



Essais en immuno-sérologie animale

LAB GTA 27 - Révision 03

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI





SOMMAIRE

1	OBJET	3
2	REFERENCES ET DEFINITIONS	3
2.1	REFERENCES	3
2.2	ABREVIATIONS ET DEFINITIONS	4
3	DOMAINE D'APPLICATION	4
4	MODALITES D'APPLICATION	5
5	MODIFICATIONS APORTEES A L'EDITION PRECEDENTE	5
6	EXPRESSION DE LA PORTEE D'ACCREDITATION	5
7	GUIDE DE LECTURE DES EXIGENCES D'ACCREDITATION ET RECOMMANDATIONS	6
7.1	GENERALITES	6
7.2	PERSONNEL	6
7.3	INSTALLATIONS ET CONDITIONS AMBIANTES	7
7.4	EQUIPEMENTS – TRAÇABILITE METROLOGIQUE	7
7.4.1	<i>Micropipettes et automates de pipetage et de distribution</i>	7
7.4.2	<i>Dispositifs de lavage</i>	8
7.4.3	<i>Enceintes thermostatées</i>	8
7.4.4	<i>Spectrophotomètres</i>	8
7.4.5	<i>Autres équipements</i>	9
7.5	PRODUITS ET SERVICES FOURNIS PAR DES PRESTATAIRES EXTERNES	9
7.6	REVUE DES DEMANDES, APPELS D'OFFRES ET CONTRATS	9
7.7	SELECTION, VERIFICATION ET VALIDATION DES METHODES	10
7.7.1	<i>Méthodes reconnues</i>	10
7.7.2	<i>Méthodes non reconnues</i>	11
7.8	MANUTENTION DES OBJETS D'ESSAI	15
7.9	EVALUATION DE L'INCERTITUDE DE MESURE	16
7.10	ASSURER LA VALIDITE DES RESULTATS	16
7.10.1	<i>Contrôles qualité internes</i>	16
7.10.2	<i>Contrôles qualité externes</i>	16
7.11	RAPPORT SUR LES RESULTATS	17
8	BIBLIOGRAPHIE	18



1 OBJET

La norme NF EN ISO/IEC 17025 définit les exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

Au regard de certains documents internationaux (par exemple, EA-4/02, ILAC P9 etc.) le Cofrac s'attache à développer dans des guides techniques d'accréditation (GTA) qu'il publie, des recommandations spécifiques au(x) domaine(s) technique(s) considéré(s), en vue de guider les organismes dans la mise en œuvre des exigences du référentiel d'accréditation et en vue d'harmoniser les approches.

Ce document vise à établir les recommandations issues des bonnes pratiques admises dans le domaine et de la réglementation en vigueur. Il constitue un guide de lecture des exigences de ladite norme pour les essais (ou analyses) en immuno-sérologie animale.

Il ne se substitue pas aux exigences réglementaires et/ou aux normes applicables au sein du laboratoire. Les recommandations qu'il contient et que le laboratoire est libre d'appliquer sont celles reconnues comme étant les plus appropriées par le Cofrac pour répondre aux exigences de la norme NF EN ISO/IEC 17025 et notamment du document LAB REF 02. Dans tous les cas, il appartient au laboratoire de démontrer que les dispositions qu'il prend permettent de satisfaire pleinement les exigences de la norme citée ci-dessus.

2 REFERENCES ET DEFINITIONS

La liste des documents ci-dessous constitue une base non exhaustive de données. Il appartient au laboratoire d'assurer la veille documentaire (normative et réglementaire).

2.1 Références

Le présent texte fait référence aux documents en vigueur suivants :

- Norme NF EN ISO/IEC 17025 « Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais » ;
- LAB REF 02 « Exigences pour l'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO/IEC 17025:2017 » ;
- LAB REF 05 « Règlement d'accréditation » ;
- LAB REF 08 « Expression et évaluation des portées d'accréditation » ;
- GEN REF 10 « Traçabilité des résultats de mesure » ;
- GEN REF 11 « Règles générales pour la référence à l'accréditation et aux accords de reconnaissance internationaux » ;
- LAB INF 60 « Nomenclature et expression des lignes de portées d'accréditation pour les essais en Immuno-Sérologie Animale » ;
- NF U 47-019 « Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre des techniques ELISA » ;
- NF U 47-020 « Guide de bonnes pratiques de traitement de l'échantillon soumis à des analyses immuno-sérologiques » ;
- Manuel des tests de diagnostics et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE ;
- Manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques de l'OIE.



2.2 Abréviations et définitions

Les abréviations suivantes sont utilisées :

- AFNOR : Association Française de Normalisation, www.afnor.org
- COFRAC : Comité Français d'Accréditation, www.cofrac.fr
- EA : European Cooperation for Accreditation, www.european-accreditation.org
- ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
- EMT : Ecart maximum toléré
- ISO : International Standard Organisation (Organisation Internationale de normalisation), www.iso.org
- IVAP : Instrument volumétrique à piston
- LNR : Laboratoire National de Référence
- (O)CIL : (Organisateurs de) Comparaisons Interlaboratoires (y compris les EIL, Essais interlaboratoires)
- OIE : Organisation Mondiale de la Santé Animale (Office International des Epizooties), www.oie.int
- SI : Système International d'unités

Développeur : organisme en charge de la validation de la méthode (Cf. paragraphe 7.7.2).

Laboratoire utilisateur : laboratoire qui adopte une méthode caractérisée (Cf. paragraphes 7.7.1 et 7.7.2.2).

Définition de l'encart « Pistes de réflexion » :

Pistes de réflexion

Certains paragraphes du présent document sont accompagnés de questions pratiques ou pistes de réflexion pour aider le laboratoire dans sa démarche de mise en œuvre des exigences d'accréditation, en s'appuyant notamment sur une approche basée sur l'analyse de risques.

Ces pistes ne sont pas exhaustives, elles sont données à titre informatif pour guider les laboratoires afin de se mettre en conformité vis-à-vis de l'ensemble des exigences du référentiel.

3 DOMAINE D'APPLICATION

Ce guide technique d'accréditation s'adresse aux :

- laboratoires d'essais accrédités ou candidats à l'accréditation selon la norme NF EN ISO/IEC 17025 pour le domaine cité en objet ;
- évaluateurs du Cofrac, pour lesquels il constitue une base d'harmonisation pour l'évaluation ;
- membres des instances décisionnelles du Cofrac : Comité de Section Laboratoires, Commission d'Accréditation Biologie - Agro-Alimentaire, structure permanente ;
- clients des laboratoires d'essais accrédités sur ce domaine ;
- instances officielles concernées par ce domaine.



Le champ du présent guide couvre les techniques basées sur des réactions antigènes-anticorps mises en évidence par des méthodes :

- d'agglutination ;
- de fixation du complément ;
- immuno-enzymatiques ;
- d'immunofluorescence ;
- d'inhibition de l'hémagglutination ;
- de précipitation.

Le champ du présent guide n'inclut pas la partie échantillonnage / prélèvement.

Ce guide s'applique de manière équivalente aux laboratoires œuvrant dans le cadre des contrôles officiels ou aux laboratoires intervenant hors contrôles officiels.

4 MODALITES D'APPLICATION

Ce document est applicable à compter du **15/04/2020**.

Ce document contient à la fois des exigences et des recommandations.

Le terme « doit » est utilisé pour exprimer une exigence. Les exigences correspondent à la retranscription des exigences de la norme d'accréditation, du prescripteur ou de la réglementation, ou relèvent des règles d'évaluation et d'accréditation du Cofrac.

Dès lors que le texte reprend des exigences, elles sont identifiées en grisées dans le corps du texte.

5 MODIFICATIONS APPORTEES A L'EDITION PRECEDENTE

Du fait de la refonte du document et par souci de lisibilité, les modifications n'y sont pas repérées.

Les principaux changements concernent :

- la suppression de toute référence à la version 2005 de la norme NF EN ISO/IEC 17025 et l'alignement du contenu de ce guide aux exigences de la nouvelle version 2017 de la norme ;
- l'introduction de pistes de réflexion ;
- le retrait des exemples d'expressions de portées qui sont transférés dans le document Cofrac LAB INF 60 ;
- la suppression de l'exigence de diplôme pour le personnel ;
- des précisions concernant la manutention des objets d'essai, la définition des méthodes reconnues, la traçabilité métrologique des équipements, la validité des résultats et les rapports sur les résultats.

6 EXPRESSION DE LA PORTEE D'ACCREDITATION

La portée d'accréditation est définie par le laboratoire, conformément aux principes décrits dans le document LAB REF 08 (Expression et évaluation des portées d'accréditation).

Le laboratoire définit le niveau de flexibilité qu'il revendique. Les 4 types de portées sont définis dans le document LAB REF 08.



Pour établir sa portée, le laboratoire se reporte aux tableaux qui listent les différents types d'essais les plus couramment rencontrés et pratiqués dans le domaine de l'immuno-sérologie animale présentés dans le document LAB INF 60.

7 GUIDE DE LECTURE DES EXIGENCES D'ACCREDITATION ET RECOMMANDATIONS

7.1 Généralités

Les exigences et recommandations qui suivent sont d'ordre général.

Les normes NF U 47-019 « Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre des techniques ELISA » et NF U 47-020, « Guide de bonnes pratiques de traitement de l'échantillon soumis à des analyses immuno-sérologiques » définissent les exigences et les recommandations applicables pour les méthodes utilisées en immuno-sérologie animale. Le guide LAB GTA 27 apporte des précisions complémentaires.

7.2 Personnel

NF EN ISO/IEC 17025 § 6.2
LAB REF 02

Le laboratoire doit disposer de personnels ayant des connaissances générales en immuno-sérologie et sur les maladies animales, en fonction des activités de laboratoire exécutées.

Afin d'assurer que son personnel possède les compétences nécessaires pour accomplir les activités de laboratoire qui lui sont attribuées, le laboratoire doit autoriser son personnel selon des dispositions prédéfinies.

Pistes de réflexion

- Quelles sont les tâches définies par le laboratoire ? (préparation des échantillons, mise en œuvre de l'analyse, approbation des résultats, validation de méthodes ...)
- Quels sont les éléments pris en compte par le laboratoire pour autoriser son personnel à exécuter les tâches prédéfinies ? Par exemple :
 - la connaissance des points critiques des méthodes analytiques ;
 - la connaissance de l'environnement réglementaire et de l'épidémiologie des maladies ;
 - les différentes variantes techniques (protocole automatisé ou manuel) ;
 - la fidélité et la concordance des résultats obtenus ;
 - la fréquence de réalisation des analyses ou d'approbation des rapports d'analyses ;
 - la flexibilité revendiquée.
- Quels sont les éléments pris en compte par le laboratoire pour s'assurer que les compétences de son personnel sont maintenues ? Par exemple :
 - la fréquence de réalisation ;
 - l'exploitation des données de surveillance de la validité des résultats ;
 - la formation.



7.3 Installations et conditions ambiantes

NF EN ISO/IEC 17025 § 6.3

Les conditions d'environnement, notamment la température, doivent permettre la bonne application des normes d'essais, le maintien de l'intégrité de l'échantillon soumis à l'essai et l'absence d'influence sur la validité des résultats.

7.4 Equipements – Traçabilité métrologique

NF EN ISO/IEC 17025 § 6.4 et 6.5
GEN REF 10

Le laboratoire doit identifier les équipements ayant une influence sur la validité des résultats et s'assurer de leur maintien en bon état de fonctionnement (propreté, maintenance, contrôle).

Ils doivent faire l'objet d'un raccordement métrologique conformément aux dispositions décrites dans la norme NF EN ISO/IEC 17025 et le document Cofrac GEN REF 10.

7.4.1 Micropipettes et automates de pipetage et de distribution

Métrologie

Les exigences des normes de la série 8655 ne sont pas systématiquement opposables, en particulier pour ce qui concerne les critères de conformité des EMT. Ces derniers y sont décrits dans un but d'émission d'un certificat de conformité par un fabricant et non pour être systématiquement pris en compte par un laboratoire réalisant des analyses immuno-sérologiques.

Les points suivants doivent être pris en compte pour les équipements ayant une influence sur la validité des résultats :

- le raccordement au Système International d'unités est exigé ;
- la fréquence de raccordement doit être définie et argumentée ;
- la justesse (ou erreur systématique selon les normes 8655) et la fidélité (ou erreur aléatoire selon les normes 8655) doivent être vérifiées. Le nombre de répétitions doit être défini et argumenté ;
- pour les IVAP multicanaux, chaque canal doit être vérifié indépendamment des autres ;
- les critères de performance (EMT) attendus doivent être définis et argumentés par le laboratoire en fonction des besoins des méthodes ;
- pour les IVAP à volume variable, l'étendue et le mode d'utilisation (par exemple : mode répétitif) doivent être pris en compte; ainsi, pour une utilisation sur une gamme de volumes, le laboratoire vérifie au moins les volumes minimum et maximum utilisés ; pour une utilisation à un seul volume, la vérification de ce seul point est acceptable.

Contamination inter-échantillons

Le laboratoire doit vérifier l'absence d'inter-contamination par des essais biologiques basés sur la réaction anticorps-antigène.

Ces vérifications sont réalisées au minimum selon la méthode estimée la plus sensible par le laboratoire. Les modalités de la vérification tiennent compte des risques d'inter-contaminations liés au nombre d'essais, à leur nature et aux étapes du processus analytique. Ces tests permettent d'identifier de manière claire le résultat de conformité individuelle par équipement, notamment lorsque plusieurs automates sont utilisés consécutivement.



Paramétrage des automates de manipulation des échantillons

Le laboratoire doit s'assurer que l'automate réalise bien les programmes de distribution définis informatiquement au moins lors de la première mise en service et lors de chaque modification des programmes.

Pistes de réflexion

- Quels sont les éléments pris en compte pour définir les EMT lorsqu'elles ne sont pas précisées dans les méthodes ? Par exemple :
 - la ou les étapes de la méthode pour lesquelles la métrologie des IVAP a un impact sur les résultats ;
 - les données de robustesse du dossier de validation de la méthode (provenant d'un fournisseur ou interne au laboratoire).
- Quelles sont les sources d'inter-contamination identifiées par le laboratoire (par exemple : pipette à embout non jetable, aiguille d'automate de prélèvement / distribution, consommable ou petit matériel réutilisé, etc) et comment les maîtrise-t-il ?

7.4.2 Dispositifs de lavage

Les dispositifs de lavage (automatiques ou manuels) ne nécessitent pas de vérification métrologique. Cependant, compte tenu de l'importance de cette étape pour les techniques immuno-enzymatiques, la vérification de la fiabilité du système (aspiration, distribution), à une fréquence définie, est nécessaire.

7.4.3 Enceintes thermostatées

Pour toute enceinte thermostatée ayant un impact critique sur les essais (exemples : bain d'eau servant à la décomplémentation, enceinte destinée à maintenir une température d'incubation, enceinte assurant le stockage des réactifs ou des échantillons, etc.) :

- une cartographie doit être réalisée préalablement à la mise en service et en cas d'intervention importante (par exemple : déplacement, réparation). Le laboratoire devra par ailleurs se fixer une fréquence pertinente de cartographie pour assurer le suivi dans le temps de l'enceinte ;
- le contrôle effectif de la température est nécessaire, par exemple par l'enregistrement en continu (l'intervalle d'acquisition des données doit être adapté aux durées d'incubation). Si l'enceinte thermostatée est utilisée de façon intermittente, un enregistrement doit être effectué avant et au cours de toute utilisation.

