

EN TETE DE L'HOPITAL ET DU LABORATOIRE	VERIFICATION DE METHODE PCR EN TEMPS REEL <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECI</i> METHODE QUANTITATIVE (PORTEE A OU PORTEE B SI TECHNIQUE MAISON NON PUBLIEE)	PROCEDURE VERSION DATE D'APPLICATION
---	---	---

Note : le laboratoire se réfèrera au tableau du § 9.1.1 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) et complètera **une fiche par examen de biologie médicale**

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE : Détection d'ADN de <i>Pneumocystis jirovecii</i> par PCR en temps réel

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte/Mesurande :	Gène de <i>Pneumocystis jirovecii</i> ciblé
Principe de la Mesure :	Extraction d'ADN et PCR en temps réel avec sonde (préciser le type de sonde). Utilise un couple d'amorces et une sonde spécifiques de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .
Méthode de mesure :	Obtention d'une courbe d'amplification dont la valeur du Ct est proportionnelle à la quantité d'ADN fongique présent initialement dans la prise d'essai.
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) :	Prélèvements respiratoires et pulmonaires (LBA, LROP, crachats induits, crachats, aspirations bronchiques, liquide pleural, biopsies).
Type de récipient, Additifs (tubes, ...) :	Pot stérile
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	LBA, LROP : décrire la procédure de centrifugation
Unités :	Cp et/ou nombre de copies du gène et/ou nombre de <i>Pneumocystis</i>
Intervalles de référence¹ :	Cp seuil pour la positivité et pour l'interprétation des résultats (colonisation versus infection)
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui ou non utilisation ou non d'un kit commercialisé
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA
Instrument (analyseur automatique, etc.) :	Appareil de PCR en temps réel
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :	Citer le kit commercial ou les réactifs utilisés
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique :	NA
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Décrire la gamme utilisée pour la quantification (dilutions d'ADN plasmidique, de <i>Pneumocystis</i> quantifiés,...)

MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) habilité(s) ayant réalisé la vérification de méthode :	Tous les techniciens habilités en Biologie Moléculaire.
Procédure de validation :	Citer la procédure (référence)
Procédure de gestion de la portée flexible :	Citer la procédure (références)
Période d'évaluation :	
Date de mise en service :	
Autorisation de mise en service par :	Biologiste responsable

¹ Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...



EN TETE DE L'HOPITAL ET DU LABORATOIRE	VERIFICATION DE METHODE PCR EN TEMPS REEL <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECI</i> METHODE QUANTITATIVE (PORTEE A OU PORTEE B SI TECHNIQUE MAISON NON PUBLIEE)	PROCEDURE VERSION DATE D'APPLICATION
---	---	---

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	Prélèvements respiratoires et pulmonaires (LBA, LROP, crachats induits, crachats, aspirations bronchiques, liquide pleural, biopsies). Tubes ou flacons adéquats, stériles	Manuel (ou procédures) de prélèvements Catalogue des analyses Procédure de réception des échantillons Gestion des non-conformités pré-analytiques
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Centrifugation des LBA et LROP	Procédure de prétraitement des échantillons Qualification de l'installation, contrat de maintenance, suivi métrologique et cahier de vie des centrifugeuses
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Qualification/compétence et habilitation du personnel technique et des biologistes Maintien des compétences	Fiche de poste Fiche d'habilitation technicien Biologie Moléculaire Fiche d'habilitation des biologistes Procédures d'habilitation et de suivi
Conditions ambiantes requises (ex : Température, organisation des locaux, éclairage,...) :	Contamination des échantillons par de l'ADN de <i>P. jirovecii</i> présent dans l'air	Locaux aménagés et circuit à sens unique : - Pièce de réception et enregistrement des échantillons - Pièce d'extraction d'ADN - Pièce de préparation du Mix (sans ADN) - Pièce post-amplification Extraction d'ADN sous PSM Procédure de nettoyage des surfaces Respect de la marche en avant et des règles de manipulation. Inclusion d'une étape de prétraitement des échantillons par l'UNG dans le cycle de PCR temps réel. Contrôle de non contamination (extraction et mix) inclus dans chaque série.
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	Citer le kit commercial ou les réactifs utilisés	Procédure de gestion des commandes et des stocks Contrôle à réception (date de péremption, validité du lot) Traçabilité des lots Respect de la notice du kit et suivi des versions Procédure de gestion des alertes de réacto-vigilance. Suivi de la stabilité des CIQ à chaque changement de lot



EN TETE DE L'HOPITAL ET DU LABORATOIRE	VERIFICATION DE METHODE PCR EN TEMPS REEL <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECI</i> METHODE QUANTITATIVE (PORTEE A OU PORTEE B SI TECHNIQUE MAISON NON PUBLIEE)	PROCEDURE VERSION DATE D'APPLICATION
---	---	---

