

Université Pierre et Marie Curie –
Sorbonne Universités

MÉMOIRE
POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE
«ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE DE
BIOLOGIE MÉDICALE»

VALIDATION DE MÉTHODE DE L'IDENTIFICATION
DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX PAR
SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Valentin WEHLÉ
Année 2016

NOTE AU LECTEUR

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

Valentin WEHRLÉ

Interne en 5^{ème} semestre de biologie médicale

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie

Centre Hospitalo-Universitaire de Rouen

1 rue de Germont, 76000 ROUEN

Remerciements

Je remercie l'ensemble de l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Rouen pour leur aide à la réalisation de ce travail malgré la charge de travail quotidien. Je souhaite également remercier tout particulièrement le Docteur Hélène GIROD qui m'a encadré et aiguillé dans ce travail.

Je remercie les Docteurs PERNET et VAUBOURDOLLE ainsi que l'ensemble des intervenants du DU pour le partage de leurs connaissances.

Je remercie également tous mes proches qui m'aident et me soutiennent au quotidien.

Sommaire

Sommaire.....	5
Glossaire.....	6
1. Introduction.....	7
1.1 Présentation de l'établissement.....	7
1.1.1 CHU-Hôpitaux de Rouen.....	7
1.1.2 Le pôle de Biologie.....	7
1.1.3 Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie.....	7
1.2 La démarche qualité au pôle de biologie médicale.....	8
1.3 Intérêts et objectifs.....	8
1.4 Limites.....	9
2. Validation de méthode.....	10
2.1 Modalités de validation de méthode.....	10
2.2 Maitrise des risques.....	15
2.3 Logigramme d'interprétation.....	20
3. Discussion.....	21
4. Conclusion.....	22
5. Bibliographie.....	22
5.1 Documents associés.....	22
5.2 Bibliographie.....	22
6. Annexes.....	23

Glossaire

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire.

CIQ : Contrôle Interne de Qualité.

COH : Gélose au sang de cheval

EEQ : Evaluation Externe de Qualité.

GEDI : Système documentaire du laboratoire.

PVX : Gélose au sang cuit.

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

SGC : Sabouraud Gentamicine Chloramphénicol

1 - Introduction

1.1 Présentation de l'établissement

1.1.1 CHU-Hôpitaux de Rouen

Le CHU-Hôpitaux de Rouen est un établissement public de santé. Il est composé de plusieurs établissements (2 établissements de soins et d'hébergement, 2 établissements industriels ainsi que 11 écoles), pour une capacité d'accueil de 2445 lits et places (hors prestations à domicile et dialyses). L'Hôpital Charles Nicolle est l'établissement de soins et d'hébergement principal avec plus de 1200 lits et places pour adultes. L'Hôpital Charles Nicolle est composé de onze pôles cliniques et médico-techniques dont le pôle de biologie.

1.1.2 Le pôle de Biologie

Le pôle de Biologie assure la réalisation d'analyses de biologie médicale, d'anatomie et cytologie pathologiques 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 notamment translationnelle tant dans le domaine du diagnostic que dans 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 selon la revue de processus 2014.

Les laboratoires de biologie médicale, d'anatomie et de cytologie pathologiques et d'explorations fonctionnelles fonctionnent en pôle depuis 2004 et ont été regroupés en décembre 2008.

Le pôle regroupe 11 laboratoires répartis sur 5 sites.

1.1.3 Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie

Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie est composé de 4 biologistes (1 PU-PH, 1 MCU-PH, et 2 Praticiens attachés), 6 techniciens, et 2 à 3 internes selon les semestres. L'activité du laboratoire correspond à 37 156 actes (B et liste complémentaire) répartis sur 98 analyses (données 2015).

1.2 La démarche qualité au pôle de biologie médicale

Le pôle de biologie est accrédité depuis novembre 2015 à 50% (pour 148 analyses).

La famille microbiologie est accréditée pour 29 analyses, regroupant majoritairement les sérologies infectieuses et la virologie. Concernant le laboratoire de Parasitologie-Mycologie, aucune des 98 analyses n'est, à ce jour, accréditée.

