

Université Pierre et Marie Curie - Sorbonne Universités

MEMOIRE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE

« ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE

DE BIOLOGIE MÉDICALE»

Validation de Méthode :

Examen Direct en Mycologie

Mlle SOURON Isabelle

Année 2015-2016

Note aux lecteurs

« 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 les 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

Mlle SOURON Isabelle

Interne en 6^{ème} semestre

DES de Biologie Médicale

CHU Charles Nicolle de Rouen

1, rue de Germont.76000 Rouen

Remerciements

J'adresse mes remerciements au Dr Hélène Girot qui m'a guidée dans la rédaction de ce mémoire, ainsi qu'aux intervenants de ce DU qui nous ont apporté un regard extérieur sur la qualité en Biologie médicale.

SOMMAIRE

Glossaire	p.1
Introduction	p.2
1 Présentation de la structure	
1.1 Le CHU de Rouen et son Pôle de Biologie Clinique	p.3
1.2 L'Unité de Parasitologie-Mycologie	p.4
2 Présentation du projet	
2.1 Intérêts et objectifs	p.5
2.2 Calendrier du projet	p.5
3 Matériels et méthode	
3.1 Détermination de la portée d'accréditation	p.6
3.2 Etat des lieux	p.6
3.3 Analyse de risques	p.7
3.4 Rédaction du mode opératoire	p.14
3.5 Création d'un CIQ	p.14
4 Validation technique	
4.1 Répétabilité	p.15
4.2 Reproductibilité intra- laboratoire ou Fidélité intermédiaire ..	p.16
4.3 Contamination inter-échantillons	p.17
4.4 Stabilité des réactifs	p.17
4.5 Limite de détection	p.17
4.6 Intervalle de référence (valeurs usuelles)	p.17
4.7 Sensibilité / Spécificité analytiques	p.17
4.8 Robustesse	p.18
4.9 Comparaison de méthodes	p.19
5 Discussion et Conclusion	p.20
Bibliographie	p.22
Liste des Annexes	p.23

GLOSSAIRE

ATCC : American Type Culture Collection

CAN2 : Gélose ChromID™ Candida. Milieu chromogène pour l'isolement sélectif des levures et l'identification directe de Candida albicans

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

COFIL : Comité de Pilotage

CV : Coefficient de Variation

DU: Diplôme Universitaire

ED : Examen Direct

GBEA : Guide de Bonne Exécution des Analyses de Biologie Médicale

GEDI : Système de Gestion Documentaire du Laboratoire

HAS : Haute Autorité de Santé

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

MO : Mode Opérateur

PDCA : Plan, Do, Check, Act

QUAMIC : Comité Qualité de la Société Française de Microbiologie

REMIC : Référentiel en Microbiologie Médicale

SIL : Système d'Information du Laboratoire

SAPANET : Logiciel de gestion des stocks et des commandes, et des non-conformités

SMQ : Système de Management de la Qualité

Introduction

L'exercice de la biologie médicale a été profondément bouleversé par l'importance croissante accordée à la qualité, dont le but est d'assurer la fiabilité des résultats des examens de biologie médicale en vue d'une prise en charge efficiente du patient.

Les prémices de la qualité se situent dans les années 1970 avec la création en 1975 des contrôles nationaux de qualité. Le Guide de Bonne Exécution des Analyses de Biologie Médicale GBEA paru en 1994 puis la norme ISO 15189 en 2003 viennent préciser les exigences de qualité et de compétences applicables aux laboratoires de biologie médicale. En 2010, la publication de l'ordonnance du 15 janvier au journal officiel reformera définitivement la biologie médicale française, rendant la démarche d'accréditation obligatoire. Le COFRAC (ou comité français d'accréditation) est chargé, à travers l'accréditation, de gagner la reconnaissance au niveau international des compétences des laboratoires de biologie médicale installés sur le territoire français. Il s'appuie sur les normes NF EN ISO 15189, NF EN ISO 22870 dédiée aux examens de biologie délocalisée et enfin sur la norme NF EN ISO 17025 consacrée à la recherche de légionelles environnementales, pour mener à bien sa mission.

La conjoncture actuelle de la biologie médicale française résulte de la loi 2013-442 du 30 mai 2013 : les LBM doivent désormais être accrédités sur 50% des examens au 1^{er} novembre 2016, 70% au 1^{er} novembre 2018 et enfin sur la totalité des examens au 1^{er} novembre 2020.

Le mémoire traitera de la validation de méthode de l'examen direct en mycologie au sein du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU Charles Nicolle de Rouen. Les différentes étapes de cette validation en portée B seront tour à tour détaillées, depuis l'état des lieux jusqu'au recueil et à l'interprétation des résultats. La rédaction du SH FORM 43 viendra finaliser le projet.

1. Présentation de la structure

1.1 Le CHU de Rouen et son Pôle de Biologie Clinique

Le CHU-Hôpitaux de Rouen est un établissement public de santé regroupant 5 établissements de soins et d'hébergement, 2 établissements industriels ainsi que 11 écoles d'envergure régionale. Il assure l'accès aux soins aux habitants de Haute-Normandie et réalise des missions d'enseignement universitaire et de recherche médicale, en convention avec la faculté de médecine et de pharmacie de Rouen. Il compte au total onze pôles cliniques et médico-techniques, parmi lesquels figure le pôle de Biologie Clinique.

Le pôle de Biologie Clinique concentre les laboratoires de biologie médicale, d'anatomie et de cytologie pathologiques et d'explorations fonctionnelles, soient onze laboratoires répartis sur 5 sites géographiques (Institut de Biologie Clinique, Pavillon Derocque, Pavillon Jacques Delarue, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rouen et Hôpital Saint Julien. Cf. organigramme du pôle de Biologie Annexe 1). Selon la revue de direction du 29 mars 2016, l'activité du pôle s'élève à 6 733 161 actes en 2015, ce qui représente 167 279 280 B/P/K/Z totaux. En termes de qualité, l'ensemble du Pôle s'est engagé en accord avec la direction générale du CHU à définir et à respecter une Politique qualité. L'organisation de la qualité dans le pôle suit un mode pyramidal (figure 1 ci-dessous).

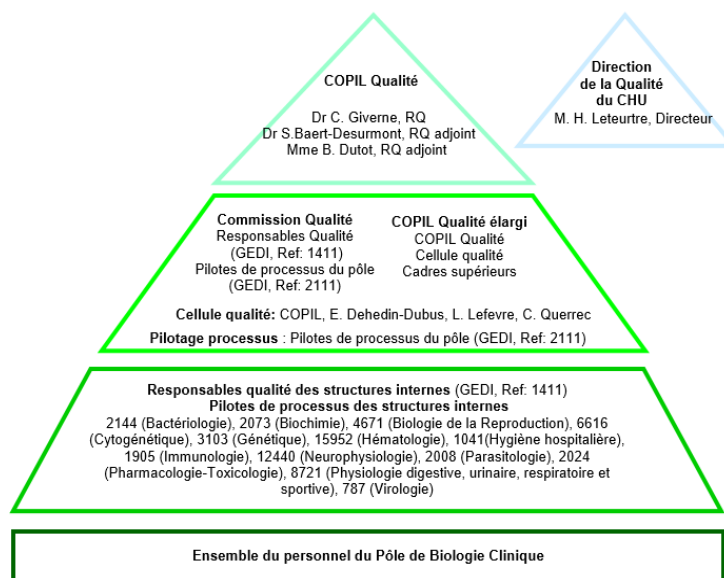


Figure 1 : Organigramme Qualité du Pôle de Biologie Clinique du CHU-Hôpitaux de Rouen

Un système de management de la qualité (SMQ) a été instauré et s'applique à l'ensemble des activités du Pôle, à l'exception de la Pharmacovigilance. Ce SMQ se conforme aux

normes et référentiels suivants : NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 22870 pour les activités d'analyses de biologie médicale ; la norme NF EN ISO/CEI 17025 pour la recherche et le dénombrement des légionelles ainsi que le dosage des endotoxines ; la norme NF EN ISO 9001 pour les activités relevant de la physiologie digestive, urinaire, respiratoire et sportive ; et enfin le manuel de certification HAS applicable à l'ensemble du CHU-hôpitaux de Rouen. Le SMQ suit une approche par processus et s'appuie sur une logique d'amélioration continue reposant sur le principe du PDCA (Plan, Do, Check, Act). Une Revue de Direction est organisée annuellement: les indicateurs qualité y sont analysés et de nouveaux axes d'amélioration définis.

L'accréditation a été obtenue à hauteur de 50% des examens de biologie médicale, sur les trois familles :

-Famille « Biochimie-Génétique » : sous-familles Biochimie générale et spécialisée et Pharmacologie-Toxicologie ;

-Famille « Hématologie-Immunologie-Biologie de la Reproduction » : sous-familles Hématocytologie et Hémostase ;

-Famille « Microbiologie » : sous-famille sérologie infectieuse.

Un dossier de demande d'extension a été déposé en avril 2016 et une visite par les évaluateurs COFRAC est prévue début octobre 2016.

Les analyses accréditées et les extensions demandées sont répertoriées en annexe 2.

1.2 L'Unité de Parasitologie-Mycologie

Au sein de l'Institut de Biologie Clinique, le service de Microbiologie est divisé en quatre unités : bactériologie, virologie, parasitologie-mycologie et hygiène hospitalière.

Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU Charles Nicolle de Rouen assure les analyses de parasitologie et de mycologie médicales, sous la responsabilité du Pr Loïc Favennec. Son équipe est constituée de 4 biologistes, 5 techniciens, 2 à 3 internes ainsi qu'un externe de pharmacie (cf. annexe 3 : Organigramme de l'Unité de Parasitologie).Ce laboratoire est subdivisé en trois sous-unités :

-le secteur de mycologie médicale, chargé de détecter les champignons dans les prélèvements biologiques (examen direct microscopique, culture, identification fongique et antifongogramme si nécessaire ; biologie moléculaire)

-le secteur de parasitologie, chargé de la recherche microscopique de parasites

-le secteur d'immunologie, qui recherche des marqueurs immunologiques parasitaires et fongiques (recherche d'antigènes et sérologies).

2 Présentation du projet

2.1 Intérêts et objectifs

Le mémoire traite de la validation de méthode de l'examen direct en mycologie. Au CHU Charles Nicolle, l'examen direct mycologique est réalisé selon une technique particulière utilisant une solution d'Uvibio diluée au 1/100^{ème}. Les objectifs de ce travail sont de deux ordres :

-Analytique : la validation technique démontrera les performances de l'Uvibio dilué au 1/100^{ème} pour la réalisation de l'examen direct mycologique. Cette utilisation de l'Uvibio ne figure pas parmi les indications du fournisseur. Cette validation technique permettra d'assurer la fiabilité des résultats rendus aux cliniciens.

-« Qualité » : l'objectif final est de constituer un dossier de validation de méthode « SH FORM 43 » qui pourra être soumis au COFRAC dans la démarche d'accréditation de 2018.

2.2 Calendrier du projet

La méthodologie adoptée pour ce projet s'appuie sur le principe du PDCA (Plan, Do, Check, Act) ou roue de Deming représentée ci-dessous.