Le laboratoire pourra suivre les fascicules FD V08-601 ou FD X15-140 pour effectuer les cartographies des enceintes. Il est obligatoire de matérialiser les zones non acceptables le cas échéant.

7.4.4 Spectrophotomètres

La fidélité, la linéarité et l'effet intercanal des spectrophotomètres utilisés doivent systématiquement être vérifiés pour chaque longueur d'onde utilisée. La vérification de la justesse doit être effectuée quand elle s'avère critique (quand le résultat est interprété à partir des densités optiques brutes ou pour des méthodes ELISA quantitatives).

Les moyens mis en œuvre pour déterminer la linéarité et la justesse (le cas échéant) doivent être raccordés au SI, au moins sur trois points.



Le laboratoire peut utiliser une plaque, raccordée au SI, qu'il ne maîtrise pas en permanence, sous réserve qu'il réalise lui-même la vérification du spectrophotomètre. Dans tous les cas, la compétence du laboratoire à réaliser la vérification des spectrophotomètres est examinée lors des évaluations.

7.4.5 Autres équipements

Selon les méthodes d'analyse, il appartient au laboratoire de contrôler les autres équipements qui peuvent avoir un impact sur les résultats conformément aux dispositions décrites dans les normes spécifiques.

7.5 Produits et services fournis par des prestataires externes

NF EN ISO/IEC 17025 § 6.6
LAB REF 02

Les laboratoires doivent utiliser, lorsqu'ils existent, des réactifs ayant fait l'objet d'un contrôle par un laboratoire officiellement désigné par l'autorité compétente du domaine. Dans ce cas, le laboratoire détient le certificat correspondant pour démontrer la conformité de son réactif.

La qualité de l'eau utilisée doit être vérifiée (caractéristiques physico-chimiques et bactériologiques). Elle doit satisfaire aux exigences que le laboratoire se sera imposé. Ces exigences doivent permettre une mise en œuvre satisfaisante de chaque méthode.

La norme NF EN ISO 3696 « Eau pour laboratoire à usage analytique - Spécification et méthodes d'essai. » peut être utilisée pour vérifier la qualité de l'eau.

7.6 Revue des demandes, appels d'offres et contrats

NF EN ISO/IEC 17025 § 7.1

La revue de contrat peut être effectuée directement avec les clients ou les représentants des clients : des organismes à vocation sanitaire (par exemple, groupement de défense sanitaire) et des organisations vétérinaires à vocation technique (par exemple, groupement de vétérinaires).

La revue de contrat peut être réalisée sur des documents tels que l'ordonnance, un formulaire de demande interne au laboratoire ou tout autre document accompagnant les prélèvements.

Ce processus de revue permet d'identifier notamment le ou les destinataires des rapports d'essais ainsi que les informations associées qui leur seront transmises (résultat, déclaration de conformité).

Les dispositions prévues et les éventuels risques afférents sont clairement indiqués aux clients lors de la revue de contrat.

Pistes de réflexion

- Quelles sont les informations que le laboratoire transmet à son client lors de la revue de contrat ?
 - les critères d'acceptation des échantillons à réception tels que quantité/volume, température, délai entre le prélèvement et la réception, intégrité, etc ?
 - les délais d'analyse, en accord avec les exigences normatives ou réglementaires le cas échéant ?
 - les prestations éventuellement confiées à un prestataire externe ?
 - la méthode retenue, notamment lorsque le laboratoire utilise plusieurs références pour un même principe de mesure ?
 - du délai et des modalités de conservation des échantillons ?



- des modalités de prise en compte et/ou d'affichage des incertitudes de mesure ?
- des modalités de transmission des résultats ?
- de l'adéquation de demandes spécifiques du client par rapport aux performances des méthodes (par exemple par rapport à la taille des mélanges) ?

7.7 Sélection, vérification et validation des méthodes

NF EN ISO/IEC 17025 § 7.2
LAB REF 08

De manière générale, les principes relatifs à la validation des méthodes tels que décrits dans les chapitres correspondants du manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres et du manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques de l'OIE doivent être respectés.

- 1) Le document LAB REF 08 précise la définition d'une méthode reconnue :
 - Les méthodes décrites dans les normes AFNOR sont considérées comme reconnues lorsqu'elles décrivent une analyse spécifique (recherche d'anticorps dirigés contre un agent pathogène spécifié dans une ou des matrices identifiées par une méthode décrite) ;
 - Les méthodes identifiées comme recommandées dans le manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres et aquatiques de l'OIE peuvent être considérées comme reconnues lorsqu'elles sont suffisamment décrites pour être mises en œuvre et qu'elles sont utilisées pour l'usage prévu dans le manuel ;
 - Les méthodes décrites (conformément au LAB REF 08) par les fournisseurs de kits, contrôlées par un LNR ; et rendues d'application obligatoire par l'autorité compétente sont considérées comme reconnues ;
 - Les méthodes rendues d'application obligatoire, si elles sont décrites, ou référencées dans un texte réglementaire, dès lors que ces méthodes sont utilisées dans le contexte d'application obligatoire.
- 2) Dans tous les autres cas, les méthodes sont considérées comme des méthodes internes nécessitant une détermination des caractéristiques puis validation préalable (portée de type FIXE ou flexibilité de type FLEX 3).

