

GUIDE D'AIDE POUR LA MISE EN PLACE DES CONTRÔLES DE CONFORMITÉ DES RÉACTIFS DE DIAGNOSTIC

Version c

La version révisée de ce document précise en Introduction les documents associés à ce guide à utiliser, donne un résumé en fin de chaque chapitre et détaille en chapitre 4 l'organisation du processus de contrôle de réactifs par les LNR Anses.

Table des matières

Table des matières.....	2
INTRODUCTION	4
1. ÉLÉMENTS NÉCESSAIRES À L'ÉTABLISSEMENT DU CAHIER DES CHARGES	5
1.1 Détermination des valeurs de performance attendues.....	5
1.2 Collections de référence	5
2. RÉDACTION DU CAHIER DES CHARGES	6
2.1 Principes généraux de la construction du cahier des charges	6
2.2 Référentiels et matériaux de référence	6
2.3 Définitions	7
2.4 Contexte et objectifs d'application du réactif	7
2.5 Descriptif du réactif et du lot soumis au contrôle.....	7
2.6 Dossier technique à présenter par le fabricant : aspects généraux	7
2.7 Caractérisation des réactifs de diagnostic immunologique qualitatifs ou semi quantitatifs.....	8
2.7.1 Inclusivité et exclusivité.....	8
2.7.2 Interférences de la matrice (ou sélectivité selon l'OMSA).....	8
2.7.3 Limite de détection (ou sensibilité analytique, SeA).....	8
2.7.4 Cohérence de la loi dose-effet	9
2.7.5 Répétabilité (intra-essai)	9
2.7.6 Fidélité intermédiaire (ou reproductibilité intralaboratoire).....	9
2.7.7 Reproductibilité interlaboratoires.....	10
2.7.8 Sensibilité et spécificité diagnostique (SeD, SpD)	10
2.7.9 Robustesse	10
2.7.10 Stabilité	11
2.8 Critères supplémentaires pour les réactifs de diagnostic immunologiques quantitatifs	11
2.8.1 Limite de détection ou de détectabilité	11
2.8.2 Limite de quantification	11
2.8.3 Zone de linéarité	11
2.8.4 Justesse (ou biais)	11
2.9 Caractérisation des réactifs de techniques PCR	11
2.9.1 Analyse <i>in silico</i> (étude bio-informatique)	12
2.9.2 Inclusivité - Exclusivité (ou spécificité analytique, SpA, selon l'OMSA)	12
2.9.3 Limite de détection (ou sensibilité analytique, SeA).....	12
2.9.4 Efficacité.....	12
2.9.5 Robustesse de la (RT)PCR.....	13
2.9.6 Stabilité du réactif.....	13
2.10 Caractérisation complémentaire des réactifs (RT)PCR pour des techniques quantitatives	13

2.10.1	Domaine de linéarité	13
2.10.2	Limite de quantification LQ(RT)PCR.....	13
2.11	Caractérisation de la méthode complète (préparation de l'échantillon/extraction/PCR) pour des techniques PCR qualitative, quantitative ou semi-quantitative/relative à un MRSI.....	13
2.11.1	Limite de détection de la méthode (LD _{METHODE})	13
2.11.2	Sensibilité et spécificité diagnostiques (SeD et SpD)	14
2.12	Caractérisation complémentaire d'une méthode PCR quantitative	14
2.13	Caractérisation d'une méthode PCR semi-quantitative/relative à un matériau de référence au seuil d'interprétation (MRSI).....	14
2.14	Synthèse des paramètres de performance et des niveaux d'exigence attendus	14
3.	Contrôles effectués par le LNR	15
3.1	Vérifications effectuées par le LNR pour le contrôle initial	15
3.2	Contrôle de lot par le LNR	15
4.	ORGANISATION DU CONTROLE DE REACTIFS PAR LES LNR ANSES	15
4.1	Cadre décisionnel préalable	15
4.2	Cahier des charges.....	16
4.3	Appel à manifestation d'intérêt	16
4.3.1	Intégration du cahier des charges.....	16
4.3.2	Validation interne	16
4.3.3	Contenu minimal du courrier d'accompagnement.....	16
4.3.4	Diffusion de l'AMI	16
4.4	Conduite du contrôle de réactifs	17
4.5	Diffusion des résultats de contrôle	17
ANNEXE 1 : Étude de l'impact de variations de <i>cut-off</i> sur la sensibilité et la spécificité diagnostiques : robustesse des niveaux de performance diagnostique des tests immunologiques		19
Bibliographie.....		21

INTRODUCTION

1. Objet du guide

Le présent guide est un des documents visant à harmoniser les pratiques des laboratoires nationaux de référence Anses (LNR) pour la mise en œuvre **du contrôle de conformité des réactifs**, et rédigés par le Groupe de travail Anses « Contrôle des réactifs » :

Animation : successivement, Jaqueline Vialard (Direction de la stratégie et des programmes, DSP), Bruno Garin-Bastuji (DSP), Marc Tabouret (Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, PPN) et Bertrand Lombard (DSP).

Membres : Corinne Sailleau & Sylvie Henault (Laboratoire de santé animale), Élodie Rousset (Laboratoire de Sophia Antipolis), Céline Deblanc (Laboratoire PPN), Géraldine Anthoine (Laboratoire de santé des végétaux).

Ce guide, réservé à un usage interne à l'Anses, est à destination des LNR chargés du contrôle **des réactifs immunologiques ou PCR de diagnostic (ou "kits")**. Applicable principalement en santé animale, car fondé sur le corpus normatif dans ce domaine, il peut cependant être utilisé en santé des végétaux.

Ce guide donne des recommandations aux LNR Anses pour la mise en place et le fonctionnement du contrôle initial de conformité et du contrôle de lot.

Ce guide est évolutif : chaque LNR est invité à transmettre ses retours d'expérience pour les futures révisions.

