

CAHIER DES CHARGES



Laboratoire de Niort

Laboratoire Expert

pour la Diarrhée Virale Bovine

Objet	VALIDATION DE RÉACTIFS
Pathologie	Pestivirus bovins
Technique	ELISA
Matrice	Biopsie auriculaire

Version	01
Date d'application	26/01/2017

Validation

<i>Nom/Prénom</i>	<i>Fonction</i>	<i>Date</i>	<i>Signature</i>
Aurore TEILLET	Responsable Technique	26/01/2017	
Aude ALLEMANDOU	Responsable Thématique	26/01/2017	

Diffusion

Ce cahier des charges est en diffusion limitée : Usage exclusif réservé aux producteurs de réactifs.

Suivi des modifications

- Cahier des charges séparé pour la technique ELISA et la technique PCR

Commentaire

Sommaire

1. Objectifs	3
2. Contexte	3
3. Présentation d'un dossier de validation	3
4. Définitions.....	3
5. Les matériaux de référence	4
6. Critères de performance pour les méthodes ELISA	4
7. Annexe	5

1. Objectifs

Ce cahier des charges précise aux producteurs de réactifs, les conditions générales nécessaires à la validation d'un kit.

Il vise à décrire les critères de performance attendus des réactifs de diagnostic ELISA pour la détection des pestivirus bovins dans la matrice biopsie auriculaire individuelle. L'objectif est la détection des animaux Infectés Permanents Immunotolérants (IPI) en accord avec le Cahier des Charges ACERSA « bovin non IPI ». Ces critères de performance seront étudiés lors de l'examen du dossier de validation transmis par le producteur de réactif.

Le producteur de réactifs devra informer impérativement le LE-BVD de tout changement appliqué à un réactif ELISA ayant une attestation initiale de conformité (Annexe C de la norme XP U47-310).

2. Contexte

En 2010, l'Association de certification en santé animale (Acersa) a défini dans un cahier des charges les conditions d'obtention de l'appellation « bovin non infecté permanent immunotolérant vis-à-vis du virus BVD » (CC BVD 01). Cette appellation peut être attribuée selon différentes modalités analytiques reposant soit sur la détection du virus BVD (BVDV), du génome ou des antigènes viraux soit sur la détection d'anticorps spécifiques du BVDV. Les tests de diagnostic direct peuvent être réalisés sur des matrices variées (sang total, sérum, lait ou biopsie auriculaire), en individuel ou en mélange. L'appellation « BVD non IPI » délivrée selon les critères définis dans le cahier des charges apporte une garantie correspondant à un risque maximal d'erreur par excès de 1 bovin pour 5000.

3. Présentation d'un dossier de validation

Chaque producteur de réactifs désirant soumettre au contrôle un réactif ELISA pour la détection de pestivirus bovin à partir de la matrice biopsie auriculaire devra fournir :

- Un dossier administratif à minima comme décrit dans les normes U47-301 mais également XP U47-310 (annexe B) pour les réactifs ELISA.
- Un dossier technique de caractérisation de la méthode comme décrit dans la norme XP U47-310 pour les réactifs ELISA.

4. Définitions

- **Matériau de référence (MR)** (Guide ISO 30)

Matériau ou substance dont une (ou plusieurs) valeur(s) de la (des) propriété(s) est (sont) suffisamment homogène(s) et bien définie(s) pour permettre de l'utiliser pour l'étalonnage d'un appareil, l'évaluation d'une méthode de mesurage ou l'attribution de valeurs aux matériaux.

- **Niveau exigible de détection (NED)** (XP U47-310)

Niveau spécifié d'un MR contenant l'analyte, qui doit entraîner une réponse positive de la méthode utilisée. Le niveau exigible de détection est défini par voie réglementaire, normative ou, à défaut, par le laboratoire de contrôle (en concertation avec les organismes gestionnaires).

- **Coefficient de Variation**

Il sera calculé comme suit = Ecart type / Moyenne des essais réalisés x 100%.

5. Les matériaux de référence

Les matériaux de référence pour la matrice biopsie auriculaire ont été obtenus lors de différentes collectes réalisées sur le terrain en partenariat avec GDS France. A partir du contrôle du statut BVD de jeunes animaux, des prélèvements d'oreilles, de sérum et de sang total ont été effectués.

Il est rappelé que des matériaux de référence sont à la disposition exclusive des producteurs de réactifs pour la validation de nouvelles méthodes et sont accompagnés d'une fiche descriptive. Les tarifs sont consultables sur www.anses.fr.

- **Biopsies Auriculaires Négatives**

Le statut indemne de BVD des animaux sélectionnés a été vérifié par différentes techniques, sur les différentes matrices. Un matériau de référence pour cette matrice est défini par un poinçon de 2 ou 3 millimètres conservé à une température $\leq -65^{\circ}\text{C}$.

- **Biopsies Auriculaires Positives**

Le statut infecté BVD (IPI) des animaux sélectionnés a été vérifié par différentes techniques, sur les différentes matrices. Un matériau de référence pour cette matrice est défini par un poinçon de 2 ou 3 millimètres conservé à une température $\leq -65^{\circ}\text{C}$.

6. Critères de performance pour les méthodes ELISA

La définition des critères de performance est basée sur les normes en vigueur concernant le contrôle des réactifs ELISA (XP U47-310), ainsi que sur les caractéristiques attendues de la méthode.

Ces critères devront être présentés dans le dossier de validation et être respectés pour obtenir une attestation initiale de conformité du réactif délivrée par le LE-BVD.

Ce cahier des charges s'applique aux producteurs de réactifs désirant valider une méthode ELISA pour des analyses individuelles de biopsies auriculaires.

Le producteur devra apporter la preuve que les échantillons qu'il utilise pour la validation de la méthode sont bien des échantillons d'animaux IPI (échantillons autres que ceux fournis par le LE-BVD). L'âge de l'animal, le statut sérologique p80, le statut obtenu avec un autre kit autorisé (préciser lequel) devra être également transmis avec le statut obtenu avec le kit du producteur faisant l'objet de la demande de contrôle.

- **Données permettant l'établissement du seuil**

Le producteur de réactifs fournira les données qui lui ont permis de fixer le seuil de la méthode ainsi que les données de caractérisation des matériaux utilisés. Ces données seront à fournir pour chaque condition d'emploi et pour tout changement pouvant influencer sur ces paramètres (par exemples : protocoles court ou long, conjugué,...)

- **Spécificité analytique**

Non applicable pour cette matrice.

- **Sensibilité analytique**

Le producteur de réactifs pourra disposer d'un matériau de référence pour vérifier le niveau exigible de détection (NED). Ce matériau devra être trouvé positif 10 fois sur 10 à partir de biopsies auriculaires individuelles et pour chaque condition d'emploi.

- **Sensibilité diagnostique**

Elle sera réalisée à l'aide d'un panel d'échantillons de bovins infectés permanents immunotolérants vis-à-vis du virus BVD (IPI) issus de cheptels européens (données à préciser par le producteur de réactifs). Afin de vérifier au minimum une sensibilité de 99 % avec un niveau de confiance de 95 %, un échantillonnage minimum de 70 biopsies auriculaires positives est nécessaire. Le producteur devra apporter les éléments de caractérisation de tous les échantillons utilisés. La sensibilité diagnostique devra être vérifiée pour chaque condition d'emploi.

- **Spécificité diagnostique**

Elle sera réalisée à l'aide d'un panel d'échantillons de bovins indemnes de pestivirus (statut négatif confirmé) et de cheptels européens (données à préciser par le producteur de réactifs). Afin de vérifier au minimum une spécificité de 99 % avec un niveau de confiance de 95 %, un échantillonnage minimum de 70 biopsies auriculaires négatives est nécessaire. Le producteur devra apporter les éléments de caractérisation de tous les échantillons utilisés. La spécificité diagnostique devra être vérifiée pour chaque condition d'emploi.

- **Loi dose-effet**

Elle sera réalisée à partir de 5 niveaux de dilution d'une biopsie auriculaire fortement positive (dilutions réalisées avec des biopsies auriculaires négatives) dont une dilution équivalente au NED et dans la zone de linéarité de la méthode. Elle devra être vérifiée pour chaque condition d'emploi.

- **Répétabilité**

Celle-ci pourra être réalisée à l'aide de la biopsie auriculaire du NED ou d'un échantillon de niveau de détectabilité comparable au NED sur au moins 20 points et sur 3 plaques différentes (soit 60 points au total, en faisant varier la place des témoins et des échantillons). Le coefficient de variation (CV) acceptable devra être inférieur à 12 %. Elle devra cependant être vérifiée pour chaque condition d'emploi. Les valeurs brutes des densités optiques des 3 plaques et les 3 CV devront être comparables. L'absence d'effet bord ou d'effets puits sera démontrée.

- **Fidélité intermédiaire**

Trois niveaux de dilution d'un même échantillon, situés dans la gamme linéaire, dont un niveau de détectabilité est comparable au NED, sont analysés dans 3 séries d'analyses différentes en faisant varier les facteurs les plus susceptibles d'influer sur la fidélité de l'essai (matériel et opérateurs). Le producteur de réactifs devra démontrer une fidélité intermédiaire avec un CV inférieur à 15 %. Elle devra être vérifiée pour chaque condition d'emploi.

- **Reproductibilité inter-laboratoire**

Le producteur de réactifs devra démontrer une reproductibilité inter-laboratoire avec un CV maximum inférieur à 20%. Pour ce faire, l'essai devra être réalisé en aveugle dans au moins 4 laboratoires différents accrédités en ELISA et dans le LE-BVD. Pour ce faire, à minima, trois essais sur 3 niveaux (positif, équivalent NED, négatif) en triplicata devront être réalisés. Les données brutes des différents laboratoires sollicités seront fournies sous la forme d'un tableau récapitulatif, faisant apparaître moyenne, écart-type et CV de répétabilité pour chaque triplicata et moyenne, écart-type et CV de répétabilité pour les trois essais, pour chaque niveau et pour chaque laboratoire. Ces résultats seront formalisés dans le dossier de validation (les rapports d'analyse des différents laboratoires seront à mettre en annexe).

- **Robustesse**

Les données seront à fournir pour les paramètres critiques de la méthode.

Pour exemple : température et temps d'incubation limites indiqués dans la notice du producteur de réactif.

- **Stabilité** Les données seront à fournir et la méthode d'évaluation sera à justifier (ex : vérification au 2/3 de vie du réactif et à la date de péremption du kit).

7. Annexe

Annexe 1 : Critères de conformité des kits de diagnostic ELISA – Pestivirus Bovins – Matrice Biopsie Auriculaire.

Critères de performance	Echantillons	Nombre d'échantillons	Nombre d'essais	Protocole	Conformité
SEUIL	Collection de BA caractérisées	Minimum 150 BA	Sans objet		Fournir les données
SENSIBILITE ANALYTIQUE	NED	Adapté à la prise d'essai définie dans le(s) protocole(s)	10 essais par protocole		100% positif
SENSIBILITE DIAGNOSTIQUE	Collection de référence positive LE-BVD et européen	Minimum 70 BA	1 essai par protocole	Selon spécifications du producteur de réactifs	99 % positif [95%]
SPECIFICITE DIAGNOSTIQUE	Collection Référence négative LE-BVD et européen	Minimum 70 BA	1 essai par protocole		99 % négatif [95%]
DETECTABILITE (LOI DOSE EFFET)	BA Positive	1 BA par protocole	5 dilutions de la BA pour 1 essai pour chaque protocole		Linéarité et cohérence
REPETABILITE	Equivalent NED	Adapté à la prise d'essai définie dans le(s) protocole(s)	3 essais de 20 répétitions minimum pour chaque protocole		CV ≤ 12 %
FIDELITE INTERMEDIAIRE	BA positive, Equivalent NED, BA négative	Adapté à la prise d'essai définie dans le(s) protocole(s)	3 essais sur 3 niveaux différents de BA répétés 3 fois pour chaque protocole	Faire varier les facteurs pouvant influencer sur la fidélité (matériel, opérateurs)	CV ≤ 15 %
REPRODUCTIBILITE INTER LABORATOIRE	BA positive, Equivalent NED, BA négative	Adapté à la prise d'essai définie dans le(s) protocole(s)	3 essais sur 3 niveaux différents de BA répétés 3 fois pour chaque protocole réalisés dans 5 laboratoires différents	Dans les conditions opératoires des différents laboratoires	CV ≤ 20 %
ROBUSTESSE et STABILITE	Vérification des paramètres critiques (température et temps d'incubation, lavages manuels et automatiques)			Fournir les données de vérification des paramètres critiques	
	Vérification au 2/3 de vie du réactif et à la date de péremption				