7.7.1 Méthodes reconnues

Pour les méthodes reconnues, le laboratoire doit appliquer strictement les méthodes décrites dans les normes techniques ou les notices fournisseur.

Il n'est pas demandé au laboratoire utilisateur de déterminer les caractéristiques de la méthode. Le laboratoire doit toutefois s'assurer de sa capacité à appliquer la méthode retenue avant de la mettre en œuvre, conformément au LAB REF 08.

Le laboratoire établit un dossier de **confirmation** qui comporte au minimum, pour une méthode donnée, les éléments suivants :

- adéquation des performances de la méthode par rapport au besoin de ses clients ;
- données de répétabilité et de reproductibilité intra laboratoire (fidélité intermédiaire) ;
- vérification de la concordance des résultats qu'il obtient sur un panel d'échantillons (positifs et négatifs).



Les différents critères de confirmation d'une méthode ne s'appliquent qu'à la matrice sur laquelle ils ont été établis et sur elle seule. Toute matrice traitée par le laboratoire et définie dans la méthode reconnue doit faire l'objet d'une confirmation spécifique.

De la même façon, une confirmation doit être réalisée pour chaque variante opératoire mise en œuvre par le laboratoire (exemple incubation longue/incubation courte, méthode automatisée/manuelle).

Pistes de réflexion

- Le laboratoire a-t-il documenté dans son système de management des dispositions relatives à la vérification de la mise en œuvre de la méthode ?
- Les dispositions de gestion documentaire mises en œuvre permettent-elles d'assurer la traçabilité des modifications apportées au dossier de confirmation ?
- Quels sont les moyens mis en œuvre pour atteindre les critères de performance définis ?
 - le choix du panel d'échantillons (par exemple : EIL, matériaux de référence externes, échantillons analysés avec une autre méthode reconnue, etc) ;
 - l'identification et la maîtrise des facteurs ayant une influence sur les résultats.
- Le laboratoire a-t-il conclu sur l'adéquation de la méthode par rapport à l'emploi prévu et sur son autorisation d'emploi ?

7.7.2 Méthodes non reconnues

Les critères de performance d'une méthode à établir dépendent du caractère qualitatif, semi-quantitatif ou quantitatif de la méthode.

Quel que soit le principe de la méthode, un dossier de validation doit être constitué, conformément aux exigences de la norme NF EN ISO/IEC 17025 et du document LAB REF 08

La méthode ELISA étant la méthode la plus largement pratiquée en immuno-sérologie, elle a été choisie comme exemple pour les paragraphes suivants.

7.7.2.1 Détermination des caractéristiques

La méthode ELISA est considérée comme une méthode semi-quantitative lorsque la mesure physique de densité optique permet de calculer une valeur chiffrée (E/P ; %) rapportée à une valeur seuil d'interprétation.

La méthode ELISA est considérée comme une méthode quantitative lorsque la mesure physique de la densité optique est rapportée à une gamme d'étalonnage.

Les différents paramètres de caractérisation d'une méthode ne s'appliquent qu'à la matrice sur laquelle ils ont été établis et sur elle seule. Toute matrice (exemples : sérum individuel, mélange de sérums, biopsie auriculaire, plasma, broyat d'organes, exsudat, buvard, etc.) doit faire l'objet d'une caractérisation spécifique.

De la même façon une caractérisation doit être réalisée pour chaque variante opératoire (exemple incubation longue/incubation courte, méthode automatisée/manuelle).

a) Détermination des caractéristiques d'une méthode qualitative ou semi-quantitative

- **sensibilité analytique** : plus petite quantité de substance caractérisable ou la plus faible réaction décelable avec un niveau de confiance défini ;



- **sensibilité diagnostique** : proportion d'animaux de référence connus comme infectés et présentant un résultat positif à l'analyse. Les animaux infectés pour lesquels le résultat est négatif sont considérés comme des « faux négatifs » ;
- **spécificité analytique** : faculté du test à distinguer entre les analytes cibles et les autres substances de la simple matrice ;
- **spécificité diagnostique** : proportion d'animaux de référence connus comme non infectés et présentant un résultat négatif lors d'une épreuve. Les animaux de référence non infectés chez lesquels le résultat est positif sont considérés comme des « faux positifs ». Les modalités d'établissement des seuils d'interprétation doivent être documentées ;
- **valeur de fidélité** (répétabilité, reproductibilité inter laboratoire ou à défaut intra laboratoire) ;
- **données de robustesse** si possible. (degré de concordance entre les analyses réitérées d'un même échantillon avec un même réactif au sein du même laboratoire, dans les conditions opératoires limites prévues par le protocole).

Le dossier de validation établi par le développeur présente les résultats obtenus pour ces paramètres ainsi que la description des conditions de leur obtention (nature, origine, nombre d'échantillons utilisés) et est accessible au laboratoire utilisateur.

Le laboratoire utilisateur doit s'assurer de la pertinence des conditions d'obtention des résultats vis-à-vis de ses propres objectifs et compléter le dossier de validation si ces conditions ne répondent pas à son besoin (cf. tableau paragraphe 7.7.2.2).

b) Détermination des caractéristiques d'une méthode quantitative

La détermination des caractéristiques d'une méthode quantitative comprend celles listées pour les méthodes semi-quantitatives auxquelles s'ajoutent :

- **le domaine de linéarité** : capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une valeur d'information ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon pour le laboratoire. Cette proportionnalité s'exprime au travers d'une expression mathématique définie a priori. Les limites de linéarité sont les limites expérimentales de grandeurs entre lesquelles un modèle d'étalonnage linéaire peut être appliqué avec un niveau de confiance connu (généralement 1 %) ;
- **les limites de quantification basse et haute** : plus petite (ou plus forte) quantité ou concentration de l'analyte permettant, dans des conditions de fidélité intermédiaire (avec un seuil de tolérance défini, par exemple 90 %), d'obtenir des résultats compris dans un intervalle d'acceptabilité préalablement défini.
- Ces informations doivent être fournies par le développeur sur le matériau de référence défini et utilisé pour réaliser la gamme d'étalonnage ;
- **la justesse** : en biologie vétérinaire, il n'existe pas d'échantillons de contrôles raccordés sur le plan métrologique à des étalons internationaux. Il est donc impossible de parler stricto sensu de "valeur vraie" et par là-même de justesse.
- En l'absence de ces échantillons, des échantillons pour lesquels une valeur a été assignée (matériaux de référence externe) peuvent être utilisés.

7.7.2.2 Validation et autorisation d'emploi (méthode qualitative, semi-quantitative ou quantitative)

a) Généralités

La validation est la confirmation que les caractéristiques de la méthode conviennent pour l'emploi prévu.



Les données à prendre en compte et à vérifier sont entre autres :

- la prévalence de la maladie dans la population étudiée, nécessaire au calcul de la Valeur Prédictive Positive (VPP) et de la Valeur Prédictive Négative (VPN) ;
- le contexte de la demande (dépistage, confirmation, diagnostic...) ;
- lorsqu'il existe des contraintes particulières (exigences réglementaires ou professionnelles ...), le laboratoire s'assure qu'il atteint le niveau de détectabilité requis au moyen de matériaux de référence correspondant à la contrainte.

Dans le cas d'une méthode quantitative, le laboratoire utilisateur définit son propre domaine de linéarité et ses limites de quantification avec le matériau de référence utilisé pour la caractérisation.

Le laboratoire doit apporter les éléments de vérification suivants, pour chaque matrice revendiquée et pour chaque variante opératoire (exemple incubation longue/incubation courte, températures d'incubation utilisées, méthode automatisée/manuelle) :

Paramètres à vérifier et/ou connaître	Données bibliographiques / Données du développeur *	Données acquises pour l'évaluation de la performance d'une méthode par le laboratoire utilisateur **
Spécificité Diagnostique	Oui	Si nécessaire
Sensibilité Diagnostique	Oui	Si nécessaire
Fidélité (répétabilité et reproductibilité)	Oui	Oui
Robustesse	Oui (si disponible)	Non
Concordance avec une méthode de référence	Oui	Non
Concordance avec une méthode déjà utilisée	Oui	Oui (si possible)
Détectabilité (sensibilité et spécificité analytiques)	Oui	Si nécessaire
Evaluation de l'incertitude de mesure	Oui	Oui
Et pour les méthodes quantitatives		
Limites de quantification	Oui	Oui
Linéarité et domaine analytique	Oui	Oui
« Justesse » sur des matériaux de référence externes.	Oui	Oui

NA : Non Applicable

* Cette colonne est applicable lors de la détermination des caractéristiques par le développeur

** Cette colonne est applicable lors de l'autorisation d'emploi par le laboratoire utilisateur



b) Recommandations permettant la validation d'une méthode

Spécificité/Sensibilité Diagnostique :

En fonction des données communiquées par le développeur et des exigences pour la validation des méthodes décrites dans le manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres et dans le manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques de l'OIE, le laboratoire évalue la nécessité de compléter les données et dans ce cas, il justifie les modalités mises en œuvre et les résultats obtenus. Pour ce faire, il convient de se référer aux tables statistiques existantes évaluant le degré de confiance de ces paramètres en fonction du nombre d'échantillons testés.

Fidélité (répétabilité et reproductibilité) :

- Répétabilité

L'évaluation de la répétabilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon dans des conditions standardisées : même opérateur, même(s) lot(s) de réactif(s), même(s) instrument(s), mêmes conditions d'analyse.

En pratique, cet essai est réalisé au cours d'une même série. Il est recommandé d'utiliser au minimum un matériau fournissant un résultat proche du seuil d'interprétation.

Dans le cas d'une méthode quantitative il est recommandé d'utiliser plusieurs niveaux de concentration (au minimum trois niveaux de concentration répartis dans le domaine de linéarité).

Il est recommandé d'obtenir au moins 10 valeurs pour un même échantillon afin que le résultat puisse être considéré comme statistiquement valable.

L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (m), l'écart-type (s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales.

- Reproductibilité intra-laboratoire (fidélité intermédiaire)

L'évaluation de la reproductibilité (interne au laboratoire) consiste à effectuer l'analyse d'un ou plusieurs échantillons dans des conditions différentes (à titre d'exemples : variation d'opérateur, de jour de réalisation, des lots de réactifs, des instruments, des automates...).

Il est recommandé d'obtenir au moins 15 valeurs indépendantes en faisant varier le maximum de paramètres représentatifs de l'activité de routine prévue, afin que le résultat puisse être considéré comme statistiquement valable.

Les modalités de calcul de la reproductibilité sont identiques à celles de la répétabilité, avec calcul de la moyenne, de l'écart-type et du coefficient de variation, et exprimées pour chaque échantillon.

Comparaison avec une méthode déjà utilisée au laboratoire

Cette comparaison ne peut intervenir qu'après la vérification de la répétabilité et de la reproductibilité (ainsi que de la justesse, de la limite de détection et du seuil de quantification pour les méthodes quantitatives).

Pour comparer deux méthodes entre elles, il est recommandé d'utiliser au moins 15 échantillons positifs et autant de négatifs de statut connu et judicieusement choisis.

Ces échantillons sont analysés en parallèle par les deux techniques dans des conditions opératoires aussi proches que possibles afin de limiter l'introduction de sources de variabilité.

DéTECTABILITÉ

Le laboratoire s'assure qu'il atteint le niveau de détectabilité requis au moyen de matériaux de référence.

Limites de quantification et linéarité

La linéarité est vérifiée à partir de dilutions d'un matériau de référence. Le matériau de référence est titré pour établir les limites de quantification.



En pratique, le laboratoire utilise le même matériau de référence que le développeur (ou un matériau qui lui est « raccordé ») afin de définir ses propres limites de quantification et son propre domaine de linéarité.

« Justesse »

La justesse est vérifiée à l'aide d'échantillons auxquels une valeur a été assignée (matériaux de référence externe).

Incertitudes

Le laboratoire doit estimer l'incertitude sur la méthode conformément au paragraphe 7.9.

c) Constitution du dossier de validation

Les informations et les résultats collectés font l'objet d'un document cohérent et clair, qui mentionne une acceptation formelle par le laboratoire de la validité de la méthode, c'est-à-dire une décision ou une déclaration :

- quant à la détermination des caractéristiques de la méthode,
- quant à l'autorisation d'emploi de la méthode.

Ce document est géré dans le système de management de la qualité du laboratoire.

Pistes de réflexion

- Comment la traçabilité des étapes de validation de la méthode, jusqu'à l'autorisation d'emploi de la méthode, est-elle assurée ?
- Les dispositions du laboratoire permettent -elles d'assurer, pour une méthode donnée, la traçabilité des évolutions ultérieures ?

7.8 Manutention des objets d'essai

NF EN ISO/IEC 17025 § 7.4

Le laboratoire peut analyser plusieurs types de matrice : sérum, lait, plasma, sang total, éluat de papier buvard, biopsie auriculaire, etc.

Pour les échantillons de sang prélevé sans anticoagulant, le laboratoire réalise les analyses sur la matrice sérum.

Les demandes d'accréditation sur les matrices non couvertes par la portée d'accréditation du laboratoire (même dans le cas où les kits fournisseurs font référence à ces matrices) doivent systématiquement faire l'objet d'une demande d'extension préalable auprès du Cofrac.

Les matrices revendiquées peuvent être analysées en mélange, si cela a été pris en compte dans le dossier de confirmation et/ou de validation du laboratoire.

L'objet « lait de tank » n'est pas considéré comme une matrice « mélange » à proprement parler. En effet, le résultat rendu porte sur un échantillon de lait sans qu'il soit possible d'associer à cet échantillon un animal précisément identifié (l'objectif de l'analyse sur le lait de tank est différent de celui d'une analyse sur mélange de sérums).

La norme NF U 47-020, « Guide de bonnes pratiques de traitement de l'échantillon soumis à des analyses immuno-sérologiques », doit servir de base aux laboratoires pour définir leurs conditions de recevabilité, conservation, préparation et élimination des échantillons.

Si les échantillons parvenant au laboratoire ne satisfont pas aux exigences définies dans la norme NF U 47-020, le laboratoire peut soit refuser les échantillons, soit émettre des réserves sur les résultats.



Le laboratoire doit mettre en place des dispositions qui assurent la traçabilité des échantillons tout au long du processus de traitement et d'analyse, y compris lors des étapes au cours desquelles les échantillons ne sont identifiables que d'après le repère de leur position dans l'espace et non par marquage individuel. Les produits soumis à analyse doivent être conservés au moins jusqu'à la validation finale des résultats puis éliminés selon des modalités qui évitent toute contamination.

