



## Essais en virologie animale

LAB GTA 32 - Révision 02

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI





## SOMMAIRE

<b>1</b>	<b>OBJET</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCES ET DEFINITIONS</b>	<b>3</b>
2.1	Références	3
2.2	Abréviations et définitions	4
<b>3</b>	<b>DOMAINE D'APPLICATION</b>	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>MODALITES D'APPLICATION</b>	<b>5</b>
<b>5</b>	<b>MODIFICATIONS APORTEES A L'EDITION PRECEDENTE</b>	<b>5</b>
<b>6</b>	<b>EXPRESSION DE LA PORTEE D'ACCREDITATION</b>	<b>6</b>
<b>7</b>	<b>GUIDE DE LECTURE DES EXIGENCES D'ACCREDITATION ET RECOMMANDATIONS</b>	<b>6</b>
7.1	Personnel	6
7.2	Installations et conditions ambiantes	7
7.2.1	Conception et agencement du laboratoire de virologie	7
7.2.2	Décontamination, lavage, stérilisation du matériel et des locaux du laboratoire de virologie	8
7.3	Equipements – Traçabilité métrologique	9
7.3.1	Micropipettes et automates de pipetage et de distribution	9
7.3.2	Enceintes thermostatées	10
7.3.3	Balances	11
7.4	Produits et services fournis par des prestataires externes	11
7.4.1	Les cellules	11
7.4.2	Les œufs	12
7.4.3	Les souches virales	12
7.4.4	Réactifs et consommables divers	13
7.5	Revue des demandes, appels d'offres et contrats	13
7.6	Sélection, vérification et validation des méthodes	14
7.6.1	Méthodes reconnues	14
7.6.2	Méthodes non reconnues	15
7.7	Manutention des objets d'essai	18
7.7.1	Réception et stockage des échantillons	18
7.7.2	Préparation des échantillons	18
7.8	Assurer la validité des résultats	19
7.8.1	Contrôles qualité internes	19
7.8.2	Contrôles qualité externes	19
7.9	Rapport sur les résultats	20
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>20</b>



## 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 normalisation en vigueur. Il constitue un guide de lecture des exigences de ladite norme pour les essais (ou analyses) en virologie 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 ;
- LAB REF 16 : Politique relative à la participation des Laboratoires de Référence au système d'accréditation dans le champ d'application du Règlement (UE) 2017/625 ;
- GEN REF 10 : Traçabilité des résultats de mesure – Politique du Cofrac et modalités d'évaluation ;
- GEN REF 11 : Règles générales pour la référence à l'accréditation et aux accords de reconnaissance internationaux ;
- LAB INF 33 : Nomenclature et expression des lignes de portées d'accréditation pour les essais en virologie animale ;
- LAB GTA 90 : Guide technique d'accréditation – étalonnage des instruments volumétriques à piston ;
- LAB GTA 95 : Guide technique d'accréditation – étalonnage d'instruments de pesage à fonctionnement non automatique ;
- NF U47-020 : Guide de bonnes pratiques de traitement de l'échantillon soumis à des analyses immuno-sérologiques ;



- NF U47-200 : Guide de bonnes pratiques pour les cultures cellulaires ;
- BP U47-555 : Guide de bonnes pratiques – Ovoculture virale ;
- NF U47-600-1 : Exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR en Santé Animale ;
- NF U47-600-2 : Exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en Santé Animale ;
- Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OMSA ;
- Manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques de l'OMSA.