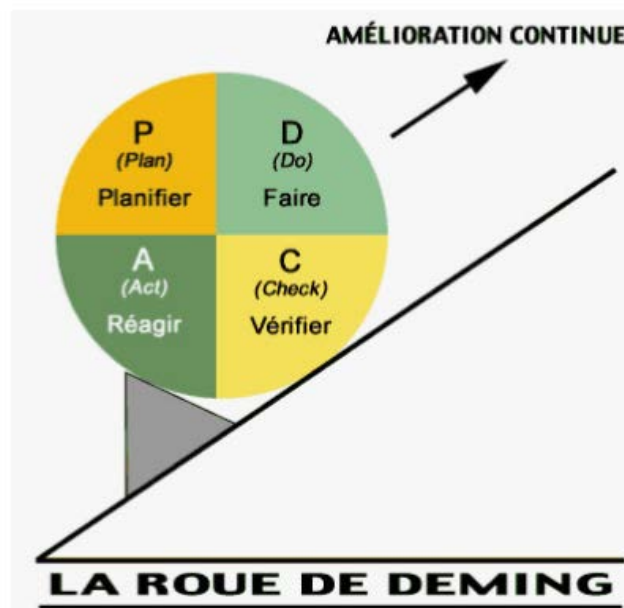


Figure 2 : Roue de Deming ou principe du PDCA (Plan, Do, Check, Act)

La réalisation du projet s'est faite en plusieurs étapes, selon le calendrier suivant :

Etape 1	Etat des lieux	Plan
Etape 2	Analyse de risques	
Etape 3	Rédaction du MO et mise en place de CIQ	Do
Etape 4	Validation technique	
Etape 5	Recueil des résultats	Check
Etape 6	Interprétation et rédaction du dossier de validation de méthode	Act

3 Matériels et méthode

3.1 Détermination de la portée d'accréditation

L'examen direct en mycologie est réalisé selon une technique développée au CHU Charles Nicolle, qui utilise une solution d'Uvibio diluée au 1/100^{ème}. Cette utilisation de l'Uvibio ne fait pas partie des indications du fournisseur, qui préconise son usage pour la recherche des microsporidies dans les selles. Selon le SH-GTA-04, « les laboratoires peuvent employer des méthodes adaptées ou développées en interne (portée flexible étendue B). » Le modèle choisi est donc celui d'une validation de méthode qualitative en portée B.

3.2 Etat des lieux

Les besoins en matériel et réactifs ont été évalués lors de l'état des lieux. Une check-list a été établie et figure dans le tableau ci-dessous. La fiche de vie du microscope à fluorescence est disponible sur le logiciel SAPANET, qui sert également de logiciel de gestion de stocks et de commandes.

Produit	Fournisseur	Référence
Uvibio	LDBIO Diagnostics	REF B 200
PBS	Biomérieux	REF 75511
Lames à bords rodés	Thermo Scientific	LR90D
Lamelles	Thermo Scientific	LC02020
Sterile Pasteur Pipettes	OXOID	137138
Microscope à fluorescence	LEITZ Laborlux	S

Figure 3 : Check-list des besoins en matériel et réactifs

Les moyens « humains » ont également été évalués lors de l'état des lieux. La fiabilité du résultat d'un examen direct en mycologie tient à la compétence des opérateurs. L'habilitation des techniciens au poste de mycologie passe par la lecture de 200 lames sous le contrôle d'un tuteur. Quatre techniciens sont habilités à rendre les examens directs en mycologie ; un cinquième a dernièrement été habilité selon les mêmes critères.

3.3 Analyse de risques

Une analyse de risques a été effectuée selon la méthode des 5M (Matière, Matériel, Main d'œuvre, Milieu et Méthode) en amont de la validation technique. Elle permet d'identifier l'ensemble des risques à maîtriser pour répondre aux exigences du COFRAC. Une approche par sous-processus a été choisie : des critères communs à l'ensemble des sous-processus sont définis, auxquels viennent s'ajouter des critères spécifiques à chaque sous-processus. Les facteurs susceptibles d'influencer le résultat ont été répertoriés dans les tableaux ci-dessous :

Echelle de cotation de la maîtrise des risques		
Evaluation de la fréquence : Survenue des événements indésirables (NC) pour chaque point critique identifié		
F1	1/2 fois par an	1
F2	1 fois par trimestre	2
F3	1/2 fois par mois	3
F4	1-3 fois par semaine	4
F5	1/x fois par jour	5
Evaluation de la gravité : Impact sur la prise en charge du patient, sur le diagnostic ou le traitement médical		
G1	Sans conséquence visible	1
G2	Conséquence visible mais faible	2
G3	Conséquence grave mais réversible	3
G4	Conséquence grave et irréversible	4
G5	Conséquence extrêmement grave	5
Evaluation de la détectabilité : Possibilité d'éviter un risque ou d'en diminuer les effets		
D1	Détectable automatiquement	1
D2	Facilement détectable	2
D3	Détection non spontanée	3
D4	Difficilement détectable	4
D5	Indétectable	5
Efficacité des actions de maîtrise mises en œuvre par le laboratoire		
M1	Actions de maîtrise efficaces et utilisées par tous	0,5
M2	Actions de maîtrise efficaces et utilisées par une ou plusieurs personnes	0,7
M3	Actions de maîtrise partiellement efficaces et utilisées par tous	0,8
M4	Actions de maîtrise partiellement efficaces et utilisées par une ou plusieurs personnes	0,9
M5	Absence d'actions de maîtrise ou actions inefficaces	1
Criticité calculée : FXGDXM		
C1	Non Critique	[1;24]
C2	Criticité avec un impact faible sur la prise en charge du patient	[25;49]
C3	Criticité avec un impact modéré sur la prise en charge du patient	[50;74]
C4	Criticité un avec impact important sur la prise en charge du patient	[75;99]
C5	Criticité avec impact vitale sur la prise en charge du patient	[100;125]
Priorisation des délais de mise en œuvre du plan d'action		
P5	Ne demande pas d'action corrective dans l'immédiat mais peut faire l'objet d'actions préventive	[1;24]
P4	Ne demande pas d'action corrective dans l'immédiat mais peut faire l'objet d'actions corrective	[25;49]
P3	Plan d'action à établir et à engager dans les 12 mois	[50;74]
P2	Plan d'action à établir et à engager dans les 6 mois	[75;99]
P1	Plan d'action à établir et à engager dans les 3 mois	[100;125]

Maîtrise de risques pré-analytique

Maîtrise des risques pré-analytiques										
SM	Points critiques	Risques	Fréquence	Gravité	Déteçabilité	score	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise	Maîtrise du risque	Criticité
Maîtrise	Identité	Erreur de patient lors du prélèvement des échantillons/Absence de vérification de l'identité du patient avant le prélèvement des échantillons	2	5	5	50	Formation et information des préleveurs/Habilitation des préleveurs	Procédure institutionnelle "Identification administrative du patient" Gedi 7644 / "Utilisation du bracelet d'identification" Gedi 8635 / Différents protocoles de prélèvements institutionnels : Gedi 1161, Gedi 10205, Gedi 11369, Gedi 15584, Gedi 6868, Gedi 1372 / Contrat de collaboration Pôle de Biologie/Direction des soins Gedi 7397 / Fiche de formation habilitation aux prélèvements Gedi 12881	0,7	35
		Absence de vérification de l'identité du patient au moment de l'enregistrement de la demande d'examen	3	5	3	45	Formation et information de l'ensemble des personnels susceptibles d'enregistrer les demandes d'examen	Procédure d'utilisation du SIL DuLab Gedi 1104 / Procédure d'enregistrement des demandes d'examen spécifiques à chaque secteur le cas échéant	0,7	31,5
		Absence d'identité sur la fiche de prescription et/ou sur les échantillons	5	5	1	25	Formation et information des préleveurs/ Suivi des non conformités	Procédure institutionnelle "Identification administrative du patient" Gedi 7644 / "Utilisation du bracelet d'identification" Gedi 8635 / Différents protocoles de prélèvements institutionnels : Gedi 1161, Gedi 10205, Gedi 11369, Gedi 15584, Gedi 6868, Gedi 1372 / Critères d'acceptabilité des échantillons biologiques (fiche d'analyse et aide au prélèvement)/Grille d'habilitation des techniciens de mycologie Gedi 17128/Microbiologie : habilitation du pré-analytique Gedi 12185	0,5	12,5
		Discordance d'identité entre fiche de prescription et échantillons	4	3	2	24			0,7	16,8
		Erreur de sélection de patient dans la base de donnée Cpage	2	3	5	30	Formation et information de l'ensemble du personnel susceptible d'enregistrer les demandes d'examen	Procédure d'utilisation du SIL DuLab Gedi 1104 / Grille d'habilitation des techniciens de mycologie Gedi 17128/Microbiologie : habilitation du pré-analytique Gedi 12185	0,7	21
		Erreur de saisie de l'identité du patient à la création du dossier (saisie manuelle)	2	2	3	12			0,7	8,4
	Préparation du Patient	Préconisations prélèvements non respectées (Patient à jeun, ordre des tubes de prélèvement, utilisation intempesive du garrot, moment ou horaire du prélèvement, conditions de recueil)	5	5	3	75	Information des patients / Formation et information des préleveurs	Différents protocoles de prélèvements institutionnels : Gedi 1161, Gedi 10205, Gedi 11369, Gedi 15584, Gedi 6868, Gedi 1372 / Critères d'acceptabilité des échantillons biologiques (fiche d'analyse et aide au prélèvement)	0,7	52,5
		Hygiène non respectée (Asepsie site de prélèvement)	5	3	5	75			Catalogue des examens de biologie médicale du CHU de Rouen Gedi 11172 / Fiche d'Analyse et d'Aide au Prélèvement spécifique en fonction de la nature de l'échantillon/ Différents protocoles de prélèvements institutionnels : Gedi 1161, Gedi 10205, Gedi 11369, Gedi 15584, Gedi 6868, Gedi 1372	0,7
	Type de contenants	Contenant de mauvaise qualité	1	3	5	15	Achats	Choix des récipients primaires : Marquage CE/étanchéité	0,8	12
		Contenant inadapté	4	3	1	12	Formation des préleveurs/Suivi des non conformités	Catalogue des examens de biologie médicale du CHU de Rouen Gedi 11172 / Fiche d'Analyse et d'Aide au Prélèvement spécifique en fonction de la nature de l'échantillon / Différents protocoles de prélèvements institutionnels : Gedi 1161, Gedi 10205, Gedi 11369, Gedi 15584, Gedi 6868, Gedi 1372 / Fiche(s) de prescription/ Bibliographie pour les tubes borates utilisés pour les urines	0,8	9,6
		Contenant détérioré	3	2	1	6			0,8	4,8
		Contenant périmé	2	1	3	6	Formation et information des préleveurs	Contrôles ponctuels sur tubes (urines) reçus au laboratoire	0,7	4,2
		Non respect des conditions de conservation des contenants	2	1	5	10			Mise à disposition des documents fournisseurs dans les unités de soins et de prélèvements	0,7
	Nature et volume de l'échantillon	Nature échantillon non déterminée	4	3	2	24	Formation et information des préleveurs / Contrôle à réception / Suivi des non conformités	Catalogue des examens de biologie médicale du CHU de Rouen Gedi 11172 / Fiche d'Analyse et d'Aide au Prélèvement spécifique en fonction de la nature de l'échantillon / Différents protocoles de prélèvements institutionnels : Gedi 1161, Gedi 10205, Gedi 11369, Gedi 15584, Gedi 6868, Gedi 1372 / non conforme en cas de quantité insuffisante ou de nature de prélèvement non déterminée	0,7	16,8
		Volume échantillon insuffisant	5	3	2	30			0,7	21
		Qualité de l'échantillon : contamination lors du prélèvement	2	4	3	24	Formation et information des préleveurs	Différents protocoles de prélèvements institutionnels : Gedi 1161, Gedi 10205, Gedi 11369, Gedi 15584, Gedi 6868, Gedi 1372 / Contrat de collaboration Pôle de Biologie / Fiche de formation habilitation aux prélèvements Gedi 12881/Commentaire biologique sur le résultat cas de contamination avérée après interprétation de la culture.	0,7	16,8