1.3 Intérêts et objectifs

Le laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU de Rouen est entré dans la première partie de sa démarche d'accréditation en constituant l'ensemble des dossiers de validation de méthode. Ces dossiers seront soumis, d'après le calendrier établi par la cellule qualité, dans les années 2019-2020.

Ce mémoire restitue la validation de méthode et la maîtrise des risques analytiques de l'identification fongique par spectrométrie de masse. Jusqu'à maintenant, l'identification des champignons filamenteux nécessitait d'excellentes connaissances mycologiques, une formation longue et hétérogène selon l'opérateur. Cette identification est basée sur l'aspect morphologique des colonies fongique, et sur l'étude microscopique des spores et des structures qui les supportent. Cette méthode entraîne une profonde hétérogénéité de rendu de résultat, pouvant avoir un impact direct sur le patient. La formation, l'homogénéité du rendu des résultats par les opérateurs, et les avancées phylogénétiques (regroupement d'espèces, espèces non différenciables selon les techniques traditionnelles d'identification... exemple :

Aspergillus fumigatus et *Aspergillus lentulus*) impose une évolution des méthodes d'identification fongique.

Aujourd'hui, l'identification en routine des agents pathogènes bactériens et fongiques par spectrométrie de masse semble s'approcher de la technique de référence (biologie moléculaire). Cette technique récente utilise le protéome des micro-organismes pour lequel un spectre d'identification est décodé. Le spectre est ensuite comparé à une base de données. L'identification du genre et de l'espèce découlent directement de la concordance des spectres. Ce qui offre une standardisation et une homogénéité dans le rendu de résultat d'un laboratoire à l'autre.

En bactériologie, la spectrométrie de masse est très largement utilisée dans les structures importantes.

En mycologie, l'identification des levures est également largement basée sur l'utilisation de la spectrométrie de masse, comme c'est le cas au CHU de Rouen. Concernant l'identification des champignons non levuriformes, la spectrométrie de masse commence à voir le jour, intégrant les différentes validations de méthodes. Au laboratoire de microbiologie du CHU de Rouen, nous disposons d'un unique spectromètre de masse Bruker® mutualisé entre la bactériologie et la mycologie. Contrairement aux autres micro-organismes identifiés par spectrométrie de masse, les champignons filamenteux nécessitent une étape d'extraction complète préalablement à l'identification.

L'utilisation de la spectrométrie de masse dans l'identification des champignons filamenteux permet à notre centre de rendre des résultats plus précis, plus fiables, plus reproductibles qu'avec la technique traditionnelle (identification macroscopique et microscopique). De plus, le niveau de compétence du personnel sur cette ancienne technique est très variable, ainsi la variabilité inter-opérateur était trop importante, malgré les formations continues. La spectrométrie de masse est une technique d'identification pour laquelle l'impact de l'opérateur est moindre.

1.4 Limites

La principale limite de cette validation de méthode est la dépendance du rendu de résultat au laboratoire de parasitologie-mycologie de l'AP-HM. En effet,

bien que l'examen biologique soit effectuée dans nos locaux. L'interprétation du spectre fongique nécessite sa comparaison à une bibliothèque. La bibliothèque utilisée a été créée par l'AP-HM (la bibliothèque proposée par le constructeur étant, à ce jour, moins complète). L'AP-HM a accrédité cette technique en portée B. Nous sommes tributaires de leur personnel afin d'interroger la bibliothèque. Cette dépendance reste cependant transitoire, dans l'attente d'une mise à disposition commune de cette base de données (ou d'une bibliothèque du fournisseur de l'automate plus complète).

Nous pouvons également observer une seconde limite dans cette validation de méthode. Il s'agit du recul sur l'utilisation de cette technique d'identification. En effet, l'identification des champignons filamenteux par spectrométrie de masse est une technique très récente, non disponible dans chaque centre, et avec un coût important. Il semble important d'évaluer les performances de cette technique dans les années à venir, afin d'harmoniser les pratiques entre les différents laboratoires.