## 2.2 Abréviations et définitions

Les abréviations suivantes sont utilisées :

- AFNOR : Association Française de Normalisation, [www.afnor.org](http://www.afnor.org)
- COFRAC : Comité Français d'Accréditation, [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)
- EA : European Cooperation for Accreditation
- EIL : Essais interlaboratoires
- EMT : Erreur maximale tolérée
- ISO : International Standard Organisation, [www.iso.org](http://www.iso.org)
- IVAP : Instrument volumétrique à piston
- LNR : Laboratoire National de Référence
- LRUE : Laboratoire de Référence de l'Union Européenne
- OCIL : Organismes de Comparaisons Interlaboratoires
- OMSA : Organisation Mondiale de la Santé Animale, [www.woah.org](http://www.woah.org)
- PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en Chaîne)
- PSM : Poste de Sécurité Microbiologique
- SI : Système International d'unités

### Définitions :

Développeur : organisme en charge de la validation de la méthode (Cf. paragraphes 7.6.2.1 et 7.6.2.2)

Laboratoire utilisateur : laboratoire qui adopte une méthode validée (Cf. paragraphes 7.6.1, 7.6.2.1 et 7.6.2.2)

### 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 ;
- aux membres de la structure permanente ;
- clients des laboratoires d'essais accrédités sur ce domaine ;
- instances officielles concernées par ce domaine.

Le champ du présent guide couvre notamment les techniques basées sur l'isolement de virus sur support cellulaire ou œuf embryonné suivi de son identification par immunochimie (immunofluorescence, immunoperoxydase, ...), neutralisation virale, inhibition de l'hémagglutination ou par biologie moléculaire (PCR, hybridation, ...). Ce guide couvre également les techniques de recherche et de titrage éventuel d'anticorps neutralisants dirigés contre un virus donné.

Le champ du présent guide ne couvre pas la partie échantillonnage / prélèvement.

Les aspects d'hygiène et sécurité sont couverts en France par la législation et ne relèvent pas de la mission du Cofrac. Le laboratoire est néanmoins tenu de respecter la réglementation en vigueur.

Ce guide s'applique de manière équivalente aux laboratoires œuvrant dans le cadre des contrôles officiels (au sens du règlement UE 2017/625) ou aux laboratoires intervenant hors contrôle officiel.

### 4 MODALITES D'APPLICATION

Ce document est applicable à compter du **16 janvier 2023**.

Dans ce document, les formes verbales suivantes sont utilisées.

Le terme « **doit** » exprime 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. Ainsi, dès lors que le texte reprend des exigences, elles sont surlignées en gris.

Le terme « **devrait** » exprime une recommandation de bonne pratique. L'organisme est libre de ne pas suivre la recommandation s'il peut démontrer que les dispositions alternatives qu'il met en œuvre satisfont les exigences d'accréditation.

Le terme « **peut** » exprime une permission ou une possibilité. La possibilité est généralement employée pour indiquer des moyens de satisfaire une exigence donnée, que l'organisme est libre d'appliquer ou non.

### 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 ;
- La reformulation des recommandations en pistes de réflexion ;



- le retrait des exemples d'expressions de portées d'accréditation qui sont transférés dans le document Cofrac LAB INF 33 ;
- La mise à jour des références du document et des définitions ;
- des précisions concernant notamment les installations et conditions ambiantes, la traçabilité métrologique des équipements, les produits et services fournis par des prestataires externes, la sélection, vérification et validation des méthodes et la validité des 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. 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 la virologie animale présentés dans le document LAB INF 33.

## 7 GUIDE DE LECTURE DES EXIGENCES D'ACCREDITATION ET RECOMMANDATIONS

### 7.1 Personnel

NF EN ISO/IEC 17025 § 6.2  
LAB REF 02

Le laboratoire doit disposer de personnels ayant des connaissances générales en virologie 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 nécessitant une autorisation ? Par exemple :
  - la préparation des échantillons ;
  - la préparation des supports d'isolement ;
  - la mise en œuvre de l'essai ;
  - l'approbation des résultats ;
  - la sélection, vérification et validation des méthodes.
- Quels sont les éléments pris en compte par le laboratoire pour autoriser son personnel à exécuter les tâches prédéfinies ? Ces éléments peuvent par exemple inclure :
  - la production, l'entretien et le contrôle des supports d'isolement ;
  - la connaissance des différentes méthodes d'isolement et d'identification mises en œuvre ;
  - la connaissance des principes et points critiques des méthodes ;
  - les caractéristiques des virus recherchés et/ou utilisés ;
  - la connaissance des pathologies et de l'environnement réglementaire ;
  - la fréquence de réalisation des essais ;
  - la fidélité et la concordance des résultats obtenus ;
  - 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 de la tâche (incluant l'approbation des rapports) ;
  - la représentativité des essais ;
  - l'exploitation des données de surveillance de la validité des résultats ;
  - la formation.