Délai et température avant traitement analytique	Acheminement hors délai des échantillons au laboratoire	5	3	3	45	Gestion logistique des collectes et/ou dépôt des échantillons / Formation et information des préleveurs/Habilitation des préleveurs	CRE Pôle de Biologie : Modalités de fonctionnement Gedi 3704 / Catalogue des examens de biologie médicale du CHU de Rouen Gedi 11172 / Fiche d'Analyse et d'Aide au Prélèvement spécifique en fonction de la nature de l'échantillon (critères d'acceptabilité)/Grille d'habilitation des techniciens de mycologie Gedi 17126/Microbiologie : habilitation du pré-analytique Gedi 12185 non conforme en cas de délai dépassé/Accueil pré-analytique : circuit des demandes d'exams urgents Gedi 11832.	0,7	31,5
	Délai de prise en charge de l'échantillon trop long sur la phase pré-analytique	2	3	3	18	Gestion des flux	Circuit des demandes d'exams urgents Gedi 11832	0,7	12,6
	Température d'acheminement de l'échantillon au laboratoire: non conforme	2	3	1	6	Formation et information des préleveurs/Habilitation des préleveurs / Gestion des températures d'acheminement / Suivi des non conformités	Catalogue des examens de biologie médicale du CHU de Rouen Gedi 11172 / Fiche d'Analyse et d'Aide au Prélèvement spécifique de l'analyse / Fiches) de prescription / Modalités pour la transmission des prescriptions d'exams biologiques ... Gedi 4065 / Qualification des enceintes de transport du CRE / Suivi des températures / Mise à disposition dans les services de soins de pochettes de transport isothermes réfrigérantes / Critères d'acceptabilité des échantillons biologiques (fiche d'analyse et aide aux prélèvements)	0,5	3
Prétraitement: centrifugation ...	Spécimens non conformes pour la réalisation des examens	2	3	3	18	Conditions de centrifugation : vitesse, température et temps	Vérification métrologique / Respect des consignes (fournisseurs, sociétés savantes, procédures analytiques)/Formation et habilitation des techniciens et assistants techniques de laboratoire / Pôle de biologie : procédure de caractérisation métrologique des centrifugeuses Gedi 16741/ Pôle de biologie : mode opératoire de caractérisation métrologique des centrifugeuses Gedi 16742	0,7	12,6
						Homogénéisation et aliquotage de l'échantillon	Formation - habilitation des techniciens en mycologie Gedi 17128		
						Congélation/Décongélation des aliquotes	Formation - habilitation des techniciens en mycologie Gedi 17128 / Respect des consignes (fournisseurs, sociétés savantes, procédures analytiques)		
						Prétraitement chimique ou physique spécifique à l'examen	Formation - habilitation des techniciens en mycologie Gedi 17128		
Interférences	Résultats incohérents en lien avec l'échantillon (hémolyse, lactescence, viscosité)	4	3	2	24	Formation et information des préleveurs / Contrôle à réception de l'aspect du sérum	NA	0,5	12
Milieu	Conditions de conservation des échantillons (T°...)	2	2	1	4	Formation et information des préleveurs/Habilitation des préleveurs / Gestion des températures d'acheminement / Suivi des non conformités/	Catalogue des examens de biologie médicale du CHU de Rouen Gedi 11172 / Fiche d'Analyse et d'Aide au Prélèvement spécifique de chaque nature d'échantillon (critères d'acceptabilité) des échantillons/ Modalités pour la transmission des prescriptions d'exams biologiques ... Gedi 4065 / Qualification des enceintes de transport du CRE / Suivi des températures	0,5	2
						Gestion de la température ambiante / Gestion des températures de conservation / Maintien de l'intégrité des échantillons avant analyse	Formation des techniciens de laboratoire et des aides techniques de laboratoire / Qualification des enceintes climatiques/Suivi des températures des enceintes de stockage des échantillons / Suivi de la température et des conditions ambiantes / Procédure Entretien des matériels et équipements Gedi 1107 / Respect des consignes (fournisseurs, sociétés savantes, procédures ou modes opératoires (pre) analytiques)	0,7	8,4
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	Conditions ambiantes susceptibles d'influer sur la qualité des résultats	2	3	2	12	Conditions environnementales (statiques et/ou dynamiques dans le temps)	Formation et habilitation du personnel de laboratoire / Procédure Entretien des matériels et équipements GEDI 1107/ Suivi des températures	0,7

Matériel	Informatique	Utilisation d'un logiciel (SIL) non maîtrisé	2	3	3	18	Paramétrage, connexions, archivage des données...	Vérification initiale et après modifications paramétrage Gedi 16641 et 10489 / Suivi bon fonctionnement par réalisation drossiers tests / Sauvegarde des données / Maintenance / Fiche de vie du logiciel (SAPANET) / Procédure de vérification du fonctionnement d'un logiciel Gedi 16546 / Contrat DIR Gedi 8464	0,9	16,2
	Chambre froide	Mauvaise conservation des échantillons (absence de culture ou prolifération de contaminants)	1	5	2	10	Métrologie des enceintes (cartographie et suivi des températures)	Marquage CE (Suivi (cartographie)des enceintes	0,5	5
	Refrigerateurs									
Matériel (réactifs)	conservation	Non respect des instructions du fabricant lors du stockage des réactifs	1	2	4	8	Métrologie des enceintes (cartographie et suivi des températures) (chambre froide ; réfrigérateur ; congélateur)	Suivi (cartographie)des enceintes / Suivi de la température et des conditions ambiantes	0,5	4
	Gestion des stocks	Réception de réactifs et de consommables endommagés	1	2	2	4	Contrôles à réception / Respect des conditions de stockage définies par le fabricant	Procédure de gestion des réactifs et consommables Gedi 11735	0,5	2
		Rupture de stock	1	2	2	4	Gestion des stocks	Utilisation d'un logiciel de gestion des stock SAPANET permettant un déstockage en temps réel	0,7	2,8
	Reactifs "maison"	lot de fabrication défectueux	1	5	2	10	Contrôle de Contamination/ performance/ conservation	Mode opératoire de l'utilisation et de la fabrication des milieux de culture en mycologie médicale Gedi 16526 /Tests de pousse et tests de stérilité/ Évaluation de la durée de conservation/ Etiquetage avec n° de lot et date de péremption/ Enregistrement via le logiciel sapanet/ Fiche d'habilitation des externes dans le secteur de parasitologie-mycologie Gedi 16594	0,7	7
Main d'œuvre	Compétence du préleveur	Prélèvement par du personnel non qualifié /Prélèvement non contributif	2	5	2	20	Formation et information de l'ensemble des préleveurs	Procédure institutionnelle "Identification administrative du patient" Gedi 7644 / "Utilisation du bracelet d'identification" Gedi 8635 / Différents protocoles de prélèvements institutionnels : Gedi 1161, Gedi 10205, Gedi 11369, Gedi 15584, Gedi 6888, Gedi 1372 / Contrat de collaboration Pôle de Biologie/Direction des soins Gedi 7397 / Fiche de formation et d'habilitation aux prélèvements Gedi 12881	0,5	10
	Compétence lors de la réception et de l'enregistrement de la demande	Erreur de saisie des analyses à l'enregistrement/ mauvaise conservation des prélèvements / Caractère d'urgence non détecté	2	5	2	20	Formation et information de l'ensemble des personnels susceptibles d'enregistrer les demandes d'examen	Procédure d'utilisation du SIL DiLab Gedi 1104 /Grille d'habilitation des techniciens de mycologie Gedi 17128/Microbiologie : habilitation du pré-analytique Gedi 12185	0,5	10
Milieux	Condition de stockage des récipients	Détérioration de la qualité des récipients	1	1	3	3	Stockage dans les conditions préconisées par le fabricant	Documents fournisseurs	0,5	1,5
Methodes	Prélèvement/Enregistrement	Prélèvement effectué par du personnel non qualifié, Réception enregistrement et pré-traitement des demandes d'examen par du personnel non qualifié pour les tâches effectuées	1	4	3	12	Formation et évaluation des compétences du personnel, plan de formation Disponibilité du personnel pour assurer le respect de la procédure.	Contrat de collaboration Pôle de Biologie/Direction des soins Gedi 7397 / Fiche de formation habilitation aux prélèvements Gedi 12881/Procédure de recrutement Gedi 7602 /Dossier du personnel/ Livret d'accueil des nouveaux arrivants / Procédures poitaines formation, évaluation, habilitation PIM gedi 10120 et PM Gedi 12665 / Grille d'habilitation des techniciens de mycologie Gedi 17128/Microbiologie : habilitation du pré-analytique Gedi 12185/Procédures / Fiches de maintien de l'habilitation à un poste de travail / Planning de formation / Plan de formation / Contrat DRH Gedi 8308	0,5	6

Maîtrise de risques analytiques

Maîtrise des risques analytiques										
SM	Points critiques	Risques	Fréquence	Gravité	Défectabilité	Score	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise	Maîtrise du risque	Criticité
			1	4	1				4	
Commun à l'ensemble des sous processus										
Matière	CIQ	Mauvaise évaluation des performances analytiques	1	4	1	4	Habilitation et formation du personnel/Matériaux de référence	Fiche d'habilitation des techniciens au poste de mycologie Gedi 17128 /Fiche d'habilitation des internes dans le service de parasitologie-mycologie Gedi15203/Fiche d'habilitation des biologistes Gedi 15347/Procédure de gestion des CIQ et des EEQ en mycologie Gedi 16854/Suivi des CIQ en mycologie Gedi 19323/2 Souche ATCC + 1 souche provenant d'un organisme d'EEQ (UKNEQAS).	0,5	2
	EEQ		2	4	1	8	Habilitation et formation du personnel Choix de l'organisme d'EEQ	Fiche d'habilitation des techniciens au poste de mycologie Gedi 17128 /Fiche d'habilitation des internes dans le service de parasitologie-mycologie Gedi15203/Fiche d'habilitation des biologistes Gedi 15347/Procédure de gestion des CIQ et des EEQ en mycologie Gedi 16854/Suivi des EEQ en mycologie Gedi 19322/choix des organismes d'EEQ : SH NF 19/ 2 organismes d'EEQ : UKNEQAS (X échantillons/an); Biologie prospective (X échantillons/an)	0,5	4
Sous-processus 2 : examen direct										
Milieu	Identité	Discordance d'identité : échantillon primaire/numéro de lame	1	4	3	12	Formation et information du personnel/Mode opératoire	Fiche de poste : technicien en mycologie Gedi 17051/Fiche de poste des internes dans le service de parasitologie-mycologie Gedi 15203/ Fiche d'habilitation des techniciens au poste de mycologie Gedi 17128 /Fiche d'habilitation des internes dans le service de parasitologie-mycologie Gedi15203/Fiche d'habilitation des biologistes Gedi 15347/vérification de la concordance du résultat de l'examen direct avec la culture/Mode opératoire de l'examen direct en mycologie médicale	0,5	6
	Qualité de l'échantillon primaire	Résultat erroné si altération de l'échantillon primaire	2	2	1	4	Formation et information du personnel	Fiche de poste : technicien en mycologie Gedi 17051/Fiche de poste des internes dans le service de parasitologie-mycologie Gedi 15203/ Fiche d'habilitation des techniciens au poste de mycologie Gedi 17128 /Fiche d'habilitation des internes dans le service de parasitologie-mycologie Gedi15203/ Mode opératoire de l'examen direct en mycologie Gedi	0,5	2
commun à l'ensemble des sous-processus										
Matériel	Conditions de conservation des échantillons (T°, ...)	Non respect des conditions de conservation des échantillons primaires et secondaires pendant l'analyse (température, abri de la lumière, hygiène et sécurité, ...)	1	3	2	6	Gestion de la température ambiante / Gestion de la température des enceintes thermostatées / Maintien de l'intégrité de l'échantillon pendant l'analyse	Formation des techniciens de laboratoire / Habilitation des techniciens de laboratoire / Suivi des températures des enceintes thermostatées / Suivi de la température et des conditions ambiantes / fiches d'aide aux prélèvements pour chaque échantillon biologique	0,7	4,2
	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (T°, ...)	Non respect des instructions du fabricant lors de l'acheminement des réactifs et/ou de leur stockage	1	4	2	8	Gestion de la température pendant le transport / Gestion de la température de stockage/ Maintien de l'intégrité des réactifs	Contrat DSEL Gedi 8305 / Tests réalisés par les fabricants (fiches de stress) / Suivi de la température pendant le transport/ Suivi des enceintes (cartographie) / Suivi de la température et des conditions ambiantes / Essais à réception (certificats des fournisseurs) / Passage des CIQ (Procédure de Gestion des CIQ et EEQ en mycologie Gedi 16854)	0,5	4
		Non respect des conditions d'utilisation des réactifs	1	4	2	8	Gestion de la température ambiante / Maîtrise des zones techniques	Suivi de la température et des conditions ambiantes / Notices fournisseurs (veille) / Modes opératoires analytiques / Passage des CIQ (Procédure de Gestion des CIQ et EEQ en mycologie Gedi 16854)	0,5	4
	Sécurité biologique et maîtrise de la contamination des prélèvements précieux	Contamination d'un prélèvement précieux / contamination à partir d'un prélèvement	1	4	3	12	Hygiène	Procédure générale d'hygiène et sécurité au laboratoire Gedi 14281/PSM / Entretien des locaux	0,7	8,4
Panne électrique	Impossibilité de travailler / Panne des instruments	1	5	1	5	Coupe électrique	contrat DTST	0,5	2,5	
commun à l'ensemble des sous-processus										
Matériel	Petit matériel : anses, pipettes...	contamination	1	5	3	15	Choix du matériel/Suivi des recommandations du fabricant/ Formation du personnel	Marquage CE/Matériel à usage unique	0,5	7,5
		rupture de stock	1	3	3	9	réapprovisionnement	Gestion des stocks / Possibilité de dépannage par le service de bactériologie	0,5	4,5
	PSM	Contamination du personnel et du prélèvement	1	3	3	9	maintenance/entretien des PSM	Gestion des PSM / Contrat de maintenance avec les fournisseurs	0,7	6,3
Sous-processus 2 : examen direct										
Lames/huile à immersion	Résultat erroné / contamination	1	3	1	3	Choix du matériel/Formation du personnel	Marquage CE	0,5	1,5	
UV/BIO	Résultat erroné / contamination	1	3	3	9	Formation et information du personnel	Marquage CE	0,5	4,50	
Microscope à fluorescence	Défaillance du microscope / Résultat erroné ou différé	1	5	1	5	Entretien/Panne/ Formation et information du personnel	Procédure technique de maintenance du microscope à fluorescence leitz labortlux Gedi 14571/Biomedical/fiche de vie sur le logiciel Sapanet	0,5	2,5	