Sauf mention particulière dans le texte de référence, le laboratoire définit ses conditions de stockage.

7.9 Evaluation de l'incertitude de mesure

NF EN ISO/IEC 17025 § 7.6
LAB REF 02

Conformément au document LAB REF 02, pour les méthodes qualitatives, le laboratoire doit au moins identifier les facteurs critiques d'influence et les moyens de maîtrise associés.

Pour les méthodes strictement quantitatives et pour les méthodes ELISA, le laboratoire doit compléter l'étude de ces facteurs par une estimation de l'incertitude de mesure.

Le laboratoire peut s'inspirer de la norme NFU 47-019 pour évaluer les incertitudes des méthodes revendiquées.

7.10 Assurer la validité des résultats

NF EN ISO/IEC 17025 § 7.7
LAB REF 02

Tels que précisés dans les chapitres 7.7.1 et 7.7.2 de la norme NF EN ISO/IEC 17025, le laboratoire doit surveiller d'une part, la validité de ses résultats par l'intermédiaire des contrôles « internes » qu'il a mis en place et d'autre part sa performance via des contrôles « externes ».

La mise en œuvre de ces contrôles « internes et externes » doit être planifiée et revue par le laboratoire. La détermination de la fréquence de ces contrôles peut être définie et justifiée, par exemple, par une analyse des risques et des opportunités liées aux activités concernées.

7.10.1 Contrôles qualité internes

Les témoins positifs et négatifs décrits dans la méthode d'analyse doivent être mis en œuvre et conduire aux résultats attendus.

En cas d'écart, le laboratoire doit effectuer l'analyse des causes et statuer sur la validité de la série d'épreuve.

Lorsque les matériaux de référence existent et sont disponibles (étalons primaires ou secondaires), le laboratoire doit en disposer, les utiliser selon une périodicité définie dans le système Qualité et les exploiter. La norme NFU 47-019 impose par ailleurs la réalisation de cartes de contrôle pour les techniques ELISA.

7.10.2 Contrôles qualité externes

Le laboratoire doit participer aux essais d'aptitude appropriés pour démontrer sa performance.

Ces essais peuvent être organisés par un LNR (dans le cadre de l'obtention/maintien des agréments ministériels) ou par un autre organisateur de comparaisons inter-laboratoires.

Lorsqu'aucun essai d'aptitude n'existe, il appartient au laboratoire, pour assurer la cohérence de ses résultats, de corrélérer ses résultats avec ceux d'autres laboratoires.



Pistes de réflexion

- Le plan de participation du laboratoire inclut-il des programmes d'essais d'aptitudes en cohérence avec sa portée d'accréditation ?
- Le laboratoire a-t-il mis en place un dispositif permettant de statuer périodiquement sur la pertinence de son choix et de revoir la planification de la surveillance de la validité de ses résultats, si nécessaire ?
- Le laboratoire évalue-t-il la performance de l'OCIL en adéquation avec ses besoins ? (cf § 6.6 de la norme NF EN ISO/IEC 17025) ?
- En cas de résultats de comparaisons interlaboratoires non conformes, la procédure relative aux travaux non conformes (§ 7.10) est-elle mise en œuvre ?

7.11 Rapport sur les résultats

NF EN ISO/IEC 17025 § 7.8
LAB REF 02

Le client doit être informé de la référence de la méthode utilisée (par exemple : notice fournisseur X1). Lorsque le laboratoire est accrédité pour plusieurs notices fournisseurs pour une même caractéristique recherchée, la méthode effectivement utilisée doit être nommée.

De façon générale :

- Dans le cas de l'utilisation de mélanges d'échantillons, le rapport d'analyses ne doit laisser subsister aucune ambiguïté sur la portée des résultats obtenus par rapport aux échantillons individuels ayant servi à constituer le mélange. A cet effet, un commentaire doit être indiqué dans le rapport.
- Les avis interprétations, déclaration de conformité ne doivent pas être en contradiction avec un éventuel texte réglementaire ou infra-réglementaire (notes de service, ...) dans le cadre des contrôles officiels.
- Les avis et interprétations et/ou déclaration de conformité portant sur des analyses/essais tous réalisés sous couvert de l'accréditation font partie intégrante du rapport et sont couverts par l'accréditation

Les « conclusions » émises par le laboratoire et imposées par le donneur d'ordre (interprétations SIGAL) ne relèvent ni de la déclaration de conformité ni des avis et interprétations au sens du LAB REF 02.

Elles doivent être considérées comme étant hors champs d'accréditation.



8 BIBLIOGRAPHIE

- FD X15-140 « Mesure de l'humidité de l'air - Enceintes climatiques et thermostatiques - Caractérisation et vérification »
- FD V08-601 « Microbiologie des aliments – enceintes thermostatiques, caractérisation, vérification et suivi quotidien »
- NF ISO 5725-3 « Application de la statistique - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 3 : mesures intermédiaires de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée »
- NF EN ISO 8655-2 « Appareils volumétriques à piston - Partie 2 : pipettes à piston »
- XP U47-310 « Méthodes d'analyse en santé animale - Contrôle de réactif biologique pour les techniques immunologiques utilisées dans le domaine de la santé animale »

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI