



Fiche type de vérification (portée A) d'une méthode de biologie médicale

Note : le laboratoire se référera au tableau du § 9 du document Cofrac SH GTA 04 rev 01 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complètera **une fiche par examen de biologie médicale**

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : Identification de levures par spectrométrie de masse
Processus simple <input checked="" type="checkbox"/> ; Processus complexe <input type="checkbox"/> (nombre de sous-processus : ...)

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
Sous-processus 1	Éléments à vérifier (argumentation)	Modalités de vérification/validation ¹ : <input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude <input checked="" type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique (Biblio) <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input type="checkbox"/> 10. Interférences <input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination <input type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence

Pour chaque étape, le laboratoire procédera à la vérification / validation des items attendus, et dupliquera autant que de besoin les pages 2 à 8 (évaluation des performances de la méthode) du présent document. Si un autre élément du processus lui semble critique, il devra vérifier / valider cette étape et le préciser dans la conclusion argumentée. C'est cette vérification qui lui permettra de maîtriser ce point critique.

Argumentaire (le cas échéant) :

¹ Note : Pour la vérification/validation de méthodes quantitatives, le renseignement des items 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu a minima. Pour la vérification/validation de méthodes qualitatives, le renseignement des items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, a minima.

Le types de vérification (bibliographique ou essais) est à indiquer.

L'absence d'applicabilité de certains items (NA) doit être justifiée dans le corps du document.



Fiche type de vérification (portée A) d'une méthode de biologie médicale

SOUS-PROCESSUS 1 : titre

Portée A ; Portée B (à justifier)

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte / Mesurande :	Identification de levures (genre et si possible espèce) à partir de colonies fongiques
Principe de la Méthode :	Spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Les molécules de l'échantillon et de la matrice sont ionisées par l'action d'un laser. Les ions formés sont accélérés par l'application d'un champ électromagnétique, puis séparés selon leur rapport m/z. L'intensité du signal de chaque ion m/z est mesurée, permettant l'acquisition d'un spectre de masse. Ce dernier est comparé à une base de données permettant l'identification fongique.
Type d'échantillon primaire :	Colonie sur milieu de culture fongique
Type de récipient, additifs :	NA
Prétraitement de l'échantillon :	Extraction par acide formique.
Unités :	NA
Critères d'interprétation ² :	Carré vert : concordance duplicate : OK % de probabilité >= 99% : OK < 99% : avis biologiste
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	PAR
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	Vitek MS : EXT45038
Référence du réactif :	Lames cibles jetables : ref. 410893410893 Matrice CHCA (acide cyanohydroxycinnamique) : ref. 411071 Acide formique : VITEK MS-FA ref 411072 Cryobille E. coli ATCC 8739 Cryobille ATCC C. glabrata MYA-2950
Matériau d'étalonnage (références) :	Cryobille E. coli ATCC 8739
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Calibration à chaque groupe d'acquisition

MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	M. Besse
Procédure de validation/mode opératoire :	7180-PR-023
Procédure de gestion de la portée flexible :	7180-PR-026
Période d'étude :	Du : 13/12/14 au 30/06/15
Date de 1 ^{ère} utilisation :	Mars 2013

² Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

SH-GTA04

9.4 Maîtrise des risques

Le tableau ci-dessous propose un modèle selon une analyse 5M et la méthode AMDEC. Le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé, certaines lignes devront être ajoutées et d'autres pourront être supprimées.

Etude AMDEC : Cf. Analyse de risque « 7180-IM-033 : Identification par Vitek MS

MAITRISE DES RISQUES (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité ³	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matière (échantillons)				
Milieu				
Matériel (équipements)				

³ A préciser par le laboratoire, par exemple 1 non critique – 5 très critique ;



Fiche type de vérification (portée A) d'une méthode de biologie médicale

MAITRISE DES RISQUES (Le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité ³	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matériel (réactifs)				
Méthode				
Main d'œuvre (Personnel)				

Fiche type de vérification (portée A) d'une méthode de biologie médicale

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon : [souches ATCC](#) et [échantillons patients](#).

REPETABILITE			
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>			
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Concordance	Conclusion
Candida albicans ATCC 90028	4	4/4	<p>Chaque souche a été passée 4 fois dans la même série.</p> <p>=> <i>Trichosporon</i>, <i>Saccharomyces</i> : en l'absence d'une bonne identification par Maldi-TOF les critères d'identification englobant l'aspect macroscopique de la culture et l'aspect microscopique des colonies sont un faisceau d'arguments pour aider au diagnostique.</p> <p>- Pour <i>Trichosporon</i> : 5 problèmes de dépôt, 1 identification correcte (<i>T. inkin</i> 99.9%) et 3 identifications d'un mauvais champignon : <i>C. glabrata</i> (47.9% et 75,5%), <i>C. sphaerica</i> (52%).</p> <p>- Pour <i>Saccharomyces</i> : 1 duplicate bien identifié (2x 99.9%) et l'autre duplicate : aucune identification (problème de dépôt).</p> <p>Pour toutes les autres souches : bonne identification rendue par le spectro.</p>
Candida glabrata ATCC 2950	4	4/4	
Candida parapsilosis ATCC 22019	4	4/4	
Candida krusei ATCC6258	4	4/4	
Candida tropicalis	4	4/4	
Candida kefyr	4	4/4	
Geotrichum candidum	4	4/4	
Trichosporon inkin	8	1/8	
Saccharomyces cerevisiae	4	2/4	
Rhodotorula mucilaginosa	4	4/4	

Fiche type de vérification (portée A) d'une méthode de biologie médicale

FIDELITE INTERMEDIAIRE			
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>			
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Concordance	Conclusion
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	5	4/5	<p>Chaque souche testée a été identifiée 5 fois (chaque fois en duplicate).</p> <p>- Dans la plupart des cas les erreurs d'identification sont dues à un problème de dépôt d'analyse : « Pas d'identification ou mauvais spectre lors de l'acquisition ».</p> <p>- Pour <i>C. krusei</i> : bonne identification mais degré de confiance de 88%, le duplicat rend une double identification (C. krusei et C membranifaciens) : donc résultat global = faible discrimination.</p> <p>- Un groupe d'acquisition n'a pas fonctionné à cause d'une « erreur de calibration ».</p> <p>- <i>Trichosporon</i> : pas d'identification sur le 1^{er} dépôt, mauvaise identification à 99,9% <i>Candida sphaerica</i> sur le duplicat:</p> <p>Sur un autre point de reproductibilité : 73,5% par <i>C. kefyr</i> (et le 2eme dépôt : <i>C. sphaerica</i>, <i>C. uniguttulatus</i> et <i>Malassezia furfur</i>).</p> <p>Sur un autre point : 99,9% <i>C. kefyr</i> et pb depot.</p> <p>Cependant, ces mauvaises identifications ont à chaque fois rendu une faible discrimination en résultat global. La réalisation d'une analyse en double dépôt prend ici tout son sens.</p>
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2950	5	4/5	
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	5	2/5	
<i>Candida krusei</i> ATCC6258	5	4/5	
<i>Candida tropicalis</i>	5	4/5	
<i>Candida kefyr</i>	5	5/5	
<i>Geotrichum candidum</i>	5	3/5	
<i>Trichosporon inkin</i>	5	0/5	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5	4/5	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	5	3/5	

VARIABILITE INTER-OPERATEURS	
Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>	
Opérateur évalué 1	<p style="text-align: center;">Méthode automatisée.</p> <p>Critère maîtrisé par l'habilitation des techniciens à la manipulation et à l'interprétation.</p> <p>Le maintien de compétence se fait par le passage d'un CQI mensuel (9130-IM-xx).</p>
Opérateur évalué 2	
...	

Fiche type de vérification (portée A) d'une méthode de biologie médicale

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite ⁴	Conclusion ⁵
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire de la conclusion : Absence de CQI externalisés.

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ) Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input checked="" type="checkbox"/>			
Echantillons	Performance au niveau du genre	Performance au niveau du genre	Conclusion ⁵
10	100%	100%	CONFORME

Argumentaire de la conclusion : CQE organisme UKNEQAS (6/an). Les espèces à identifier étaient principalement du genre Candida (les autres du genre : Saccharomyces, Trichosporon et Cryptococcus).

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>		
Vérification bibliographique	Auteur, Journal	Identification
Performance of mass spectrometric identification of bacteria and yeasts routinely isolated in a clinical microbiology laboratory using MALDI-TOF MS	Wang et al. J Thorac Dis 2014;6(5):524-533	97.5% Identification correcte 0.8% Mauvaise identification 1.5% Absence d'identification

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input checked="" type="checkbox"/> ; calcul <input type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Formule utilisée	Référence
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	Niveau 1 en valeur absolue ± U ou Niveau 1 en valeur absolue ± U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	Niveau 2 en valeur absolue ± U ou Niveau 2 en valeur absolue ± U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :	Niveau xxx en valeur absolue ± U ou Niveau xxx en valeur absolue ± U%	Exigences en fidélité, justesse et incertitude

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) :



Fiche type de vérification (portée A) d'une méthode de biologie médicale

LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)
Applicable ; non applicable

Limite de détection :	LD trouvée ou référence bibliographique
-----------------------	---

Argumentaire de la conclusion :

COMPARAISON DE METHODES :
Applicable ; non applicable (à justifier)

Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Références méthodes
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	Back-up ou absence d'identification par le SM : Galerie ID32C et Identification moléculaire (PCR/Séquençage maison ITS1 et D1D2)
Nombre de mesures :	30
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	NA
Méthode d'exploitation des résultats :	Concordance au niveau de l'espèce et du genre
Equation de la droite de régression :	NA
Diagramme des différences et/ou des rapports :	NA

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...)
Applicable ; non applicable (à justifier)

Limite de détection :		
Limite de quantification :		
Limite supérieure de linéarité :		

Argumentaire de la conclusion : [Les espèces indétectables sont décrites dans la base de données Knowledge Base VITEK MS Clinical Use V2.0 05/2012](#)

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire)
Applicable ; non applicable (à justifier)

Hémolyse	
Turbidité	
Bilirubine, ictère	
Médicaments	
...	

Argumentaire de la conclusion : [L'objet d'essai est uniquement des souches fongiques pures.](#)



Fiche type de vérification (portée A) d'une méthode de biologie médicale

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, β HCG, ...):	Alternance de puits avec matrice seule et de matrice + bactéries, répétée 6 fois
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...):	NA

Argumentaire de la conclusion : Aucune contamination inter-échantillon retrouvée dans l'essai sur site.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)	NA
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	Fiches techniques : Respect des recommandations du fournisseur. Matrice : à 2-8°C à l'abri de la lumière. Utilisation maximum 1 semaine après ouverture. Lames : stockage à 15-25°C jusqu'à péremption. Acide formique VITEK MS-FA : Conserver les tubes entre 2°C et 8°C. Utilisation 2 semaines maximum après ouverture du tube.
Données bibliographiques	Certificat de compatibilité des milieux (cf. Guide de qualification VITEK MS)

Argumentaire de la conclusion :

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>	
Valeurs de référence	Préciser les données fournisseur ou essai sur site

Argumentaire de la conclusion :

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : méthode conforme utilisée à partir du ../../....
Autorisée par : Signature