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
		de sonde ou d'amorces
Matériau de référence :	NA	NA
Contrôles qualité :	CIQ négatifs : témoin d'extraction d'ADN, témoin Mix CIQ positifs : au moins 2 points de gamme pour la quantification et 2 échantillons patients positifs (2 niveaux) EEQ	Procédure de Gestion des CIQ et EEQ CIQ négatifs et positifs passés à chaque série et suivi du Cp des points de gamme et de la quantification des échantillons patients Procédure d'exploitation des EEQ
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	PSM Appareil de PCR en temps réel Pipettes Réfrigérateurs, congélateurs	PSM, thermocycleur, enceintes réfrigérées : qualification de l'installation et contrat de maintenance Thermocycleur et pipettes critiques : cahier de vie Pipettes critiques et enceintes réfrigérées : suivi métrologique Suivi des CIQ

* item à renseigner si nécessaire



EN TETE DE L'HOPITAL ET DU LABORATOIRE	VERIFICATION DE METHODE PCR EN TEMPS REEL <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECI</i> METHODE QUANTITATIVE (PORTEE A OU PORTEE B SI TECHNIQUE MAISON NON PUBLIEE)	PROCEDURE VERSION DATE D'APPLICATION
---	---	---

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) :

Répétabilité:

Etude sur au moins 6 valeurs pour un échantillon fortement positif et pour un échantillon faiblement positif (patient ou plasmide).

La répétabilité peut être évaluée pour les Cp et pour les quantités calculées.

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne ²	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs ³)	Conclusion ⁴
Echantillon niveau 1							
Echantillon niveau 2							

Conclusions :

Fidélité intermédiaire :

Etude sur au moins 6 valeurs pour un échantillon fortement positif et pour un échantillon faiblement positif (patient ou plasmide).

La fidélité intermédiaire peut être évaluée pour les Cp et pour les quantités calculées.

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne ²	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs ³)	Conclusion ⁴
Echantillon niveau 1							
Echantillon niveau 2							

Conclusions :

² Nombre de chiffres significatifs

³ Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

⁴ Conforme/non conforme



EN TETE DE L'HOPITAL ET DU LABORATOIRE	VERIFICATION DE METHODE PCR EN TEMPS REEL <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECI</i> METHODE QUANTITATIVE (PORTEE A OU PORTEE B SI TECHNIQUE MAISON NON PUBLIEE)	PROCEDURE VERSION DATE D'APPLICATION
---	---	---

Justesse (approche de la) : NA

Cas des contrôles internes externalisés

Echantillons	Nombre (N)	Valeurs Labo ²	Cible (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) /groupe de pairs	Biais (%) /moyenne générale	Biais (%) limite ³	Conclusion ⁴
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Conclusions :

Exactitude :

Cas des contrôles externes ponctuels

Lister les résultats des EEQ

Echantillons	Nombre (N)	Valeur Labo ⁵	Cible (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) /groupe de pairs	Biais (%) /moyenne générale	Biais (%) limite ⁶	Conclusion
Echantillon CQN								
Echantillon ponct xy								
Echantillon ponct zy								

Conclusions :

INCERTITUDES (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :	
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	NA
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	NA
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	NA
Interprétation :	NA

Conclusions :

⁵ Nombre de chiffres significatifs

⁶ Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.



EN TETE DE L'HOPITAL ET DU LABORATOIRE	VERIFICATION DE METHODE PCR EN TEMPS REEL <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECII</i> METHODE QUANTITATIVE (PORTEE A OU PORTEE B SI TECHNIQUE MAISON NON PUBLIEE)	PROCEDURE VERSION DATE D'APPLICATION
---	--	---

COMPARAISON DE METHODES :	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Indiquer les sensibilités et spécificités des différentes méthodes en fonction du type d'échantillon (LROP, crachat, crachat induit, LBA) (cf par exemple, Harris et al. 2011, Annexe 1)
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou EBMD :	Comparaison à la méthode de PCR précédente si déjà mise en place. Interprétation en fonction des résultats de l'examen microscopique (colorations, Immunofluorescence indirecte)
Nombre de mesures :	Au minimum 30
Intervalle de comparaison adaptée à l'activité du laboratoire :	Echantillons congelés ou échantillons de contrôle connus, positifs ou négatifs avec l'ancienne méthode. Tester les différentes matrices possibles. Inclure des patients atteints de pneumocystose prouvée (examen microscopique positif) et des patients colonisés
Méthode d'exploitation des résultats :	Etude des concordances : Vérification de la concordance des 2 PCR pour les échantillons testés. Confrontation aux résultats des techniques microscopiques et aux données cliniques pour la différenciation infection/colonisation.
Equation de la droite de régression :	Non applicable
Diagramme des différences et/ou des rapports :	Non applicable
Conclusions et dispositions⁷ :	Sensibilité au moins équivalente. Praticabilité supérieure. Préciser les modalités de rendu des résultats. Interprétation en fonction du contexte clinique à expliciter sur le compte-rendu.

Référence

HARRIS JR, MARSTON BJ, SANGRUJEE N, DUPLESSIS D, PARK B. Cost-effectiveness analysis of diagnostic options for *Pneumocystis pneumonia* (PCP). PLoS One. 2011. 6(8):e23158.

INTERVALLE DE MESURE (indispensable en portée B) (si possible et pertinent, ex : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH) :	
Mode de détermination :	Gamme de dilution d'ADN plasmidique ou de <i>Pneumocystis</i>
Limite inférieure de linéarité (de quantification)/ Profil de fidélité :	Dernier point détecté en qPCR avec une pente acceptable de la droite de calibration
Limite supérieure de linéarité :	Point de concentration le plus élevé détecté en qPCR avec une pente acceptable de la droite de calibration

⁷ Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation **transitoire et documentée** d'un facteur de correction).



EN TETE DE L'HOPITAL ET DU LABORATOIRE	VERIFICATION DE METHODE PCR EN TEMPS REEL <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECII</i> METHODE QUANTITATIVE (PORTEE A OU PORTEE B SI TECHNIQUE MAISON NON PUBLIEE)	PROCEDURE VERSION DATE D'APPLICATION
---	--	---

INTERFERENCES (ex : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) :	
Vérification bibliographique :	Inhibition possible de la réaction de PCR, notamment en présence de sang (hémoglobine)
Vérification :	Recherche d'inhibiteurs de PCR sur chaque échantillon (référence procédure)

CONTAMINATION (indispensable en portée B et pour les paramètres sensibles en portée A)	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, β HCG) :	Oui : à tester pour la méthode d'extraction (au minimum 6 positifs et 6 négatifs) et pour la PCR si PCR en microplaques
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides) :	NA
Vérification bibliographique :	
Vérification :	Absence de contamination inter-échantillons

Commentaires éventuels :

Conclusion : L'ensemble des performances est vérifié. La méthode est déclarée apte par rapport aux besoins du laboratoire et à l'utilisation prévue des résultats.

Méthode validée le :

Par :

Utilisation sous accréditation à partir du :



<p>EN TETE DE L'HOPITAL ET DU LABORATOIRE</p>	<p>VERIFICATION DE METHODE PCR EN TEMPS REEL <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECII</i> METHODE QUANTITATIVE (PORTEE A OU PORTEE B SI TECHNIQUE MAISON NON PUBLIEE)</p>	<p>PROCEDURE VERSION DATE D'APPLICATION</p>
--	---	--

Annexe 1 : Sensibilité et spécificité des méthodes pour le diagnostic des pneumocystoses (Harris et al. 2011)



**VERIFICATION DE METHODE
PCR EN TEMPS REEL
PNEUMOCYSTIS JIROVECI
METHODE QUANTITATIVE (PORTEE A OU
PORTEE B SI TECHNIQUE MAISON NON
PUBLIEE)**

PROCEDURE
VERSION
DATE D'APPLICATION

Diagnostic	Specimen collection	Sensitivity	Specificity	Cost (USD)
CXR	None	0.86	0.40	\$40.00
DQ	Oral wash	0.30	1.00	\$2.32
	Expectorated sputum	0.60	1.00	\$2.22
	Induced sputum	0.75	1.00	\$8.72
	Bronchoalveolar lavage	0.75	1.00	\$77.12
GMS	Oral wash	0.30	1.00	\$4.21
	Expectorated sputum	0.52	0.95	\$4.11
	Induced sputum	0.70	0.96	\$10.61
	Bronchoalveolar lavage	0.82	0.98	\$79.01
TBO	Oral wash	0.30	1.00	\$0.93
	Expectorated sputum	0.71	1.00	\$0.83
	Induced sputum	0.75	1.00	\$7.33
	Bronchoalveolar lavage	0.80	1.00	\$75.73
CW	Oral wash	0.30	1.00	\$2.94
	Expectorated sputum	0.33	1.00	\$2.84
	Induced sputum	0.57	1.00	\$9.34
	Bronchoalveolar lavage	0.78	1.00	\$77.74
IFA	Oral wash	0.30	1.00	\$20.79
	Expectorated sputum	0.50	1.00	\$20.69
	Induced sputum	0.81	1.00	\$27.19
	Bronchoalveolar lavage	1.00	1.00	\$95.59
PCR	Oral wash	0.71	0.99	\$8.78
	Expectorated sputum	0.85	0.99	\$8.68
	Induced sputum	0.94	0.99	\$15.18
	Bronchoalveolar lavage	1.00	0.94	\$83.58
nPCR	Oral wash	0.83	1.00	\$10.32
	Expectorated sputum	0.91	1.00	\$10.22
	Induced sputum	1.00	1.00	\$16.72
	Bronchoalveolar lavage	1.00	0.89	\$85.12
rtPCR	Oral wash	0.89	0.94	\$13.84
	Expectorated sputum	0.92	0.94	\$13.74
	Induced sputum	0.95	0.90	\$20.24
	Bronchoalveolar lavage	0.99	0.80	\$88.64

CXR: Chest x-ray; DQ: Diff-Quick; GMS: Grocott's Methenamine Silver Stain; TBO: Toluidine Blue O; CW: Calcofluor white stain; IFA: Immunofluorescence; PCR: Polymerase chain reaction; nPCR: nested PCR; rtPCR: real-time (quantitative) PCR.

doi:10.1371/journal.pone.0023158.t001

