

GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION

Essais et Analyses en Santé Végétale

LAB GTA 40

Révision 00

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI



SOMMAIRE

1	OBJET DU DOCUMENT	3
2	REFERENCES ET DEFINITIONS	3
2.1	REFERENCES	3
2.2	DEFINITIONS.....	4
2.3	SIGLES ET ABREVIATIONS	4
3	DOMAINE D'APPLICATION	4
4	MODALITES D'APPLICATION	5
5	SYNTHESE DES MODIFICATIONS	5
6	EXPRESSION DE LA PORTEE D'ACCREDITATION	5
6.1	PORTEE DE TYPE STANDARD (A).....	5
6.1.1	<i>Exemple de demande de type A1</i>	6
6.1.2	<i>Exemple de demande de type A2</i>	6
6.1.3	<i>Exemple de demande de type A3</i>	8
6.2	PORTEE DE TYPE ETENDU (B).....	8
7	GUIDE DE LECTURE DES EXIGENCES D'ACCREDITATION ET RECOMMANDATIONS	11
7.1	GENERALITES.....	11
7.2	PERSONNEL	11
7.3	REVUE DES DEMANDES ET DE CONTRAT, ET SERVICES AU CLIENT	11
7.4	ECHANTILLON POUR LABORATOIRE	12
7.4.1	<i>Réception et stockage des échantillons</i>	12
7.4.2	<i>Préparation des échantillons</i>	12
7.5	METHODES.....	12
7.5.1	<i>Méthode reconnue en santé végétale</i>	12
7.5.2	<i>Méthodes reconnues</i>	12
7.5.3	<i>Méthodes non reconnues</i>	13
7.5.4	<i>Incertitudes</i>	14
7.6	INSTALLATION ET CONDITIONS AMBIANTES.....	14
7.7	EQUIPEMENTS – TRAÇABILITE DU MESURAGE	14
7.7.1	<i>Micropipettes et automates de pipetage et de distribution</i>	15
7.7.2	<i>Enceintes thermostatées et thermomètres</i>	15
7.7.3	<i>Spectrophotomètres</i>	15
7.7.4	<i>Thermocycleurs</i>	15
7.7.5	<i>Balances et masses</i>	16
7.7.6	<i>Autres équipements</i>	16
7.7.7	<i>Milieux de culture et réactifs</i>	16
7.8	QUALITE DES RESULTATS	16
7.9	RAPPORTS	16
8	BIBLIOGRAPHIE	17

1 OBJET DU DOCUMENT

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

En ligne avec l'annexe B de la norme NF EN ISO/CEI 17025, le présent Guide Technique d'Accréditation (GTA) constitue un guide de lecture des exigences de ladite norme pour les essais et analyses en phytopathologie (bactériologie, mycologie, virologie) et sur les ravageurs et parasites de plantes (nématologie et entomologie). En complément, il établit des recommandations issues des bonnes pratiques admises dans ces domaines.

Enfin, il contient des informations utiles aux laboratoires dans le cadre de leur démarche d'accréditation, notamment celles qui sont relatives à l'expression de la portée d'accréditation et aux règles particulières d'évaluation des laboratoires par le COFRAC.

Ce guide ne se substitue pas aux exigences 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/CEI 17025 et 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 aux exigences de la norme citée supra.

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/CEI 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/CEI 17025 »,
- **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 882/2004 »,
- **MOA 008** « Techniques sérologiques ELISA : DAS et dérivés »,
- **MOA 010** « Techniques d'immunofluorescence »,
- **MOA 022** « Techniques qualitatives d'amplification enzymatiques des acides nucléiques : PCR (polymerase chain réaction), RT-PCR (reverse transcription-PCR) et PCR temps réel »,
- **MOA 012** « Extraction, détection et identification morphobiométrique des nématodes phytoparasites ».
- **MOA REP 001** « Répertoire des recettes en vigueur au LNPV »

2.2 Définitions

Accréditation : attestation délivrée par une tierce partie constituant une reconnaissance formelle de la compétence d'un laboratoire à réaliser des activités d'essais, d'analyses et/ou d'étalonnages. La « tierce partie » représente l'organisme accréditeur qui est, en France, le COFRAC (*extrait LAB REF 05*).

Portée d'accréditation : énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le laboratoire est accrédité. Elle se compose de lignes de portée d'accréditation (*extrait LAB REF 05*).

Ligne de portée d'accréditation : elle est définie a minima par les champs « Objet », « Caractéristique mesurée ou recherchée », « Principe de la méthode » et « Référence de la méthode ».

Comparaison inter-laboratoires : organisation, exécution et évaluation de mesurages ou d'essais sur la même entité ou sur des entités similaires par deux laboratoires ou plus selon des conditions prédéterminées (*extrait LAB REF 05*).

2.3 Sigles et abréviations

- AFNOR, Association Française de Normalisation, www.afnor.org
- CIL, Comparaisons Inter-Laboratoires
- COFRAC, Comité Français d'Accréditation, www.cofrac.fr
- DAS, Double Antibody Sandwich
- DGAL, Direction Générale de l'ALimentation
- DO, Densité Optique
- EA, European Cooperation for Accreditation
- EIL, Essais Inter-Laboratoires
- ELISA, Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
- EMT, Ecart Maximum Toléré
- IF, ImmunoFluorescence
- ISO, International Standard Organisation (Organisation Internationale de normalisation), www.iso.org
- LNR, Laboratoire National de Référence
- PCR, Polymerase Chain Reaction
- RT-PCR, ReverseTranscription-Polymerase Chain Reaction
- SI, Système International d'unités

3 DOMAINE D'APPLICATION

Ce guide technique d'accréditation s'adresse aux :

- laboratoires d'essais ou d'analyses accrédités ou candidats à l'accréditation selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 pour les domaines cités en objet,
- évaluateurs du COFRAC, pour lesquels il constitue une base d'harmonisation pour l'évaluation,
- membres des instances du COFRAC (Comité de Section Laboratoires, Commission Technique d'Accréditation Biologie et Agro-Alimentaire, Commission Interne d'Examen des Rapports pour l'Accréditation), pour lesquels il constitue un outil d'aide à la décision,
- clients des laboratoires d'essais accrédités sur ces domaines,
- instances officielles concernées par ces domaines.

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

Sont notamment concernées par ce guide, les techniques

- immuno-enzymatiques (ELISA),
- d'immunofluorescence (IF),
- d'amplification d'acides nucléiques (PCR, RT-PCR, PCR temps réel...),
- d'observation morphologique et morphobiométrique.

L'accréditation est délivrée pour une portée définie par le laboratoire, correspondant à ses besoins et suivant les différentes options décrites dans le document LAB REF 08 (Expression et évaluation des portées d'accréditation).

Ce guide s'applique de manière équivalente aux laboratoires œuvrant dans le cadre des contrôles officiels (au sens du règlement CE 882/2004 et ses révisions) ou aux laboratoires intervenant hors contrôles officiels. Pour les premiers, les prescriptions du document LAB REF 16 complètent celles du LAB REF 08.

4 MODALITES D'APPLICATION

Ce document est applicable à compter du 1^{ER} JUIN 2016.

5 SYNTHÈSE DES MODIFICATIONS

Il s'agit de la première version du document. Il porte donc l'indice de révision 00 et aucune marque de modification n'est indiquée.

Ce document annule et remplace les programmes 158, 159, 163 et 166.

6 EXPRESSION DE LA PORTEE D'ACCREDITATION

La portée d'accréditation est définie, conformément aux principes décrits dans le document LAB REF 08, par le laboratoire à partir des quatre éléments suivants :

1. Objet (*matrice telle que soumise à l'essai : exemples : semences, tubercules, vigne*),
2. Grandeur ou caractéristique mesurée (*exemples : virus, bactéries, phytoplasmes*),
3. Principe de mesure (*exemples : ELISA, Immunofluorescence, PCR,...*),
4. Référence de la méthode (*exemples : méthode officielle, méthode interne + n° version*).

6.1 Portée de type standard (A)

Pour ce type de portée, le laboratoire définit le niveau de flexibilité qu'il revendique (3 options). Les 3 types de portées sont définis dans le document « Expression et évaluation des portées d'accréditation (LAB REF 08) ».

Dans les exemples cités dans les paragraphes suivants, le terme « méthode interne *adaptée* de » signifie que le laboratoire a réalisé une modification de la méthode reconnue citée pour l'ajuster aux besoins des clients ou à ses propres besoins.

6.1.1 Exemple de demande de type A1

Ce type de portée peut s'appliquer à des laboratoires qui pratiquent leurs propres méthodes ou des méthodes précisément définies dans la réglementation ou qui adaptent des méthodes reconnues et qui ne souhaitent pas les faire évoluer.

La compétence du laboratoire n'est reconnue que pour des essais correspondant à un protocole de mesure figé. En cas de modification de ce protocole, le laboratoire n'est pas autorisé à rendre les résultats sous couvert de l'accréditation sans évaluation et accord préalable du Cofrac.

Conformément au document LAB REF 08 et sur demande du laboratoire, il est possible de ne pas faire figurer les indices de révision des méthodes internes dans les annexes techniques si les critères décrits dans ce document et évalués sur site sont correctement respectés.

AGROALIMENTAIRE / VEGETAUX / Virologie <i>(Essais et analyses en virologie et/ou en phytoplasmodologie végétale)</i>			
OBJET	CARACTERISTIQUE MESUREE OU RECHERCHEE	PRINCIPE DE LA METHODE	REFERENCE DE LA METHODE
Plantes herbacées	Cucumber Mosaic Virus (CMV)	Détection par ELISA	Méthode interne X version Y
Vignes (feuilles) (<i>vitis sp.</i>)	Phytoplasmes de la Flavescence dorée et du Bois noir	Détection par PCR multiplex en temps réel	Méthode interne X version Y adaptée de la MOA 006 partie B

AGROALIMENTAIRE / VEGETAUX / Bactériologie <i>(Essais et analyses en bactériologie végétale)</i>			
OBJET	CARACTERISTIQUE MESUREE OU RECHERCHEE	PRINCIPE DE LA METHODE	REFERENCE DE LA METHODE
Souche	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	Détection par PCR	MOA 030 partie C Mode opératoire X révision x

Portée de type A1 : Le laboratoire est accrédité pour pratiquer les analyses décrites en respectant strictement les référentiels mentionnés dans la portée. En cas d'écart au référentiel, le résultat d'analyse ne peut être couvert par l'accréditation.

6.1.2 Exemple de demande de type A2

Ce type de portée A2 est particulièrement adapté pour les laboratoires qui pratiquent des méthodes reconnues (exemple : méthodes officielles) susceptibles d'être fréquemment révisées et qui souhaitent avoir la possibilité, entre deux évaluations sur site du Cofrac, d'utiliser leur accréditation sur les révisions successives de ces méthodes, dès lors que les révisions n'impliquent pas la mise en œuvre de nouvelles compétences. La définition des méthodes reconnues étant précisée dans le document LAB REF 08.

Lors de l'évolution des méthodes reconnues citées en référence dans la portée d'accréditation, à la suite de nouvelles éditions ou révisions, le laboratoire mettra en application la nouvelle version selon les modalités qu'il aura définies dans son système de management de la qualité et dans le délai mentionné sur la méthode révisée.

Si la révision de la méthode reconnue implique une nouvelle compétence, le laboratoire doit se soumettre à une évaluation du Cofrac avant de pouvoir revendiquer l'application de la méthode révisée sous accréditation.

AGROALIMENTAIRE / VEGETAUX / Nématologie (Détection et / ou identification d'organismes nuisibles aux végétaux appartenant au phylum des nématodes)			
OBJET	CARACTERISTIQUE MESUREE OU RECHERCHEE	PRINCIPE DE LA METHODE	REFERENCE DE LA METHODE
Sols, substrats, végétaux	<i>Ditylenchus dipsaci</i> et <i>Ditylenchus destructor</i>	Extraction des nématodes du genre <i>Ditylenchus</i> par élutriation (méthode à spécifier) ou migration. Identification morphobiométrique	MOA 013 parties A+B
Sols et /ou organes végétaux souterrains	<i>Globodera</i>	Méthode d'extraction à spécifier Observation morphologique	MOA 019 partie A

AGROALIMENTAIRE / VEGETAUX / Virologie (Essais et analyses en virologie et/ou en phytoplasmodologie végétale)			
OBJET	CARACTERISTIQUE MESUREE OU RECHERCHEE	PRINCIPE DE LA METHODE	REFERENCE DE LA METHODE
Feuilles de bananier	Banana Bunchy Top Virus (BBTV)	Détection par ELISA	MOA 014 partie A

AGROALIMENTAIRE / VEGETAUX / Mycologie (Essais et analyses en mycologie végétale)			
OBJET	CARACTERISTIQUE MESUREE OU RECHERCHEE	PRINCIPE DE LA METHODE	REFERENCE DE LA METHODE
Semences et graines de céréales	<i>Tilletia indica</i> (agent de la carie de Karnal)	Détection par filtration sélective et identification morphologique	MOA 017

AGROALIMENTAIRE / VEGETAUX / Bactériologie (Essais et analyses en bactériologie végétale)			
OBJET	CARACTERISTIQUE MESUREE OU RECHERCHEE	PRINCIPE DE LA METHODE	REFERENCE DE LA METHODE
Vigne	<i>Xylophilus ampelinus</i>	Détection par IF indirecte	MOA 027 partie B

AGROALIMENTAIRE / VEGETAUX / ENTOMOLOGIE			
OBJET	CARACTERISTIQUE MESUREE OU RECHERCHEE	PRINCIPE DE LA METHODE	REFERENCE DE LA METHODE
Végétaux	<i>Bemisia tabaci</i>	Observation morphologique	MOA 007 Parties A+B

Portée de type A2 : Le laboratoire est accrédité pour pratiquer les analyses en suivant la méthode décrite dans le référentiel cité, dans sa version en vigueur. Il lui appartient d'établir sa capacité à maîtriser et mettre en pratique la méthode révisée.

La mise en œuvre du référentiel révisé ne doit pas mobiliser des compétences qui n'auraient pas fait l'objet d'une reconnaissance préalable dans le cadre de l'accréditation.

6.1.3 Exemple de demande de type A3

Ce type de flexibilité est particulièrement adapté pour les laboratoires qui souhaitent avoir en plus la possibilité, entre deux visites d'évaluation du Cofrac, d'utiliser sous accréditation des méthodes reconnues reposant sur des compétences techniques qu'ils ont précédemment démontrées (adopter par exemple une méthode officielle dès sa publication).

Portée générale:

AGROALIMENTAIRE / VEGETAUX / Virologie (Essais et analyses en virologie et/ou en phytoplasnologie végétale)		
OBJET	CARACTERISTIQUE MESUREE OU RECHERCHEE	PRINCIPE DE LA METHODE
Plantes herbacées	Virus	Détection par ELISA

Portée de type A3 : le laboratoire a la possibilité de mettre en œuvre toute méthode reconnue dans ce domaine de compétence

Portée détaillée *

AGROALIMENTAIRE / VEGETAUX / Virologie (Essais et analyses en virologie et/ou en phytoplasnologie végétale)			
OBJET	CARACTERISTIQUE MESUREE OU RECHERCHEE	PRINCIPE DE LA METHODE	REFERENCE DE LA METHODE
Feuilles de bananier	Banana Bunchy Top Virus (BBTV)	Détection par ELISA	MOA 014 partie A
Plantes de betterave ou épinard	Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)	Détection par ELISA	MOA 011 partie B
Feuilles de bananier	Cucumber Mosaic Virus (CMV)	Détection par ELISA	MOA 009

* La liste exhaustive des analyses proposées sous accréditation est tenue à jour par le laboratoire.

Commentaire : le laboratoire est accrédité pour pratiquer les analyses dans le domaine décrit dans la portée en utilisant toute méthode reconnue (méthode officielle), que les compétences reconnues au moment de l'accréditation lui permettent de mettre en œuvre. Il lui appartient d'établir sa capacité à maîtriser et mettre en pratique la méthode retenue.

Le laboratoire doit documenter et tenir à disposition permanente du COFRAC la liste détaillée des analyses et en particulier, des méthodes qu'il propose dans le cadre de son accréditation.

L'adéquation entre les méthodes pratiquées et les compétences déjà reconnues au laboratoire fait l'objet d'un examen lors des évaluations par le Cofrac.

6.2 Portée de type étendu (B)

Ce type de flexibilité permet au laboratoire d'adapter et/ou de développer les méthodes dont il a besoin et de les utiliser sous accréditation sans évaluation préalable du Cofrac. En fonction de la portée détaillée revendiquée par le laboratoire, la portée générale et le commentaire associé seront adaptés pour correspondre aux besoins du laboratoire et aux compétences démontrées.

Les modifications portant sur la méthode (par exemple, adaptation ou dérive d'une méthode officielle) ne sont possibles qu'en flexibilité de type B.

Portée générale n°1

AGROALIMENTAIRE / VEGETAUX / Virologie <i>(Essais et analyses en virologie et/ou en phytoplasmiologie végétale)</i>		
OBJET	CARACTERISTIQUE MESUREE OU RECHERCHEE	PRINCIPE DE LA METHODE
Plantes herbacées	Virus à ARN	Détection par: RT-PCR point final Méthode qualitative
		Détection par: RT-PCR en temps réel Méthode qualitative
Plantes herbacées Plantes ligneuses	Phytoplasmes	Détection par: PCR point final Méthode qualitative
		Détection par: PCR en temps réel Méthode qualitative

Portée flexible de type B : Le laboratoire est reconnu compétent pour adapter ou adopter et mettre en œuvre dans le domaine couvert par la portée générale toute méthode reconnue, et/ou pour développer tout autre méthode **dont il aura assuré la validation.**

Portée détaillée *

AGROALIMENTAIRE / VEGETAUX / Virologie <i>(Essais et analyses en virologie et/ou en phytoplasmiologie végétale)</i>			
OBJET	CARACTERISTIQUE MESUREE OU RECHERCHEE	PRINCIPE DE LA METHODE	REFERENCE DE LA METHODE
Végétal : bananier	Banana Bract Mosaic potyvirus (BBRMV)	Détection par IC-RT-PCR	Méthode interne X adaptée de MOA 005 partie A <i>(réf. mode opératoire)</i>
Feuilles	Pospiviroïdes	Détection par RT-PCR en point final	Méthode interne X adaptée de MOA 034 <i>(réf. mode opératoire)</i>
Végétal	Virus de la Sharka <i>Plum pox virus (PPV)</i>	Détection par RT-PCR en temps réel	Méthode interne <i>(réf. mode opératoire)</i>
Végétal	Phytoplasmes de l'enroulement chlorotique de l'abricotier (ESFY), de la prolifération du pommier (AP) et du dépérissement du poirier (PD)	Détection par PCR	Méthode interne X adaptée de MOA 004 <i>(réf. mode opératoire)</i>
Vigne	Phytoplasme de la Flavescence dorée du Bois noir	Détection par PCR multiplex gigogne	Méthode interne X adaptée de MOA 006 partie <i>(réf. mode opératoire)</i>
Vigne	Phytoplasme de la Flavescence dorée du Bois noir	Détection par PCR triplex en temps réel	Méthode interne X adaptée de MOA 006 partie B <i>(réf. mode opératoire)</i>

* La liste exhaustive des analyses proposées sous accréditation est tenue à jour par le laboratoire.

Commentaires : Le laboratoire est accrédité pour pratiquer les analyses dans le domaine décrit dans la portée générale. Il peut dans ce domaine, **adapter** et/ou **développer** toute autre méthode que les compétences reconnues au moment de l'accréditation lui permettent de mettre en œuvre.

Il lui appartient d'assurer la validation des méthodes qu'il propose. Il doit établir et maintenir la compétence du personnel nécessaire à leur mise en œuvre.

Le laboratoire doit documenter et tenir à disposition permanente du Cofrac la liste détaillée des analyses et, en particulier des méthodes, qu'il propose dans le cadre de son accréditation.

L'adéquation entre les méthodes pratiquées et les compétences déjà reconnues au laboratoire fait l'objet d'un examen lors des évaluations par le Cofrac. Cet examen porte notamment sur le développement, l'adaptation et la validation des méthodes

Portée générale n2

AGROALIMENTAIRE / VEGETAUX / Mycologie (Essais et analyses en mycologie végétale)		
OBJET	CARACTERISTIQUE MESUREE OU RECHERCHEE	PRINCIPE DE LA METHODE
Semences végétales	Champignons sensu stricto et organismes généralement assimilés	Détection par PCR point final Méthode qualitative
Végétaux (tout organe sauf semences)		Détection par PCR en temps réel Méthode qualitative

Portée flexible de type B : Le laboratoire est reconnu compétent pour adapter ou adopter et mettre en œuvre dans le domaine couvert par la portée générale toute méthode reconnue, et/ou pour développer tout autre méthode **dont il aura assuré la validation.**

Portée détaillée *

AGROALIMENTAIRE / VEGETAUX / Mycologie (Essais et analyses en mycologie végétale)			
OBJET	CARACTERISTIQUE MESUREE OU RECHERCHEE	PRINCIPE DE LA METHODE	REFERENCE DE LA METHODE
Semences de tournesol	<i>Plasmopara halstedii</i>	Détection par PCR temps réel	Méthode interne X adaptée de MOA 032 (réf. mode opératoire)
Semences de <i>Pinus</i> spp et <i>Pseudotsuga menziesii</i>	<i>Gibberella circinata</i>	Détection PCR temps réel et PCR point final	Méthode interne X adaptée de MOA 003 partie B (réf. mode opératoire)
Tissu végétatif de <i>Fraxinus</i> spp	<i>Chalara fraxinea</i>	Détection par PCR temps réel	Méthode interne (réf. mode opératoire)
Tissus végétatifs <i>Pinus</i> spp et <i>Pseudotsuga menziesii</i>	<i>Gibberella circinata</i>	Détection par PCR temps réel et PCR conventionnelle	Méthode interne X adaptée de MOA 003 partie A (réf. mode opératoire)
Racines de fraisier et/ou de framboisier	<i>Phytophthora fragariae</i> et <i>Phytophthora rubi</i>	Détection par PCR conventionnelle	Méthode interne X adaptée de MOA 016 (réf. mode opératoire)
Feuilles, rameaux, et tronc	<i>Phytophthora ramorum</i>	Détection par PCR conventionnelle	Méthode interne X adaptée de MOA 018 (réf. mode opératoire)
Fruits, fleurs, tissus lignifiés de <i>Prunus</i> spp, <i>Malus</i> spp et <i>Pyrus</i> spp	<i>Monilinia fructicola</i>	Détection par PCR conventionnelle	Méthode interne (réf. mode opératoire)

* La liste exhaustive des analyses proposées sous accréditation est tenue à jour par le laboratoire.

Commentaires : Le laboratoire est accrédité pour pratiquer les analyses dans le domaine décrit dans la portée générale. Il peut dans ce domaine, **adapter** et/ou **développer** toute autre méthode que les compétences reconnues au moment de l'accréditation lui permettent de mettre en œuvre.

Il lui appartient d'assurer la validation des méthodes qu'il propose. Il doit établir et maintenir la compétence du personnel nécessaire à leur mise en œuvre.

Le laboratoire doit documenter et tenir à disposition permanente du Cofrac la liste détaillée des analyses et, en particulier des méthodes, qu'il propose dans le cadre de son accréditation.

L'adéquation entre les méthodes pratiquées et les compétences déjà reconnues au laboratoire fait l'objet d'un examen lors des évaluations par le Cofrac. Cet examen porte notamment sur le développement, l'adaptation et la validation des méthodes.

7 GUIDE DE LECTURE DES EXIGENCES D'ACCREDITATION ET RECOMMANDATIONS

7.1 Généralités

Les méthodes MOA 008 « Techniques sérologiques ELISA : DAS et dérivés », **MOA 010** « Techniques d'immunofluorescence », **MOA 022** « Techniques qualitatives d'amplification enzymatiques des acides nucléiques : PCR, RT-PCR et PCR temps réel » et **MOA 012** « Extraction, détection et identification morphobiométrique des nématodes phytoparasites » doivent être considérées comme les documents définissant les exigences spécifiques aux techniques ELISA, IF, PCR et de nématologie. Le guide LAB GTA 40 y apporte des précisions complémentaires.

7.2 Personnel

NF EN ISO CEI 17025 chap. 5.2
Politique LAB REF 02
LAB REF 08

Il revient au laboratoire de définir des critères objectifs pour la qualification du personnel.

La nomination du responsable technique intégrera notamment les critères suivants :

- connaissance des organismes visés par les essais et de l'environnement réglementaire,
- connaissance des points critiques des méthodes.

L'habilitation des personnes en charge des essais intégrera notamment la fidélité et la concordance des résultats obtenus dans le cadre des autocontrôles et des contrôles externes. Il appartient au laboratoire de définir des seuils d'acceptabilité pertinents pour ces critères.

Le processus d'habilitation initiale et de maintien des compétences sera précisément défini pour l'ensemble des fonctions y compris celles concernant le responsable technique et les signataires des rapports. Il devra tenir compte, le cas échéant, des fréquences et de la période de réalisation des analyses (par exemple, cas des campagnes d'analyses) ou de la signature des rapports d'analyses. Ce processus devra également être en adéquation avec le niveau de flexibilité revendiqué par le laboratoire.

7.3 Revue des demandes et de contrat, et services au client

NF EN ISO/CEI 17025 § 4.4

La norme NF EN ISO/CEI 17025 stipule notamment que le laboratoire doit établir et maintenir des procédures pour la revue des demandes et des contrats. Ces dernières doivent, *a minima*, assurer que les exigences implicites et explicites, y compris les méthodes, sont adéquatement définies, documentées et comprises, que la méthode d'essai appropriée est choisie et qu'elle est capable de répondre aux exigences des clients. Cette exigence s'applique à toutes les méthodes quel que soit leur statut.

Dans le cadre d'analyses officielles, les laboratoires agréés appliqueront la méthode officielle telle que publiée dans le bulletin officiel ou sa méthode dérivée telle qu'acceptée par le donneur d'ordre (DGA).

Dans les autres cas, le laboratoire veillera à sélectionner la méthode adaptée au besoin du client et l'en informera.

Dans le cas où un laboratoire utilise pour un même principe d'analyses plusieurs références de méthode, le client devra être informé de la référence de la méthode utilisée.

La revue de contrat peut être effectuée avec les clients ou leurs représentants.

La revue de contrat peut être ponctuelle et être réalisée sur des documents tels qu'un formulaire de demande interne au laboratoire ou accompagnant les prélèvements.

Les dispositions prévues et les éventuels risques afférents seront clairement indiqués aux clients lors de la revue de contrat, notamment en cas de dérive à la méthode officielle.

7.4 Echantillon pour laboratoire

NF EN ISO/CEI 17025 chap. 5.8

Lorsque la réglementation ne définit pas les conditions d'acceptation des échantillons (type, nombre, conditions d'acheminement et de conservation,...) le laboratoire établira ses propres critères et les tiendra à disposition des clients.

7.4.1 Réception et stockage 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.

Si les échantillons parvenant au laboratoire ne satisfont pas aux critères d'acceptation applicables définis dans les textes de référence mis en œuvre, le laboratoire pourra soit refuser les échantillons, soit émettre des réserves sur les résultats.

7.4.2 Préparation des échantillons

Le laboratoire mettra 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 (par exemple lors de la distribution des échantillons dans les plaques ELISA). Les produits soumis à analyse seront conservés au moins jusqu'à la validation finale des résultats puis éliminés selon des modalités qui évitent toute contamination.

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

7.5 Méthodes

NF EN ISO/CEI 17025 § 5.4

7.5.1 Méthode reconnue en santé végétale

Le document LAB REF 08 précise la définition d'une méthode reconnue ainsi que le document LAB REF 16 lorsque l'accréditation intervient dans un contexte réglementaire.

A titre d'exemple, les méthodes décrites dans les méthodes officielles sont considérées comme reconnues lorsqu'elles décrivent une analyse spécifique (recherche d'un agent pathogène spécifié dans une ou des matrices identifiées par une méthode décrite).

Dans le cas de dérives aux textes de référence, les méthodes sont considérées comme des méthodes internes nécessitant une détermination des caractéristiques puis validation préalable (portée de type A1 ou flexibilité de type B).

7.5.2 Méthodes reconnues

Pour les méthodes reconnues il n'est pas demandé au laboratoire utilisateur de déterminer les caractéristiques de performance de la méthode.

Le laboratoire devra toutefois établir **un dossier de confirmation** qui comporte *a minima*, pour une méthode donnée, les éléments suivants :

- les valeurs de performance associées à la méthode (limite de détection, taux de répétabilité et de reproductibilité) ;
- les données intra laboratoire de **répétabilité et de reproductibilité à la limite de détection de la méthode** (sauf cas des virus, viroïdes, phytoplasmes pour lesquels, les données seront obtenues à un faible niveau/concentration) ;
- l'analyse de la **concordance** des résultats qu'il obtient sur un panel pertinent d'échantillons de statut connu (positif et négatif) ;
- la confirmation de la maîtrise et l'autorisation d'emploi de la méthode.

Les différents critères de confirmation d'une méthode ne s'appliquent qu'au domaine d'application tel que décrit dans la méthode.

7.5.3 Méthodes non reconnues

Quel que soit le principe de la méthode (interne ou dérivée), un dossier de détermination des caractéristiques doit être constitué selon les modalités indiquées ci-dessous ainsi qu'une validation de son emploi.

La validation est la confirmation que les caractéristiques de la méthode conviennent pour l'emploi prévu et elle s'articule en deux étapes :

Étape 1 : définition des valeurs cibles à atteindre pour les différentes caractéristiques à évaluer. Les données à prendre en compte pour définir ces valeurs sont entre autres :

- le contexte de la demande (import/export, surveillance du territoire, ...),
- l'existence de contraintes particulières (exigences réglementaires ou professionnelles,...).

Étape 2 : vérification de la conformité des valeurs de performance obtenues en comparaison des valeurs cibles. Le laboratoire aura préalablement défini le niveau de conformité à atteindre.

a. Définition des caractéristiques d'une méthode

- **Sensibilité** : quantité minimale de cible qui peut être détectée de manière répétable et reproductible. Dans le cas où la quantification n'est pas possible (pour les virus ou les organismes non cultivables ou non aisément quantifiables par exemple), il s'agira d'évaluer la plus petite dilution détectée.
- **Spécificité** : propriété d'une méthode à détecter exclusivement la cible.
- **Répétabilité** : étroitesse d'accord entre des résultats successifs et indépendants obtenus avec la même méthode en utilisant un matériau d'essai identique, dans des conditions identiques (appareillage, opérateur, ...).
- **Reproductibilité** : étroitesse d'accord entre des résultats successifs et indépendants obtenus avec la même méthode en utilisant un matériau d'essai identique, dans des conditions différentes (appareillage, opérateur, ...).

b. Recommandations permettant l'évaluation des caractéristiques d'une méthode

- **Sensibilité :**

L'évaluation de la sensibilité consiste *a minima* à définir le seuil de détection de la méthode. D'une manière générale, le seuil de détection se détermine sur la base d'une gamme de dilutions ou de quantités de cibles et/ou d'échantillons contaminés pour permettre de déterminer la plus petite d'entre elles donnant une réponse positive avec les méthodes évaluées.

L'évaluation de la sensibilité peut également intégrer l'inclusivité et la sélectivité.

Dans le cas d'exigences réglementaires pour la sensibilité de la méthode, la gamme de quantité de cibles devra inclure le seuil minimal exigé.

- **Spécificité :**

Pour tester la spécificité d'une méthode, il convient de prévoir de tester :

- des échantillons non contaminés par l'organisme cible (absence d'interférence avec la ou les matrice(s) = matrices dites « saines ») ;
- des échantillons non contaminés par l'organisme cible mais contaminés par des analytes non cibles ou des organismes génétiquement proches et susceptibles de « croiser », dont la microflore naturelle présente sur la ou les matrices testées.

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 échantillon fournissant un résultat proche du seuil de détection.

Le nombre de résultats obtenus peut être compris entre 10 et 30.

L'exploitation des résultats aboutit à la définition du taux de concordance entre répétitions.

• **Reproductibilité**

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...).

Ce ou ces essais doivent permettre d'obtenir 15 à 30 résultats obtenus en faisant varier le maximum de paramètres représentatifs de l'activité de routine prévue. Il est recommandé d'utiliser au minimum un échantillon fournissant un résultat proche du seuil de détection.

L'exploitation des résultats aboutit à la définition du taux de concordance entre répétition.

c. Constitution du dossier de validation

Beaucoup d'informations et de résultats sont collectés, ceux-ci feront l'objet d'un document cohérent et clair, qui mentionnera une acceptation formelle par le laboratoire de la validité opérationnelle de la méthode, c'est-à-dire une décision ou 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 de la qualité du laboratoire.

7.5.4 Incertitudes

Le présent guide traitant uniquement de méthodes qualitatives, conformément au document LAB REF 02, l'identification et la maîtrise des facteurs critiques sont demandées.

7.6 Installation et conditions ambiantes

NF EN ISO/CEI 17025 § 5.3

Les conditions d'environnement doivent permettre la bonne application des méthodes d'analyses et ne pas modifier l'intégrité de l'échantillon soumis à l'essai.

Les capacités de stockage en froid positif ou négatif des échantillons et réactifs seront à adapter en fonction des variations d'activité.

7.7 Equipements – Traçabilité du mesurage

NF EN ISO/CEI 17025 § 5.5
LAB REF 02

Le laboratoire doit définir les appareils critiques 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/CEI 17025 et le document COFRAC LAB REF 02 à une fréquence définie et argumentée par le laboratoire,
- de la définition des critères de performance (EMT) attendus et argumentés par le laboratoire en fonction des besoins des méthodes (officielles ou internes).

A ces éléments, s'ajoutent les spécificités par équipement citées ci-dessous.

7.7.1 Micropipettes et automates de pipetage et de distribution

A l'exception de celles utilisées à des étapes où le volume n'est pas critique (ex: dépôt en électrophorèse), les micropipettes à volume fixe ou à volume variable feront l'objet des vérifications suivantes :

- de la justesse et de la fidélité. Le nombre de répétitions sera défini et argumenté,
- pour les pipettes multicanaux, de chaque canal indépendamment et de la fidélité inter-canal,
- pour les pipettes à volume variable, des volumes minimum et maximum utilisés et de la prise en compte de l'étendue et du mode d'utilisation (par exemple mode répétitif),
- d'un seul point pour les pipettes à volume variable utilisés en point fixe.

7.7.2 Enceintes thermostatées et thermomètres

Il appartient au laboratoire d'établir et d'appliquer régulièrement une procédure de contrôle des enceintes thermostatées et des thermomètres associés (travail et étalon).

Pour toute enceinte thermostatée ayant un impact critique sur les essais (exemples : enceinte destinée à maintenir une température d'incubation, réfrigérateurs assurant le stockage des réactifs critiques) :

- une cartographie sera 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 son suivi dans le temps.
- le contrôle effectif de la température est nécessaire, soit par enregistrement en continu (l'intervalle d'acquisition des données doit être adapté aux durées d'incubation), soit par thermomètre mini-maxi qui sera raccordé au SI. Si l'enceinte thermostatée est utilisée de façon intermittente un enregistrement doit être effectué avant et au cours de toute utilisation.

Le laboratoire pourra, par exemple, suivre les normes FD V08-601 ou NF X 15-140 pour effectuer les cartographies. La matérialisation des zones non acceptables est indispensable.

Dans le domaine de la santé des végétaux, les EMT généralement admises sont :

- pour les incubateurs : EMT= +/- 3°C
- pour les réfrigérateurs : EMT = +/- 4°C (consigne généralement à 5°C)

7.7.3 Spectrophotomètres

La fidélité, la justesse et la linéarité des photomètres utilisés seront systématiquement vérifiés.

Les plaques étalons seront raccordées au SI.

Le laboratoire peut utiliser une plaque prêtée sous réserve qu'elle soit raccordée et 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.

7.7.4 Thermocycleurs

Il appartient au laboratoire d'établir et d'appliquer régulièrement une procédure de contrôle de ce type d'appareils.

Il est recommandé de réaliser une qualification biologique afin de vérifier l'homogénéité de la plaque en présence de témoins à la limite de détection.

Afin de vérifier l'homogénéité des résultats, il est fortement recommandé d'effectuer des tests sur la totalité des positions utilisées, à une fréquence appropriée et *a minima* après une intervention sur l'appareillage. Des informations techniques supplémentaires sont disponibles dans le document MOA 022.

7.7.5 Balances et masses

Il appartient au laboratoire d'établir et d'appliquer régulièrement une procédure de contrôle des balances et des masses associées (travail et étalons).

Concernant les balances, il est généralement admis que les EMT des masses sont de l'ordre de 10% sauf spécifications techniques particulières.

7.7.6 Autres équipements

Il appartient au laboratoire d'établir et d'appliquer régulièrement une procédure de contrôle des microscopes et de la lame micrométrique le cas échéant, des pHmètres, des minuteurs et des tamis.

Un raccordement au SI sera réalisé pour les minuteurs lorsque l'analyse l'exige (criticité des temps d'incubation).

Les dispositifs de lavage (automatiques ou manuels) ne nécessitent pas de vérification métrologique, mais le laboratoire doit définir une périodicité de vérification de la fiabilité du système (aspiration, distribution).

7.7.7 Milieux de culture et réactifs

Le laboratoire s'assurera de la traçabilité de la date d'ouverture, de préparation et de péremption des milieux et réactifs.

Le laboratoire réalise le contrôle de la qualité des milieux de culture qu'il utilise (stérilité, fertilité et sélectivité). Pour cela il pourra s'inspirer du document MOA REP 01.

7.8 Qualité des résultats

*NF EN ISO/CEI 17025 § 5.9
Politique LAB REF 02*

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 effectuera l'analyse des causes et statuera sur la validité de la série d'épreuve.

Lorsque des matériaux de référence existent et sont disponibles, le laboratoire devra en disposer, les utiliser selon une périodicité définie dans les documents qualité et les exploiter.

Conformément à la politique *ad hoc* présentée dans le document LAB REF 02, sauf exigences réglementaires particulières, les laboratoires accrédités doivent, lorsqu'elles existent et sont appropriées, participer aux CIL pour démontrer leur compétence et assurer la qualité de leurs résultats. Ceci s'applique systématiquement aux laboratoires en démarche d'accréditation et pour les demandes d'extensions. Lorsque le paramètre est réalisé dans le cadre d'un agrément, le laboratoire doit se conformer aux fréquences imposées par l'agrément.

Lorsqu'aucun programme de comparaison n'existe, il appartient au laboratoire, pour assurer la cohérence de ses résultats, de recourir à l'utilisation régulière de matériaux de référence, à l'analyse de panels d'échantillons de statut connu ou de corrélés ses résultats avec ceux d'autres laboratoires.

7.9 Rapports

*NF EN ISO/CEI 17025 § 5.10
Politique LAB REF 02*

Les rapports doivent respecter les exigences de la norme NF EN ISO/CEI 17025 et du document Cofrac LAB REF 02.

8 BIBLIOGRAPHIE

- NFX 15-140 « 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 »,
- PM 7/98 « Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity»,
- NF EN ISO 8655-2 « Appareils volumétriques à piston - Partie 2 : pipettes à piston ».

LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI