



# 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) :  <b>Identification de levures par spectrométrie de masse</b>
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 <sup>1</sup> : <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) :

<sup>1</sup> 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 <sup>2</sup> :	Carré vert : concordance duplicate : <b>OK</b> % de probabilité $\geq$ 99% : <b>OK</b> $<$ 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 <sup>ère</sup> utilisation :	Mars 2013

<sup>2</sup> 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

<b>MAITRISE DES RISQUES</b> (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 <sup>3</sup>	Eléments 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)				

<sup>3</sup> 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

<b>MAITRISE DES RISQUES</b> (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 <sup>3</sup>	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
<b>Matériel (réactifs)</b>				
<b>Méthode</b>				
<b>Main d'œuvre (Personnel)</b>				



# 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](#).

<b>REPETABILITE</b>			
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	4	4/4	Chaque souche a été passée 4 fois dans la même série.  => <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.  - Pour <i>Trichosporon</i> : 5 problèmes de <b>dépôt</b> , 1 identification correcte ( <i>T. inkin</i> 99.9%) et 3 identifications d'un <b>mauvais champignon</b> : <i>C. glabrata</i> (47.9% et 75,5%), <i>C. sphaerica</i> (52%).  - Pour <i>Saccharomyces</i> : 1 duplicate bien identifié (2x 99.9%) et l'autre duplicate : aucune identification (problème de <b>dépôt</b> ).  Pour toutes les autres souches : bonne identification rendue par le spectro.
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2950	4	4/4	
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	4	4/4	
<i>Candida krusei</i> ATCC6258	4	4/4	
<i>Candida tropicalis</i>	4	4/4	
<i>Candida kefyr</i>	4	4/4	
<i>Geotrichum candidum</i>	4	4/4	
<i>Trichosporon inkin</i>	8	<b>1/8</b>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	<b>2/4</b>	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4	4/4	

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

<b>FIDELITE INTERMEDIAIRE</b>			
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 <b>dépôt d'analyse</b> : « Pas d'identification ou mauvais spectre lors de l'acquisition ».</p> <p>- Pour <i>C. krusei</i> : bonne identification mais degré de confiance de <b>88%</b>, le duplicat rend une <b>double identification</b> (C. krusei et C membranifaciens) : donc résultat global = <b>faible discrimination</b>.</p> <p>- Un groupe d'acquisition n'a pas fonctionné à cause d'une « <b>erreur de calibration</b> ».</p> <p>- <i>Trichosporon</i> : <b>pas d'identification</b> sur le 1<sup>er</sup> dépôt, <b>mauvaise identification à 99,9%</b> <i>Candida sphaerica</i> sur le duplicat:</p> <p>Sur un autre point de reproductibilité : 73,5% par <i>C. kefyri</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. kefyri</i> et pb depot.</p> <p>Cependant, ces mauvaises identifications ont à chaque fois rendu une <b>faible discrimination</b> en résultat global. La réalisation d'une analyse en <b>double dépôt</b> 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 kefyri</i>	5	<b>5/5</b>	
<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	

<b>VARIABILITE INTER-OPERATEURS</b>	
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 <sup>4</sup>	Conclusion <sup>5</sup>
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 <sup>5</sup>
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
<b>Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :</b>	Formule utilisée	Référence
<b>Quantification de l'incertitude (niveau 1) :</b>	Niveau 1 en valeur absolue $\pm U$ ou Niveau 1 en valeur absolue $\pm U\%$	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
<b>Quantification de l'incertitude (niveau 2) :</b>	Niveau 2 en valeur absolue $\pm U$ ou Niveau 2 en valeur absolue $\pm U\%$	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
<b>Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :</b>	Niveau xxx en valeur absolue $\pm U$ ou Niveau xxx en valeur absolue $\pm U\%$	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

<b>CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B)</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, $\beta$ 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.

<b>ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS</b> (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 :

<b>INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B)</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 :

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