

IDF/LAB/HLA/PR/015 Version N°5

Date de diffusion : 03/11/2023

Ancienne référence : P-0340

9.04 - HLA

PREVENTION DES CONTAMINATIONS AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE HLA-ILP

Rédacteur	Vérificateur	Approbateur	Validation AQ
GIRARD Peggy HARFOUCH Elham LETORIELLEC Emilie PARE Benedicte	HARFOUCH Elham (25/10/2023)	CROISILLE Laure (02/11/2023)	Validation AQ (03/11/2023) (SILVAIN Christine)

Destinataires pour mise en œuvre

LAB - Pilote de processus régional - LAB/HLA Tout le personnel - LAB/HLA - Pilote de processus régional

Modification : - Modifications : élimination de l'utilisation du Gélbio et changement de la fréquence des wipe-tests.

Documents associés

Titre du document	Référence
Gestion des déchets de l'EFS IDF	IDF/ENV/DEC/PR/001
 Référentiel des pratiques générales d'hygiène à l'EFS	ENV/HSP/DC/RE/002
Entretien du laboratoire de Biologie Moléculaire HLA-ILP	IDF/LAB/HLA/MO/139
Contrôle de contamination : Wipe Test au laboratoire HLA-ILP	IDF/LAB/HLA/MO/011

1. Objet

Cette procédure décrit les contraintes organisationnelles dictées par la prévention des contaminations croisées pouvant fausser les résultats d'analyses au laboratoire de biologie moléculaire.

2. Domaine d'application

Laboratoire de biologie moléculaire HLA

3. Définitions & abréviations

DASRI : Déchets d'Activité de Soins à Risques Infectieux

HLA : Human Leucocyte Antigen

PCR : Polymerase Chain Reaction

4. Responsabilités & Personnes compétentes

Concerne tous les personnels du laboratoire, agents d'entretien, techniciens, secrétaires, biologistes. Les intervenants extérieurs au laboratoire, agents d'entretien, techniciens, commerciaux, tous les visiteurs doivent recevoir les informations sur ces contraintes et s'y plier.

5. Contenu

Particularités des analyses en biologie moléculaire :

La formation du personnel et son habilitation au respect des circuits du laboratoire est une condition sine qua non de la maîtrise des flux. Cette maîtrise passe par l'information des différents prestataires pouvant intervenir au sein des locaux : mise à disposition d'équipements jetables, communication orale.

Le laboratoire est partagé en 3 zones bien distinctes :

- 1) Pièce d'extraction des acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques. (19-TOR-T-055)
- 2) Pièce pré-PCR (19-TOR-T-06054)
- 3) Pièces post-PCR (19-TOR-T-0-052 ; 19-TOR-T-0-051 ; 19-TOR-T-0-050 ; 19-TOR-T-0-053)

La séparation entre la pièce post-PCR et les 2 autres doit être absolue c'est-à-dire qu'aucun réactif ou consommable ayant séjourné dans cette pièce, et notamment les produits PCR ne doivent pouvoir pénétrer dans les pièces pré-PCR et d'extraction.

La circulation entre ces différentes zones est schématisée sur le plan de la page 6.

Les saisies informatiques des résultats sont réalisées dans les secrétariats et bureaux.

Etapes : opérations techniques

Secteurs du laboratoire

1 : traitement des prélèvements, extraction des acides nucléiques (ADN)	1
2 : préparation des mélanges pré-réactionnels hors échantillons à tester	2
3 : mise en contact des extraits avec les mélanges pré-réactionnels	2
4 : amplification	3
5 : révélation des produits d'amplification	3

➤ Organisation des locaux

Pour la technique de PCR, les manipulations doivent être réalisées dans des locaux spécialement dédiés à chacune des étapes séquentielles de cette technique, et si possible climatisés.

L'accès à ces différents locaux est restreint aux personnels habilités.

Pour chaque zone, respecter les tenues préconisées, les modes de nettoyage ou décontamination du laboratoire HLA-ILP (IDF/LAB/HLA/MO/139).

- **Secteur 1 (étape 1)**

Zone d'extraction

Il est dédié au traitement des prélèvements, à l'extraction des acides nucléiques et à leur dosage.

Le port des gants et d'une blouse est obligatoire lors de la manipulation des échantillons biologiques.

La porte doit être fermée.

Les micropipettes sont affectées à cet espace.

Les effluents de l'automate d'extraction sont éliminés dans les jerricans DASRI fermés hermétiquement.

- **Secteur 2 (étapes 2 et 3)**

Zone pré-PCR

Il est réservé à la préparation des réactifs d'amplification et à la mise en place de la PCR.

Le local doit être dédié à cet usage et indépendant des autres pièces.

La porte doit être fermée.

Les réactifs et consommables sont spécifiques et ne doivent pas avoir séjournés en pièce post-PCR.

A l'extérieur de cette pièce, retirer la blouse. Une fois à l'intérieur, enfiler une blouse jetable dédiée à ce secteur. Porter des gants pour toute manipulation.

L'organisation des locaux ne permettant pas une pièce exclusivement pré-PCR, on distingue les portoirs de micropipettes des mélanges réactionnels étiquetés pré-Mix, des portoirs de micropipettes étiquetés ADN.

Avant de quitter la pièce, retirer la blouse dédiée.

- **Secteur 3 (étapes 4 et 5)**

Zone post-PCR

Elle est réservée à l'amplification, et à la révélation des produits amplifiés.

Devant le sas, déposer sa blouse.

Dans le sas, mettre une blouse jetable, une charlotte, des sur-chaussures et des gants.

Les réactifs et consommables sont spécifiques et ne doivent pas sortir de la pièce post-PCR.

Si c'est le cas, par exemple pour l'envoi des pipettes en métrologie, décontaminer avec de l'HCl 0,1N, rincer et essuyer.

Avant de sortir du sas, retirer la blouse, la charlotte, les sur-chaussures jetables et les accrocher sur les patères correspondantes ou les jeter dans la poubelle du sas, jeter les gants.

Veiller à ce que les portes du sas soient bien fermées.

Blouse, charlotte et sur-chaussures peuvent être utilisés pendant 2 mois avant d'être jetées.

➤ **Réactifs et consommables**

Les réactifs destinés à chaque étape doivent être préparés et conservés dans la zone correspondante.

Les micropipettes et tous les consommables (pointes et tubes) doivent être adaptés et dédiés à chacune des étapes techniques.

Les équipements doivent être dédiés à un seul espace PCR.

Ils sont stockés dans les zones correspondantes et ne sont jamais interchangeables.

Utiliser des cônes à filtre pour les pipetages.

Changer de cône à filtre à chaque distribution de réactif ou d'échantillon.

Lors de la manipulation des tubes contenant les ADN, ceux-ci doivent être ouverts délicatement pour minimiser la formation d'aérosols, les uns après les autres en les rebouchant au fur et à mesure.

➤ Témoins et contrôles

Chaque manipulation doit comporter un témoin positif (validant toutes les étapes de la technique, surtout en PCR qualitative) et un témoin négatif (vérifiant l'absence de contamination lors de l'ensemble des manipulations). De plus, il est nécessaire d'ajouter un contrôle de l'absence d'inhibiteur de la PCR (en co-amplifiant en parallèle une séquence obligatoirement présente dans le prélèvement, ou en introduisant un contrôle interne).

➤ Désinfection et élimination des déchets

La désinfection des paillasses, plans de travail et du matériel, doit être régulière et rigoureuse (IDF/LAB/HLA/MO/139). L'ensemble du personnel, y compris les agents d'entretien, doit scrupuleusement respecter les consignes de travail définies pour chaque pièce ainsi que le sens de circulation.

Les déchets des échantillons de produits amplifiés sortent de cette zone pour leur destruction dans des poubelles adaptées ayant été préalablement nettoyées en surface à l'HCl 0,1N suivi d'un rinçage H₂O et d'un séchage.

 Les déchets liquides occasionnés par le Luminex et les déchets contenant du Gelgreen sont stockés dans un jerrican DASRI puis éliminés par un prestataire spécifique après décontamination en surface du bidon à l'HCl 0.1N, suivi d'un rinçage et d'un essuyage.

Les cartouches Illumina utilisées dans le séquenceur Miseq (NGS) sont éliminées dans les fûts CMR suivi d'une décontamination en surface à l'HCl 0,1N suivi d'un rinçage H₂O et d'un essuyage.

➤ Wipe-test (IDF/LAB/HLA/MO/011)

Ce test pratiqué une fois  tous les deux mois, a pour but de dépister une éventuelle contamination de l'air ambiant et des surfaces, par des amplicons d'ADN ou de l'ADN génomique afin d'assurer la qualité des analyses de biologie moléculaire au laboratoire HLA-ILP. Il est suivi d'un nettoyage approfondi.

➤ Entretien spécifique, décontamination préventive (IDF/LAB/HLA/MO/139)

Ce mode opératoire décrit l'entretien quotidien spécifique des différentes pièces par les techniciens ainsi que le nettoyage préventif qui est fait 1 fois par an par un prestataire externe dans les pièces pré-PCR et d'extraction d'ADN.

