



# FICHE TYPE QUALITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION  
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE  
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

*Note : le laboratoire se réfèrera au tableau du § 9.2.1 du Document Cofrac SH GTA 04 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B<sup>1</sup>) et complètera une fiche par examen de biologie médicale*

## EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE:

### Etude de la sensibilité des champignons aux antifongiques par la technique du E-TEST : ANTIFONGIGRAMME LEVURES ET CHAMPIGNONS FILAMENTEUX

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande :	Détermination de la sensibilité d'une souche de champignon aux antifongiques
Principe de la Mesure :	Le E- test combine les concepts des tests de dilution et de diffusion. il permet une semi-quantification rapide de la sensibilité testée sur un milieu gélosé. un gradient d'antifongique est utilisé pour déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en µg/ml de différents antifongiques vis à vis du champignon.
Méthode de mesure :	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Le E-test se compose d'une mince bandelette de plastique inerte (5 x 60 mm ). Un côté de ce support présente une échelle de lecture de CMI en µg/mL avec un code à deux lettres identifiant l'antifongique. Un gradient exponentiel prédéfini d' antifongique est immobilisé sur l'autre face du support.</li><li>2. Le gradient couvre une plage de concentrations de 0,002 à 32 µg/mL ou 0,016 à 256 µg/mL selon les antifongiques.</li><li>3. La bandelette appliquée sur le milieu RPMI ensemencé, l'antifongique est libéré de la surface du support et se dépose sur la surface de la gélose. Un gradient continu et exponentiel de concentrations se crée juste en dessous du support. Après l'incubation, qui rend la croissance fongique visible, une ellipse d'inhibition se forme. Les bords de l'ellipse d'inhibition indique la valeur de CMI, exprimée en µg/mL.</li></ol>
Marquage CE (Oui/Non)	Oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA

MISE EN OEUVRE	
Opérateurs (Habilitation) :	M. Pillot et S. Richard : Techniciennes C.Kauffmann-lacroix -: Biologiste
Procédure de validation :	BIOL-ANA-PR-001/ PARA -ANA-PR-001
Procédure de gestion de la portée flexible :	BIOL-ORG-PR-002 Gestion de la portée d'accréditation
Période d'évaluation :	2011-2012
Date de mise en service :	2012
Autorisation par :	Pr M.H.Rodier

<sup>1</sup> Dans le cadre d'une portée B, le laboratoire aura à sa charge d'établir un protocole d'évaluation propre aux items et aux examens concernés par la portée B.



# FICHE TYPE QUALITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION  
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE  
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	Souche de champignon levure ou champignon filamenteux	Eviter les repiquages (délais minimum et absence de reversion de la résistances aux azolés
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	- Préparation une suspension dans le NaCl 0,85% stérile - ajustement de la densité -Habilitation technicien Mycologie.	Ampoule stériles BioMérieux ref 20040 Maintenance du densitomètre
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	-Validation biologiste : interprétation et commentaires dans le cahier de paillasse Envoi au CNRMA des souches résistantes pour contrôle	<b>PARA-RH-DF-001</b> Habilitation parasitologie <b>PARA-PANA-MO-516</b> Souche mycologie : Identification, Sensibilité - Institut Pasteur Paris
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :	Incubation à l'étuve 37°C dans une poche plastique.	<b>BIOL-MET-PR-003</b> Gestion des enceintes thermostatées
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	<b>Qualité du Milieu RPMI – AES ref AEB 122180</b> <b>Bandelettes antifongique BioMérieux : 0.002-32)µg/mL</b> - AmphotericinB ref 526300 -Anidulafungin fourni par le laboratoire Astellas -Caspofungin ref 532400 -Itraconazole ref 525800 -Flucytosine- ref 510900 - Micafungin ref 535700 - Posaconazole-ref 532100 -Voriconazole ref 532800 <b>0.016-256 µg/mL</b> -Fluconazole ref 510800 Tween 80 Sigma Ref 064K0064	CQi souches de référence Tester et suivre les souches de contrôle grâce à un graphique de Levey-Jennings <b>PARA-ANA-MO-199</b> E-test antifongigramme levures <b>PARA-ANA-MO 200</b> E-test antifongigramme Champ. Filamenteux Utiliser une pince et des gants
Matériau de références (témoins) :	Souches de références sensibles et résistantes -1 <i>Candida</i> sensible et 1 <i>Candida krusei</i> résistant au fluconazole - 1 <i>Aspergillus fumigatus</i> sensible à l'itraconazole - Contrôle de qualité interlaboratoire	<b>PARA-ANA-MO-001</b> Préparation, contrôle et conservation des CQi  CHU Toulouse, Rennes Reims