2. Validation de méthode

2.1 Modalités de validation de méthode

2.1.1 Répétabilité

Date	Souche	Nombre d'échantillons	Résultat	Conclusion
25/02/2016	Aspergillus fumigatus	N=30	30 Aspergillus fumigatus	Conforme
10/03/2016	Scedosporium apiospermum	N=30	27 Scedosporium apiospermum et 3 Pseudallescheria ellipsoidea	Conforme*

* *Pseudallescheria ellipsoidea* fait partie du complexe *apiospermum*, ces 2 espèces sont phylogénétiquement très proches (différenciation impossible par l'ancienne technique utilisée). Le spectromètre de masse permet une identification précise d'espèce à l'intérieur même des complexes d'espèces.

Nous pouvons en déduire que la technique est répétable.

2.1.2 Fidélité intermédiaire

Le laboratoire a mis en place un CIQ à partir d'une souche d'*Aspergillus fumigatus* isolée chez un patient. La souche est congelée, puis remise en culture chaque semaine afin de faire partie de chaque série d'identification. Son utilisation permet ainsi de valider la série d'identification dans son ensemble (extraction + identification). Si le CIQ n'est pas conforme, aucun résultat de la série ne peut être validé, les identifications doivent alors être refaites. A l'avenir, ce CIQ sera représentée par une souche de référence (ATCC) permettant également de valider le sous processus correspondant à l'antifongogramme.

2.1.3 Variabilité inter-opérateur

L'étape de l'identification à proprement parlé est totalement automatisée, l'opérateur n'interfère pas. L'impact humain interfère au moment de l'extraction et du dépôt. L'ensemble du personnel du laboratoire est habilité à l'utilisation du spectromètre de masse, à la création de projet d'identification et au dépôt sur la cible d'identification après avoir suivi une formation initiale ainsi qu'une habilitation initiale.

Nous pouvons juger la variabilité inter-opérateur par l'utilisation du CIQ. En effet, lors de chaque série, un CIQ d'*Aspergillus fumigatus* est utilisé. L'opérateur varie alors que le CIQ reste le même.

2.1.4 Justesse

Non applicable. Le laboratoire ne participe pas à un programme de CIQ externalisé.

La justesse découle de la présence d'un CIQ dans chacune des séries.

2.1.5 Exactitude

Participation à plusieurs programmes d'EEQ (UKNEKAS®, Biologie Prospective®, ...).

Date	Organisme	Résultat	Conclusion
07/04/2016	Biologie Prospective (16040412)	Trichophyton tonsurans	Conforme
06/06/2016	UKNEKAS (16060283)	Scedosporium aurantiacum	Conforme

2.1.6 Sensibilité et spécificité analytique

Mise en place d'un témoin négatif (matrice seule) à chaque série afin de déterminer les vrais négatifs « d » et d'éliminer les faux positifs « c » (en plus des contaminations).

La sensibilité n'est pas appréciable par rapport à la technique précédemment utilisées puisque les 2 techniques se font à partir d'éléments en culture. La sensibilité est donc limitée par l'inoculum ensemencé en culture. Cet inoculum provenant d'un liquide biologique ou autre prélèvement humain, l'inoculum est inconnu.

La technique s'effectue à partir d'une culture visible macroscopiquement, l'opérateur prélève une certaine quantité de matière de cette culture. Cette quantité n'est pas mesurable.

	+	-	
Malades	a	b	Sensibilité : $a/(a+b)$
Non malades	c	d	Spécificité : $d/(c+d)$
	VPP : $a/(a+c)$	VPN : $d/(b+d)$	

2.1.7 Incertitudes

Les incertitudes sont évaluées en maîtrisant les facteurs de variabilité tels qu'ils sont décrits dans la maîtrise des risques.

Les risques liés aux facteurs de variabilité étant maîtrisés, l'analyse des incertitudes est conforme.

2.1.8 Etendue de mesure

Méthode qualitative, l'étendue de mesure n'est pas applicable.

2.1.9 Comparaison de méthode

La comparaison de méthode a été effectuée sur 56 identifications consécutives réalisées entre le 29/01/2016 et le 25/02/2016.

La technique 1 est la technique de référence utilisée au laboratoire, en place au laboratoire, et qui servira de technique de seconde intention, correspondant aux examens macroscopiques et microscopiques des colonies en culture.

La technique 2 est la technique mise en place et dont la validation de méthode est étudiée.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

	nombre d'isolats	Technique 1	Technique 2			
		Examen macroscopique et microscopique	Spectrométrie de masse			
Résultats identiques	37	Aspergillus fumigatus		13		
		absence d'identification		5		
		Aspergillus terreus		4		
		Trichophyton interdigitale		4		
		Scedosporium apiospermum		3		
		Scedosporium prolificans		2		
		Arthrographis kalrae		2		
		Aspergillus ochraceus		1		
		Aspergillus candidus		1		
		Microsporum persicolor		1		
		Geosmithia argillacea		1		
genre identique + précision espèce par spectrométrie de masse	14	Penicillium sp	Penicillium glabrum	4		
			Talaromyces wortmannii	2		
			Penicillium chrysogenum	1		
			Penicillium albobiverticillium	1		
			Penicillium funiculosum	1		
			Penicillium fellutanum	1		
			Penicillium crustosum	1		
		Fusarium sp	Fusarium solani	2		
Aspergillus sp	Aspergillus tamaraii	1				
Discordance de résultat	5	inconnu		Acremonium charticola	1	
		Aspergillus ochraceus		Aspergillus westerdijkiae	1	
		Scopulariopsis brumptii		inconnu		1
		Aspergillus ochraceus		Aspergillus tamaraii	1	
		Aspergillus versicolor		Aspergillus aureolatus	1	

Conclusion :

Nous observons un rendu de résultat identique pour 66% (37/56) des examens comparés. La technique 2 permet une identification d'espèce pour des champignons dont les caractères morphologiques et culturels de genre empêchent une identification d'espèce. Ainsi, la technique 2 est plus précise pour 25% (14/56) des examens comparés.

Nous observons une discordance de résultat pour 8.9% (5/56) des examens. Nous expliquons cette discordance par l'absence de différenciation morphologique et culturelle pour 3/5 (*Aspergillus*), le spectromètre de masse rendant un résultat plus précis. L'absence d'identification du *Scopulariopsis brumptii* a été imputée au manque de ce genre fongique dans la bibliothèque utilisée.

2.1.10 Interférences

Non applicable. Absence d'interférence car analyse effectuée à partir d'une colonie issue d'une culture. Absence d'échantillon biologique. Pas d'effet matrice.

2.1.11 Contamination

Date		Résultat	Conclusion
23/05/2016	E	Aspergillus fumigatus	
	B	Absence d'identification	
	B	Absence d'identification	
	E	Aspergillus fumigatus	
	B	Absence d'identification	
	B	Absence d'identification	
	E	Aspergillus fumigatus	
	B	Absence d'identification	
	B	Absence d'identification	Conforme

Le test initial de contamination montre l'absence d'identification dans les puits censés être négatifs, et une identification concordante dans les puits concernés. On observe donc une absence de contamination évidente lors de l'utilisation de cette technique.

Le matériel utilisé lors du dépôt est du matériel à usage unique. La cible servant de support aux dépôts est lavée après chaque utilisation suivant la procédure du fournisseur.

La contamination est ensuite évaluée à chaque série puisqu'un témoin négatif est déposé. Si celui-ci s'avère contaminé et fait l'objet d'une identification, l'ensemble des identifications de la série est à refaire.

Nous pouvons ainsi conclure une absence de contamination.

2.1.12 Robustesse et fiabilité des réactifs

Influence du milieu ensemencé :

Date	N° prélèvement	Milieu ensemencé	Résultat	Conclusion
30/03/2016	16030591	PVX	Aspergillus fumigatus	
30/03/2016	16030591	COH	Aspergillus fumigatus	
30/03/2016	16030591	SGC Actidione	Aspergillus fumigatus	
30/03/2016	16030591	SGC	Aspergillus fumigatus	
30/03/2016	16030591	Erythritol	Aspergillus fumigatus	Conforme

Nous notons une parfaite concordance des résultats entre les différents milieux gélosés initialement utilisés. Il s'agit de l'ensemble des milieux de cultures susceptibles d'être utilisés pour cette technique et qui sont présents quotidiennement au laboratoire.

Le milieu de culture utilisé n'interfère donc pas avec le résultat de l'identification.

Il faut cependant que sa composition concorde avec la nature des micro-organismes que l'on souhaite mettre en culture afin que ces derniers poussent correctement.

Age des colonies : prélèvement n°16040156

Date	Age des colonies	Résultat	Conclusion
04/04/2016	3 jours	Aspergillus fumigatus	
12/04/2016	11 jours	Aspergillus fumigatus	Conforme

Nous pouvons observer que l'âge des colonies présentes sur la gélose initiale n'interfère pas sur l'identification.

Fiabilité des réactifs :

Le protocole d'extraction fongique et la matrice utilisée pour l'analyse sont ceux recommandés par le fournisseur. Ainsi, la nature des réactifs utilisés, le volume des réactifs et la centrifugation n'ont pas été étudiés.

2.1.13 Intervalle de référence

L'utilisation d'un score allant de 0 à 100 est pratiquée pour l'identification. Un score supérieur à 17 indique que la comparaison entre le spectre étudié et la bibliothèque permet une identification suffisamment précise pour affirmer le diagnostic de genre et d'espèce. Afin d'affirmer le résultat, il est convenu que 4 puits doivent être utilisés pour l'identification d'un isolat. Il est ensuite nécessaire d'obtenir au moins 2 (des 4) scores > 17 afin de garantir le résultat. Un résultat différent nécessitera l'interprétation d'un biologiste qui se basera sur les différents outils à sa disposition pour apporter une conclusion à l'examen.

2.2 Maitrise des risques

Seule la maîtrise des risques analytiques est traitée dans cette validation de méthode. En effet, les maîtrises des risques pré-analytiques et post-analytiques sont traitées dans d'autres dossiers de validations de méthodes.

Evaluation des différents critères :

Fréquence : Nous avons inclus le paramètre fréquence selon l'ordre suivant.

F1	1 à 2 fois par an	1
F2	1 fois par trimestre	2
F3	1 à 2 fois par mois	3
F4	1 à 3 fois par semaine	4
F1	Au moins 1 fois par jour	5

Gravité :

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

DéTECTABILITÉ :

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'action de maîtrise ou action inefficace	1

Criticité calculée : FxGxDxM

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 avec un impact important sur la prise en charge du patient	75-99
C5	Criticité avec un impact vital 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'action préventive	1-24
P4	Ne demande pas d'action dans l'immédiat mais peut faire l'objet d'action corrective	25-49
P3	Plan d'action à établir et à engager dans les 12 mois	50-74
P4	Plan d'action à établir et à engager dans les 6 mois	75-99
P5	Plan d'action à établir et à engager dans les 3 mois	100-125

5M	Points critiques	Risques	Fréquence	Gravité	Défectabilité	Score	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise	Maîtrise du risque	Criticité
Matériau	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 organisme d'EEQ : SH INF 19/ 2 organismes d'EEQ : UKNEQUAS (X échantillon/ans); Biologie prospective (X échantillons/ans)	0.5	4
	Identité	discordance d'identité : milieu de culture/emplacement sur la cible	1	4	2	8	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'identification avec l'aspect macroscopique des colonies/Mode opératoire de l'identification fongique par spectrométrie de masse Gedi 17585	0.5	4
	Nature et volume de l'échantillon	Présence d'autre champignons sur la gélose rendant impossible l'absence de contamination Age de la colonie trop jeune Age de la colonie trop avancé Quantité d'élément pour identification insuffisante	2	2	2	8	Formation et information du personnel	Repiquage sur nouvelle gélose/Habilitation du personnel	0.5	4
			2	1	1	2	Formation et information du personnel/Période entre 2 déblayages consécutifs	Identification reportée au prochain déblayage	0.5	1
			2	1	1	2		Repiquage sur nouvelle gélose pour identification ultérieure	0.5	1
			2	1	1	2		Repiquage sur une nouvelle gélose pour identification ultérieure à partir de davantage d'éléments	0.5	1
Milieu	Conditions de conservation des échantillons (T°,....)	Non respect des conditions de conservation des échantillons primaires et secondaires pendant l'analyse (T°, obscurité, hygiène et sécurité...)	1	3	2	6	Gestion de la T° ambiante/Gestion de la T° 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 T° des enceintes thermostatées/Suivi de la T° et des conditions ambiantes/fiches d'aide aux prélèvements pour chaque échantillons biologiques	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 T° 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 T° 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 T°/Maîtrise des zones techniques	Suivi de la T° et des conditions ambiantes/Notices fournisseurs/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	0	5	1	5	Coupage électrique	Contrat DTST	0.5	2.5
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	Rapprovisionnement	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

	Spectromètre de Masse	Mauvaise identification/Absence d'identification	1	3	1	3	Maintenance du spectromètre de masse/Formation et information du personnel	Contrat de maintenance avec le fournisseur/Habilitation du personnel	0.5	1.5
	Cibles	Mauvaise identification/Absence d'identification	1	3	1	3	Utilisation et lavage de la cible d'identification	Procédure de lavage de la cible/habilitation du personnel	0.7	2.1
	Informatique, utilisation du logiciel infecto-Maldi®	Absence, retard ou mauvais rendus de résultats	1	3	1	3	Outils informatiques/formation et information du personnel	Contrat de partage de la banque de données avec le service de parasitologie-mycologie de l'AP-HM/Habilitation du personnel	0.5	1.5
Méthode	Surveillance des dérives	Utilisation d'un équipement critique non conforme	2	2	2	8	Périodicité des maintenances/Maitrise 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	0.5	2
		Non respect des conditions d'utilisation des réactifs	1	3	2	6	Gestion de la température ambiante/Maitrise 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) Gedi15723/Passage des CIQ	0.5	6
	Main d'œuvre	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 Gedi15203/ Fiche d'habilitation des biologistes Gedi 15347/ Planning de formation / Plan de formation / Contrat DRH Gedi 8308	0.5
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
Connaissance du mode opératoire		Technique réalisée de manière non conforme	1	5	1	5	Disponibilité du mode opératoire	Mode opératoire de l'identification fongique par spectrométrie de masse Gedi 17585	0.7	3.5
	Transmission des résultats	Absence de transmission des résultats de la part de l'AP-HM	2	5	3	30	Disponibilité en personnel	Contrat d'engagement et de partage de données avec l'AP-HM (à réaliser)	1	30

Selon nos critères, il y a un paramètre de la maîtrise de risque qui n'est pas maîtrisé (main d'œuvre, transmission des résultats, absence de transmission des résultats de la part de l'AP-HM).

Ce point est classé sur notre échelle de criticité en C2 (criticité avec un impact faible sur la prise en charge du patient), ne demandant pas d'action dans l'immédiat mais pouvant faire l'objet d'action corrective.

Ainsi, une action corrective a été mise en place puisque depuis le 28/07/2016 une plateforme internet est disponible. Les spectres peuvent être directement analysés par les différents laboratoires effectuant cette technique. Le laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU de Rouen ne dépend plus de la disponibilité en personnel de l'AP-HM pour le rendu de résultat, il peut procéder à l'examen dans son ensemble de manière autonome.

Ce point est maintenant maîtrisé, cependant un nouveau point s'ajoute à la maîtrise de risque :

Main d'œuvre :

Point critique : transmission des résultats

Risque : absence de rendu de résultat par non disponibilité de la plateforme de consultation des spectres.

Fréquence : 1

Gravité : 3

Déteçtabilité : 1

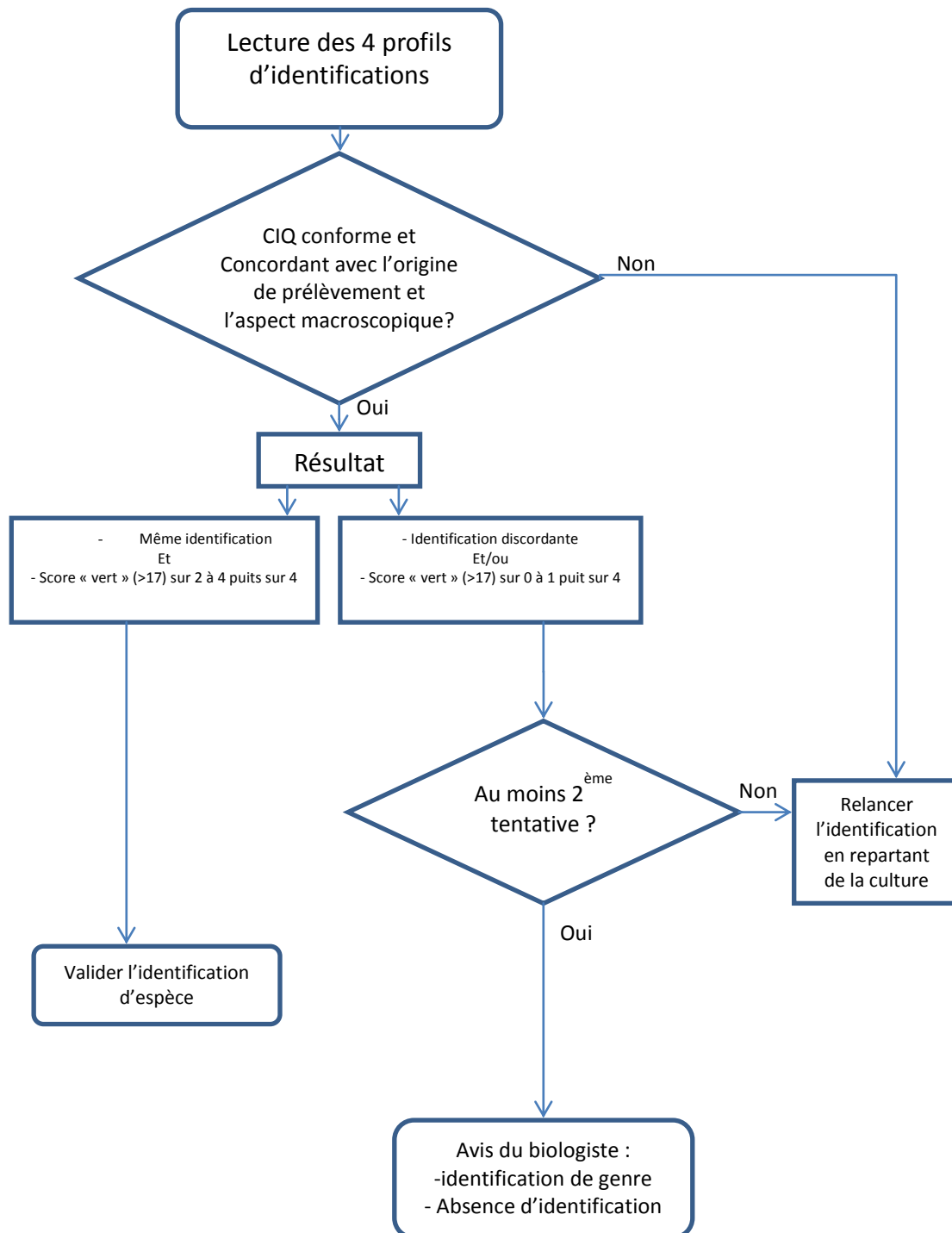
Eléments à maîtriser : connexion internet/mises à jour de la plateforme

Moyen de maîtrise : contrat de partage avec l'AP-HM

Maîtrise du risque : 0.7

Criticité : 2.1

2.3 Logigramme d'interprétation



3. Discussion

La validation de méthode précédemment décrite entre dans le futur dossier de demande d'accréditation portant sur l'identification fongique dans son ensemble.

Cette identification fongique correspond à un processus divisé en 7 sous-processus :

- **Sous-processus 1** : Ensemencement, déblayage.
- **Sous-processus 2** : Examen direct.
- **Sous-processus 3** : Identification des levures par spectrométrie de masse.
- **Sous-processus 4** : Identification des levures par automate Vitek.
- **Sous-processus 5** : Identification des filamenteux/dermatophytes par spectrométrie de masse.
- **Sous-processus 6** : Identification des filamenteux/dermatophytes par macroscopie/microscopie.
- **Sous-processus 7** : antifongigramme.

Ce processus général est en cours de rédaction et sera soumis à accréditation à l'horizon 2019-2020 selon le calendrier prévisionnel de la cellule qualité du laboratoire.

Dans le cadre du suivi des performances, il est prévu que les EEQ viennent agrémente la validation de méthode au niveau de l'exactitude de la technique.

Plusieurs éléments sont nécessaires afin de finaliser cette validation de méthode.

Il faut notamment que le laboratoire se procure une souche d'un champignon filamenteux ATCC pour poursuivre le CIQ déjà existant.

De plus, il est nécessaire de réaliser un contrat de partage de la bibliothèque de spectre avec l'AP-HM.

Il faut également prévoir l'intégration d'indicateurs qualités :

- Nombre annuel d'EEQ filamenteux discordants :

L'objectif de cet indicateur qualité est 0/an.

- Proportion des séries non validées pour non validation du CIQ et du contrôle négatif sur l'ensemble des séries :

L'objectif de cet indicateur est de <5%.

4. Conclusion

La validation de cette méthode d'identification est encore difficile à mettre en œuvre compte tenu du fait qu'il s'agisse d'une technique très récente et pour laquelle peu de laboratoires sont déjà accrédités. Cependant, l'ensemble des tests réalisés laissent présager d'un avenir prospère pour cette technique d'identification qui apporte de nombreux intérêts (simplicité, exactitude, reproductibilité, rapidité...).

Il reste un certain nombre d'éléments à intégrer au dossier de validation de méthode afin de la terminer.

5. Bibliographie

5.1 Documents associés

- Norme NF EN ISO 15189, version 2, 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.
- SH GTA 04, guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / Validation (portée B) des méthodes de biologie médicale.
- SH GTA 14, guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale.

5.2 Bibliographie

- 1) M. Gautier et al. « Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry : revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections », Clin. Microbiol. infect. 2014.
- 2) C. L'ollivier et al. « A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory », Medical Mycology, octobre 2013.
- 3) C. Cassagne et al. « Mould Routine identification in the clinical laboratory by Matrix-Assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry », PLoS ONE, décembre 2011.

6. Annexes

Document 17585v2 : Mode opératoire de l'identification fongique par spectrométrie de masse

Résumé

Le laboratoire du CHU de Rouen est accrédité dans les 3 familles, cependant l'unité de parasitologie-mycologie n'est pas encore accréditée. Ce mémoire expose le travail actuellement effectué dans ce laboratoire afin d'accréditer l'ensemble des techniques à l'horizon 2019-2020.

La spectrométrie de masse occupe aujourd'hui une place prépondérante en microbiologie de routine. Cette technique est encore peu utilisée en mycologie mais devrait connaître le même succès qu'en bactériologie.

L'accréditation des laboratoires nécessite que ces techniques soient validées. Ce mémoire comporte l'ébauche de la validation de méthode de l'identification fongique par spectrométrie de masse au laboratoire de mycologie du CHU de Rouen. Il intègre également la maîtrise des risques analytiques de ce sous processus. Plusieurs éléments doivent venir compléter ce dossier avant de le soumettre à accréditation (réalisation d'un contrat de partage de données avec un autre établissement, mise en place d'indicateurs qualités, utilisation d'une souche de référence comme CIQ,...).