2. Documents associés

Catégorie	Référence	Usage
Cahiers des charges (CdC) -types	ANSES/FGE/0302 (ELISA)	Base de rédaction de CdC pour chaque diptyque (maladie, type de réactif). Ce guide aide les LNR effectuant un contrôle de réactifs à rédiger leurs CdC spécifiques.
	ANSES/FGE/0303 (PCR)	
	ANSES/FGE/0328 – Demande de contrôle	
Formulaires fabricants/demandeurs	ANSES/FGE/0329 – Déclaration de modification	À transmettre par le LNR au fabricant/demandeur
	ANSES/FGE/0330 – Trame de rapport initial	
	ANSES/FGE/0331 – Attestation initiale (mise en ligne)	
Livrables LNR	ANSES/FGE/0332 – Attestation initiale ou lot (au fabricant)	À renseigner et diffuser par le LNR
	ANSES/FGE/0363 – Trame de liste des lots de réactifs contrôlés conformes	

1. ÉLÉMENTS NÉCESSAIRES À L'ÉTABLISSEMENT DU CAHIER DES CHARGES

1.1 Détermination des valeurs de performance attendues

Pour la détermination des valeurs de performances attendues, se référer aux référentiels nationaux, européens et internationaux (textes normatifs et réglementaires, préconisations LRUE¹, ...), lorsqu'ils existent. Il peut être utile de réaliser une enquête sur les pratiques dans les autres pays européens ou hors Europe, notamment en l'absence de référentiel.

Selon le mode de gestion du pathogène ou ravageur, il peut être nécessaire d'échanger et de contractualiser avec le gestionnaire de risque de manière à établir les niveaux de performances attendus. Il est important de conserver l'historique des échanges entre LNR et gestionnaire ayant conduit à l'établissement des niveaux de performance attendus.

Cette détermination doit prendre en compte les données inhérentes à la technique et à l'état de l'art dans le domaine (littérature scientifique, essais de caractérisation, carte de contrôle, ...).

1.2 Collections de référence

Le producteur de réactif doit constituer une collection adéquate d'échantillons caractérisés pour le développement et la validation (ou contrôle initial) du réactif qu'il propose. De son côté, le LNR devant évaluer des réactifs doit disposer, dans la mesure du possible, d'une échantillothèque aussi représentative que possible des situations potentiellement retrouvées sur le terrain.

Ces deux collections doivent être, autant que possible :

- soit représentatives de la situation française (échantillons terrain) pour les maladies présentes en France métropolitaine, en s'appuyant au besoin sur les organisations professionnelles,
- soit représentatives de la situation européenne pour les maladies présentes en Europe,
- soit suffisamment étoffées en échantillons vrais positifs, vrais négatifs et autres échantillons d'intérêt (à l'origine de réactions croisées, par exemple), notamment pour les maladies exotiques (hors France métropolitaine ou hors UE).

Ces collections doivent être, dans la mesure du possible, représentatives de la diversité des hôtes (espèce, âge, race, sexe, système de production), des origines géographiques, des contextes épidémiologiques (inclure le cas échéant des animaux vaccinés et des reproductions expérimentales).

Dans la mesure du possible, les LNR doivent prévoir des échantillons de volume suffisant pour la fabrication de matériaux de référence (MR), notamment ceux partagés avec les fabricants de réactifs, et ceux constituant des panels d'essais interlaboratoires d'aptitude (EILA).

Les échantillons de la collection du LNR doivent être caractérisés au plan épidémiologique et analytique, avec les techniques de référence disponibles, ou, à défaut, avec les kits existant sur le marché, de préférence contrôlés. Cette caractérisation porte au moins sur une partie de la collection. Il est important d'être en mesure d'apporter des preuves solides du caractère positif ou négatif de chaque échantillon avant toute décision de non-conformité prononcée par le LNR.

Le LNR peut mettre à disposition des fabricants demandeurs, pour le développement et le contrôle initial de réactif, certains échantillons de sa collection lorsque la situation l'exige et que c'est matériellement possible (nombre et volume suffisants, risques biologiques, ...).

¹ LRUE, laboratoire de référence de l'Union européenne

Le LNR doit fournir au fabricant au moins le niveau exigible de détection (NED) et le(s) MR nationaux (quand ces derniers existent). Il est donc recommandé de les fabriquer en grand volume et de choisir un mode de conditionnement permettant une conservation à long terme, sans risque de dégradation (par exemple, lyophilisation pour les sérums, congélation à - 80 ° C pour des suspensions virales). Il est possible de limiter les quantités distribuées annuellement pour inciter les fabricants à disposer de leurs propres MR, après avoir raccordé leurs MR au MR national du LNR.

✦ À retenir du Chapitre 1 – Établir le cahier des charges

- Fixer les valeurs de performance attendues via normes, référentiels et concertation avec les gestionnaires de risque (principalement DGAI)
- Constituer une collection de référence représentative (terrain France/UE/exotique)
- Documenter précisément la traçabilité et la caractérisation analytique/épidémiologique de chaque échantillon
- Prévoir des volumes suffisants pour fabriquer ou partager des matériaux de référence (MR)
- Conserver l'historique des décisions (niveau de performances, échanges LNR ↔ gestionnaire de risques)

2. RÉDACTION DU CAHIER DES CHARGES

2.1 Principes généraux de la construction du cahier des charges

Destinés aux producteurs et/ou distributeurs, construire les cahiers des charges pour le contrôle de conformité des réactifs selon la trame pour les réactifs immunologiques ou la trame pour les réactifs PCR (trames disponibles sur ENNOV). Chacune de ces trames suit le même modèle avec, d'une part, des parties fixes non modifiables (titres et texte en noir) correspondant souvent à des définitions normatives, et, d'autre part, des parties à renseigner et à compléter par le LNR (texte en vert) en fonction des particularités liées à la cible, au type de réactif et aux objectifs de gestion. La trame étant fixe, écrire "sans objet" pour les chapitres pour lesquels aucune information n'est attendue.