## 7.2 Installations et conditions ambiantes

NF EN ISO/IEC 17025 § 6.3

Les conditions environnementales doivent permettre la bonne application des normes d'essais, ne pas modifier l'intégrité de l'échantillon soumis à l'essai et ne pas avoir d'influence sur la validité des résultats.

Le laboratoire peut s'appuyer sur les recommandations des documents NF U47-200, BP U47-555 et NF U47-600 pour la conception des locaux pour la culture cellulaire, l'ovoculture et les essais de biologie moléculaire.

### 7.2.1 Conception et agencement du laboratoire de virologie

Le laboratoire de virologie est une entité composée de locaux, de matériels, de personnels, de réactifs aptes à permettre la réalisation d'essais mettant en particulier en jeu des techniques spécifiques à la multiplication virale grâce à des cultures cellulaires, inoculation d'œufs embryonnés dans le but d'isolement et d'identification du virus, ou de la mise en évidence d'anticorps spécifiques (séroneutralisation sur œufs embryonnés ou sur cellules par exemple).

La recherche ou l'identification d'antigènes ou de génomes viraux par des méthodes ne faisant pas appel aux techniques spécifiques décrites ci-dessus peuvent être réalisées dans des locaux autres que ceux faisant l'objet de cette description. Il s'agit par exemple des méthodes d'immunochimie et de biologie moléculaire.

#### Pistes de réflexion :

- Comment le laboratoire s'assure que ses locaux et ses équipements permettent une bonne application des méthodes de virologie (cultures cellulaires, inoculation d'œufs embryonnés, identification de virus, mise en évidence d'anticorps spécifiques, ...) ? Par exemple, il dispose :
  - d'une (ou plusieurs) pièce(s) réservée(s) à la manipulation des milieux et réactifs non contaminés, et des œufs et/ou des cellules saines ;
  - d'une (ou plusieurs) pièce(s), en dépression par rapport aux autres pièces du laboratoire, en fonction du niveau de confinement considéré, dédiée(s) à la manipulation des virus et des cultures inoculées et/ou des œufs inoculés ;
  - de capacités de stockage en froid positif ou négatif des échantillons et des réactifs adaptées aux activités du laboratoire.
- Comment le laboratoire a agencé ses locaux de manière à réduire au minimum les contaminations potentielles (virales, bactériennes ou fongiques) provenant de l'environnement et des substances manipulées dans le laboratoire ?
- Quels moyens le laboratoire a mis en place pour réduire au minimum les contaminations potentielles ? par exemple :
  - l'organisation des circuits au sein du laboratoire ;



- la séparation temporelle des tâches ;
  - l'utilisation de système de transport étanche ou convenablement protégé ;
  - des mesures permettant d'éviter la formation d'aérosols potentiellement contaminants ;
  - la mise à disposition de blouses et équipements de protection dédiés à chaque activité ;
  - des plans de nettoyage/désinfection ;
  - un programme de contrôle des surfaces et de l'aérobiocontamination (fréquence, modalités) ;
  - des dispositions de décontamination à suivre en cas d'incident ;
  - la maintenance des installations de traitement de l'air.
- L'accès au laboratoire de virologie est-il réglementé et fait-il l'objet de procédure particulière ?

### 7.2.2 Décontamination, lavage, stérilisation du matériel et des locaux du laboratoire de virologie

Les conditions de décontamination, lavage, stérilisation doivent permettre une bonne maîtrise de la culture cellulaire et/ou des ovocultures.

Le laboratoire de virologie est maintenu en parfait état d'ordre et de propreté. Il est exempt de tout élément sans rapport avec les essais. Le bois nu est également proscrit.

#### Pistes de réflexion :

Les dispositions, relatives à la décontamination, au lavage et à la stérilisation du matériel et des locaux, prennent-elles en compte les éléments suivants :

- la récupération du matériel contaminé au cours des essais (par exemple : en utilisant un récipient contenant un produit virucide ou sac autoclavable disposé sur le plan de travail) ;
- le plan de nettoyage ;
- la fréquence de nettoyage des sols et sa justification (par exemple : après chaque journée de travail ou une fois par semaine si le laboratoire dispose d'autres moyens de limiter les risques de contamination croisée) ;
- la fréquence de nettoyage et de désinfection des plans de travail (généralement, avant et après chaque essai) ;
- les précautions prises lors des interventions extérieures pour éviter les contaminations ;
- l'utilisation de biocides ayant des propriétés démontrées.

#### Concernant l'utilisation des PSM et des enceintes à flux laminaire :

- Comment le laboratoire s'assure-t-il que les utilisateurs connaissent les limites d'utilisation (y compris les risques de perturbation des flux) ?
- Comment et à quelle fréquence sont assurés le nettoyage et la décontamination ?
- Ces fréquences de nettoyage et de décontamination sont-elles adaptées aux différentes parties de l'appareil (dessus et dessous du plan de travail, surfaces intérieures et extérieures, vitre, etc.) en fonction du risque de contamination ?
- Comment le laboratoire s'assure-t-il de la performance de ses PSM ?



## 7.3 Equipements – Traçabilité métrologique

NF EN ISO/IEC 17025 § 6.4, 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).

Ces équipements 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.

### 7.3.1 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 essais de virologie.

Le guide technique d'accréditation LAB GTA 90 « Etalonnage des instruments volumétriques à piston » précise des recommandations de bonnes pratiques relatives à l'étalonnage des instruments volumétriques à piston. Ce document peut servir de guide aux laboratoires pour mettre en place une procédure adaptée à leur utilisation.

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 pour vérifier ces caractéristiques doit être défini et argumenté ;
- pour les IVAP multicanaux, la justesse et la fidélité doivent être vérifiées pour chaque canal 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 la méthode utilisée tout au long de la réalisation de l'essai, y compris lors des phases initiales de traitement des échantillons qui peuvent être communes à différentes activités analytiques du laboratoire (exemple : manipulation des sérums par un automate en sérologie).

Ces vérifications sont faites sur la base d'essais biologiques pertinents.



### 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) étape(s) 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 ?

### **7.3.2 Enceintes thermostatées**

Pour toute enceinte thermostatée ayant une influence sur la validité des résultats (exemples : bain d'eau servant à la décomplémentation, enceinte destinée à maintenir une température d'incubation, enceinte assurant le stockage des réactifs, ...), une cartographie doit être réalisée préalablement à la mise en service et en cas d'intervention importante (par exemple : déplacement, réparation).

Le laboratoire peut, par exemple, suivre le fascicule FD V08-601 ou la norme FD X15-140 pour effectuer les cartographies des enceintes.

Il n'est pas exigé de réaliser une cartographie des congélateurs dont la température est inférieure ou égale à -40°C. Le suivi par une sonde raccordée au SI est suffisant pour garantir le fonctionnement de l'équipement.

Le contrôle effectif de la température est réalisé, par exemple, par enregistrement en continu (avec un intervalle d'acquisition des données adapté aux durées d'incubation). Si l'enceinte thermostatée est utilisée de façon intermittente, un enregistrement est effectué avant et pendant la durée d'utilisation.

Lorsque l'enrichissement de l'atmosphère en CO<sub>2</sub> est nécessaire dans une enceinte thermostatée, la validation des témoins réalisés à chaque série d'épreuve suffit à garantir la concentration en CO<sub>2</sub>.



Pistes de réflexion :

Pour la caractérisation des enceintes thermostatées ayant une influence sur la validité des résultats, le laboratoire tient-il compte des éléments suivants ?

- les modalités de la cartographie (en conditions réelles d'utilisation, à mi-charge ou charge pleine) ;
- la nécessité de matérialiser les zones acceptables ;
- la fréquence des cartographies et les éléments à prendre en compte pour la définir, par exemple : l'influence sur les résultats, le type d'équipements; les réparations et/ou les déplacements,...
- les différentes températures de cartographie selon l'utilisation de l'enceinte ;
- le(s) moyen(s) mis en œuvre pour le contrôle effectif de la température ;
- la fréquence d'étalonnage des sondes de suivi.

### 7.3.3 Balances

Les balances ayant une influence sur la validité des résultats (exemple : utilisées pour la fabrication des milieux de culture) doivent être raccordées au Système International d'unités.

Le guide technique d'accréditation LAB GTA 95 « Etalonnage d'instruments de pesage à fonctionnement non-automatique » précise des recommandations de bonnes pratiques relatives à l'étalonnage des instruments de pesage à fonctionnement non automatique. Ce document peut servir de guide aux laboratoires pour mettre en place une procédure adaptée à leur utilisation.

## 7.4 Produits et services fournis par des prestataires externes

NF EN ISO/IEC 17025 §.6.6  
LAB REF 02

Le laboratoire doit 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.

Les documents NF U47-200 et BP U47-555 décrivent les exigences concernant la gestion des réactifs.

### 7.4.1 Les cellules

Deux catégories de cellules peuvent être utilisées pour les recherches virales :

- les cellules secondaires et de lignée,
- les cellules primaires.

Lors d'utilisation des cellules primaires, il est recommandé d'utiliser des cultures cellulaires provenant d'un animal certifié Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiés (EOPS), ou à défaut provenant d'un animal issu d'un élevage contrôlé dont le statut sanitaire est certifié ou à défaut d'un animal présumé sain et, si possible, dont le statut sanitaire négatif ou indemne a été vérifié et/ou dont on connaît l'élevage d'origine.



Lorsque les méthodes d'analyse l'exigent, les contrôles mis en œuvre ne doivent pas révéler de contamination bactérienne (notamment les mycoplasmes), fongique et virale pouvant empêcher l'utilisation normale des cellules et/ou invalider les résultats.

Pistes de réflexion :

Concernant la préparation, le stockage et la conservation des cellules :

- Comment le laboratoire s'assure que les conditions de préparation, stockage et conservation des cellules saines permettent d'éviter les contaminations (notamment d'origine virale) ? Ces conditions sont-elles formalisées par le laboratoire ?
- Comment la traçabilité des informations sur les cellules (nature, origine, résultats des contrôles, état des stocks, identité du manipulateur, niveau de passage) est-elle assurée ?
- Quelles précautions sont prises en cas d'introduction de nouvelle lignée (primaire et secondaire) ou d'œufs (Par exemple : stockage dans une zone de « quarantaine » tant que les résultats des contrôles qualités initiaux ne sont pas connus) ?

Concernant les contrôles des cellules, le laboratoire s'interroge sur les éléments suivants :

- Comment le laboratoire documente-t-il les contrôles à réaliser ?
- En cas de recours à un prestataire externe pour les contrôles de contaminants, comment le laboratoire s'assure-t-il de ses compétences ?
- Les méthodes de contrôles des contaminations virales sont-elles appropriées à l'espèce d'origine des cellules et à leur utilisation ?
- A quelle fréquence le laboratoire s'assure-t-il de la sensibilité des systèmes cellulaires utilisés vis-à-vis des virus recherchés et du nombre de passages cellulaires réalisés ?

#### **7.4.2 Les œufs**

Le document BP U47-555 décrit les exigences concernant la gestion des œufs, supports de l'ovoculture.

Deux catégories d'œufs embryonnés peuvent être utilisées pour les recherches virales :

- œufs de reproductrices certifiées (EOPS),
- œufs de reproductrices conventionnelles dont le statut sanitaire est certifié.

#### **7.4.3 Les souches virales**

Le document NF U47-200 décrit les exigences concernant la gestion de la production des souches virales.

Le laboratoire peut produire une suspension stock de la souche virale mais devrait limiter le nombre de générations successives de manière à préserver les caractéristiques initiales de la souche utilisée.

Les souches virales sont conservées à une température inférieure ou égale à -65 °C.



Pistes de réflexion :

- Comment le laboratoire s'assure-t-il de la pertinence du choix de la souche virale par rapport à l'usage prévu (par exemple, absence de virus contaminant pouvant interférer avec l'essai) ?
- Comment sont tracées les informations relatives aux souches virales (nature, origine, résultats des contrôles) ?
- Le titre de la souche virale fait-il l'objet d'un suivi et le nombre de subcultures réalisées est-il suivi et tracé ?

#### 7.4.4 Réactifs et consommables divers

Le laboratoire identifie les consommables ayant une influence sur les activités de laboratoire (par exemple : Trypsine, milieux de culture, eau, sérum pour identification, conjugué, etc.)

A réception d'un nouveau de lot de sérum ou de conjugué, la dilution d'utilisation est confirmée par le laboratoire.

Pour les sérums, la spécificité est précisée et contrôlée par le fournisseur.

L'utilisation de tubes ou flacons à pas de vis extérieur adaptés pour la culture cellulaire est recommandée afin d'éviter la projection de particules infectieuses lors de l'ouverture.

#### 7.5 Revue des demandes, appels d'offres et contrats

NF EN ISO/IEC 17025 § 7.1

La revue de contrat peut être effectuée, selon les cas, 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).

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

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

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 ?
  - les délais et les modalités de conservation des échantillons ?
  - la nécessité d'émettre ou non une déclaration de conformité et le cas échéant, la règle de décision convenue avec lui ?
  - la nécessité d'émettre ou non des avis et interprétations ?
  - les modalités de transmission des résultats ?



## 7.6 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'OMSA, doivent être respectés.

Concernant les méthodes impliquant une identification par PCR, les prescriptions techniques les plus appropriées sont celles décrites dans la norme NF U47-600-2.

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'un virus pathogène spécifié ou recherche d'anticorps vis-à-vis d'un virus spécifié) et si elles ne se limitent pas à donner des lignes directrices pour la mise en œuvre des méthodes.
- Les méthodes du manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres et aquatiques de l'OMSA 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 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.

En dehors des cas cités ci-dessus, les méthodes sont considérées comme non reconnues et sont exprimées en méthodes internes dans les portées d'accréditation (portée de type fixe ou flexibilité de type FLEX 3). Une détermination des caractéristiques et une validation préalable conformément au document LAB REF 08 sont alors nécessaires.

### 7.6.1 Méthodes reconnues

Dans le cadre de la mise en œuvre de méthodes reconnues, le laboratoire doit appliquer strictement les méthodes décrites dans les documents publiés (manuels OMSA, méthodes officielles LRUE ou LNR) ou les normes techniques.

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 document LAB REF 08.

Le laboratoire établit un dossier de **confirmation** qui comporte, 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 de statut connu (positif et négatif).

Un dossier de confirmation doit être établi pour chaque variante opératoire mise en œuvre par le laboratoire (exemple révélation par immuno-peroxydase ou par immuno-fluorescence).



Les différents critères de confirmation pour une matrice donnée peuvent s'appliquer à des matrices considérées comme similaires et appartenant au même groupe de matrices (exemple : organes ou liquides biologiques).

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 ? Par exemple :
  - le choix du panel d'échantillons (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 ?

## 7.6.2 Méthodes non reconnues

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.

Les critères de performance d'une méthode dépendent du caractère qualitatif ou quantitatif de la méthode (cas de la recherche d'anticorps par séro-neutralisation).

### 7.6.2.1 Détermination des caractéristiques

Le laboratoire doit porter une attention particulière à l'identification et à la maîtrise des points critiques de la méthode et les justifier.

