

Françoise LE VACON¹

Intérêt de l'assurance qualité dans le domaine de la biologie moléculaire des virus

RÉSUMÉ

L'assurance qualité est aujourd'hui une dynamique dans les laboratoires de biologie médicale. Dans le domaine de la biologie moléculaire cette démarche se déroule de façon similaire. De nombreux éléments de méthode permettent une mise en œuvre du contrôle de qualité pour assurer la qualité des résultats. L'accréditation d'un laboratoire de biologie moléculaire est donc parfaitement possible avec les méthodes utilisant des kits commercialisés par les industriels et ceci quel que soit le type de norme à mettre en œuvre, NF EN ISO/CEI 17025 ou NF EN ISO 15189.

MOTS-CLÉS

Assurance qualité, accréditation, biologie moléculaire.

Interest of quality insurance in the field of virus molecular biology

SUMMARY

Quality insurance is nowadays a dynamics in clinical chemistry laboratories. In the field of molecular biology the quality approach can be developed in the same way. Many elements of method contribute to ensure the quality of the results. The accreditation of this kind of laboratories is possible especially with the methods using systems available on the market and this whatever the type of standard adopted NF IN ISO /CEI 17025 or NF EN ISO 15189.

KEYWORDS

Quality insurance, accreditation, molecular biology

I - Introduction

L'assurance qualité est aujourd'hui entrée dans les laboratoires d'analyses de biologie médicale (LABM) pour le plus grand bien de nos résultats. Toutefois, si beaucoup de biologistes sont désormais convaincus de son intérêt, la démarche doit parfois être confortée par d'autres. Ainsi, dans le domaine de la biologie moléculaire le concept est encore émergent et n'a peut-être pas encore complètement fait preuve de sa nécessité. La mise en œuvre de certaines thérapeutiques, par exemple un traitement par les antirétroviraux chez des patients séropositifs pour le VIH, dans le contexte desquelles elle peut se révéler nécessaire concourt cependant à son développement. En effet, dans ce cadre, un résultat de charge virale déclenche chez le clinicien une attitude thérapeutique, un résultat parfaitement maîtrisé se révèle donc d'autant plus nécessaire.

II - L'accréditation pourquoi ?

Dans le domaine de la biologie moléculaire, quelques laboratoires se sont engagés dans une démarche d'accréditation selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 (1). Les raisons qui motivent cette démarche dans ce domaine particulier sont similaires à celles qui la justifient dans les autres disciplines de la biologie médicale :

- Le souci de la concurrence conduit à la volonté de démontrer un niveau de qualité dans le cadre d'une reconnaissance par une entité extérieure indépendante et ce, tant dans le domaine organisationnel que dans celui de la technique.
- Le souci de démontrer un niveau de compétence dans un domaine monopolistique afin de prouver que le monopole ne rend pas implicite l'existence de l'entité.
- Le souci d'obtenir un label extérieur de qualité dont la reconnaissance au niveau européen permet

¹ EFS Bretagne - Laboratoire d'immunologie virale - rue, Pierre Jean Gineste - 35000 Rennes

Intérêt de l'assurance qualité dans le domaine de la biologie moléculaire des virus

la participation à des études, des évaluations, etc. La biologie moléculaire reste aujourd'hui encore une discipline pratiquée par un nombre relativement peu important de laboratoires de biologie médicale. Il apparaît donc d'autant plus important que les entités qui pratiquent, pour d'autres laboratoires, des analyses relevant de ce domaine puissent disposer d'une preuve de leur compétence technique.

III - Mise en œuvre d'un système d'assurance qualité dans le cadre de l'accréditation des laboratoires

1. La biologie moléculaire n'est pas différente des autres technologies de biologie médicale

Même si la biologie moléculaire constitue une technologie plus récente, elle apparaît à l'instar d'autres technologies plus usitées relativement facile à « procéder », à « analyser » et à « valider ». Facile à suivre comme d'autres processus de biologie médicale, elle se révèle donc également facile en terme de contrôle de qualité car aujourd'hui les fabricants s'attellent à produire ces outils de contrôles sous forme d'échantillons spécifiques. Il apparaît clairement que l'accréditation d'un laboratoire de biologie moléculaire s'appréhende de la même façon que celle d'un laboratoire d'une autre discipline de la biologie et que seule la méconnaissance peut induire une appréhension vis-à-vis de cette démarche. Il apparaît toutefois vrai qu'il est plus aisé d'entamer cette démarche par des processus impliquant l'utilisation de trousseaux commerciaux correspondant à des tests dont le résultat s'exprime sous une forme qualitative.