2.2 Référentiels et matériaux de référence

Certains référentiels généraux en santé animale sont déjà mentionnés dans la trame commune du cahier des charges mais compléter ce chapitre avec les documents relatifs à la cible visée, s'ils existent : par exemple arrêté ministériel, manuel OMSA si existence de préconisations sur les performances attendues, cahier des charges technique et descriptif des MR nationaux, européens ou internationaux. Lorsque l'arrêté ministériel d'application du Décret 2007-311² qui définira la catégorie du réactif (B ou C) sera publié, y faire référence.

Les MR peuvent être, par exemple, le ou les échantillons au niveau du NED (Niveau Exigible de Détection), une suspension de la cible ou un plasmide.

Certains MR peuvent être des souches de collection ou des échantillons de référence détenus par un Centre de Ressources Biologiques (CRB) : dans ce cas, préciser le(s) distributeur(s) et la ou les référence(s) des produits. Les MR susceptibles d'être partagés ou mis à disposition des demandeurs doivent être précisés dans ce paragraphe.

² Décret 2007-311 du 5 mars 2007 relatif au contrôle de conformité des réactifs destinés aux analyses réalisées dans les domaines de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux et modifiant le Code Rural

2.3 Définitions

Certaines définitions sont spécifiques à la cible. Indiquer notamment dans ce chapitre comment sont définis les statuts des espèces, des individus/populations infectés ou indemnes.

Être très précis dans les définitions des termes "infecté", "indemne", "positif", "négatif", par exemple sur la base d'un statut officiel, d'un profil sérologique (y compris combinaisons de tests) et/ou des éléments épidémiologiques et/ou d'isolement de l'agent. En effet, ces définitions conditionnent en particulier les calculs de sensibilité et spécificité diagnostique (SeD, SpD).

Réserver de préférence les adjectifs "positif" ou "négatif" à des résultats de test. Si le réactif doit être testé sur des échantillons particuliers, préciser ici les exigences que doivent remplir ces échantillons. Par exemple en santé animale, pour des animaux vaccinés, préciser le type de vaccin employé, le protocole vaccinal, ou pour des individus porteurs d'agent responsable de réactions croisées, préciser les preuves cliniques ou analytiques de ce portage, ou pour des animaux sous couverture colostrale, préciser l'âge maximal des animaux prélevés.

2.4 Contexte et objectifs d'application du réactif

Préciser dans ce chapitre :

- les objectifs d'application du réactif, notamment par rapport aux objectifs de gestion. Par exemple, les objectifs d'application peuvent être la recherche des animaux infectés, des (super) excréteurs, la confirmation des suspicions, la mise en évidence d'exposition ancienne, d'une vaccination, d'une infection récente (IgM) ou bien d'une infection avec une manifestation clinique donnée ou un syndrome ;
- la(les) cible(s) : préciser si le réactif doit être multiplex et doit apporter une réponse par cible ;
- le niveau d'identification attendu :
 - o pour la détection du pathogène : l'espèce/la sous espèce/le sous-type/le génotype,
 - o pour la recherche d'anticorps : l'isotype, une spécificité d'épitope, ...
- le(s) type (s) de matrice ;
- le type de résultat(s) attendu(s) : qualitatif, quantitatif (domaine) et/ou relatif par rapport à un seuil d'interprétation, ...
- le(s) seuil(s) le cas échéant ;
- si certains types de réactifs sont exclus (par exemple : ELISA compétition ou indirect) du fait de la connaissance de leur incapacité à répondre aux niveaux de performance attendus (données bibliographiques ou expérience du LNR) ou du fait d'un cadre réglementaire ;
- les modalités à respecter pour la réalisation du prélèvement ;
- les particularités à respecter pour la préparation de l'échantillon, en particulier pour la PCR toutes les méthodes d'extraction pouvant être utilisées.

2.5 Descriptif du réactif et du lot soumis au contrôle

Ce chapitre détaille ce que le demandeur devra fournir. Avoir un haut niveau d'exigence sur la fourniture de l'intégralité des informations demandées. En cas de données manquantes, le LNR peut poursuivre la lecture du dossier mais doit réclamer les données manquantes dont l'absence est une condition suspensive de la réalisation du contrôle.

2.6 Dossier technique à présenter par le fabricant : aspects généraux

Les parties suivantes de ce guide (2.7 à 2.14) définissent notamment les paramètres de performance pour lesquels le fabricant doit présenter les résultats obtenus avec son réactif et pour chaque paramètre. Préciser le niveau de performance attendu, fixé le cas échéant avec le gestionnaire. Fixer la valeur attendue minimale, mais aussi éventuellement la valeur maximale, s'il y a par exemple

nécessité de limiter les différences entre les kits mis sur le marché en termes de sensibilité analytique ou de spécificité diagnostique.

Préciser également les conditions pour apporter les preuves que le réactif répond bien aux exigences : nombre et nature des échantillons à tester, modalités de réalisation des essais, modalités de présentation des résultats, ...

2.7 Caractérisation des réactifs de diagnostic immunologique qualitatifs ou semi quantitatifs

Une variabilité existe dans les définitions et/ou les validations demandées pour l'ensemble des critères analytiques d'une méthode. Le GT contrôle de réactifs a essayé de clarifier l'approche de caractérisation en distinguant les critères de performance dépendant exclusivement de la cible (paramètres d'inclusivité et d'exclusivité) de ceux impliquant la matrice, qui seront étudiés par la limite de détection (appelée également sensibilité analytique) et l'étude des interférences. À noter que l'OMSA regroupe sous le terme « spécificité analytique » l'inclusivité, l'exclusivité et la sélectivité (interférences) telles que définies dans ce guide.