A titre d'exemple :

- Recherche de virus sur culture cellulaire : couples matrice/support cellulaire et caractéristiques des effets cytopathiques observés.
- Recherche d'antigènes viraux : anticorps et système de révélation.
- Recherche d'anticorps par séroneutralisation : couple souche virale/ support cellulaire, caractéristiques des effets cytopathiques observés et système de révélation le cas échéant.

Les caractéristiques suivantes sont prises en compte dans le dossier de validation. Si certaines d'entre elles ne sont pas prises en compte, le laboratoire justifie son choix dans son dossier.

- **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 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 pour lesquels le résultat est positif sont considérés comme des « faux positifs ». Les modalités d'établissement des seuils d'interprétation sont documentées ;
- **valeur de fidélité** (répétabilité, reproductibilité inter laboratoire ou à défaut intra laboratoire : fidélité intermédiaire) ;
- **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 et modifiées délibérément).

Pour une recherche d'anticorps par séroneutralisation, le laboratoire définit :

- **le titre viral d'épreuve** ;
- **les conditions de neutralisation** (durée et température de contact sérum/virus) avant mise en présence du système cellulaire ;
- **le seuil de positivité** ;
- **les conditions de validation du test et d'interprétation des résultats** : par exemple viabilité cellulaire, validation de la dose virale d'épreuve, gestion de l'éventuelle cytotoxicité des sérums, valeur attendue des traceurs.

Lorsque des contraintes particulières existent (exigences réglementaires ou professionnelles ...), le laboratoire doit s'assurer qu'il atteint le niveau de détectabilité requis au moyen de matériaux de référence correspondant à la contrainte.

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 7.6.2.2).

#### 7.6.2.2 Validation et autorisation d'emploi

##### a. Généralités

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

Le laboratoire doit apporter les éléments de vérification suivants, pour chaque matrice revendiquée (ou groupe de matrices) et pour chaque variante opératoire :

Paramètres à vérifier et/ou à connaître	Données bibliographiques / Données du développeur *	Données acquises pour l'évaluation de la performance d'une méthode par le laboratoire utilisateur **
Spécificité Diagnostique	Oui	Non
Sensibilité Diagnostique	Oui	Non
Fidélité (répétabilité et reproductibilité)	Oui	Oui
Robustesse	Oui	Oui (si possible)



Paramètres à vérifier et/ou à connaître	Données bibliographiques / Données du développeur *	Données acquises pour l'évaluation de la performance d'une méthode par le laboratoire utilisateur **
Concordance avec une méthode de référence ou avec une méthode déjà utilisée	Oui	Oui (si possible)
DéTECTABILITÉ (sensibilité et spécificité analytiques)	Oui	Oui
Evaluation de l'incertitude de mesure	Oui	Oui
<b>Et pour les méthodes quantitatives :</b>		
DéTECTABILITÉ à partir de matériaux de référence externes (s'ils existent)	Oui	Oui

\* Les items mentionnés dans cette colonne sont applicables lors de la détermination des caractéristiques par le développeur

\*\* Les items mentionnés dans cette colonne sont applicables 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'OMSA, 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, le laboratoire devrait de se référer aux tables statistiques des manuels OMSA 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 positif dans des conditions standardisées : même opérateur, même(s) lot(s) de réactif(s), même(s) instrument(s), mêmes conditions d'analyse. Il est recommandé, lorsque c'est possible, d'obtenir au moins 10 valeurs pour un même échantillon.

En pratique, ces essais sont réalisés au cours d'une même série. Il est recommandé pour les séroneutralisations d'utiliser au minimum un matériau fournissant un résultat proche du seuil d'interprétation.

- Reproductibilité intra-laboratoire (fidélité intermédiaire)

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

Il est recommandé, lorsque c'est possible, d'obtenir au moins 15 valeurs indépendantes en faisant varier le maximum de paramètres représentatifs de l'activité de routine prévue.



## Comparaison avec une méthode déjà utilisée au laboratoire

Cette comparaison ne peut intervenir qu'après la vérification de la répétabilité et de la reproductibilité.

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 statut connu.

#### c. Constitution du dossier de validation

Les informations et les résultats collectés au cours du processus de validation 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 dossier de validation est géré dans le système de management du laboratoire.

## 7.7 Manutention des objets d'essai

NF EN ISO/IEC 17025 § 7.4

### 7.7.1 Réception et stockage des échantillons

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

En fonction du contexte et de la réglementation en vigueur, la réception, le transfert, le déballage et la manipulation des échantillons reçus peuvent nécessiter la mise en œuvre de dispositions de confinement adaptées au niveau de risque correspondant.

Lorsque la réglementation et/ou les méthodes ne définissent pas les conditions d'acceptation des échantillons (type, nombre, conditions d'acheminement et de conservation, informations nécessaires au traitement de l'échantillon ...), le laboratoire doit établir ses propres critères et les tenir à disposition de ses clients.

### 7.7.2 Préparation des échantillons

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 essais sont conservés au moins jusqu'à la validation finale des résultats puis éliminés selon des modalités qui évitent toute contamination.



Sauf mention particulière dans les référentiels externes applicables, le laboratoire définit ses conditions de stockage.

## 7.8 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 fréquence de ces contrôles doit être définie et justifiée, par exemple, par une analyse des risques et des opportunités liées aux activités concernées.

### 7.8.1 Contrôles qualité internes

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

Au minimum, chaque série d'essai comprend un témoin positif et un témoin négatif. Pour les séroneutralisations, les titres des virus d'épreuve et des sérums traceurs sont suivis de telle sorte que les tendances soient détectables.

Lorsque les matériaux de référence existent et sont disponibles (virus et sérum), le laboratoire en dispose, les utilise selon une périodicité définie et les exploite.

### 7.8.2 Contrôles qualité externes

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

Ces essais d'aptitude 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, le laboratoire, pour assurer la cohérence de ses résultats, devrait corréler ses résultats avec ceux d'autres laboratoires.

#### Pistes de réflexion :

- La surveillance de la performance est-elle planifiée et la périodicité est-elle justifiée (exemple : analyse de risque) ?
- Le plan de participation couvre-t-il l'ensemble des compétences et matrices de la portée d'accréditation ?
- En cas de résultats non conformes, la procédure relative aux travaux non conformes (§ 7.10) est-elle mise en œuvre ?
- 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) ?



## 7.9 Rapport sur les résultats

NF EN ISO/IEC 17025 § 7.8  
LAB REF 02

La méthode utilisée doit être identifiée dans le rapport d'essais. Lorsque le laboratoire est accrédité pour plusieurs méthodes pour une même caractéristique recherchée, la méthode effectivement utilisée doit être nommée sans ambiguïté.

Dans le cas de l'utilisation de mélanges d'échantillons, le rapport d'essais 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 d'essais.

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 sont considérées comme étant hors champs d'accréditation.

### Pistes de réflexion :

Concernant les avis et interprétations et les déclarations de conformité, le laboratoire s'interroge sur les éléments suivants :

- Comment sont-ils identifiés dans les rapports d'essais ?
- Les bases sur lesquelles ils se fondent sont-elles clairement indiquées ? L'origine des critères est-elle précisée dans les rapports ?
- Dans le cadre des contrôles officiels, sont-ils permis par la réglementation ?
- Font-ils partie intégrante du rapport et sont-ils couverts par l'accréditation lorsque les conditions sont réunies ?
- Pour les déclarations de conformité, comment la règle de décision est-elle précisée dans les rapports ?

## 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 EN ISO 8655-2 « Appareils volumétriques à piston - Partie 2 : pipettes à piston » ;
- NF U47-300 « Méthodes d'analyse en Santé Animale -Terminologie » ;
- Arrêté du 16/07/2007 fixant les mesures techniques de prévention notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologique, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes.