

**Guide**

# Mise en place de laboratoire de biologie moléculaire dans les pays à ressource limitée

---

## AMÉNAGEMENT DE L'ESPACE DE LABORATOIRE, ÉQUIPEMENTS, CONSOMMABLES, TENUES DE LABORATOIRES, REACTIFS, PERSONNELS

### **Avertissement**

*Ceci est une traduction en français d'un chapitre d'un document original en anglais (Establishment of PCR laboratory in developing countries, chapter 5, 2nd edition, WHO, 2016). En aucun cas cette traduction ne prévaut sur le document original contractuel. Cette traduction n'a pas valeur de contrat et n'engage pas Solthis.*

À noter que ce guide fournit des recommandations générales à destination des laboratoires de biologie moléculaire utilisant toutes les techniques d'amplification par PCR. Dans le cadre de la réalisation des tests de charges virales VIH, la technique utilisée (PCR en temps réel) permet d'assouplir certaines recommandations. Afin de faciliter la lecture, certaines parties du texte ont été retirées et remplacées par [...] car elles n'étaient pas adaptées aux laboratoires de biologie moléculaire réalisant uniquement des tests de charge virale VIH.

### **Notes sur la traduction**

*Biological safety cabinet* par Poste de sécurité Microbiologique

*PCR laboratory* par Laboratoire de biologie moléculaire

## INTRODUCTION

Au cours des deux dernières décennies, la PCR (réaction en chaîne par polymérase) a connu un développement très rapide en tant que technologie de base d'un laboratoire de biologie moléculaire. La technique de PCR est devenue indispensable dans les laboratoires pour amplifier de petites quantités d'une matrice composée d'acides nucléiques. Au même moment, le personnel de laboratoire a appris que la PCR était très sensible à la contamination par ses propres produits. Un certain nombre de précautions doivent être adoptées lors de la conception d'un laboratoire de biologie moléculaire afin que celui-ci soit exploité de manière à empêcher la contamination des réactions par les produits amplifiés provenant d'essais précédents et la contamination inter-échantillons, qui peuvent conduire à des résultats faussement positifs.

## AMÉNAGEMENT DE L'ESPACE DE LABORATOIRE

Un laboratoire de biologie moléculaire doit comporter deux zones de travail fonctionnelles : une zone de pré-amplification et une zone de post-amplification. Ces deux zones doivent dans l'idéal être situées dans des salles séparées ou, en cas de contraintes spatiales, dans des espaces de travail/postes de sécurité biologique distincts au sein d'une même salle. Les consommables et les équipements doivent être alloués à chaque zone de travail et ne sont pas interchangeables entre les zones.

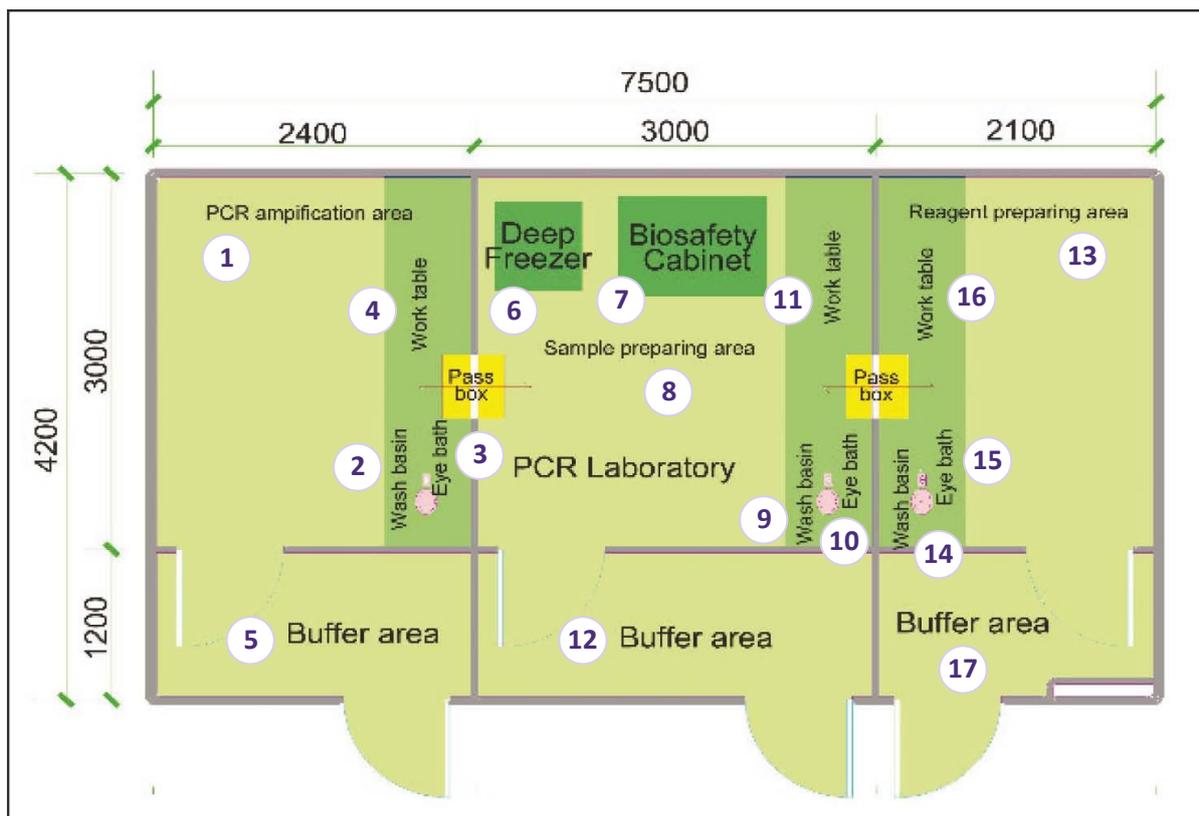


Figure 1: Plan illustrant l'agencement modèle d'un laboratoire de biologie moléculaire, avec (1) Salle d'amplification PCR ; (2) Evier ; (3) Lavage des yeux ; (4) Paillasse de laboratoire ; (5) Sas ; (6) Congélateur ; (7) Poste de sécurité microbologique ; (8) Salle de préparation des échantillons ; (9) Evier ; (10) Lavage des yeux ; (11) Paillasse de laboratoire ; (12) Sas ; (13) Salle de préparation des réactifs ; (14) Evier ; (15) Lavage des yeux ; (16) Paillasse de laboratoire ; (17) Sas.



Un laboratoire effectuant des analyses PCR à visée de diagnostic devrait être divisé en trois salles isolées, au minimum (voir figure 1) : **(1) Salle de préparation des réactifs** [...]; **(2) Salle de préparation des échantillons** [...] et **(3) Salle d'amplification et de détection des produits** [...].

Un flux de travail unidirectionnel doit être observé pour réduire les risques de contamination (voir schéma 1). Aucun matériel, consommable ou équipement de la salle de préparation des échantillons ne doit être apporté dans la salle de préparation des réactifs. De la même façon, rien de ce qui provient de la salle d'amplification et de détection de produit ne doit être apporté dans la salle de préparation des échantillons ou dans la salle de préparation des réactifs.

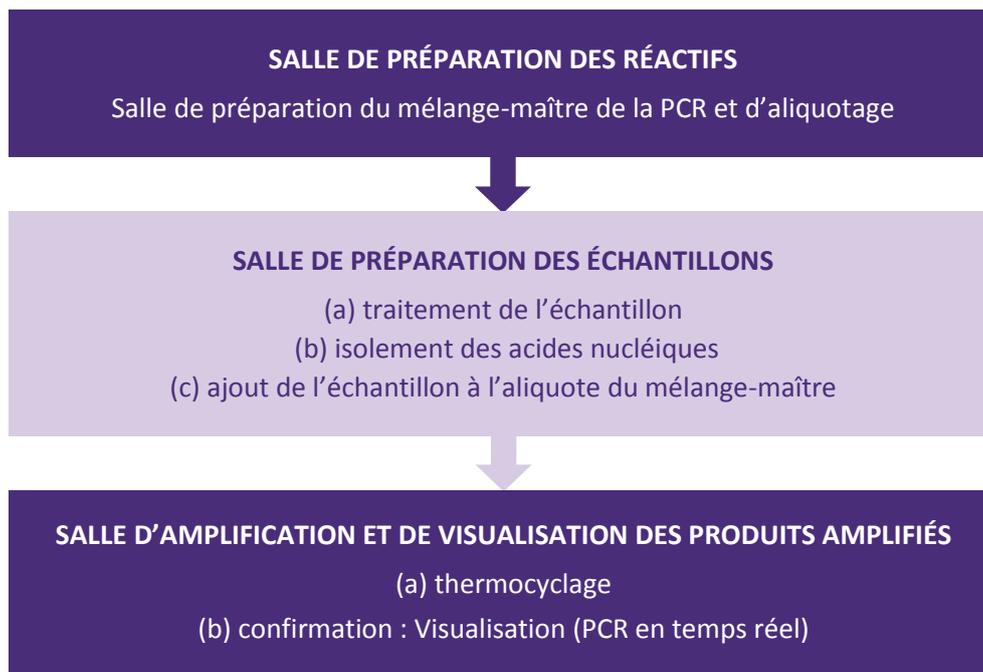


Schéma 1. Flux de travail dans un laboratoire de biologie moléculaire. Un flux de travail unidirectionnel doit être observé pour réduire les risques de contamination.

## SALLE DE PRÉPARATION DES RÉACTIFS

La salle de préparation des réactifs doit être réservée à la préparation et au stockage des réactifs de PCR. La préparation des mélanges d'amplification PCR (« master mixes ») et leur aliquotage dans les tubes de PCR [ou plaques de réaction 96 puits] doivent être effectués dans cette salle. Pour éviter les contaminations croisées et les congélations et décongélations répétées, les solutions « mère » de réactifs doivent être aliquotées dans de plus petits volumes [...]. La salle de préparation des réactifs doit disposer d'un assortiment de pipettes réglables qui sont dédiées à cette salle et assorties d'embouts à filtre barrière contre les aérosols, de blouses de laboratoire et de gants à usage unique. Le personnel doit effectuer les tâches dans la salle de préparation des réactifs avant de travailler dans les salles de traitement des échantillons ou d'amplification/détection et, une fois dans celles-ci, ne doit pas y retourner.

## SALLE DE PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

La salle de préparation des échantillons doit être réservée au traitement de l'échantillon. Elle doit être utilisée pour l'aliquotage des échantillons et la préparation des contrôles positifs et négatifs. Selon le protocole utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, la quantité nécessaire d'échantillon



à analyser doit être ajoutée au tampon de lyse puis transférée dans l'espace dédié à l'extraction des ARN/acide nucléiques. Les échantillons et contrôles analysés sont ensuite ajoutés dans les tubes contenant le « master mix » dans cette salle. Les tubes de PCR doivent être capuchonnés dès que l'échantillon ait été ajouté [ou plaques de réaction 96 puits filmées].

## SALLE D'AMPLIFICATION ET D'ANALYSE DES PRODUITS D'AMPLIFICATION

Cette salle doit être réservée à l'amplification PCR [...]. Le thermocycleur/appareil de PCR en temps réel doit y être installé. Des gants et des blouses de laboratoire doivent être systématiquement utilisés puis retirés avant de quitter cette salle afin de maîtriser la contamination des autres salles par des amplicons [...].

## ÉQUIPEMENT DES LABORATOIRES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Afin de s'assurer que les activités pré-amplification (ou pré-PCR) sont séparées des activités post-amplification (ou post-PCR), chaque salle doit disposer de ses propres équipements, réactifs, embouts de pipette et portoirs, etc., utilisés uniquement dans ce lieu.

### Thermocycleurs et appareils de PCR en temps réel

Les thermocycleurs sont essentiels à l'ensemble des méthodes de PCR et un grand soin doit leur être apporté pour s'assurer qu'ils sont correctement entretenus et fiables [...]. Les instruments de PCR en temps réel sont équipés pour réaliser l'excitation et la détection de fluorescence afin de contrôler l'amplification tout au long des cycles de PCR. La conception est généralement différente de celle du thermocycleur standard et l'étalonnage peut être spécifique au modèle d'instrument. La température, la performance du laser, l'alignement et les dispositifs de sécurité doivent être vérifiés et les systèmes optiques étalonnés. L'appareil doit être révisé chaque année.

Ces équipements étant particulièrement délicats et sensibles, les appareils de PCR en temps réel doivent être utilisés avec des systèmes d'alimentation sans interruption (ASI). Le laser doit également être protégé contre les détériorations.

### Centrifugeuses

Des centrifugeuses séparées, dont des microcentrifugeuses, sont nécessaires pour les procédures pré- et post-PCR. Les instructions du fabricant relatives à l'étalonnage doivent être suivies. La centrifugeuse doit être équilibrée avant son utilisation afin d'augmenter sa durée de vie et minimiser les vibrations.

### Agitateur vortex

Le vortex est un équipement important qui est utilisé lors de la préparation des réactifs dans la salle « propre » de PCR (ou salle de préparation des réactifs) et lors de l'extraction des acides nucléiques.

### [...] Pipettes

Des pipettes automatiques, à volume fixe, réglables, à déplacement positif et/ou des micropipettes sont utilisées au laboratoire de biologie moléculaire. Celles-ci doivent être calibrées trimestriellement par le fabricant ou un technicien [...].



## Hottes à flux laminaire/Poste de sécurité microbiologique (PSM)

Les personnels de laboratoire doivent porter une grande attention aux spécifications des hottes ou PSM afin de s'assurer qu'elle convient aux usages que le laboratoire lui destine.

Type	Lampe UV	Système de ventilation	Usage
<b>Cabinet PCR (Type A)</b>	Oui	Aucun	Préparation de réactif uniquement
<b>Cabinet PCR (Type B)</b>	Non	Filtration interne	Non recommandé, quelle que soit la nature de la préparation PCR
<b>Enceinte PCR (Type C)/ Hotte à flux laminaire</b>	Oui	Filtration interne	Préparation de réactif uniquement
<b>PSM de classe I</b>	Oui	Filtration par échappement	Non recommandé, quelle que soit la nature de la préparation PCR
<b>PSM de classe II ou III</b>	Oui	Filtration interne et par échappement	Pour toutes les activités de biologie moléculaire

Les PSM de classe I disposent d'une circulation de l'air vers l'intérieur et d'une filtration par échappement HEPA qui protègent les individus et l'environnement, mais pas les produits manipulés. Les PSM de classes II et III filtrent à la fois les entrées et les sorties d'air, et empêchent les contaminants d'entrer et de sortir de la hotte (réduisant le risque de contamination de l'échantillon et de l'espace de travail). Avant leur utilisation, les hottes doivent être décontaminées à l'aide d'une lampe UV pendant 30 minutes au minimum et nettoyées avec de l'eau de javel ou avec un autre agent inactivant les acides nucléiques de façon efficace. Le débit d'air et le filtre HEPA de l'ensemble des hottes doivent être contrôlés et certifiés selon les recommandations du fabricant, au moins une fois par an.

### [...] Congélateur (-20 °C)

Les réactifs de PCR, enzymes, tampon, dNTPs et amorces doivent être stockés à -20 °C. Les amorces, dNTPs et l'eau doivent être stockés dans de petites aliquotes pour éviter les effets de congélation/décongélation et également écarter les problèmes de contamination.

Afin de vérifier que tous ces équipements fonctionnent correctement, le laboratoire doit disposer d'un programme d'entretien. Ce programme doit comprendre l'installation, l'étalonnage, la réparation, la conservation des informations et le fonctionnement ordinaire de l'ensemble des équipements utilisés pour l'analyse des échantillons. Les résultats de tous les tests doivent être consignés dans le livret de l'équipement et/ou dans une base de données électronique. Le livret ou la base de données devraient être vérifiés chaque mois par le personnel chargé du contrôle qualité (CQ) ou par le responsable du laboratoire. Tous les problèmes doivent être pris en charge et toutes les mesures correctives entreprises. Les équipements doivent être alloués à une salle de laboratoire spécifique et les notices des équipements fournies par le fabricant doivent être disponibles.



## CONSOMMABLES

Le matériel à usage unique utilisé dans un laboratoire de biologie moléculaire comprend les embouts de pipette, les tubes d'échantillon, les tubes de PCR [ou plaques de réaction 96 puits] et les gants. Pour réduire la contamination et la dégradation des acides nucléiques cibles, le matériel à usage unique doit être de bonne qualité.

### Embouts de pipette

Les embouts spécifiques aux analyses PCR comprennent des filtres barrière contre les aérosols, qui minimisent les contaminations croisées entre les échantillons lors du pipetage [...]. Ces embouts doivent être exempts d'ARNase, d'ADNase et de pyrogènes.

### Tubes d'échantillon et de PCR

Les tubes en polypropylène certifiés exempts d'ADNase, d'ARNase et de pyrogènes sont les plus recommandés pour les laboratoires de biologie moléculaire. La taille et le modèle des tubes de PCR ou des plaques de réaction doivent être compatibles avec la hauteur du bloc et du couvercle du thermocycleur/appareil de PCR en temps réel. Les tubes à paroi fine fournissent le meilleur transfert de chaleur, garantissant que le volume de réaction atteigne la température spécifiée dans les meilleurs délais, améliorant ainsi la spécificité et la reproductibilité. Les tubes contenant les échantillons et les réactifs stockés doivent être brièvement centrifugés avant d'être ouverts pour s'assurer que tous les liquides se situent dans le fond des tubes.

## TENUES DE LABORATOIRE

Des gants à usage unique doivent être disponibles dans chacune des sections du laboratoire utilisées pour l'analyse PCR. Les gants doivent être changés avant de quitter et d'entrer dans chaque section du laboratoire et chaque fois qu'un ADN contaminant est potentiellement rencontré. En plus de réduire une éventuelle contamination par les échantillons, le port de gants peut protéger le personnel de laboratoire contre le risque d'exposition aux produits chimiques et empêcher la contamination des échantillons par de l'ADNase ou de l'ARNase humaine.

Des blouses de laboratoire spécifiques doivent être disponibles dans chacune des salles du laboratoire. Les blouses de laboratoire doivent être retirées et les gants jetés de façon adéquate avant de quitter chaque salle. Changer de blouses et de gants de laboratoire réduit le risque de contamination par un échantillon d'acide nucléique ou un produit amplifié. Les blouses de laboratoire doivent être nettoyées régulièrement pour réduire le risque de contamination entre les zones pré-PCR et post-PCR. Pour éliminer la question de leur nettoyage, des blouses de laboratoire jetables (à usage unique) peuvent également être utilisées.

## REACTIFS

Les réactifs utilisés dans l'amplification par PCR peuvent être achetés ou préparés en interne. Tous les réactifs doivent être clairement étiquetés avec leur nom, leur date de péremption et les informations de sécurité pertinentes. Les réactifs portant des numéros de lots différents ne doivent pas être échangés ou utilisés ensemble. Des précautions doivent être prises pour s'assurer que les réactifs ne sont pas contaminés et que les conditions de stockage sont correctement entretenues.



De l'eau pour la biologie moléculaire ou un équivalent existant dans le commerce doivent être utilisés pour tous les tests [...].

Les réactifs prêts à l'emploi achetés dans le commerce doivent être destinés à la biologie moléculaire et stockés conformément aux recommandations du fabricant. Tous les réactifs provenant de nouveaux lots doivent être testés pour garantir leur bon fonctionnement en exécutant un contrôle positif de PCR avec les nouveaux réactifs [...].

### Kits disponibles dans le commerce

De nombreux types de kits sont disponibles dans le commerce pour les applications de PCR. Ces produits accélèrent et simplifient certaines procédures telles que l'isolement de l'ADN et de l'ARN et la purification des acides nucléiques en vue d'éliminer les contaminants.

### Amorces et sondes (oligonucléotides)

Les analyses PCR nécessitent l'utilisation de courts segments d'ADN synthétisés chimiquement (oligonucléotides ou oligos). Les séries d'amorces sont des oligos conçus spécifiquement pour amorcer l'amplification d'une séquence d'un acide nucléique cible d'intérêt [...].

Stockage: la plupart des oligos et des matrices d'ADN doivent être conservés à -20 °C ou -70 °C dans un tampon TE (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) ou dans de l'eau pour biologie moléculaire. Le tampon TE est généralement le meilleur pour stocker les oligos et les matrices d'ADN, car il peut prévenir la dégradation de l'ADN [...]. Avant leur utilisation, les oligos doivent être complètement décongelés et homogénéisés.

### Enzymes

Les enzymes sont les éléments critiques d'une réaction d'amplification par PCR [...].

Stockage : les instructions du fabricant relatives au stockage et à l'utilisation des enzymes doivent être suivies attentivement. Les enzymes sont généralement stockées à -20 °C et ne doivent jamais être laissées à température ambiante. Des portoirs réfrigérants ou de la glace peuvent être utilisés pour maintenir les enzymes au froid dans le laboratoire, lorsqu'elles sont utilisées sur la paillasse [...].

## PERSONNEL

Le personnel travaillant dans un laboratoire de biologie moléculaire doit suivre une formation à la méthodologie couvrant la théorie et la pratique de la PCR et de l'ADN recombinant. La formation devrait également inclure les aspects de biosécurité au sein d'un laboratoire de biologie moléculaire, ainsi que les questions relatives à la qualité et à la résolution des problèmes associés à la PCR. La formation pratique doit être réalisée pour chaque technique sous la supervision d'un membre du personnel expérimenté. Le temps nécessaire à la formation variera en fonction du participant et de la technique. Le personnel doit démontrer qu'il est en mesure d'appliquer la méthode avec succès en testant des échantillons de contrôle positif et négatif déjà confirmés avant de pouvoir analyser des échantillons de patients.