# FICHE TYPE QUALITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION  
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE  
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

	Date	N° lot RPMI	C.Albicans		C.Krusei	
			AMPHO B 0,125 - 0,5 µg/mL	FLUCO 0,125 - 0,15 µg/mL	AMPHO B 0,5 - 2 µg/mL	FLUCO 128 - >256 µg/mL
1	21/05/2012	205903	0,25	0,25	1	128
2	21/05/2012	205903	0,38	0,75	1	192
3	04/2012	205903	0,125	0,38	1	256
4	29/03/2012	205319	0,125	0,38	1	256
5	03/12	201226	0,25	0,19	1	128
6	02/12	136222	0,094	0,75	0,75	256
7	29/12/2011	131425	0,38	6	0,75	32
8	29/12/2011	129106	0,38	296	0,75	256
9	07/11/2011	126528	0,38	0,38	1,5	256
10	29/09/2011	123720	0,38	0,75	0,5	64
11	29/09/2011	121311	0,19	0,5	0,5	64
12	08/08/2011	118930	0,25	0,5	0,38	256
13	01/08/2011	113744	1	32	2	64
14	16/05/2011	111718	0,5	0,19	1	256
15	16/05/2011	109628	0,25	0,125	1	192
16	16/05/2011	108105	0,25	0,19	1	128
17	05/04/2011	106824	0,064	0,25	1	256
18	15/03/2011	102045	0,25	1	1	256
19	21/02/2011	100631	0,38	0,5	2	128
20	24/01/2011	32319	0,125	2	0,75	32
21	04/11/2010	28115	0,19	0,5	0,75	128
22	23/09/2010	19618	0,125	12	1,5	128
23	03/08/2010	17203	0,25	0,38	1,5	256
24	15/07/2010	16119	0,19	0,38	0,75	256
25	15/07/2010	12408	0,19	0,38	1	256
26	10/05/2010	10613	0,25	0,38	1	256
27	10/05/2010	7431	0,19	0,5	2	128
28	17/03/2010	4634	0,064	1	0,75	256
29	15/02/2010	934922	0,094	0,19	0,38	192
30	15/02/2010	932921	0,094	0,19	0,38	64
31	12/01/2010	932022	0,19	0,38	1	96
parapsilosis						
My			<b>0.2483</b>	<b>0.495</b>	<b>0.9964</b>	<b>176.516</b>
Ecart type			<b>0.1796</b>	<b>0.3822</b>	<b>0.4412</b>	<b>82.570</b>

<b>Equipements :</b> <b>Exigences métrologiques*</b> <b>(définir les paramètres critiques)</b> <b>Exigences informatiques*</b> <b>spécifiques</b>	Densitomètre Fréquence de la maintenance  Etuve, Congélateur  Pipettes à piston	<b>PARA-MAT-MO-006.</b> Densitomètre attention à la date de péremption de la gamme d'étalonnage <b>BIOL-MET-PR-003</b> Gestion des enceintes thermostatées <b>BIOL-MET-PR-001</b> Suivi, maintenance, contrôle des pipettes automatiques
	* item à renseigner si nécessaire	



# FICHE TYPE QUALITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION  
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE  
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

### SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES (indispensable en portée B)

Résultats de l'étude des courbes  
ROC à partir d'une étude clinique :

C. Lacroix, A. Gicquel, F. Morio, J. Lambert, I. Accoceberry, E. Bailly, G. Desoubeaux, E. Collin, L. Feghoul, N. François, F. Gabriel, F. Gay-Andrieu, J. Guitard, C. Hennequin, C. Kauffmann-Lacroix, D. Lauzin, B. Sendid, O. Lortholary, M.-E. Bournoux Diversité et sensibilité des *Candida spp.* isolés en réanimation et en hématologie dans 8 hôpitaux universitaires: étude Epicandi Journal de Mycologie Médicale 2012 : 22, 106-107

### CONTAMINATION

Inter échantillon pour les  
paramètres sensibles :

En cas de résistance , vérifier que la soucheensemencée était pure

Inter réactif si nécessaire :

Vérification bibliographique :

Vérification sur site :

### COMPARAISON DE METHODES

Méthode précédente, autre méthode  
utilisée dans le laboratoire :

En cas de résistance envoi de la souche au CNRMA  
méthode EUCAST en milieu liquide: Protocole RESSIF -  
PARA-POAN-DI-518

Nombre de mesures :

Descriptif de l'échantillon étudié :

Méthode d'exploitation des résultats  
(études des concordances) :

Résultats et interprétations des  
discordances :

Conclusions et dispositions<sup>2</sup> :

Il existe des différences de résultats.  
Tous les compte – rendus du CNRMA sont adressés au  
clinicien

**Comparaison des résistances retrouvées au sein du laboratoire de mycologie de Poitiers avec ceux de l'Institut Pasteur (2012):**

Ø pas de résistance

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



# FICHE TYPE QUALITATIF

VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION  
(PORTEE B) D'UNE METHODE DE BIOLOGIE  
MEDICALE

RÉFÉRENCE : SH FORM 44

INDICE DE RÉVISION : 00

DATE D'APPLICATION : 15/04/11

référence :	Identification Poitiers :	Résistance trouvé à Poitiers :	Identification Inst Pasteur:	Résistance Institut Pasteur :
1201_202085	<i>C.glabrata</i>	<b>Fluco intérm.</b> (8µg/ml à 24h et 16µg/ml à 48h) <b>Vorico intérm.</b> (0.38µg/ml à 24h et 2µg/ml à 48h)	<i>C.glabrata</i>	Ø
1205_090173	<i>C.krusei</i>	<b>Ampho B</b> (3 µg/ml) <b>Fluconazole</b> (256 µg/ml)	<i>C.krusei</i>	Ø <b>Fluco intérm.</b> (32µg/ml)
1205_200685	<i>C.parapsilosis</i>	<b>Fluconazole</b> (4µg/ml à 24h et 192µg/ml à 48h)	<i>C.nivariensis</i>	Pb de mélange
1206_081795	<i>C.glabrata</i>	<b>Voriconazole</b> (0.38 µg/ml à 24h et >24µg/ml à 48h) <b>Fluconazole</b> (24µg/ml à 24h et 256 µg/ml à 48h)	<i>C.glabrata</i>	Ø  <b>Fluconazole</b> (>64µg/ml)
1206_291025	<i>C.parapsilosis</i>	<b>Caspo</b> (8µg/ml)	<i>C.parapsilosis</i>	Ø
1207_301819	<i>C.tropicalis</i>	<b>Fluconazole</b> (6µg/ml)	<i>C.tropicalis</i>	Ø
1208_231236	<i>C.parapsilosis</i>	<b>Caspo</b> (3µg/ml)	<i>C.tropicalis</i> <i>C.parapsilosis</i>	Pb de mélange (50%)
<b>CHAMPIGNONS FILAMENTEUX</b>				
1203_300231	<i>A. fumigatus</i>	<b>Itraconazole</b> (2 µg/ml)	<i>Asp. fumigatus</i>	Ø
1206_081572	<i>A. flavus</i>	<b>Ampho B</b> (3 µg/ml)	<i>Asp. flavus</i>	<b>Ampho B</b> (2µg/ml)
1209_051313	<i>A. niger</i>	Ø	<i>Asp.niger</i>	Ø

## ROBUSTESSE (indispensable en portée B)

Données bibliographiques :	Besoin de surveiller les résultats épidémiologique de la littérature Les seuils de sensibilité / résistance sont espèce-dépendante
Résultats :	
Conclusions et dispositions <sup>2</sup> :	Révision annuelle des modes opératoires

## STABILITE (indispensable en portée B)

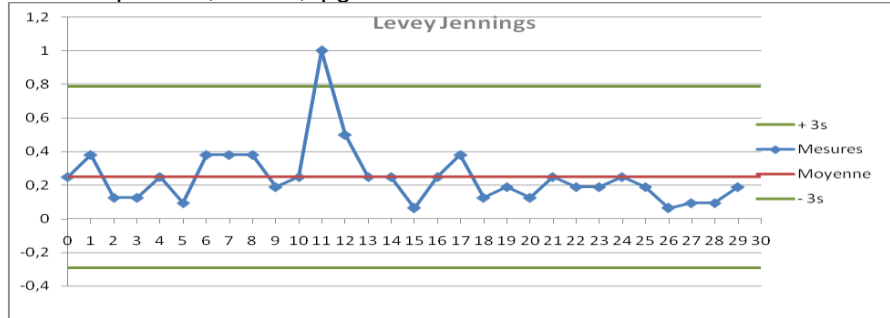
Données bibliographiques :	OUI
Résultats :	NA
Conclusions et dispositions <sup>2</sup> :	NA

Commentaires éventuels :

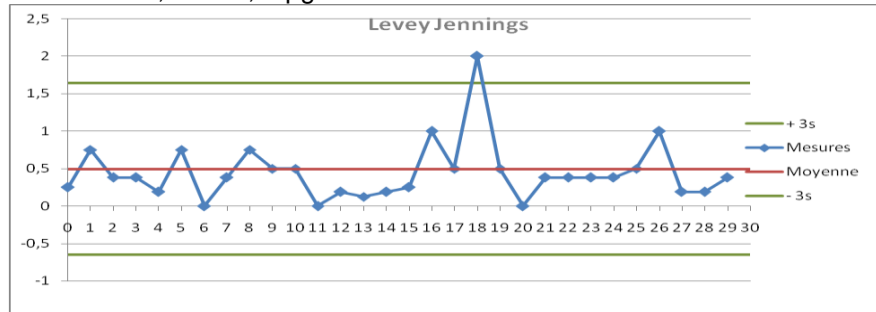
**Méthode validée**

## Annexes

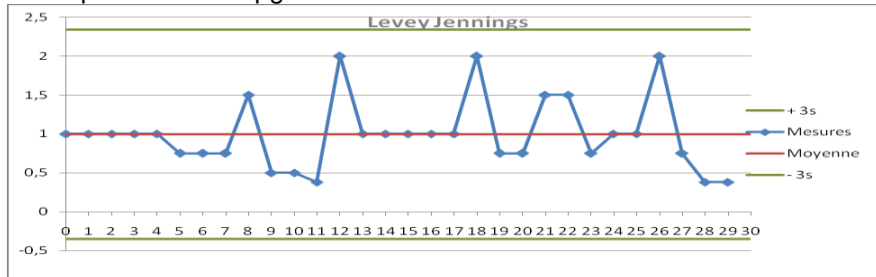
1- C.albicans Ampho B 0,125 - 0,5µg/L



2- C.albicans Fluco 0,125 - 0,15µg / mL



3- C.krusei ampho B 0.5 – 2 µg / mL



4- C.krusei fluco 128 - ≥ 256 µg / mL

