

Qualité des Essais dans les Laboratoires Vétérinaires d'Analyses: Exigences spécifiques pour la réalisation des tests ELISA et PCR

Département de Saône-et-Loire



Rappels:

Objectif de la démarche qualité en laboratoire d'analyses

= assurer la fiabilité des résultats

- maîtriser les différents points critiques de l'analyse

points critiques propres à chaque technique parmi les 5M

- assurer la reproductibilité des résultats

pratiques homogènes; contrôle des points critiques

- déceler une éventuelle dérive à l'origine de résultats Positifs ou Négatifs en excès

suivi d'un traceur faiblement positif (cartes de contrôles ou équivalent)

Rappels:

Référentiels utilisés en laboratoires vétérinaires d'analyses

Référentiels généraux:

- NF EN ISO/ CEI 17025 – chapitre 5/ Lab REF 02 du COFRAC
- OIE: Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious diseases; Manuel Terrestre – chapitres 1.1.3 et 1.1.4

Référentiels spécifiques selon le type d'analyse:

- **ELISA:** Programme 109 du COFRAC, Normes NF U47-019; NF U47-020
- **PCR en Santé animale:** Manuel terrestre OIE, ch. 1.1.5; XP U47-600 Partie 1 (utilisateurs) – partie 2 (développeurs de méthodes)

Main d'œuvre (ch.5.2) : Qualification sur la base d'un niveau d'études, formation, expérience et/ou de compétences démontrées **– Habilitation initiale et maintien des compétences**

Personnel technique:

- procédure de qualification = acquisition des compétences
- habilitation initiale avec autorisation de réaliser les essais
- maintien des compétences (contrôles internes, EIL, évaluations internes...)

Signataires des rapports d'analyses:

- compétence technique; connaissance des points critiques de l'analyse; connaissances réglementaires
- maintien des compétences

Cas particuliers des Avis et Interprétations

Exemples qualification personnel technique LDA71:

Qualification niveau LDA

- pipetage; utilisation centrifugeuse
- prise de connaissance des procédures / observation
- formation par tutorat avec personne habilitée

Qualification ELISA

- dépôt des échantillons, TP, TN et traceur en double avec personne habilitée
- réalisation ELISA sur échantillons de statut connu en double avec personne habilitée – écart autorisé $\pm 20\%$
- lecture et validation technique de la plaque avec personne habilitée

Qualification PCR en temps réel

- extraction des AN en double avec personne habilitée sur échantillons de statut Positif avec différents niveaux de positivité, TP, TN, sentinelle – écart maximum autorisé ± 1 Ct
- réalisation de la PCR en double avec personne habilitée – écart maximum autorisé ± 0.5 Ct
- lecture-interprétation des signaux (± 0.5 Ct) et validation technique du run (TP, TN, CPI)

Installations et conditions ambiantes (ch. 5.3): surveillance, maîtrise et enregistrement des conditions ambiantes conformément aux exigences ou lorsqu'elles influencent la qualité des essais

= température, séparation des activités incompatibles, accès restreint; plan de nettoyage - désinfection...

ELISA Programme 109 – NF U47-019

- parfait état de propreté – plan de nettoyage adapté
- zones appropriées réservées à cet usage ou démontrer non-interférence avec autres activités
- température des enceintes, des automates ELISA, conditions ambiantes

PCR XP U47-600 ch. 5

Organisation des différents flux (personnel, échantillons, matériel, air) et des activités doit limiter risque d'inter-contamination par aérosols contenant AN

- agencement des locaux = séparation physique en 3 zones (réalisation du mélange réactionnel sauf AN; extraction des AN et dépôt dans mix –amplification- étapes post-PCR)
- maîtrise des flux – circuits: air; personnel; documents, réactifs, matériels, amplicons, déchets
- entretien des locaux: plan d'entretien respectant flux, du plus « propre » au plus « sale »

Matrice (ch. 5.8): conditions de transport, réception, manutention, stockage; élimination pour protéger intégrité de l'échantillon et assurer sa traçabilité

ELISA NF U47-020

- précautions de sécurité ex: *Coxiella burnetii*, *Brucella spp* dans le lait
- conditions de recevabilité: intégrité du contenant; qualité physico-chimique ex: hémolyse primaire compatible / hémolyse secondaire avec multiplication bactérienne incompatible
- préparation de l'échantillon pour analyse: éviter les inter-contaminations; séparation sérum-plasma de la phase cellulaire (cas particulier des sangs d'oiseau); réalisation des mélanges
- conservation

PCR XP U47-600 (ch. 9)