2.7.1 Inclusivité et exclusivité

L'inclusivité et l'exclusivité sont des paramètres importants à étudier afin de connaître précisément ce que le réactif détecte ou ne détecte pas (type/sous type, variant, ...), indépendamment de la matrice. Ces paramètres peuvent être difficiles à estimer du fait de la faible disponibilité d'échantillons suffisamment caractérisés avec la détermination précise (sous-type, germe apparenté, ...) du pathogène à l'origine de l'infection. Les contrôles d'inclusivité et d'exclusivité doivent, dans la mesure du possible, être réalisés sur des échantillons représentatifs de la diversité de l'analyte à détecter (différents sous-types), cette diversité étant définie à partir des données épidémiologiques et de la bibliographie. Spécifier un nombre minimal par catégorie et indiquer si possible des fournisseurs potentiels. En cas d'absence d'échantillons permettant l'évaluation de ces paramètres, veiller à la diversité de l'échantillonnage réalisé lors de l'étude de la sensibilité et de la spécificité diagnostique (2.7.8).

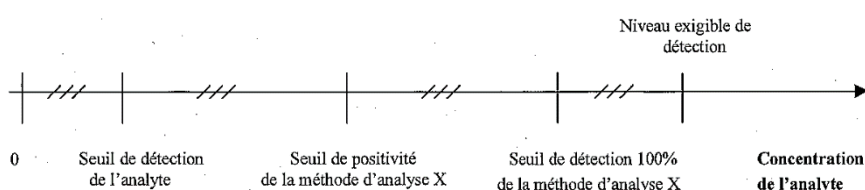
2.7.2 Interférences de la matrice (ou sélectivité selon l'OMSA)

Les interférences de la matrice doivent être étudiées autour du seuil de positivité de la méthode d'analyse (2.7.3) afin de pouvoir estimer leur éventuel impact sur les performances de sensibilité et de spécificité diagnostique (2.7.8).

2.7.3 Limite de détection (ou sensibilité analytique, SeA)

La limite de détection (LD) (ou sensibilité analytique, SeA) correspond à la quantité minimale d'analyte décelable avec un niveau de confiance défini. Pour des techniques qualitatives et semi-quantitatives, elle correspond à la quantité minimale d'analyte donnant 95 % de réponses positives pour des analyses effectuées en condition de répétabilité, avec le réactif considéré.

Différentes limites (ou seuils, selon la norme NF U47-300) peuvent être considérées. Voir la figure suivante extraite la norme NF U47-300 :



En règle générale, la limite de détection est évaluée au niveau du seuil de positivité de la méthode (*cut-off* déterminé par le fabricant). Cette limite de détection doit dans tous les cas être inférieure au NED et le NED doit être positif dans 100% des cas, par conséquent supérieur au seuil de détection à 100% de la méthode d'analyse utilisant le réactif.

Le fait d'avoir un seuil de positivité très inférieur au NED peut parfois poser problème sur le terrain, en induisant des différences importantes de sensibilité analytique (et diagnostique) entre les tests pour un même analyte. Ainsi, en plus d'un NED, il est possible de déterminer un niveau exigible de non-détection afin d'homogénéiser la sensibilité analytique entre les différents réactifs pour un même analyte. Cela limite des écarts trop importants de sensibilité à l'origine de discordances de résultats.

Lorsque le NED est obtenu par dilution d'un MR fourni et dans la mesure du possible, il est conseillé de fournir également le diluant, ce diluant étant une matrice négative, afin d'éviter les effets induits par des conditions physico-chimiques différentes entre matrices. La fourniture de cette matrice est préférable pour limiter les variations apportées par la matrice elle-même.

2.7.4 Cohérence de la loi dose-effet

Cette étude peut être conduite (i) sur une matrice négative additionnée expérimentalement de concentrations décroissantes en analyte ou (ii) à partir de dilutions d'un échantillon fortement positif. L'ensemble de la courbe dose-effet doit être couverte, au-delà de la zone linéaire : au moins 4 niveaux de concentration de l'analyte doivent être utilisés incluant la zone de linéarité et les points d'inflexion, et encadrant le NED.

L'existence d'un éventuel « effet crochet » (hook-effect ou inhibition de la réaction avec de très fortes concentrations d'analyte) doit être vérifiée sur les formats où il est théoriquement possible et décrit.

2.7.5 Répétabilité (intra-essai)

Pour les tests de type ELISA, la norme AFNOR U47-310 demande d'analyser un échantillon au niveau de détectabilité du NED sur 3 plaques entières et un coefficient de variation (CV) calculé sur les valeurs brutes de chaque plaque. Il est toutefois préférable de réaliser le calcul sur les valeurs transformées afin d'être dans les conditions de l'utilisateur final (une différence peut être observée quand, par exemple, la transformation combine ratio de valeurs auxquelles un blanc a été soustrait). La norme AFNOR U47-310 indique à titre d'exemple un CV < 10% comme performance attendue (pour chacune des plaques). Cette limite peut être réduite ou augmentée par le LNR en fonction de son expérience, des résultats déjà obtenus sur des couples (matrice, méthode) analogues, en particulier en fonction du niveau de réactivité du NED.

Pour les autres tests immunologiques (type IDG, FC, IHA ...), la norme AFNOR U47-310 demande l'utilisation d'au moins 3 supports d'essai complets, et nous pouvons recommander un minimum de 30 répétitions au total. Les résultats doivent être comparables entre eux et, le cas échéant, entre les différents supports.

Il est important de préciser sur quel(s) étape(s) du processus analytique portent les répétitions.

2.7.6 Fidélité intermédiaire (ou reproductibilité intralaboratoire)

La fidélité intermédiaire est évaluée à 3 niveaux différents de concentration en analyte, situés dans la zone de linéarité de la méthode d'analyse, dont un au niveau de détectabilité comparable au NED. Les échantillons doivent être testés en triplicat dans 6 séries d'analyses différentes, en faisant varier entre les séries les facteurs les plus susceptibles d'influer la fidélité d'une analyse (erreur aléatoire). Ces essais doivent inclure au moins 2 opérateurs sur plusieurs jours différents. L'écart-type et le CV de fidélité intermédiaire sont calculés pour les méthodes semi-quantitatives sur les données transformées (unités de pourcentage d'inhibition par exemple) en utilisant la méthodologie adéquate de la norme NF ISO 5725-3.

2.7.7 Reproductibilité interlaboratoires

Adapter les recommandations aux différents types de test, notamment en matière de type d'échantillons à sélectionner : par exemple sérum ou lait pour un test ELISA.

La reproductibilité interlaboratoires est évaluée à 3 niveaux différents de concentration en analyte, situés dans la zone de linéarité de la méthode d'analyse, dont un au niveau de détectabilité comparable au NED. Les échantillons doivent être testés, de préférence en triplicat, dans 4 séries d'analyses, et ceci dans 5 laboratoires différents (pouvant inclure celui du producteur) dans le cadre d'un essai interlaboratoires organisé par le producteur.

L'écart-type et le CV de reproductibilité interlaboratoires sont calculés pour les méthodes semi-quantitatives sur les données transformées (unités de pourcentage d'inhibition par exemple) en utilisant la méthodologie adéquate de la norme NF ISO 5725-2.

2.7.8 Sensibilité et spécificité diagnostique (SeD, SpD)

Les résultats doivent être exprimés en pourcentage de (i) positifs trouvés parmi les positifs attendus pour la sensibilité diagnostique et (ii) négatifs trouvés parmi les négatifs attendus pour la spécificité diagnostique, en ajoutant l'intervalle de confiance à 95 % et les nombres testés.

Ces paramètres sont évalués à partir d'un panel représentatif d'échantillons du terrain de statut connu au regard de la cible. Dans le cas général, le statut de ces échantillons doit avoir été préalablement déterminé par une méthode de référence et/ou sur la base de critères justifiés, épidémiologiques ou analytiques. Dans certains cas, il est très compliqué de connaître le véritable statut d'infection, or ce dernier conditionne le dénominateur du calcul de la SeD et de la SpD. En l'absence d'échantillons ou de méthode de référence, la Se et la Sp diagnostiques peuvent être exprimés par rapport à une autre technique de diagnostic direct (Se et Sp relatives). Des approches bayésiennes peuvent aussi être mises en œuvre (Branscum et al, 2005, Lurier et al, 2021).

Être très précis dans les définitions données dans le chapitre 2.3 (définitions spécifiques de la cible). Fixer le nombre, le niveau (faible, fort positif) et la nature des échantillons, en tenant compte des données bibliographiques, de la disponibilité des échantillons et des objectifs fixés (valeurs attendues, intervalles de confiance).

Dans le cas d'études externalisées, préciser, autant que possible, les zones géographiques d'origine des échantillons, les éléments de caractérisation exigés, analytiques et épidémiologiques. Les études externalisées ne sont facilement envisageables que pour les maladies pour lesquelles le statut des échantillons est bien défini.

Lorsque les données le permettent, une évaluation de la robustesse des performances de sensibilité et de spécificité obtenues est très utile pour comprendre l'impact d'une variation de *cut-off* sur les résultats (voir annexe 1).

2.7.9 Robustesse

La température, la durée d'incubation, voire les volumes de pipetage peuvent être considérés comme les principaux points critiques d'une méthode utilisant un réactif ELISA. Peuvent être ajoutés le nombre et l'intensité des lavages, la remise à températures des réactifs du kit, la durée du dépôt des réactifs. Adapter la liste des points critiques à la méthode considérée (durée des incubations par exemple) et tenir compte *a minima* des plages de tolérance indiquées dans la notice d'utilisation du réactif. Au minimum, quand il y a plusieurs étapes, considérer que chaque facteur critique doit être testé en valeur minimale et en valeur maximale (volume de distribution par exemple).

Dans le cadre d'une méthode qualitative, l'étude de la robustesse autour du *cut-off* est la plus importante.

2.7.10 Stabilité

Il s'agit de stabilité du lot de production du réactif dans le temps, et pas la stabilité du niveau de réactivité d'un lot à l'autre. Tout comme pour la robustesse, la stabilité autour du *cut-off* doit être étudiée en priorité.

À l'étude de stabilité du kit non ouvert dans les conditions de conservation préconisées, peut être ajoutée l'étude de la stabilité en condition extrême de transport hivernal ou estival.

2.8 Critères supplémentaires pour les réactifs de diagnostic immunologiques quantitatifs

2.8.1 Limite de détection ou de détectabilité

La limite de détection ou de détectabilité (LD) est la limite en-dessous de laquelle l'analyte est considéré comme non détecté avec une certaine probabilité associée : voir figure en 2.7.3, limite (ou seuil) de détection (sensibilité analytique, SeA). Plusieurs méthodes existent pour calculer la LD : voir Guide de validation des méthodes d'analyses ([ANSES/PG/0069](#)).

2.8.2 Limite de quantification

La limite de quantification (LQ) est la plus faible concentration dans un échantillon qui puisse être quantifiée avec une exactitude acceptable (fidélité et justesse). Elle peut être dérivée de la LD en appliquant un facteur 2 ou 3 : $LQ = 2 \times LD$ ou $LQ = 3 \times LD$.

Il est toutefois préférable d'optimiser l'estimation de la LQ à partir d'une approche fondée sur le profil d'exactitude, de façon à garantir des performances de justesse et de fidélité acceptables, voir Guide de validation des méthodes d'analyses ([ANSES/PG/0069](#)).

2.8.3 Zone de linéarité

Zone pour laquelle on observe une relation linéaire entre les concentrations mesurées et les concentrations théoriques des dilutions d'un échantillon. Les limites de linéarité définissent l'intervalle de concentration en analyte à l'intérieur duquel les mesures peuvent être effectuées avec fiabilité.

La zone de linéarité est déterminée à partir d'un échantillon négatif de la matrice considérée, auquel est ajouté l'analyte à doser à une concentration supérieure à celle attendue pour la limite supérieure de linéarité. Des dilutions (correspondant à 90%, 80%, ..., 10%) dans une matrice négative sont testées en triplicat et les concentrations mesurées sont comparées aux concentrations théoriques sur un graphique et par une régression linéaire, en éliminant les valeurs extrêmes qui diminuent la valeur du coefficient de corrélation.

Il est toutefois préférable d'utiliser une approche globale fondée sur le profil d'exactitude, de façon à garantir des performances de justesse et de fidélité acceptables dans la zone de linéarité, voir Guide de validation des méthodes d'analyses ([ANSES/PG/0069](#)).

2.8.4 Justesse (ou biais)

Se référer au Guide de validation des méthodes d'analyses ([ANSES/PG/0069](#)) qui définit ce paramètre et indique comment le déterminer.

2.9 Caractérisation des réactifs de techniques PCR

Caractérisation de la (RT)PCR pour des techniques qualitative, quantitative ou semi-quantitative/relative à un matériau de référence au seuil d'interprétation (MRSI).

2.9.1 Analyse *in silico* (étude bio-informatique)

Toute information telle que les séquences utilisées (souches / sérotypes, ...) pour la conception du couple « amorces/sondes » peut être demandée au fabricant afin de vérifier la bonne inclusivité théorique du couple « amorces/sondes ». Le LNR peut être amené à préciser les séquences à partir desquelles le fabricant « conçoit » son système « amorces –sonde(s) » ou restreindre le choix de ce dernier à des systèmes déjà publiés et caractérisés, référencés dans le cahier des charges.

2.9.2 Inclusivité - Exclusivité (ou spécificité analytique, SpA, selon l'OMSA)

- **Inclusivité**

Le contrôle d'inclusivité doit, dans la mesure du possible, être réalisé sur des échantillons représentatifs de la diversité de l'analyte à détecter (différents sous-types, génotypes, voire différentes localisations géographiques, types d'environnements ou espèces hôtes...), cette diversité étant définie à partir des données épidémiologiques et de la bibliographie. Spécifier un nombre minimal d'échantillons par catégorie et indiquer si possible des fournisseurs potentiels. Le contrôle d'inclusivité peut être restreint dans le cas où le système « amorces –sonde(s) » est issu d'un système déjà publié et caractérisé, référencé dans le cahier des charges.

En cas d'absence ou de faible disponibilité de ces échantillons, essayer d'y pallier par une plus grande diversité de l'échantillonnage lors de l'étude de sensibilité diagnostique.

- **Exclusivité**

Indiquer au demandeur la nature et le nombre d'échantillons dépourvus de l'analyte cible mais renfermant d'autres agents biologiques susceptibles de provoquer des réactions croisées. Il peut s'agir, par exemple, d'échantillons de terrain et/ou de cultures cellulaires infectés par un agent pathogène de la même famille. Le LNR peut donner des exemples et indiquer des fournisseurs potentiels comme les LDA ou des fournisseurs de souches (centres de ressources biologiques-, tels que <https://www6.inra.fr/cirm/>, <https://www.pasteur.fr/fr/distribution-cip>). Le contrôle d'exclusivité peut être restreint dans le cas où le système « amorces –sonde(s) » est issu d'un système déjà publié et caractérisé, référencé dans le cahier des charges.

En cas d'absence ou de disponibilité limitée de ces échantillons non cibles permettant l'évaluation de l'exclusivité, veiller à la diversité de l'échantillonnage réalisé lors de l'étude de la spécificité diagnostique.

2.9.3 Limite de détection (ou sensibilité analytique, SeA)

La limite de détection de la (RT)-PCR ($LD_{(RT)-PCR}$) doit être déterminée à partir d'un acide nucléique cible. Si ce dernier est produit ou dosé par le producteur de réactif, le LNR peut demander à ce dernier de préciser la méthode utilisée pour la production, le dosage et la quantification de son étalon.

Quand plusieurs cibles sont visées par la méthode (PCR multiplex), préciser pour quelles cibles une LD est demandée, en présence ou non de(s) l'autre(s) cible(s). En général, la LD n'est pas requise pour le témoin « non-cible » (ex : Gapdh) permettant de valider l'efficacité de l'extraction des acides nucléiques dans l'échantillon et le caractère non inhibiteur de l'extrait. Mais les essais doivent inclure ce témoin « non-cible » pour la détermination de chaque LD. La norme NF U47-600-2 préconise la détermination des caractéristiques dans les conditions les plus défavorables (présence des autres cibles en quantité maximale).

2.9.4 Efficacité

L'efficacité d'une réaction PCR est généralement comprise entre 75 et 125 %. Indiquer dans le cahier des charges le niveau d'exigence : par exemple, efficacité comprise entre 90 et 110 % ou supérieure à 85 %.

Le LNR peut préciser le nombre minimal de points de gamme à réaliser (généralement entre 4 et 6 points).

2.9.5 Robustesse de la (RT)PCR

Indiquer les paramètres (volume de la prise d'essai et de mix, température d'hybridation, ...) sur lesquels la robustesse doit être évaluée. Par exemple : demander une variation de la température d'hybridation de +/- 1°C et de la prise d'essai de +/- 10 %. Cette étude peut être réalisée à partir d'un NED ou d'un échantillon à environ 3 x la LD.

2.9.6 Stabilité du réactif

Il s'agit de la stabilité du lot de réactif dans le temps et pas de la stabilité du niveau de réactivité d'un lot à l'autre. A l'étude de stabilité, dans les conditions de conservation préconisées du kit non ouvert, peut être ajoutée la stabilité en condition extrême de transport hivernal ou estival.

2.10 Caractérisation complémentaire des réactifs (RT)PCR pour des techniques quantitatives

2.10.1 Domaine de linéarité

Le domaine testé doit être étendu de manière à contenir la limite de quantification (LQ) minimale supposée et la LQ maximale requise selon les besoins diagnostiques de quantification.

Préciser les besoins de quantification, le nombre de points de gamme minimal à réaliser (généralement entre 4 et 6 niveaux) et le critère d'acceptation du biais : valeur absolue du biais entre les mesures et les valeurs théoriques, par série et par niveau.

Les critères peuvent être exprimés ainsi :

- **Vérification** : coefficient de corrélation $R^2 \geq 0,98$; alignement des points ; efficacité entre 85% à 115% ;
- **Validation** : $|\text{biais}| \leq 0,25 \log_{10}$ pour chaque niveau testé.

Dans le cas des techniques PCR multiplex, spécifier de conduire les essais en présence de l'ensemble des cibles.

2.10.2 Limite de quantification LQ(RT)PCR

S'assurer de la compatibilité de la valeur de la LQ avec les besoins de la méthode.

Le LNR peut demander d'utiliser la LQ comme premier point de la gamme de la PCR et de définir la gamme pour tous les essais suivants à réaliser pour la caractérisation de la (ou les) méthode(s).

2.11 Caractérisation de la méthode complète (préparation de l'échantillon/extraction/PCR) pour des techniques PCR qualitative, quantitative ou semi-quantitative/relative à un MRSI

2.11.1 Limite de détection de la méthode (LD_{METHODE})

Préciser à partir de quel matériel de référence (échantillon biologique dosé, cible biologique dosée) doit être évaluée la LD de la méthode et si le LNR met ce matériel à disposition des fabricants.

En l'absence de précision du LNR, le fabricant doit se référer aux recommandations de la norme NF U47-600-2. Tout comme la LD et la LQ PCR, définir sur quelle cible et dans quelle condition la LD de la méthode doit être réalisée (cas des PCR multiplex : présence de l'ensemble des cibles).

2.11.2 Sensibilité et spécificité diagnostiques (SeD et SpD)

Ces paramètres sont évalués à partir d'un panel représentatif d'échantillons du terrain de statut connu au regard de la cible. Dans le cas général, le statut de ces échantillons doit avoir été préalablement déterminé par une méthode de référence et/ou sur la base de critères justifiés, épidémiologiques ou analytiques. En l'absence d'échantillons ou de méthode de référence, la SeD et la SpD peuvent être exprimées par rapport à une autre technique de diagnostic direct (Se et Sp relatives). Des approches bayésiennes peuvent aussi être mises en œuvre (Branscum, A. J., I. A. Gardner, and W. O. Johnson. 2005).

Dans certains cas, il est très compliqué de connaître le véritable statut positif des échantillons, or celui-ci conditionne le dénominateur du calcul de la SeD. Être très précis dans les définitions données dans le chapitre 2.3 (définitions spécifiques de la cible). Les définitions peuvent être cible-dépendantes selon la valeur des outils dont on dispose. Fixer le nombre, le niveau (faible, fort positif) et la nature des échantillons, en tenant compte des données bibliographiques, de leur disponibilité et des objectifs fixés. Les résultats doivent être présentés en pourcentage de positifs trouvés parmi les positifs attendus pour la sensibilité diagnostique et en pourcentage de négatifs trouvés parmi les négatifs attendus pour la spécificité diagnostique, en ajoutant de préférence les intervalles de confiance et les nombres testés correspondants.

Dans le cas d'études externalisées, préciser, autant que possible, les zones géographiques d'origine des échantillons, les éléments de caractérisation exigés, analytiques et épidémiologiques. Cette manière de procéder n'est facilement envisageable que pour les maladies pour lesquelles le statut des échantillons est bien défini.

2.12 Caractérisation complémentaire d'une méthode PCR quantitative

Limite de quantification de la méthode ($LQ_{\text{méthode}}$), justesse et fidélité par élaboration du profil d'exactitude

Se référer au Guide de validation des méthodes d'analyses ([ANSES/PG/0069](#)) pour la description et la mise en œuvre du profil d'exactitude.

Préciser la limite d'acceptabilité de l'intervalle de tolérance du profil d'exactitude (par exemple : 0,70 $\log_{10}$), voire le nombre minimal d'essais à réaliser (par exemple : minimum 3 ou 5).

2.13 Caractérisation d'une méthode PCR semi-quantitative/relative à un matériau de référence au seuil d'interprétation (MRSI)

Fidélité au seuil d'interprétation de la méthode (ou au MRSI)

Préciser la limite d'acceptabilité de l'incertitude élargie. Par exemple, une incertitude de 2,33 Ct correspond théoriquement à une incertitude de $\pm 0,70 \log_{10}$ copies de génome par ml.

2.14 Synthèse des paramètres de performance et des niveaux d'exigence attendus

Reporter dans le tableau de synthèse les niveaux d'exigence attendus et adaptés à chaque type de méthode, pour les différents paramètres de performance.

✦ À retenir du Chapitre 2 – Rédaction du cahier des charges

- Utiliser la trame de CdC ENNOV (immunologie ou PCR), compléter les zones vertes, écrire « sans objet » ailleurs
- Détailler les référentiels ciblés, les définitions strictes (positif/négatif, infecté/indemne), le contexte et les objectifs
- Demander au fabricant un dossier technique complet comprenant le niveau de performance de chaque paramètre.

3. Contrôles effectués par le LNR

3.1 Vérifications effectuées par le LNR pour le contrôle initial

En complément des données de performance générées par le fabricant, le LNR détermine les vérifications qu'il va effectuer, son référentiel étant le cahier des charges qu'il a établi. Il pourra se référer aussi à la norme NF U 47-310 pour les kits immunologiques et à la norme NF U47-311 pour les kits PCR qui donnent des précisions sur le nombre d'échantillons et d'essais à envisager.

Le LNR ne doit pas refaire toute l'étude de validation demandée au producteur de réactif et il se limite à une vérification des paramètres les plus importants. Concernant la sensibilité et la spécificité diagnostique, effectuer la vérification avec un panel restreint ; ce qui n'équivaut pas à une étude de sensibilité et de spécificité diagnostique qui permettrait d'estimer des pourcentages (5 MR sont préconisés dans la norme NF U47-310 mais il est conseillé d'en tester plus lorsque c'est possible). Il s'agit plutôt d'un panel de vérification de sensibilité ou de spécificité constitué d'échantillons ciblés dont le statut est connu, représentatif de la diversité de ce qui peut être retrouvé sur le terrain et/ou permettant de vérifier les résultats sur des échantillons particuliers (niveaux de réactivité différents, différents sérotypes/génotypes ...). Le panel permet alors de vérifier des paramètres analytiques.