commun à l'ensemble des sous-processus										
Méthode	Surveillance des dérives	Utilisation d'un équipement critique non conforme	2	2	2	8	Périodicité des maintenances Maîtrise des équipements (suivi métrologique, raccordement...)	Respect du programme de surveillance programmée (SAPANET) défini selon les recommandations du fournisseur/ Réalisation et enregistrement des maintenances quotidiennes / Suivi des CIQ et EEQ +/- long terme / Raccordement métrologique des équipements critiques et traçabilité (SAPANET) / Procédure générale de métrologie Gedi 1642 / Procédures dégradées	0,5	4
	Contamination	Production d'un résultat erroné	1	4	2	8	Respect des conditions opératoires du fournisseur	Respect du programme de surveillance programmée (SAPANET) défini selon les recommandations du fournisseur/ Réalisation et enregistrement des maintenances quotidiennes / Suivi des CIQ / Maintenance spécifique et ponctuelle en cas de contamination massive ou connue / Contrôles microbiologiques des surfaces et/ou de l'air / Procédures d'entretien des locaux Gedi 1106 et d'entretien du matériel et des équipements Gedi 1107	0,5	4
	Informatique	Utilisation d'un logiciel (SIL, Middleware, logiciel embarqué) non maîtrisé	1	3	3	9	Paramétrage, étalonnage, connexions, archivage des données,...	Vérification initiale et après modifications paramétrage Gedi 16641 et 10489 / Suivi bon fonctionnement par réalisation dossiers tests / Sauvegarde des données / Maintenance / Fiche de vie du logiciel (SAPANET) / Procédure de vérification du fonctionnement d'un logiciel Gedi 16546 / Contrat DIR Gedi 8464 / Certificat de non régression	0,5	4,5
	Conservation et conditions d'utilisation	Non respect des instructions du fabricant lors du stockage des réactifs	1	2	2	4	Gestion de la température de stockage / Maintien de l'intégrité des réactifs	Suivi (cartographie) des enceintes / Suivi de la température et des conditions ambiantes / Essais à réception (certificats des fournisseurs) / Passage des CIQ / Notices fournisseurs (veille)	0,5	2
		Non respect des conditions d'utilisation des réactifs	1	3	2	6	Gestion de la température ambiante / Maîtrise des zones techniques	Suivi de la température et des conditions ambiantes / Notices fournisseurs (veille) / Modes opératoires analytiques / Passage des CIQ	0,5	3
	Gestion des stocks	Utilisation de réactifs et consommables endommagés	1	3	2	6	Conditions de stockage et d'utilisation des réactifs et consommables	Cartographie des enceintes de stockage / Suivi de la température et des conditions ambiantes / Notices fournisseurs (veille) / Modes opératoires analytiques / Passage des CIQ	0,5	3
		Réactifs périmés	1	3	2	6	Suivi des dates de péremption	Logiciel de gestion des stocks SAPANET	0,7	4,2
		Absence de réactif car oublié de commande	1	3	1	3	Gestion des stocks	Formation du personnel/ logiciel de gestion des stocks et des commandes SAPANET	0,7	2,1
	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles	Non justesse du volume de reconstitution des réactifs, calibrants, contrôles de qualité	2	3	2	12	Métrologie des pipettes Respect du mode opératoire de reconstitution	Vérification des pipettes à fréquence définie (1 an pour les pipettes critiques) Gedi 15723 / Passage des CIQ (Procédure de Gestion des CIQ)	0,5	6
	Sous-processus 2 : examen direct									
Utilisation du microscope à fluorescence	Détérioration du microscope	1	3	1	3	Nettoyage / changement d'ampoules / métrologie / Formation du personnel	Suivi métrologique / maintenance préventive (fiche GEDI14571)/ Formation et habilitation des techniciens de laboratoire et aides techniques de laboratoire	0,5	1,5	
commun à l'ensemble des sous-processus										
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	Réalisation des examens par du personnel non qualifié pour les tâches effectuées	1	5	1	5	Formation et évaluation des compétences du personnel / Plan de formation Disponibilité du personnel pour assurer le respect de la procédure	Procédure de recrutement Gedi 7602 / Dossier du personnel / Livret d'accueil des nouveaux arrivants Gedi 19325 / Procédures polaires formation, évaluation, habilitation PNM Gedi 10120 et PM Gedi 12665 / Gestion des plannings et des affectations / Fiche de poste : technicien en mycologie Gedi 17051/Fiche de poste des internes dans le service de parasitologie-mycologie Gedi 15203/ Fiche d'habilitation des techniciens au poste de mycologie Gedi 17128 / Fiche d'habilitation des internes dans le service de parasitologie-mycologie Gedi 15203/ Fiche d'habilitation des biologistes Gedi 15347/ Planning de formation / Plan de formation / Contrat DRH Gedi 8308	0,5	2,5
	Traçabilité	Pas d'identification des différents opérateurs	2	2	1	4	Identification de l'opérateur	Formation et information du personnel / Mise à disposition de profils personnels sur chaque logiciel	0,7	2,8
	Sous-processus 2 : examen direct									
Connaissance du mode opératoire	Technique réalisée de manière non conforme	1	5	1	5	Disponibilité du mode opératoire	Mode opératoire de l'examen direct en mycologie (GEDI)	0,7	3,5	

Maîtrise de risques post-analytique

Maîtrise des risques post-analytique										
5M	Points critiques	Risques	Fréquence	Gravité	Déteçtabilité	Score	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise	Maîtrise du risque	Criticité
Matiere	Identité	Identité erronée	3	4	3	36	Formation et information du personnel	Pôle de biologie clinique : validation et diffusion des résultats d'exams Gedi 10687 / Signalement d'EIAS	0,7	25,2
	Conservation des Tubes	Impossibilité de réaliser une vérification post analytique du tube de prélèvement (identité,nature/type)	1	2	2	4	Connaissance des conditions de conservation des tubes	Procédure technique spécifique de chaque échantillon précisant la durée de conservation des récipient primaires	0,5	2
	Conservation des souches après analyse	Perte de souches pour exploitation ultérieure/ impossibilité de vérification lors de la validation biologique	1	5	1	5	Délai et mode de conservation des souches fongiques	Mode opératoire de congélation des champignons Gedi 16007/ Modalités de conservation des milieux de cultures après analyse décrits dans la procédure opératoire spécifique de chaque échantillon (fiches Gedi)	0,7	3,5
Milieux	Conditions de conservation des milieux de culture positifs après analyse	Non respect des conditions de conservation	2	4	1	8	Gestion de la température ambiante	Suivi de la température dans la pièce 03 A010 (sonde d'ambiance)	0,5	4
Materiel (équipements)	Réfrigérateurs	Mauvaise conservation post-analytique des échantillons	2	2	1	4	Gestion de la température	Formation des techniciens de laboratoire et des aides techniques de laboratoire / cartographie des réfrigérateurs /Suivi des températures des réfrigérateurs /Fiche de vie sur le logiciel Sapanet / Procédure Entretien des matériels et équipements Gedi 1107/marque CE	0,5	2
	SIL	Panneutilisation d'un équipement non conforme : Biocare	1	4	3	12	Paramétrage, connexions, archivage des données,...	Vérification initiale et après modifications paramétrage Gedi 16641 et 10489 / Suivi du bon fonctionnement par réalisation de dossiers tests / Réunion GTPI (Groupe Technique Paramétrage Informatique) /Sauvegarde des données / Maintenance / Fiche de vie du logiciel (SAPANET) / Procédure de vérification du fonctionnement d'un logiciel Gedi XXXXXXXXXXXX/ Contrat DIR Gedi 8464 /Mode dégradé sans SIL et sans Middleware automate connectés MPL Gedi 13569 /SAV Médasy	0,8	9,6
	CDP2	Panneutilisation d'un équipement non conforme : CDP2	1	4	3	12	Paramétrage, connexions, archivage des données	Contrat DIR Gedi 8464	0,8	9,6
	Congélateur	Conservation des souches congelées	2	4	1	8	Température	Formation des techniciens de laboratoire et des aides techniques de laboratoire / cartographie des réfrigérateurs /Suivi des températures des réfrigérateurs /Fiche de vie sur le logiciel Sapanet / Procédure Entretien des matériels et équipements Gedi 1107/marque CE	0,5	4
Methode	Interprétation des résultats	Cohérence des résultats avec l'ensemble du dossier biologique	2	5	5	50	Validation biologique	Fiche d'habilitation des biologistes (secteur mycologie) Gedi 15347/ Fiche d'habilitation des internes dans le secteur de parasitologie-mycologie Gedi 15203/ Maintien de l'habilitation du personnel médical en parasitologie-mycologie Gedi 18990/Plan de formation / Habilitations des biologistes/ Bibliographie	0,7	35
	Transmission des résultats	Absence de transmission des résultats	2	5	5	50	Mode de diffusion des résultats	Pôle de biologie clinique : validation et diffusion des résultats d'examen Gedi 10687/ Laboratoire de parasitologie-mycologie : procédure générale de diffusion et validation des résultats Gedi 19247	0,5	25
Main d'oeuvre (Personnel)	Validation biologique : compétence et maintien de compétence du personnel	Validation des résultats des examens de biologie par du personnel médical non qualifié pour les tâches effectuées	1	5	1	5	Formation et évaluation des compétences du personnel/ Plan de formation	Livret d'accueil des nouveaux arrivants / Procédures polaires formation, évaluation, habilitation PM Gedi 12665 /Fiche d'habilitation des biologistes (secteur mycologie) Gedi 15347/ Fiche d'habilitation des internes dans le secteur de parasitologie-mycologie Gedi 15203/ Maintien de l'habilitation du personnel médical en parasitologie-mycologie Gedi 18990/Plan de formation / Procédure de validation biologique et de diffusion des examens Gedi 10687/ liste des examens et valeurs critiques à téléphoner Gedi	0,5	2,5
	Conservation/archivage : compétence et maintien de compétence du personnel	Mauvaise conservation et/ou mauvais archivage	1	1	2	2	Formation du personnel	Grille d'habilitation du technicien de mycologie Gedi 17128/ Maintien de l'habilitation en mycologie Gedi 17129	0,5	1
	Diffusion des résultats	Résultats mal diffusés	1	1	1	1	Destination des copies rendus papier/CDP2	Procédure de validation et diffusion des résultats d'examen Gedi 10687/ tests CDP2	0,5	0,5
	Archivage des prescriptions	Gestion de conservation des prescriptions	3	2	5	30	Sauvegarde et lisibilité des données	Procédure d'archivage : procédure de gestion des documents et de l'information Gedi 6875 /Contrat DSI/ Conservation des feuilles de demande pendant un an	0,7	21
	Archivage des résultats	Gestion de conservation des résultats	1	5	3	15	Sauvegarde et lisibilité des données	Procédure d'archivage : procédure de gestion des documents et de l'information Gedi 6875 /Contrat DSI/ Conservation des données SIL : MOLIS/Conservation des feuilles de travail pendant 18 mois	0,5	7,5

3.4 Rédaction du mode opératoire

Le mode opératoire de l'examen direct en mycologie (cf. Annexe 4) a été rédigé en collaboration avec la technicienne référente de mycologie puis approuvé par le responsable du service. Il a été inclus dans le système de gestion documentaire du laboratoire GEDI de manière à être accessible à l'ensemble du personnel du laboratoire. Ce document sera révisé dans un délai maximum de 2 ans.

3.5 Création d'un CIQ

Un CIQ ou contrôle interne de qualité a été mis en place à partir de la souche ATCC 90028 *Candida albicans*.

- Intérêt du CIQ

Le CIQ a été mis en place dans 2 buts :

- analytique : la lecture d'un examen direct mycologique peut être entravée par des aléas techniques difficilement détectables (lampe du microscope à fluorescence défectueuse, ...). Le passage d'un CIQ en début de série permet de contrôler les conditions opératoires et de valider techniquement la lecture de la série de lames. Au cours de la validation de méthode, une opératrice a été confrontée à une diminution de l'intensité de fluorescence imputable à un défaut de la lampe ; en l'absence de CIQ, tous les examens directs de la série auraient été rendus négatifs, retardant la prise en charge du patient dans le cas de « faux négatifs » ;
- qualité : l'instauration d'un CIQ permet de garantir la fiabilité des résultats rendus et participe au maintien des compétences.

- Modalités techniques

Le passage du CIQ a été défini selon les modalités suivantes :

- Fabrication du CIQ : le CIQ sera fabriqué à partir du repiquage sur gélose Can2 de la souche ATCC 90028 *Candida albicans*. La validation technique démontrant la stabilité des réactifs sur 1 mois, les aliquotes seront fabriqués par série de 30 puis congelés. Le CIQ sera fabriqué en préparant une suspension à 0.5 MacFarland aliquotée et congelée. A chaque série, la suspension sera décongelée puis diluée au 1/10^{ème} (100 µL de suspension dans 900 µL de NaCl 0.9%) ; la suspension diluée sera ensuite mise en contact volume à volume avec l'Uvibio puis 1 µL de cette suspension sera déposée dans une cellule de Kova. Ces étapes sont répertoriées dans le mode opératoire en accès libre à tous les opérateurs dans le système documentaire.

- Fréquence du CIQ et validation: le CIQ sera passé quotidiennement, à chaque série de lecture d'examens directs, et sera lu en premier. Le CIQ sera validé si l'opérateur dénombre

10 levures au minimum sur la cellule de Kova. En cas de CIQ invalide, un autre CIQ sera déposé avant de débiter la lecture. Si le CIQ est invalide 2x de suite, il faudra rechercher la cause de l'invalidité (erreur de fabrication du CIQ, mauvaise conservation des aliquotes, lampe du microscope à fluorescence défectueuse, ...).

4 Validation technique

La validation technique a été réalisée avec la souche ATCC 90028 *Candida albicans*.

Comme le préconise le SH GTA 04 pour une portée B, l'ensemble des critères de qualité susceptibles de démontrer la maîtrise de la méthode ont été étudiés, à savoir : la répétabilité, la reproductibilité intra-laboratoire ou fidélité intermédiaire, la stabilité des réactifs, la limite de détection, la sensibilité et la spécificité analytiques, la robustesse et la comparaison de méthodes (cf. Annexe 5 : Tableau résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative).

4.1 Répétabilité

La répétabilité a été testée en comptant 30 fois le nombre de levures présentes dans des puits de cellule de Kova. Dans chaque puits, 1 µL d'une suspension de la souche ATCC 90028 *Candida albicans* (suspension à 0.5 McFarland diluée au 1/10^{ème} mise en présence volume à volume d'une solution d'Uvibio diluée au 1/100^{ème}) a été déposé : l'opérateur a alors compté le nombre de levures présentes sur 10 champs. L'opération a été répétée 30 fois.

Figure 4 : Tests de Répétabilité

N=1	N=2	N=3	N=4	N=5	N=6	N=7	N=8	N=9	N=10	N=11	N=12	N=13	N=14	N=15
57	58	59	51	54	54	59	60	55	57	58	56	52	53	56
N=16	N=17	N=18	N=19	N=20	N=21	N=22	N=23	N=24	N=25	N=26	N=27	N=28	N=29	N=30
51	60	55	58	57	57	52	55	56	54	61	56	58	60	57

Paramètres	Moyenne	Ecart-type	Variance	CV (%)
Résultats statistiques	56,2	2,73420227	7,47586207	4,8651286

Le CV obtenu montre la faible dispersion des valeurs ; aucun CV seuil n'a été défini par le fournisseur ou les sociétés savantes. Cependant, le résultat est uniquement qualitatif et se

résume à être positif ou négatif. L'examen direct a été retrouvé positif dans 100% des cas. La méthode est donc répétable.

4.2 Reproductibilité

La reproductibilité intra-laboratoire ou fidélité intermédiaire a été évaluée par 2 opérateurs sur 30 jours.

La suspension de levures est identique à celle testée lors de la répétabilité. Elle a été aliquotée et congelée pour la reproductibilité.

Figure 5 : Tests de Reproductibilité intra-laboratoire ou Fidélité intermédiaire

Jours	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15
Opérateur 1	57	58	59	56	60	56	57	52	63	54	52	58	57	56	59
Opérateur 2	54	57	60	53	58	55	51	57	59	56	59	59	61	60	60
	J16	J17	J18	J19	J20	J21	J22	J23	J24	J25	J26	J27	J28	J29	J30
Opérateur 1	60	57	56	60	59	60	62	64	56	55	59	60	54	57	59
Opérateur 2	57	61	58	56	55	58	58	57	55	57	55	57	66	58	60

Paramètres	Moyenne	Ecart-type	Variance	CV (%)
Résultats statistiques	57,65	1,97462349	3,89913793	3,42519253

Le raisonnement est le même que pour la répétabilité. Le CV montre la faible dispersion des valeurs ; aucun CV seuil n'a été défini par le fournisseur ou les sociétés savantes. Cependant, le résultat est uniquement qualitatif et se résume à être positif ou négatif. L'examen direct a été retrouvé positif dans 100% des cas. La méthode est donc reproductible.

Le CIQ mis en place correspond à la suspension testée lors des tests de reproductibilité et sera conservé sous la forme d'aliquotes 30 jours au congélateur.

4.3 Contamination inter-échantillons

L'évaluation de la contamination inter-échantillons en méthode manuelle est non applicable car chaque échantillon est lu individuellement. Le matériel utilisé étant stérile et à usage unique, le risque de contaminations inter-échantillons est nul.

4.4 Stabilité des réactifs

La stabilité de l'Uvibio dilué au 1/100^{ème} a été testée sur 1 mois à partir d'aliquotes congelés.

-Réactif primaire : le réactif primaire a été utilisé selon les recommandations du fournisseur, en se référant à la date de péremption.

-Réactif secondaire : la stabilité de l'Uvibio dilué au 1/100^{ème} a été testée sur 1 mois à partir d'aliquotes congelés à -80°C. L'évaluation de la stabilité de l'Uvibio dilué au 1/100^{ème} a été réalisée simultanément au test de reproductibilité : aucune altération du fluorochrome n'a été notée par les opérateurs et la faible dispersion des valeurs montre l'intégrité du réactif sur toute la durée du test. La durée de conservation de l'Uvibio dilué au 1/100^{ème} a été fixée à 1 mois.

4.5 Limite de détection

La limite de détection a été définie en étudiant une gamme de dilutions d'une suspension de la souche ATCC 90028 *Candida albicans*. Les résultats de l'étude figurent en annexe 6.

La limite de détection a été estimée à 18 spores/mm³ et correspond à une culture de *Candida albicans* à 10³.

4.6 Intervalle de référence (valeurs usuelles)

Il s'agit d'une technique qualitative réalisée sur des prélèvements dans lesquels on ne retrouve d'ordinaire pas de champignons.

La « valeur usuelle » correspond donc à un examen direct mycologique négatif. Tout examen direct positif sera communiqué aux cliniciens.

4.7 Sensibilité / Spécificité analytiques

La sensibilité et la spécificité analytiques de la technique ont été évaluées à partir des résultats d'examen direct et de culture de 215 échantillons. Ces 215 échantillons correspondent à la totalité des échantillons de peau, cheveux ou ongles prélevés par le laboratoire en 2015.

Les résultats sont répertoriés dans la figure 6 qui suit.

	ED +	ED -
Culture +	69	34
Culture -	25	86

Figure 6 : Tableau récapitulatif des résultats d'examen direct (ED) et de culture des prélèvements réalisés en 2015 par le laboratoire.

Etude des ED+ avec culture - :

- 9 prélèvements ont en fait une culture positive mais non répondue car non pathogène (par exemple : aspergillus, penicillium...)
- 10 patients ont un autre prélèvement positif le jour même avec un dermatophyte (plusieurs sites sont prélevés par l'interne) : défaut de la culture.
- 1 patient avait mis un vernis antifongique avant le prélèvement ce qui explique la négativation de la culture.
- 1 patient avait arrêté son traitement antifongique local depuis seulement 1 semaine alors que les recommandations (REMIC 2015) recommandent un arrêt d'au moins 15 jours avant le prélèvement.

Au total : 3 patients (4 prélèvements) présentent un examen direct positif avec une culture négative.

Etude des ED- avec culture + :

34 prélèvements ont un examen direct négatif et une culture positive. Ces résultats s'expliquent par un défaut de sensibilité de l'examen direct par rapport à la culture.

La sensibilité et la spécificité analytiques ont été calculées de la manière suivante :

-Sensibilité : $(69) / (69+34) = 67\%$

-Spécificité : $(86 / (86+4)) = 95.5 \%$

4.8 Robustesse

- Effet de la congélation : la robustesse de la méthode a été évaluée en testant l'effet de la congélation sur le nombre de levures présentes dans la suspension.

Le nombre de levures présentes dans la suspension a été estimé sur la suspension initiale faite à partir du repiquage de la souche ATCC 90028 Candida albicans ; puis sur la même suspension congelée à -80°C pendant 1 semaine (cf. Annexe 7 : validation technique de la robustesse).

Un test de Student a permis de comparer les moyennes obtenues avant et après congélation : $Z = 1.85 < 1.96$.

Les 2 moyennes ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.

La méthode est robuste par rapport à la congélation.

- Effet de l'opérateur : la robustesse de la méthode par rapport à l'opérateur a été testée simultanément à la reproductibilité. 2 opérateurs ont dénombré les levures sur 30 jours.

Un test de Student a permis de comparer les moyennes obtenues avec l'opérateur 1 et l'opérateur 2 : $Z = 0.23 < 1.96$

Les 2 moyennes ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.

La méthode est robuste par rapport à l'opérateur.

4.9 Comparaison de méthodes

La comparaison a été faite avec un kit commercial MYCETFLUO à base de calcofluor. Ce kit utilise un réactif fluorescent permettant la mise en évidence d'éléments fongiques lors de l'examen direct microscopique d'un prélèvement.

	Technique à l'Uvibio	Mycetfluor
ED +	2	2
ED -	40	40

Figure 7 : Tableau récapitulatif de la comparaison de méthodes Uvibio-Mycetfluor

100% des résultats sont concordants entre la technique à l'Uvibio utilisée au laboratoire et la technique commerciale Mycetfluor.

5 Discussion et Conclusion

L'examen direct en mycologie repose sur une technique particulière au laboratoire qui utilise l'Uvibio, initialement destiné à la recherche de microsporidies dans les selles. Il s'agit d'une « technique adaptée » qui, comme le préconise le SH GTA 04, définit une portée B d'accréditation.

Ce mémoire a conduit à un travail en équipe avec les biologistes et les techniciens référents, qui a permis de rédiger le mode opératoire et de définir l'ensemble des points critiques à maîtriser pour répondre aux exigences du COFRAC. Le projet a rencontré les difficultés inhérentes au domaine de la microbiologie, qui s'intéresse au monde du vivant ; ce qui suppose d'aborder l'accréditation différemment des autres disciplines de la biologie médicale, telles que la biochimie. Comme le souligne le QUAMIC (Comité Qualité de la Société Française de Microbiologie), « il ressort que pour la microbiologie, [...] nous ne disposons que 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. » Dans ce contexte, l'ensemble des critères susceptibles de démontrer la maîtrise de la méthode ont été étudiés. La validation technique a démontré les performances de la méthode, assurant ainsi la fiabilité des résultats rendus aux cliniciens et l'optimisation de la prise en charge du patient. Elle a abouti à la rédaction du dossier de validation de méthode SH FORM 43 qui pourra être présenté aux évaluateurs COFRAC dans la démarche d'accréditation 2018.

Le projet a impliqué des domaines très divers tels que la gestion des commandes, la métrologie, ... permettant une approche très transversale de la biologie médicale à l'heure actuelle.

Le service de mycologie s'est engagé à respecter la Politique qualité définie par le Pôle de Biologie et suit la logique d'amélioration continue du SMQ. A ce titre, plusieurs axes d'amélioration ont été évoqués. Une révision du mode opératoire est prévue dans un délai de 2 ans maximum afin d'actualiser le document et d'assurer la veille du système de gestion documentaire. L'habilitation et le maintien des compétences sont également au cœur de la démarche qualité du laboratoire. L'habilitation initiale au poste de mycologie se déroule sous la forme d'un tutorat, le tuteur étant un technicien référent apte à répondre aux interrogations

du nouvel opérateur. Le maintien des compétences du personnel habilité repose sur la lecture du CIQ qui garantit de façon pérenne la fiabilité des résultats rendus.

Dans la logique d'amélioration continue, l'inscription à un organisme d'EEQ (Evaluation externe de la Qualité) a été envisagée de manière à confronter nos résultats à d'autres laboratoires. Cependant, aucun EEQ n'existe à l'heure actuelle pour l'examen direct en mycologie.

Devant les bénéfices tirés de l'audit interne réalisé en mycologie en 2015, un autre audit interne est prévu, dont la date va prochainement être fixée.

Bibliographie

• Norme NF EN ISO 15189, décembre 2012

• SH GTA 01, Guide technique d'Accréditation en Biologie Médicale, révision 01, avril 2015, COFRAC section Santé humaine

• SH GTA 04, Guide technique d'Accréditation de Vérification (portée A) / de validation (portée B) des Méthodes en Biologie Médicale, révision 01, Avril 2015, COFRAC section Santé humaine

• SH GTA 06, Guide technique d'Accréditation : Contrôle de Qualité en Biologie Médicale, juin 2012, COFRAC Section Santé humaine

• SH REF 02, Exigences pour l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189, révision 05, juin 2016, COFRAC Section Santé humaine

• QUAMIC : Comité Qualité de la Société Française de Microbiologie, Recommandations 2014

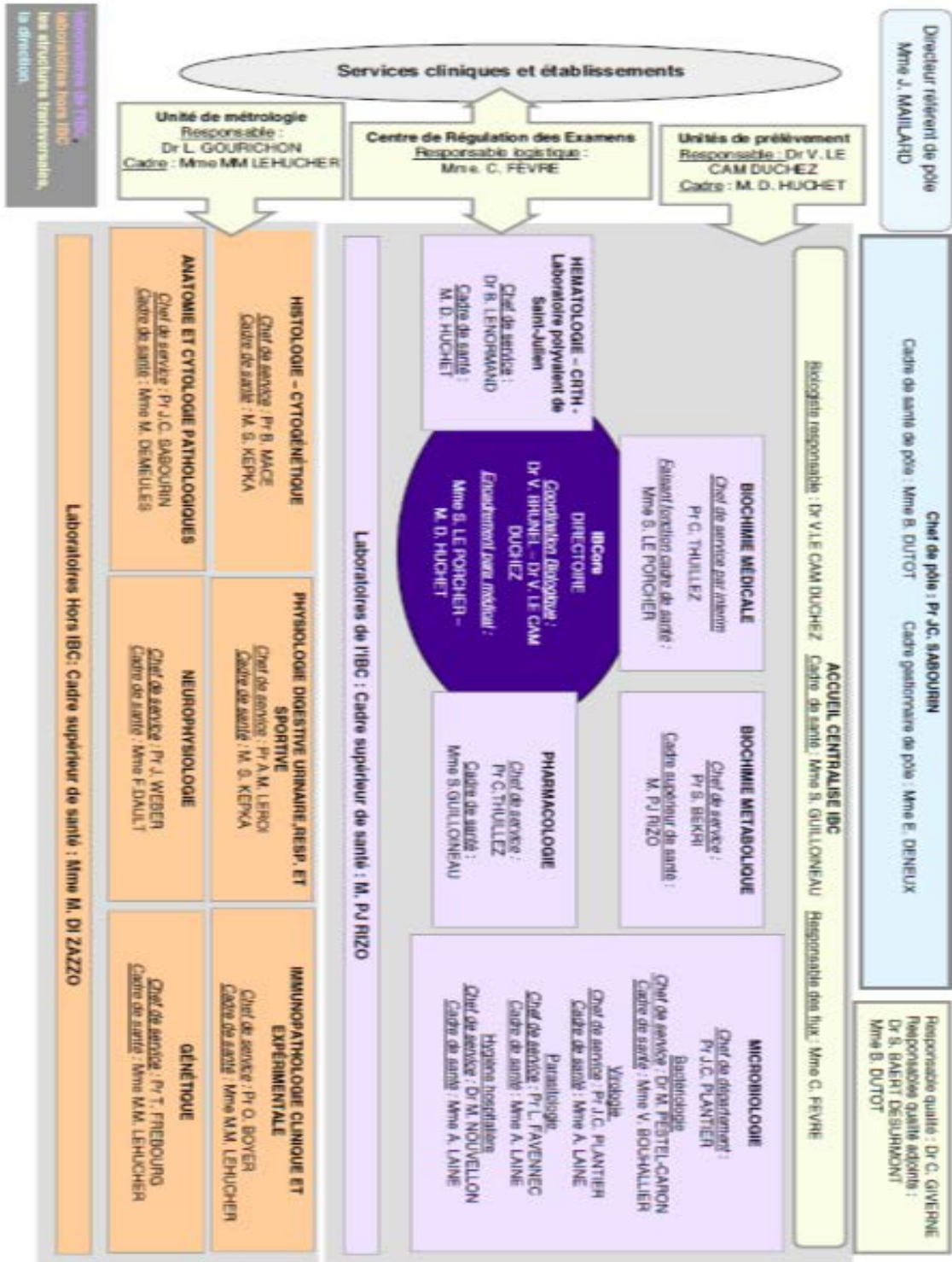
• REMIC : Référentiel en Microbiologie médicale. 5^{ème} édition 2015 : 5.1

• Cahier de formation Bioforma : Les Levures et Levuroses, 2010, page 5

Annexes

Annexe 1 : Organigramme du Pôle de Biologie	p.24
Annexe 2 : Liste des examens accrédités et des extensions demandées ...	p.25
Annexe 3 : Organigramme du laboratoire de Parasitologie-Mycologie	p.36
Annexe 4 : Mode opératoire de l'examen direct en mycologie	p.37
Annexe 5 : Tableau résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative. SH GTA 04 ...	p.41
Annexe 6 : Validation technique de la limite de détection	p.42
Annexe 7 : Validation technique de la robustesse	p.45

Annexe 1. Organigramme du Pôle de Biologie



Annexe 2 : Liste des examens accrédités et des extensions

Examens accrédités			
Domaine	Famille	Sous-famille	Examen accrédité
Biologie médicale	Biochimie- Génétique	Biochimie générale et spécialisée	Créatine Kinase
			Potassium
			Haptoglobine
			Troponine T
			Cortisol
			Phosphatase alcaline
			Magnésium
			Chlore
			Estradiol femme
			Lipase
			Calcium
			T3 libre
			Urée
			Procalcitonine
			Thyréostimuline
			Sodium
			Protides
			T4 libre
			NT-proBNP
			Lactate déshydrogénase
Gamma-GT			
Hormone folliculostimulante FSH			
SHBG			

Examens accrédités (suite1)			
Domaine	Famille	Sous-famille	Examen accrédité
Biologie médicale	Biochimie- Génétique	Biochimie générale et spécialisée	Lactates
			Hormone Lutéinisante LH
			Prolactine
			ACTH
			Progestérone
			ACE
			C4
			C3c
			IgG
			IgM
			IgA
			Créatine U
			Guanidinoacétate U
			Créatinine U
		Pharmacologie- Toxicologie	Plombémie
			Amikacine
			Vancomycine
			Théophylline
			Tobramycine
			Gentamicine
			Carbamazépine
			Acide valproïque
			Phénytoïne
Phénobarbital			
Sirolimus			
Everolimus			

Examens accrédités (suite 2)			
Domaine	Famille	Sous-famille	Examen accrédité
Biologie médicale	Biochimie- Génétique	Pharmacologie- Toxicologie	Mycophénolate
			Tacrolimus
			Rifampicine
			Troponine T
	Hématologie- Immunologie- Biologie de la Reproduction	Hématocytologie	Plaquettes
			Volume moyen plaquettaire
			Indice de distribution plaquettaire
			Hémoglobine
			Hématocrite
			VGM
			CCMH
			TCMH
			Globules rouges
			Réticulocytes méthode automatisée
			Réticulocytes SJU
			Globules Blancs
			PNN
			PNB
			PNE
			Lymphocytes
			Formule sanguine en microscopie optique
			Plaq à l'hématimètre
			GB à l'hématimètre
Numération globulaire des liquides divers			

Examens accrédités (suite 3)			
Domaine	Famille	Sous-famille	Examen accrédité
Biologie médicale	Hématologie- Immunologie- Biologie de la Reproduction	Hématocytologie	Morphologie érythrocytaire
			Recherche de cellules de Sézary
			Recherche de lymphocytes vacuolés
			Recherche d'hématies ponctuées
			Recherche de tricholeucocytes
		Hémostase	Temps de Quick
			TCA
			Fibrinogène
			Facteur II
			Facteur V
			Facteur VII
			Facteur X
			Facteur VIII
			Facteur IX
			Facteur XI
			Facteur XII
			Facteur XIII
			Facteur Willebrand Antigène
			Antithrombine Ag
			Antithrombine activité
			Activité anti-Xa HNF
			Activité anti-Xa HBPM
			Activité anti-Xa Organan
Activité anti-Xa Arixtra			

Examens accrédités (suite 4)			
Domaine	Famille	Sous-famille	Examen accrédité
Biologie médicale	Microbiologie	Sérologie infectieuse	Antigénurie Légionnelle (test rapide)
			CMV Sérologie (IgG immunité)
			CMV Sérologie (IgM-dépistage infection)
			Rubéole Sérologie (IgG immunité)
			Rubéole Sérologie (IgM-dépistage infection)
			VIH Sérologie (dépistage infection)
			VIH sérologie (dépistage infection technique alternative)
			VIH sérologie (Ag p24)
			VIH-séroneutralisation de l'Ag p24
			HTLV sérologie (dépistage-infection)
			Hépatite A sérologie (IgG immunité)
			Hépatite A sérologie (IgM-dépistage infection)
			Hépatite B sérologie (Ag HBs-dépistage infection)
			Hépatite B – séroneutralisation de l'Ag HBs
			HBV sérologie (Ac anti-HBs immunité)
HBV sérologie (Ag HBe-suivi infection)			

Examens accrédités (suite 5)			
Domaine	Famille	Sous-famille	Examen accrédité
Biologie médicale	Microbiologie	Sérologie infectieuse	HBV sérologie (Ac anti-HBe-suivi infection)
			HBV sérologie (Ac totaux anti-HBc-dépistage infection)
			HBV sérologie (IgM anti-HBc- dépistage infection)
			HCV sérologie (dépistage infection)
			EBV sérologie (Ac hétérophiles-dépistage infection)
			Rotavirus et Adénovirus : TDR dans les selles
			VIH sérologie (confirmation infection VIH-1)
			VZV sérologie (IgG immunité)
			HTLV sérologie (confirmation infection)
			VIH sérologie (confirmation infection VIH-2)
			EBV sérologie (IgG anti-EBNA-immunité)
			EBV sérologie (IgG anti-VCA- dépistage infection)
			EBV sérologie (IgM anti-VCA –dépistage infection)

Extensions demandées			
Domaine	Famille	Sous-famille	Extension demandée
Biologie médicale	Microbiologie	Bactériologie	Recherche automatisée de mycobactéries en milieu liquide MGIT su BACTEC
			Antibiogramme automatisé de mycobactéries du complexe tuberculosis
			Cytologie urinaire automatisée
			Recherche automatisée de germes bactériens et/ou de bactéries spécifiques dans les liquides biologiques d'origine humaine
			Mise en culture pour recherche et identification de germes bactériens
			Identification automatisée de germes bactériens
			Recherche et identification manuelle de germes bactériens et/ou de germes spécifiques
			Antibiogramme automatisé
			Antibiogramme manuel
			Recherche d'ADN bactérien de Bordetella pertussis (PCR)
	Hématologie- Immunologie- Biologie de la Reproduction	Spermiologie diagnostique	Viscosité du sperme

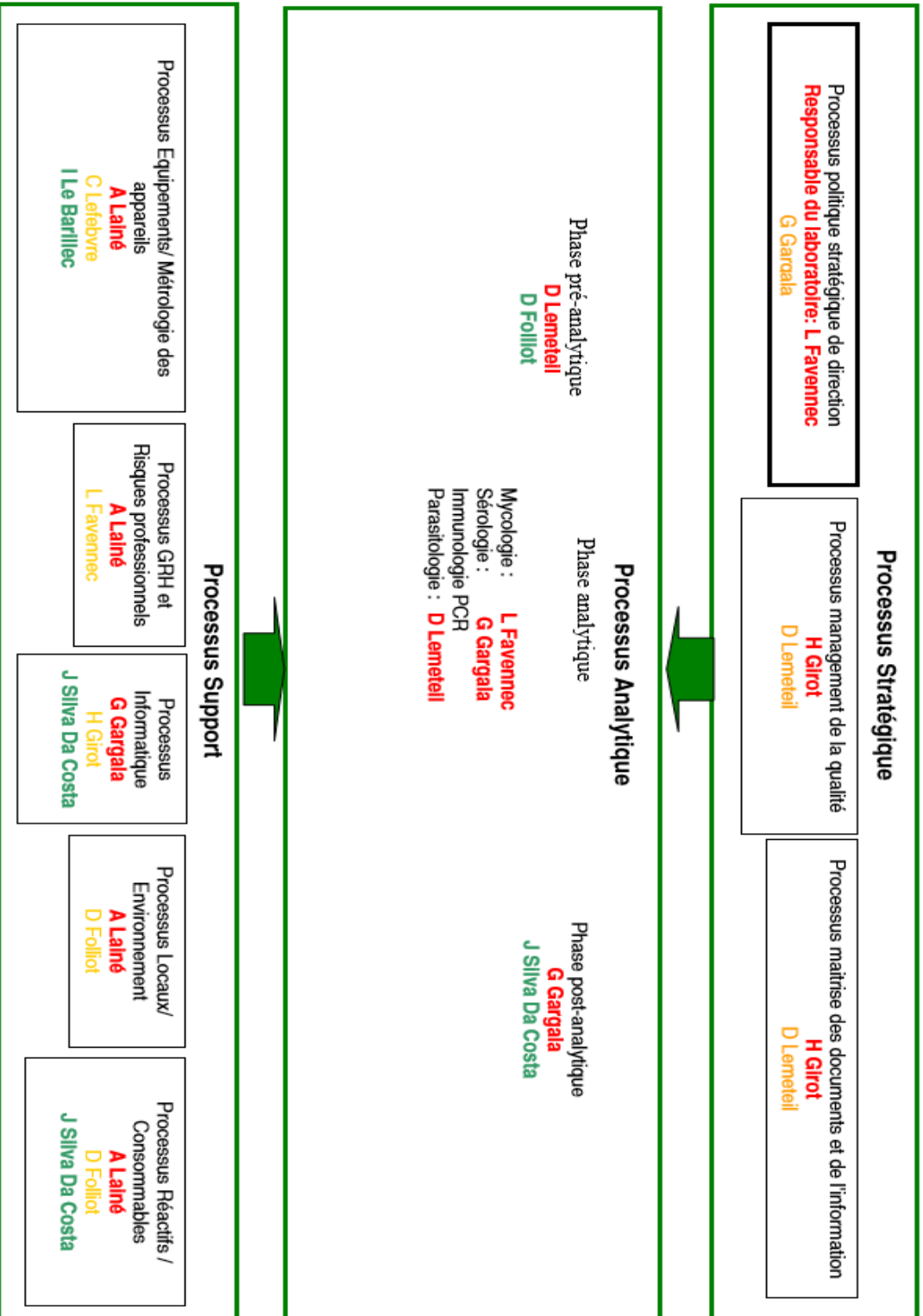
Extensions demandées (suite 3)			
Domaine	Famille	Sous-famille	Extension demandée
Biologie médicale	Biochimie- Génétique	Génétique Constitutionnelle	Polypose adénomateuse familiale de transmission autosomique récessive : séquençage SANGER gène MUTYH
			Polypose juvénile : séquençage SANGER du gène SMAD4
			Polypose juvénile : séquençage SANGER du gène BMPR1A
			Cowden (syndrome de) : séquençage SANGER du gène PTEN
			Li-Fraumeni (syndrome de) : séquençage SANGER du gène TP53
			Hydrocéphalie liée à l'X : séquençage SANGER du gène L1CAM
			Cornelia de Lange (syndrome de) : séquençage SANGER du gène NIPBL
			Peutz-Jeghers (sd de) : séquençage SANGER du gène STK11

Extensions demandées (suite 4)			
Domaine	Famille	Sous-famille	Extension demandée
Biologie médicale	Biochimie- Génétique	Génétique Constitutionnelle	Amyotrophie spinale infantile : analyse du gène SMN1
			Li-Fraumeni (syndrome de) : QMPSF du gène TP53
	Hématologie- Immunologie- Biologie de la Reproduction	Hémostase	Plasminogène, activité
			Facteur Willebrand, activité cofacteur à la ristocétine
		Hématocytologie	Typage des hémopathies (sang)
		Allergie	Allergologie IgE spécifiques
			Allergologie IgE totales
			Tryptases
		Auto-immunité	Ac anti-BPAG2
			Ac anti-CCP
			Ac anti-desmogléine 1
			Ac anti-saccharomyces cerevisiae IgG
			Ac anti-saccharomyces cerevisiae IgA
		Ac anti-tissus transglutaminase IgA	
		Ac anti-membrane basale glomérulaire	

Extensions demandées (suite 5)				
Domaine	Famille	Sous-famille	Extension demandée	
Biologie médicale	Biochimie- Génétique	Génétique Constitutionnelle	Génotypage TPMT	
			Génotypage CYP3A5	
	Hématologie- Immunologie- Biologie de la Reproduction	Auto-immunité	Ac anti- thyroperoxydase	
			Ac anti-thyroglobuline	
			Ac anti-ADN double brin	
			Ac anti- myéloperoxydase	
			Ac anti-nucléaire	
			Ac anti-BPAG1	
			Ac anti-desmogléine 3	
			Ac anti-protéinase 3	
	Microbiologie	Virologie	Immunologie cellulaire spécialisée et histocompatibilité	Etude des sous- populations lymphocytaires CD3 CD4 CD8
			Parasitologie- Mycologie	Examen Parasitologique des Selles
				EBV charge virale sang

Extensions demandées (suite 6)			
Domaine	Famille	Sous-famille	Extension demandée
Biologie Médicale	Microbiologie	Virologie	EBV/PCR sur liquides divers et biopsies
			Entérovirus PCR
			Hépatite C charge virale sang
			VIH-1 charge virale sur sang
			JC virus PCR sur LCR
			Paréchovirus PCR sur liquides divers
	Biochimie-Génétique	Génétique Somatique	KRAS/BRAF : recherche des mutations de l'exon 2 du gène KRAS et de l'exon 15 du gène BRAF SNaPshot
			KRAS/NRAF : recherche des mutations de l'exon 2 du gène KRAS et de l'exon 15 du gène BRAF SNaPshot
			BRAF : recherche des mutations du codon 600 du gène BRAFSNaPshot
			EGFR/KRAS : recherche de mutations ponctuelles au niveau des exons 18,20 et 21 de l'EGFR et 2 de KRAS par la technique d'extension d'amorce par SNaPshot
Anatomie et Cytologie Pathologiques		Histologie	Détection de la protéine ALK par immunohistochimie
			HES : coloration HES

Organigramme du laboratoire de Parasitologie



Annexe 3 : Organigramme du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie

Annexe 4 : Mode opératoire de l'examen direct en mycologie

Description de la dernière évolution :		
Critérium		
	Rédaction	Approbation
Nom(s) et fonction(s)	Hélène GIROT (Cadi : Rédacteur - CHU/Prôles - Directions/Prôles Médicales/Biologie Clinique/Microbiologie/Parasitologie)	Loïc PAVENNEC (Cadi : Approuvateur - CHU/Prôles - Directions/Prôles Médicales/Biologie Clinique/Microbiologie/Parasitologie)
Date	12/09/2015	17/06/2018

Sommaire

1	Objet	1
2	Domaine d'application.....	1
3	Référence(s) et document(s) associé(s)	1
4	Définitions et abréviations.....	1
5	Responsabilités et personne(s) ressource(s)	2
5.1	Responsabilités	2
5.2	Personne(s) ressource(s)	2
5.2.1	Participant(s) à la rédaction.....	2
5.2.2	Référent(s).....	2
6	Contenu	2
6.1	Définition.....	2
6.2	Technique	2
6.2.1	Réactifs et consommables	2
6.2.2	Traitement de l'échantillon.....	3
6.2.3	Lecture et interprétation de l'examen direct	3
6.3	Contrôle interne de Qualité.....	4
6.3.1	Fabrication du CIQ	3
6.3.2	Lecture et validation du CIQ.....	3

1 Objet

Mode opératoire de la réalisation d'un examen direct en mycologie

2 Domaine d'application

Cette procédure est applicable au secteur Mycologie du laboratoire de Parasitologie-Mycologie.

3 Référence(s) et document(s) associé(s)

3.1 Bibliographie

REMIC Référentiel en Microbiologie médicale édition 2015

Seule la version électronique de ce document est valide.

«RE: L'AS MOUHELE» «N°10» Page 10

3.2 Documents associés

-Mode opératoire de fonctionnement et d'utilisation du microscope à fluorescence LEITZ Laborlux S: fiche GEDI 14572

-Pôle de biologie clinique: validation et diffusion des résultats d'examens: Fiche GEDI n°10687

4 Définitions et abréviations

CHU: Centre Hospitalier Universitaire

CIQ: Contrôle Interne de Qualité

PBS: Phosphate Buffered Saline

REMIC: Référentiel en Microbiologie médicale

5 Responsabilités et personne(s) ressource(s)

5.1 Responsabilités

Biologistes, techniciens et internes du laboratoire de Parasitologie-Mycologie

5.2 Personne(s) ressource(s)

5.2.1 Participant(s) à la rédaction

Docteur GIROT Hélène

SOURON Isabelle (Interne)

5.2.2 Référent(s)

Professeur FAVENNEC Loïc

6 Contenu

6.1 Définition

L'examen direct en mycologie est une observation microscopique à la recherche de champignons. Il repose au laboratoire sur l'utilisation d'Uvitex 2B, fluorochrome qui se fixe sur la chitine et les glucanes présents dans la paroi fongique. Une fluorescence vert pomme apparaîtra en présence de champignons lors de la lecture dans l'ultraviolet au microscope à fluorescence.

Prélèvements pour lesquels un examen direct mycologique est réalisé au laboratoire:

- Les liquides péritonéaux
- Les prélèvements d'abcès
- Les aspirations pharyngées de patients atteints de mucoviscidose
- Les liquides bronchoalvéolaires
- Les prélèvements cutanés à la recherche de dermatophytes

La recherche de pityriasis versicolor s'effectue par scotch test cutané.

L'examen direct à la recherche de Pneumocystis jirovecii sur liquides bronchoalvéolaires s'effectue par coloration rapide au MGG.

6.2 Technique

6.2.1 Réactifs et consommables

UVITEX 10 ml REF B200 LDBCO DIAGNOSTICS (conservé dans le réfrigérateur IF2)	Stockés dans la pièce O3A015
PBS Biomérieux REF 75511	
Lames Porte-Objet : Thermo scientific LR90D	Stockés dans la pièce O3C10
Lamelles Thermo Scientific LC02020	
Solution de ROH à 30%	Stockée sous la hotte BIC 11610

Seule la version électronique de ce document est valide.

<NE PAS MODIFIER> <RPM> Page 2/3

• **Préparation de la solution d'UVIBIO au 1/100^{ème}**

Préparer extemporanément une solution d'uvibio diluée au 1/100^{ème} dans du PBS dans un tube à hémolyse.

Préparer 3 mL comme suit : 30µL d'uvibio + 2970 µL de PBS

Entourer le tube d'un papier aluminium pour protéger l'UVIBIO de la lumière puis noter la date de fabrication sur le tube.

Conserver la solution sous la hotte de mycologie jusqu'à 1 mois après dilution.

• **Préparation de la solution d'uvibio/KOH 30%**

Mélanger à volume égal la solution d'uvibio diluée au 1/100^{ème} et une solution de KOH à 30% dans un tube à hémolyse.

Entourer le tube d'un papier aluminium pour protéger l'UVIBIO de la lumière puis noter la date de fabrication sur le tube.

Conserver la solution sous la hotte de mycologie jusqu'à 1 mois après dilution.

6.2.2 Traitement de l'échantillon

* **Prélèvements de liquides divers** : après centrifugation et ensemençement, ajouter au culot une goutte de la solution d'uvibio diluée au 1/100^{ème}, vortexer et attendre 5 minutes. Déposer une goutte sur une lame et recouvrir d'une lamelle. Attendre au minimum 15 minutes avant la lecture au microscope à fluorescence.

* **Aspiration pharyngée de patients atteints de mucoviscidose** : déposer une goutte d'uvibio diluée au 1/100^{ème} sur une lame puis ajouter environ une goutte d'aspiration pharyngée et recouvrir d'une lamelle. Attendre au minimum 15 minutes avant la lecture au microscope à fluorescence

* **Biopsie** : mettre une goutte du mélange uvibio au 1/100^{ème} (potasse 30%) sur une lame, ajouter un échantillon fin de la biopsie et recouvrir d'une lamelle. Attendre au minimum 15 minutes avant la lecture au microscope à fluorescence.

* **Prélèvements de peau ou de phanères à la recherche de dermatophytes**: déposer une goutte du mélange uvibio 1/100^{ème} (KOH 30% sur une lame puis ajouter un échantillon du prélèvement (squames, cheveux, copeaux d'ongle...). Mettre les lames 24h à 2-8°C à l'abri de la lumière en zone MF2.

6.2.3 Lecture et interprétation de l'examen direct

Allumer la lampe du microscope à fluorescence 20 à 30 minutes avant utilisation.

Observer aux objectifs x100 et x400 en lumière ultraviolette. Une fluorescence vert pomme apparaît en présence de champignons (se méfier des artefacts). L'observation microscopique permet d'observer en cas de positivité :

- Des levures +/- bourgeonnantes, éventuellement associées à du pseudomycélium voire à du mycélium.
- Des filaments mycéliens
- Des spores

Noter les résultats sur la feuille de travail "MYCEX".

Tout examen direct positif doit être communiqué le plus rapidement possible dans le service demandeur par l'interne ou le biologiste présent.

6.3 Contrôle interne de qualité (CIQ)

6.3.1 Fabrication du CIQ

Le CIQ est fabriqué à partir d'un repiquage de la souche ATCC 90028 *Candida albicans*. Il sera utilisable jusqu'à 30 jours après congélation.

- Faire une suspension de la souche 90028 *Candida albicans* à 0.5 MacFarland dans du NaCl 0.9% ;
- Aliquoter la suspension en 30 aliquotes d'un volume de 200 µL. Sur chaque aliquote, noter la date de congélation ;
- Congeler les aliquotes.

Un CIQ sera décongelé quotidiennement et passé au début de chaque série d'examens directs :

- Décongeler un aliquote
- Réaliser une dilution au 1/10^{ème} de la suspension : dans un tube à hémolyse, déposer 100 µL de suspension à la pipette puis ajouter 900 µL de NaCl 0.9%. La suspension obtenue après dilution correspond à la suspension A.
- Prélever 100 µL de la suspension A. Les déposer dans un deuxième tube à hémolyse et ajouter 100 µL d'Uvibio. La suspension obtenue correspond à la solution B.
- Déposer 1 µL de la suspension B dans un puits de cellule de KOVA.

6.3.2 Lecture et Validation du CIQ

-Fréquence de passage du CIQ : le CIQ sera passé à chaque série d'examens directs et sera lu en premier

-Condition de Validité du CIQ : le CIQ est valide si ≥10 levures sont dénombrées.

-Conduite à tenir en cas de CIQ invalide : décongeler un 2^{ème} aliquote pour fabriquer une autre suspension. Si le CIQ est invalide 2x de suite, rechercher la cause de l'invalidité du CIQ (lampe du microscope à fluorescence défectueuse, mauvaise conservation des aliquotes, erreur lors de la fabrication du CIQ, ...)

La série de lames sera validée uniquement si le CIQ est valide.

|

Annexe 5 : Tableau résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative. SH GTA 04

Tableau résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative (selon NATA note n°17 – juin 2012) :

CRITERES A EVALUER	Vérification (portée A)		Validation (portée B)	
	Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode quantitative	Méthode qualitative
<i>Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Justesse/exactitude (approche)</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation</i>	<i>Essai</i>	<i>Maîtrise des facteurs de variabilité</i>	<i>Essai</i>	<i>Maîtrise des facteurs de variabilité</i>
<i>Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir⁹, EBMD) et analyse des discordances¹⁰</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Intervalle de mesure (Limite de quantification et limites de linéarité)</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>/</i>	<i>Essai</i>	<i>/</i>
<i>Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, ...)</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Robustesse</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Intervalle de référence (valeurs usuelles)</i>	<i>Bibliographie (fournisseur ou autre, s'assurer de la cohérence avec l'état de l'art)</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>Essai</i>	<i>Essai</i>
<i>Limite de détection</i>	<i>/</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>/</i>	<i>Essai</i>
<i>Spécificité/sensibilité analytique</i>	<i>/</i>	<i>Bibliographie</i>	<i>/</i>	<i>Essai</i>

Annexe 6 : Validation technique de la limite de détection

1^{ère} suspension :

	Nombre de spores										Total
Spores/ cellule de KOVA	100	96	100	98	101	95	90	110	110	95	995*9= 8955/mm3
Spores/cellule de KOVA de la solution diluée dans l'Uvibio	42	44	44	39	41	40	33	32	44	38	397*9= 3573/mm3
	39	42	41	33	37	40	32	40	47	36	387*9= 3483/mm3

	10 champs (*400) en fluorescence			Total
Opérateur 1	337	408	423	1168
Opérateur 2	440	444	381	1265
Opérateur 3	319	440	391	1150

Ensemencement CAN2	CAN2 : 1	CAN2 : 2	CAN2 : 3	Moyenne
Puissance	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶

2^{ème} suspension :

	Nombre de spores										Total
Spores/ cellule de KOVA	19	26	25	32	28	30	27	31	39	28	(285*9) = 2565 spore/mm3
	30	34	28	29	35	42	40	27	45	35	(315*9)=2835 spore/mm3
Spores/cellule de KOVA de la solution diluée dans l'Uvibio	19	7	11	12	14	13	12	14	15	8	125*9 =1125/mm3
	15	21	11	18	14	20	17	15	10	14	155*9 = 1395/mm3
	10 champs (*400) en fluorescence									Total	
Opérateur 1	146	166	192	504							
Opérateur 2	167	200	213	580							

Ensemencement CAN2	CAN2 : 1	CAN2 : 2	CAN2 : 3	Moyenne
Puissance	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵

3^{ème} suspension :

	Nombre de spores										Total
Spores/ cellule de KOVA	7	8	5	2	2	6	4	6	6	6	52*9= 468/mm3
	5	6	4	7	9	4	7	8	8	5	63*9=567/mm3
Spores/cellule de KOVA de la solution diluée dans l'Uvibio	2	0	3	4	2	2	4	1	4	2	23*9=207/mm3
	2	1	1	2	0	0	1	2	1	5	15*9=135/mm3
10 champs (*400) en fluorescence											Total
Opérateur 1	28			21			23				72
Opérateur 2	23			18			23				64

Ensemencement CAN2	CAN2 : 1	CAN2 : 2	CAN2 : 3	Moyenne
Puissance	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴

4^{ème} suspension :

	Nombre de spores										Total
Spores/ cellule de KOVA	0	4	6	2	3	0	4	3	2	5	28*9=252/mm3
	2	4	2	6	3	2	3	6	3	2	33*9=297
Spores /cellule de KOVA de la solution diluée dans l'Uvibio	2	1	0	0	1	1	1	2	0	1	9*9 = 81/mm3
	2	1	0	2	1	1	0	1	1	1	10*9 = 90/mm3
10 champs (*400) en fluorescence											Total
Opérateur 1	8			7			8				24
Opérateur 2	10			9			9				28

Ensemencement CAN2	CAN2 : 1	CAN2 : 2	CAN2 : 3	Moyenne
Puissance	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴

5^{ème} suspension :

	Nombre de spores										Total
Spores/ cellule de KOVA	1	0	1	2	1	1	0	0	1	1	$8*9=72/\text{mm}^3$
	0	2	1	0	0	1	0	1	1	1	$7*9=63/\text{mm}^3$
Spores/cellule de KOVA de la solution diluée dans l'Uvibio	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	$3*9=27/\text{mm}^3$
	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	$4*9=36/\text{mm}^3$
	10 champs (*400) en fluorescence										Total
Opérateur 1	3			4			6				13
Opérateur 2	5			4			6				15

Ensemencement CAN2	CAN2 : 1	CAN2 : 2	CAN2 : 3	Moyenne
Puissance	10^3	10^3	10^3	10^3

6^{ème} suspension :

	Nombre de spores										Total
Spores/ cellule de KOVA	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	$2*9=18/\text{mm}^3$
	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	$2*9=18/\text{mm}^3$
Spore /cellule de KOVA de la solution diluée dans l'Uvibio	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	$1*9 = 9/\text{mm}^3$
	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	$2*9= 9/\text{mm}^3$
	10 champs (*400) en fluorescence										Total
Opérateur 1	0			2			2				4
Opérateur 2	3			0			3				6

Ensemencement CAN2	CAN2 : 1	CAN2 : 2	CAN2 : 3	Moyenne
Puissance	10^3	10^3	10^3	10^3

Annexe 7 : Validation technique de la Robustesse

	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	N12	N13	N14	N15
Sans congélat°	56	53	60	55	55	55	53	58	60	52	54	54	59	58	56
Congélat°	50	57	55	57	58	57	50	58	61	58	60	61	61	60	60
	N16	N17	N18	N19	N20	N21	N22	N23	N24	N25	N26	N27	N28	N29	N30
Sans congélat°	61	60	55	58	57	54	58	59	57	60	55	57	57	57	58
Congélat°	57	59	58	53	54	58	60	60	59	57	57	60	56	57	56

RESUME

La conjoncture actuelle de la biologie médicale française résulte de la loi 2013-442 du 30 mai 2013 : les laboratoires de biologie médicale doivent désormais être accrédités sur 50% des examens au 1^{er} novembre 2016, 70% au 1^{er} novembre 2018 et enfin sur la totalité des examens au 1^{er} novembre 2020.

Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU Charles Nicolle de Rouen s'est engagé dans la démarche d'accréditation. Il s'est fixé l'échéance de 2018 pour constituer les dossiers de vérification et de validation de méthodes du secteur de mycologie.

Le mémoire traite de la validation de méthode de l'examen direct en mycologie. Il s'agit d'une technique adaptée qui, comme le préconise le SH GTA 04, définit une portée B d'accréditation. Basé sur le principe du PDCA (Plan, Do, Check, Act) ou roue de Deming, le projet a surmonté les difficultés inhérentes à la microbiologie, seule discipline confrontée au « monde du vivant ». Les différentes étapes du projet sont tour à tour détaillées, depuis l'état des lieux et l'analyse de risques, jusqu'au recueil et à l'interprétation des résultats. La rédaction du SH FORM 43 vient finaliser le projet.