- décrire pour le client/préleveur pour chaque PCR: matrices compatibles, conditions de prélèvement et de transport; critères d'acceptation
- prélèvement: veiller à non-inter-contamination; type de conditionnement compatible avec PCR (ex tube EDTA/hépariné)
- transport: préserver intégrité du génome du pathogène cible = sous-couvert du froid sous 24h-48h voire congélation pour organes et cible ARN (cf Annexe A)
- au laboratoire: précautions de sécurité particulières / manipulation d'agents responsables de zoonoses
- au laboratoire: précautions pour limiter les inter-contaminations

Equipement et Traçabilité du mesurage (ch. 5.5 et 5.6): notion d'équipement critique pour l'analyse – identification, vérification de conformité lors de la mise en service, instructions d'utilisation (personnel qualifié), procédures de maintenance, contrôle métrologique, étalonnage (Matériaux de référence) – logiciel de calcul

ELISA U47-019 (ch. 8.1.-2, -3, -4, -6, 7, -8, -9)

- distribution des échantillons: inter-contaminations non décelables en ELISA; durée
- instruments volumétriques: vérifier justesse et fidélité
- distribution des réactifs: volume
- laveur de plaques: circuits rincés en début et fin d'utilisation; entretien des têtes de lavages

ELISA U47-019 (ch. 8.1.-2, -3, -4, -6, 7, -8, -9)

- automates ELISA: respect des délais des étapes, températures d'incubation (notamment délais d'attente) ou montrer que dépassement n'a pas d'incidence
- spectrophotomètre: à chaque fois que cela s'avère critique pour le résultat final vérification de l'exactitude, répétabilité inter-canaux et inter-essais, linéarité
- informatique de calcul: utilisation si volume d'analyses et/ou risque d'erreur de calcul – doit être validé par jeu d'essais avec valeurs au changement d'interprétation

PCR XP U47-600 (ch. 7)

- thermocycleurs: le laboratoire doit réaliser des enregistrements des couples température/durée représentatifs des couples thermiques pour surveiller justesse et homogénéité

PCR XP U47-600 (ch. 7)

- thermocycleurs: exigences sur moyens de vérification, sur modalités de vérification des températures
- thermocycleurs en temps –réel: vérification des performances optiques selon instructions fournisseurs (outils d'émission et détecteurs); en absence de dispositifs raccordés, vérification de l'homogénéité par épreuve biologique ou chimique possible
- centrifugeuses: vérification par tachymètre si une étape de centrifugation est jugée comme critique
- électrophorèse en gel: vérification de performance de la migration par témoins, respect des spécifications pour appareils de visualisation
- automates d'extraction des AN: vérification volumes, températures, durées

Méthodes d'essai – Mode opératoire (ch. 5.4): utilisation de méthodes appropriées avec description du mode opératoire (utilisation équipement, manutention des objets d'essai, validation technique de la série d'analyses)

- sélection des méthodes: selon spécification du client; de préférence méthodes normalisées, ou méthodes internes si validées et appropriées à l'usage - sélection parmi des kits commerciaux agréés
- adoption de la méthode = vérification préalable de la capacité à mettre en œuvre la méthode par obtention des performances attendues
- description des modalités de validation analytique des résultats

ELISA

- sélection du kit ELISA: si maladie réglementée, choix parmi kits agréés (lot par lot) par Laboratoire de référence; critères à prendre en compte (en plus de l'aspect financier): détermination des sensibilités et spécificités diagnostiques sur échantillons positifs et négatifs internes (adaptation du seuil fournisseur à la situation épidémiologique locale); répétabilité; facilité d'utilisation dans l'organisation du laboratoire...
- application stricte du protocole fournisseur: toute modification doit faire l'objet d'une étude documentée sur absence d'incidence

ELISA

- échantillons de contrôles: au moins 1 TP et 1 TN fournisseur par plaque, traités si possible comme les échantillons sauf indication contraire du protocole; surveillance d'éventuelle variation significative des valeurs; si utilisation valeur moyenne TP et/ou TN, fixer écart maximum entre chaque valeur entrant dans la moyenne (ex: $\pm 10\%$)
- échantillons pour le contrôle de la fidélité intermédiaire: matériau de référence interne (MRI) faiblement positif, doit être placé à chaque série d'épreuve (recommandation pour dépôt sur chaque plaque); suivi du % obtenu pour MRI (carte de contrôle)
- matériau de référence: certifiés, externes ou internes; utilisation si existent et sont disponibles selon fréquence définie (adaptée au volume d'analyses)

ELISA

- adoption de méthode: échantillons de statut connu (ex: panel issu d'un CIL ou interne au laboratoire), contrôles positifs et négatifs fournisseur et MR en répétabilité conformes
- acceptation d'un nouveau lot: comparaison avec ancien lot sur panel échantillons de statut connu, TP, TN, MR et MRI
- validation analytique de la série: valeurs TP, TN et MRI conformes
- validation signataire: observation de chaque plaque dans son ensemble (concordance avec lecture spectrophotomètre, inter-contaminations, dérive des valeurs de TP/TN, échantillons proches du seuil...)

PCR

- sélection du kit: parmi kits agréés par Laboratoire de référence, d'après dossier de validation du fournisseur, caractéristiques adaptées à situation épidémiologique locale et au type d'isolats, adaptation au type de matériel disponible (ex: fluorophores utilisés pour la PCR en temps réel)
- application stricte du protocole fournisseur, si modification des conditions opératoires, étude d'impact et selon niveau de criticité défini, soit « rien », soit nouvelle adoption de méthode, soit nouvelle validation de PCR, soit nouvelle validation de méthode

PCR XP U47-600 partie 1 (ch.10)

- Témoin positif PCR: témoin fournisseur, 1 par série
- Témoin négatif de processus analytique: au moins 1 par série, nombre et répartition adaptés ex: 1 pour série de 24 colonnes d'extraction, 4 par plaque d'extraction
- Témoin positif cible = « MRI »: 1 par série analytique; endogène ou exogène, proche de la LDméthode (1 à 100 fois), valide ensemble du processus
- Témoin positif non cible = « CPI »: 1 par échantillon; endogène ou exogène

PCR XP U47-600 partie 1 (ch. 11-12)

- adoption de méthode: confirmation des performances de la PCR et de la méthode complète (extraction + PCR), différence selon méthode qualitative et quantitative
- acceptation d'un nouveau lot de réactifs-consommables critiques: soit avant leur utilisation par comparaison avec ancien lot sur échantillons de statut connu, « MRI »...; soit a posteriori sur validité des témoins
- validation analytique de la série: TP, TN, Témoin positif cible conformes
- validation analytique par échantillon: Témoin positif non cible conforme
- validation signataire: analyse globale et individuelle des signaux, allure et cohérence des courbes, profils de migration...

Incertitudes de mesure – Incertitude sur le résultat

Obligation de l'évaluer, mention sur le rapport d'analyse fonction de la demande du client

- identification des facteurs générateurs d'incertitude (sources de variabilités parmi les 5M), déterminer leur niveau d'influence sur le résultat (ex: criticité définie par combinaison « gravité, occurrence, probabilité de non détection de la dérive ») et décrire les moyens de maîtrise mis en place
- pour méthode qualitative avec résultat obtenu par données numériques, possibilité d'utiliser cette valeur pour évaluer la fidélité de la méthode avec suivi de la dispersion du MRI

ELISA **NF U47-019** (ch.11)

- incertitude du laboratoire « au seuil » ou incertitude moyenne sur le résultat d'après données fabricant, CIL...
- choix du MRI: matrice identique si possible, échantillon positif proche du seuil
- choix du modèle de la carte de contrôle (**normes NF X 06-031-0; NF ISO 7870-1**) : utiliser MRI en conditions de répétabilité intra-essai et fidélité intermédiaire (ex: 3 dépôts sur une plaque, sur 10 séries) pour déterminer moyenne et écart-type (zones de surveillance-contrôle)
- suivi en routine du MRI sur carte de contrôle: règles de Westgard + si « anomalie » recherche cause (ex: MRI mal conservé, détérioration des réactifs, biais...)
- lorsque l'incertitude estimée a un impact potentiel sur le résultat d'analyse et selon le contexte épidémiologique, il est recommandé au laboratoire d'attirer l'attention sur un résultat proche du seuil

PCR XP U47-600 partie 1 Annexe D informative

- témoin positif cible
- soit suivi Ct du traceur cible
- soit suivi du delta de Ct entre traceur cible et témoin positif

Validation de Méthode

Ex: PCR XP U47-600 partie 2

- distinction entre validation PCR et validation méthode complète
- étude de faisabilité
- optimisation
- caractérisation de la PCR: spécificité analytique (inclusivité, exclusivité); LD; linéarité et LQ
- caractérisation de la méthode complète: LD; spécificité et sensibilité diagnostiques; justesse et fidélité par élaboration du profil d'exactitude
- suivi des performances et de l'adéquation de la méthode

Conseil général de Saône-et-Loire

LDA71

+33 385 33 52 20

lda71@cg71.fr

www.cg71.fr

Département de Saône-et-Loire