Dans ce contexte, l'introduction de l'assurance qualité dans un laboratoire de biologie moléculaire et l'accréditation selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 ou NF EN ISO 15189 (2) constitue une démarche pertinente et une opportunité à considérer.

Un laboratoire ayant déjà entamé une démarche de ce type dans les domaines de la biochimie, de l'immunologie ou de l'hématologie ne devrait pas rencontrer de difficulté majeure pour franchir le pas en biologie moléculaire. La philosophie reste la même et les craintes associées spécifiquement au secteur de la biologie moléculaire disparaissent lorsque l'on applique la démarche qui vaut pour l'ensemble des domaines de la biologie médicale.

Le laboratoire d'immunologie virale du site rennais de l'EFS Bretagne a entamé ce type de démarche et nous présentons dans cet article les grandes lignes de cette expérience au travers de quelques exemples illustrant les étapes de mise en œuvre de l'assurance qualité afin d'accréditer ce secteur d'activité. Le système utilisé au laboratoire pour le diagnostic génomique viral (DGV) est constitué d'une chaîne bioMérieux - Chiron qui repose sur la mise

en œuvre des matériels suivants : un automate de distribution d'échantillons et de réactifs GENESIS (Tecan, Mannedorf/Zurich, Suisse), bain-marie, vortex, un système de traitement de l'échantillon assurant notamment les lavages en champ magnétique (Target Capture System), et un luminomètre pour la lecture des résultats en fin de processus.

2. Par où commencer ?

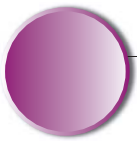
La mise en œuvre et la maîtrise d'un système qualité nécessitent de considérer plusieurs paramètres clés :

- le personnel et ses compétences : qualification, formation, habilitation ;
- le matériel : cahier des charges, qualification, fiche signalétique, modes opératoires d'utilisation, protocoles de vérification périodique, enregistrements de suivi des maintenances (chapitre 5.5 de la norme NF EN ISO/CEI 17025) ;
- le milieu ou environnement : suivi des conditions ambiantes (température, pression d'une pièce à l'autre), suivi de la non-contamination du laboratoire, entretien des locaux (ne pas oublier la formation du personnel d'entretien) (chapitre 5.3 de la norme NF EN ISO/CEI 17025) ;
- la matière : on regroupe sous cet intitulé, d'une part, les réactifs, et d'autre part, la matière première constituée par les échantillons sanguins.
 - Les échantillons sanguins doivent être prélevés de manière à obtenir le fluide adapté (sérum, plasma) acheminé dans de bonnes conditions de température et dans des délais raisonnables par rapport au moment du prélèvement (chapitre 5.8 de la norme NF EN ISO/CEI 17025).
 - Les réactifs : feront l'objet de toutes les attentions. Les réactifs en kits seront simples à valider nous y reviendront. Les réactifs dits « maisons » poseront plus de problème. En routine, un système de contrôle de qualité permettra un suivi dans le temps avec une validation analytique appropriée.
- les méthodes seront décrites dans le système documentaire.

Ces paramètres doivent être considérés selon une certaine logique, d'autant plus importante que le secteur de biologie moléculaire est nouveau et qu'il débute son activité. Ainsi on ne peut pas considérer la réalisation des analyses sans un personnel adéquatement formé, et l'obtention de résultats valides sans un matériel et des réactifs validés, dans des locaux conformes.

2.1 - Le personnel

De façon évidente, la mise en place de la démarche ne pourra être entreprise sans un personnel formé, qui maîtrise les tâches à exécuter, qui est habilité à les pratiquer, qui comprend le sens de son travail et contribue à la dynamique d'amélioration de la qualité par sa motivation (chapitre 5.2 de la norme NF EN ISO/CEI 17025). Le personnel a donc été formé tant sur le plan théorique, formation au niveau national par les experts du DGV français, que pratique, formation par les ingénieurs de la chaîne



utilisée. A l'issue de cette formation une habilitation a été délivrée à l'issue d'un test pratique, d'une part, par le fabricant au regard d'un test effectué à l'aveugle, et d'autre part, par le biologiste en fonction du résultat de ce test et de la formation théorique, l'ensemble étant tracé.

2.2 - Le matériel

Trois mois avant le démarrage en routine, les différents éléments de la chaîne DGV ont été qualifiés en s'appuyant sur les grandeurs classiques de la métrologie. Un protocole a été décidé au niveau national (3) en collaboration avec la branche d'activité, Chiron Blood Testing, de la société Chiron. Les différentes mesures réalisées ont permis de mettre sur pied les protocoles relatifs aux contrôles périodiques de ces appareils :

- au niveau de l'automate de distribution d'échantillons et de réactifs : tests colorimétriques et gravimétriques trimestriels ;
- au niveau du système de traitement de l'échantillon : tests gravimétriques avec 3 TTU (Ten Tubes Unit) pesés vides, puis remplis, puis après aspiration (qualité de la distribution et de l'aspiration) ;
- vortex : vérification de l'absence d'éclaboussure sur le papier absorbant couvrant les TTU et ceci à toutes les vitesses tous les 6 mois ;
- bain-marie : vérification par sonde thermique en 6 points annuellement ;
- pipettes : vérification trimestrielle des volumes utilisés par 10 pesées ;
- luminomètre : utilisation du protocole fabricant tous les 3 mois.

2.3 - Le milieu

On connaît l'importance de l'influence de la température et particulièrement de la « température ambiante » sur les résultats d'analyse en biologie moléculaire. Aussi un contrôle quotidien de la température dans les deux pièces dédiées aux étapes de pré-amplification et de post-amplification est réalisé.

La pression a été réglée dans les deux pièces de

manière à éviter un retour en arrière de matière contenant des amplicons de la salle de post-amplification vers la salle de pré-amplification. Une différence de 10 mba est requise de manière à maintenir ces conditions et seule cette différence est vérifiée chaque jour sur des manomètres situés à l'extérieur des salles.

2.4 - La matière

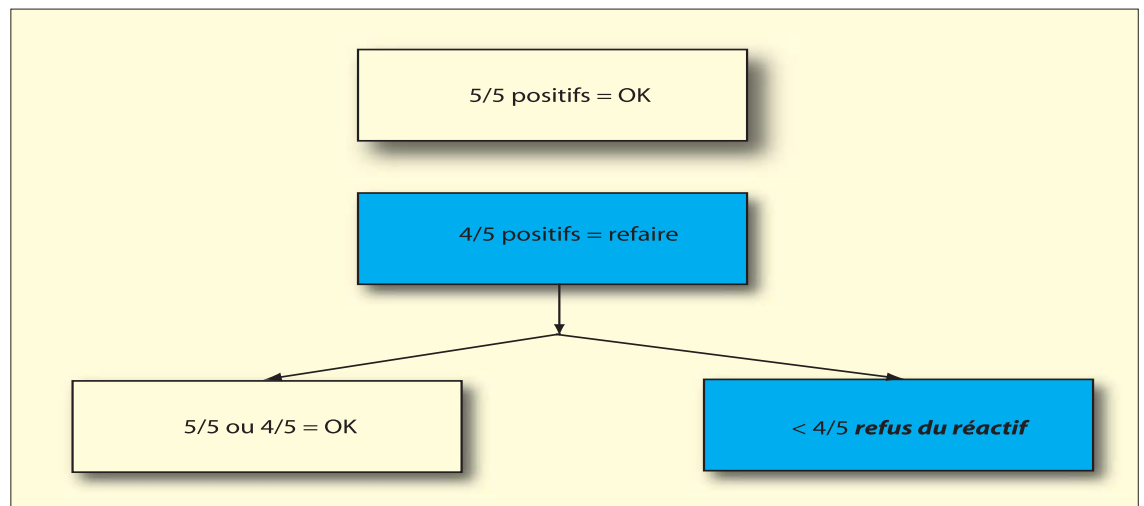
Ce point clef est abordé au travers de la validation du couple matériel-réactif avec un échantillon dont la nature est bien précisée (chapitre 5.4 de la norme NF EN ISO/CEI 17025 et LAB GTA 04 (4)). En effet, si l'on a validé une méthode sur plasma, la réalisation de celle-ci sur sérum (au cas où celle-ci serait praticable sur ce type d'échantillon) nécessitera la réalisation d'une nouvelle validation. Deux points sont essentiels à noter à ce niveau :

- Le dossier de validation constitue le pré-requis à l'accréditation dans la mesure où son analyse par le Cofrac constitue une étape initiale du processus d'accréditation. Appelée étude de recevabilité, elle est effectuée par un expert technique du domaine concerné et son résultat conditionne la poursuite du processus d'accréditation.
- La validation analytique (traitée dans un document du Cofrac (5)) permet de maîtriser la méthode dans son contexte analytique, de définir les conditions de validation analytique et de calculer les incertitudes de mesures. Elle constitue le premier pas vers le contrôle de qualité.

Concernant notre expérience, la validation a été réalisée au cours d'une période de trois mois ayant précédé la mise en routine du laboratoire. L'étude de la répétabilité, de la reproductibilité, de la sensibilité (gamme en 10 points de charges virales de 2 à 200 UI/mL de charge virale en ARN du VHC et de 5 à 500 copies/mL d'ARN du VIH) et de la spécificité s'est appuyée sur l'analyse d'un nombre important d'échantillons, soit 250. Cette période d'acquisition s'est accompagnée d'une montée en puissance progressive ayant permis la mise en routine de l'activité.

Il est également important de préciser que la vali-

Figure 1
Algorithme décisionnel utilisé lors du contrôle à réception d'un réactif.



Intérêt de l'assurance qualité dans le domaine de la biologie moléculaire des virus

dation de méthode dans le contexte de l'utilisation de réactifs dits « maisons », doit démontrer à la fois les points exigés par le Cofrac dans le contexte de l'utilisation des réactifs mais aussi ceux qui relèvent de la bibliographie et qui sont normalement fournis par le fabricant et la littérature scientifique. Or ici, le laboratoire se retrouve dans une situation où il est à la fois fabricant et utilisateur. De ce fait, cette validation doit être très aboutie et fait l'objet d'exigences supplémentaires vis-à-vis de critères comme la stabilité des réactifs, leur robustesse, ainsi que la vérification de l'impact de tous les éléments de variations (température, volumes, durées) au moyen d'un plan d'expérience.

Aujourd'hui, chaque réception de lot de réactif fait l'objet d'un contrôle de conformité en utilisant les calibrateurs du fabricant comme dans toute série. L'incorporation de contrôles positifs, ou « run-controls » VIH et VHC (charges virales respectives de 100 copies/mL et 50 UI/mL) et des contrôles de charges virales plus faibles, à la limite de la sensibilité de la trousse (VIH : 55 copies /mL et VHC : 10 mUI/mL) est également réalisé. Chacun de ces quatre contrôles est déposé 5 fois (figure 1).

2.5 - Les méthodes

Elles sont décrites dans les procédures dont certaines sont imposées par les Normes. Beaucoup d'entre elles restent les mêmes quelle que soit la discipline (achats, gestion des non conformités, action correctives et préventives, gestion des réactifs...), seules diffèrent celles qui sont spécifiques à ce domaine d'activité (l'organisation du laboratoire selon un mode différent). Terminer l'exercice par cet aspect du système documentaire peut certainement conduire à simplifier l'ensemble du processus.

3. Points particuliers

3.1 - Analyser ce qui est réalisé au laboratoire

Cette phase d'analyse est essentielle. La description détaillée de la chaîne d'étapes réalisées au laboratoire, du tube échantillon au rendu du résultat final constitue un exercice essentiel pour la rédaction du système documentaire, la réalisation de l'analyse de risque et l'identification des incertitudes de mesures. En effet, nous sommes dans l'expérience décrite ici dans le cas d'une méthode qui peut être considérée comme une méthode qualitative. Il est donc particulièrement difficile de définir par le calcul une incertitude de mesure sur le résultat final exprimé de façon binaire : positif ou négatif). Ceci est particulièrement vrai en biologie moléculaire où l'on peut se situer dans un modèle de type « tout ou rien ». En effet, par exemple, pour de très faibles charges virales, un pipetage ne conduira pas toujours à pipeter une particule virale, le risque de ne rien prélever est concret d'où l'intérêt de cette approche par l'analyse de risque afin de prouver la maîtrise du processus. A chaque étape pourra être éventuellement identifié un risque pour lequel il sera nécessaire de réfléchir à une action à opposer de manière à prévenir ce risque et à garantir la maîtrise du résultat.

3.2 - Contrôle de qualité

Le contrôle de qualité constitue le maillon clef de la validation du processus, de la maîtrise de celui-ci et de la qualité propre des résultats issus de ce processus. Il permet d'assurer la qualité propre du résultat (chapitre 5.9 de la norme NF EN ISO/CEI 17025). On distingue notamment le contrôle interne de qualité (CIQ) et le contrôle externe de qualité (CEQ).

- Le CIQ correspond à un contrôle intralaboratoi-

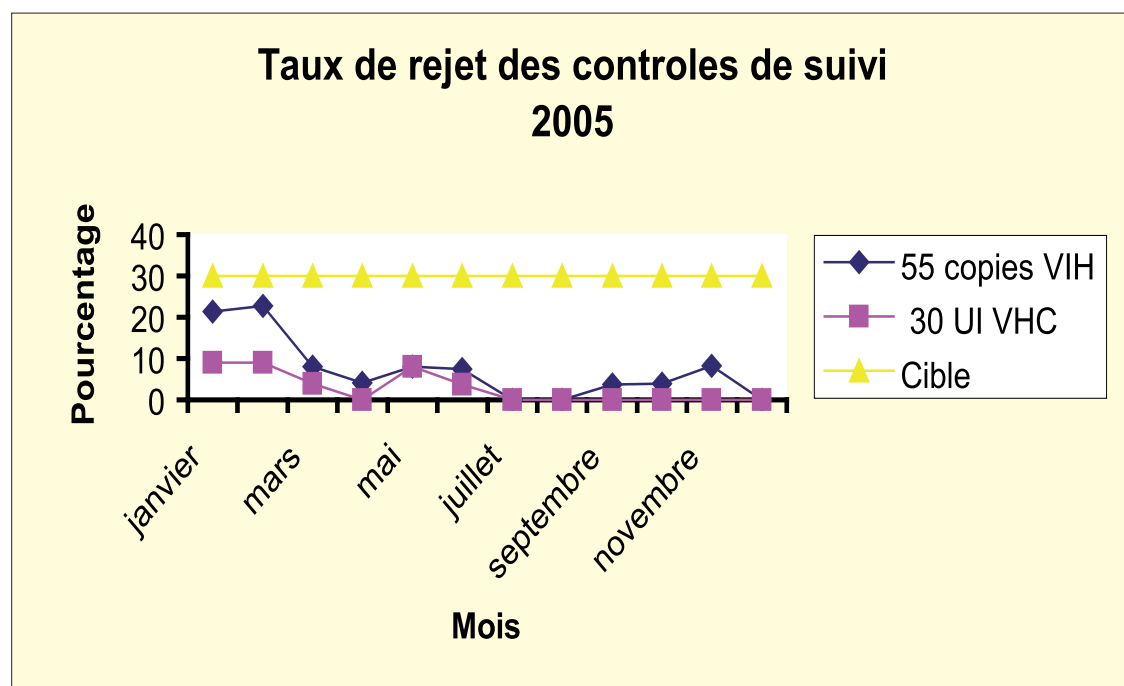
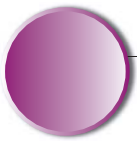


Figure 2
Taux de rejet des contrôles de suivi pour l'année 2005.



re. Effectué par le biais de l'utilisation d'un échantillon de contrôle intégré à chaque série d'analyses, il permet une validation analytique qui tient compte de cet échantillon et permet le suivi qualitatif du processus analytique dans le temps (*figure 2, voir page précédente*). Sa mise en œuvre peut être facilitée par des outils informatiques.

- Le CEQ est un contrôle interlaboratoire rétrospectif on distingue :
 - La forme obligatoire correspondant aux échantillons adressés par l'AFSSaPS à tous les laboratoires en fonction des analyses qu'ils pratiquent, la biologie moléculaire fait partie intégrante des programmes de l'AFSSaPS.
 - La forme volontaire correspondant aux programmes ponctuels auxquels les laboratoires peuvent s'inscrire afin de recevoir d'organismes privés ou publics des échantillons qui permettront selon le programme et selon les analyses, de vérifier que les résultats obtenus correspondent bien à ceux attendus.

Quel que soit le contexte, en cas d'analyses quantitatives au regard des résultats obtenus par le laboratoire et par les autres participants, un calcul d'incertitudes de mesures peut être mis en œuvre en tenant compte des éléments du CIQ (5).

3.3 - La traçabilité

Enfin, il est nécessaire de conserver les preuves (chapitre 5.6 de la norme NF EN ISO/CEI 17025) de ce qui est réalisé :

- Compte rendu d'intervention des appareils ;
 - Résultats analytiques avec « qui a fait quoi » et comment ;
 - Éléments des validation des méthodes ;
 - Certificats de conformité lors de vérification des équipements par des outils raccordés.
- Tout cela fait l'objet d'une traçabilité qui peut pa-

raître drastique mais qui se révèle particulièrement utile en cas de problème pour mettre le doigt sur les analyses à reprendre, par exemple.

IV - Conclusion

La biologie moléculaire nécessite du matériel, du personnel, un environnement, des réactifs, des consommables et des méthodes qui n'ont rien de véritablement plus exceptionnels que les autres méthodes d'analyses de la biologie médicale. Les éléments que l'on peut extraire du dossier de validation de méthode permettent une mise en œuvre du contrôle de qualité pour assurer la qualité des résultats. Les contrôles externes de qualité que ce soit ceux de l'AFSSaPS ou de sociétés privées ou publiques existent sur le marché.

L'accréditation d'un laboratoire de biologie moléculaire est donc parfaitement possible. Certains se sont déjà prêtés à l'exercice avec succès et ceci avec des technologies différentes selon les laboratoires. On doit noter que le fait d'inclure dans l'accréditation uniquement des méthodes utilisant des kits industriels constitue une approche beaucoup plus aisée. En effet, les méthodes « maisons » doivent faire l'objet de validation de méthode de type 3 dite « portée flexible » (méthodes développées au laboratoire) qui demandent un investissement énorme relevant presque de la recherche et développement. Quant à la question de savoir quel type de norme, NF EN ISO /CEI 17025 ou NF EN ISO 15189, doit être mise en œuvre, le choix relève de chaque laboratoire dans la mesure où les deux normes sont acceptées par le Cofrac. La première a été révisée récemment et se trouve en parfaite adéquation dans sa partie « qualité » chapitre 4 avec la norme ISO 9001 version 2000.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. NF EN ISO/CEI 17025 : mai 2000, www.afnor.fr

(2) Laboratoires d'analyses de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. ISO 15189: février 2003, www.iso.ch

(3) LEPOT I., CHUTEAU C. NAT and transfusion safety : bioMérieux/Roche production chain performances - Chiron production chain performances, *Transfus. Clin. Biol.*, 2003, 10(2), 69-71.

(4) Guide de validation des méthodes en biologie médicale, Lab GTA 04, www.cofrac.fr

(5) Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale, LAB GTA 06, www.cofrac.fr