
Extraction rapide MALDI BIOTYPER	16/12/2014	208356	208796	<i>Candida parapsilosis</i>	1.932	<i>Candida parapsilosis</i>	1.932	<i>Candida parapsilosis</i>	1.863
Cryptococcus néoformans souche UKNEQAS n°2226 Colonies de 48 heures sur COH									
Dépôt direct	Date	Standard	Matrice	Ident.1	Score 1	Ident.2	Score 2	Ident.3	Score 3
Dépôt direct	19/12/14	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.949	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.942	<i>Cryptococcus néoformans</i>	2.049
Extraction rapide MALDI BIOTYPER	19/12/14	208356	208796	<i>Cryptococcus néoformans</i>	1.959	<i>Cryptococcus néoformans</i>	2.078	<i>Cryptococcus néoformans</i>	2.102

Conclusion : pas d'impact

STABILITE (indispensable en portée B)	
Données bibliographiques :	Donnée fournisseur

Conclusion :
La technique d'identification par spectrométrie de masse est conforme aux exigences du laboratoire

Annexe IV : Extrait du compte rendu d'audit interne du 21/07/2015 :

Audit interne n° 10/2015 Date de l'audit interne : 21/07/2015
Auditeurs : Responsable d'audit (RA) : Elodie Alessandri-Gradt Deuxième auditeur (A) : Magali Demeules
Service audité : Département de microbiologie, service de Parasitologie/Mycologie
Personnes rencontrées : Loïc Favennec (biologiste Chef de service), Hélène Girot (biologiste, RAQ), Annick Lainé (Cadre de santé), Yolène Lessieu (Technicienne), Dominique Folliot (Aide technique)
Champ de l'audit : Audit analytique portant sur la famille PARASITO-MYCOLOGIE : recherche, identification et étude de la sensibilité de germes fongiques à partir d'échantillons urinaires
Référentiel(s): Norme ISO 15189 v2012, SH REF02, SH REF08
Elément(s) audité(s): Procédures, modes opératoires, fiches de poste, fiches de fonction, enregistrements, et autres éléments relatifs à la traçabilité d'un dossier de patient tiré au sort.
Suivi de l'audit précédent ayant porté sur le même champ : Audit n° XX/20XX <i>En cas d'écarts non résolus, les reporter sur ce rapport.</i>

Points forts

N°fiche d'audit : 1

- Engagement de l'ensemble des personnels dans la démarche qualité
- Transparence sur les informations fournies lors de l'audit
- Exhaustivité et pertinence des références (notamment bibliographiques) fournies dans les dossiers de validation de méthode
- Remise en question des pratiques par l'équipe encadrante dans un souci d'amélioration continue

Axes d'améliorations :

N° fiche audit	Critère (exigence, référentiel)	Observation faite	Risque	Actions préventives	Responsabilités	Délais	Etat
6	NF ISO 15189 § 5.5.1 Sélection, vérification et validation des procédures analytiques § 5.6 Garantie de qualité des résultats	La phase de dépôt sur la plaque du spectromètre n'est pas tracée. Absence de double vérification de la série à réaliser au moment du dépôt pour la plaque du spectro	Traçabilité non maîtrisée : impact sur le rendu du résultat	Modification du mode opératoire du SM (17585) incluant l'utilisation d'une scanette au moment du dépôt.	H. GIROT	1 mois	Clôturé
8	NF ISO 15189 § 4.3 Maitrise des documents	Mettre à jour les fiches de données de sécurité (absence des FDS du spectro)	Perte de maîtrise de la gestion documentaire	Mise à jour des fiches de données sécurités	H. GIROT	1 jour	Clôturé

Résumé :

Depuis l'ordonnance du 13 juillet 2010, les laboratoires de biologie médicale ont l'obligation de s'accréditer selon la norme NF EN ISO 15189. Cette norme précise que les procédures d'examens validés doivent faire l'objet d'une vérification indépendante par le laboratoire avant d'être utilisées régulièrement.

Ce mémoire présente la méthodologie et la vérification de méthode de l'identification des levures par Spectrométrie de masse faisant suite à l'acquisition de cet automate par le département de microbiologie du CHU de Rouen.

Suite à l'installation du SM il a fallu rapidement former le personnel à cette nouvelle technologie, évaluer les besoins en réactifs pour commencer les essais, réaliser une analyse de risque pour prévenir la survenue d'erreurs, rédiger un mode opératoire, mettre en place des CIQ et réaliser des essais pour vérifier que cet appareil est conforme aux exigences du laboratoire. La vérification de méthode suit une portée A qualitative nous avons donc réalisé des essais de fidélité, de justesse, de contamination, d'impact de facteurs de variabilité. Nous avons également comparé cette technique aux techniques d'identification déjà utilisées au laboratoire et les résultats de cette comparaison nous ont permis la réalisation d'un logigramme de vérification analytique . Un SH FORM 44 à été rédigé et envoyé au COFRAC au vue d'une accréditation en 2016.