Afin de mettre en évidence des différences entre réactifs (ou entre lots), les panels peuvent comporter des échantillons dont le résultat d'analyse peut dépasser les exigences de performance du cahier des charges, par exemple échantillons en-dessous du NED. Ils ne doivent pas alors entrer dans les critères d'acceptation de conformité du produit.

La liste des kits contrôlés conformes ou leurs certificats de contrôle ([ANSES/FGE/0331](#)) doivent être disponibles sur le site de l'Anses.

3.2 Contrôle de lot par le LNR

En fonction des cas, précisé dans le cahier des charges, un contrôle de certains lots ou un contrôle lot par lot est effectué par le LNR.

Les préconisations reportées en 2.15 pour le contrôle initial sont applicables au contrôle de lot. Les normes NF U47-310 et NF U47-311 renvoient aux modalités définies dans ces mêmes textes pour le contrôle initial de conformité, en ce qui concerne les modes opératoires pour le contrôle de lot. Alléger le contrôle de lot par rapport au contrôle initial.

Le nombre d'échantillons testés étant plus faible, afin de mettre en évidence et/ou se prémunir des effets bords pour les kits immunologiques, les échantillons ainsi que les témoins du kit peuvent être testés en double à des endroits différents de la plaque.

En cas de changement de lot d'un composant critique, les panels peuvent être complétés par des échantillons présents utilisés pour le contrôle initial, afin notamment de vérifier l'inclusivité et la spécificité.

L'utilisation de mêmes MR permet de contrôler l'évolution de la réactivité des lots au cours du temps.

4. ORGANISATION DU CONTROLE DE REACTIFS PAR LES LNR ANSES

4.1 Cadre décisionnel préalable

Tout LNR prévoyant un contrôle initial seul (réactif de catégorie B selon décret 2007-311) ou initial et de lot (réactif de catégorie C selon le même décret) sur un nouveau diptyque (combinaison agent pathogène x type de réactif) doit informer la DGAI (Bureau de la santé animale et Bureau des laboratoires) et attend :

- de préférence son accord explicite,

- ou son accord tacite («sauf avis contraire dans un délai fixé » , 1 mois par exemple).

4.2 Cahier des charges

Le LNR doit rédiger un cahier des charges (CdC) spécifique du dyptique (agent pathogène x type de réactif) selon le CdC-type approprié : immunologie ([ANSES/FGE/0302](#)) ou PCR ([ANSES/FGE/0303](#)) et à l'aide du présent guide, chapitres 1 et 2.

4.3 Appel à manifestation d'intérêt

4.3.1 Intégration du cahier des charges

Le LNR doit inclure chaque CdC spécifique dans un appel à manifestation d'intérêt (AMI) pour éviter toute distorsion de concurrence entre fabricants de réactifs, sauf exception dûment justifiée par le LNR et validée par la DSP.

4.3.2 Validation interne

Le LNR doit faire relire le projet d'AMI par la DSP avant diffusion.

4.3.3 Contenu minimal du courrier d'accompagnement

Le courrier d'accompagnement de l'AMI doit notamment préciser :

- Le planning prévu : (i) date limite de dépôt des dossiers par les demandeurs (producteurs/distributeurs), si ce planning a été défini par le LNR, et (ii) fenêtre prévisionnelle de la réalisation du contrôle (contrôle initial ou contrôle de lot) ;
- Le tarif appliqué, selon le catalogue des prestations Anses si ce contrôle y figure ou, à défaut, sur devis.

Ce courrier peut comporter une des mentions suivantes :

« En l'absence d'évolution particulière de la réglementation ou des méthodes de diagnostic recommandées par le LRUE « x » ou par le manuel OMSA, cette campagne ne sera pas reconduite avant l'année « y ».

Ou « Le LNR reconduira la campagne d'AMI en cas d'évolution particulière de la réglementation ou des méthodes de diagnostic recommandées par le LRUE « x » ou le manuel OMSA. »

4.3.4 Diffusion de l'AMI

L'AMI doit être :

- publié sur la page « contrôle de réactifs » du site web Anses (<https://www.anses.fr/fr/content/outils-diagnostiques-contr%C3%B4le-de-r%C3%A9actifs>). En faire la demande à maj.internet@anses.fr
- transmis au Syndicat de l'industrie du médicament et diagnostic vétérinaires (SIMV) (Marie-Anne Barthélémy, ma.BARTHELEMY@simv.org)

4.4 Conduite du contrôle de réactifs

Une fois le (ou les demandeurs³) de contrôle de réactifs identifié(s) comme suite à l'AMI, mener les actions suivantes :

- demander au fabricant/distributeur de (i) formaliser sa demande, en remplissant la fiche de demande de contrôle ([ANSES/FGE/328](#)) et (ii) fournir son dossier de validation du réactif ;
- effectuer l'instruction du dossier du demandeur : enregistrement, vérification de complétude, analyse des résultats fournis ;
- si le dossier n'est pas complet ou pas conforme aux exigences, demander des compléments au fabricant/distributeur ;
- si les éléments du dossier du demandeur sont conformes aux exigences, mener le contrôle technique initial ou de lot du réactif, selon le CdC spécifique ;
- rédiger le rapport de contrôle initial selon le modèle ([ANSES/FGE/0330](#)) ainsi que l'attestation de conformité selon le modèle ([ANSES/FGE/0332](#)) à envoyer au demandeur.

4.5 Diffusion des résultats de contrôle

Si le contrôle a permis de conclure à une conformité du réactif au CdC spécifique (=réactif « validé »), mettre l'information sur la page « contrôle de réactifs » du site web Anses (cf 4.3.4),

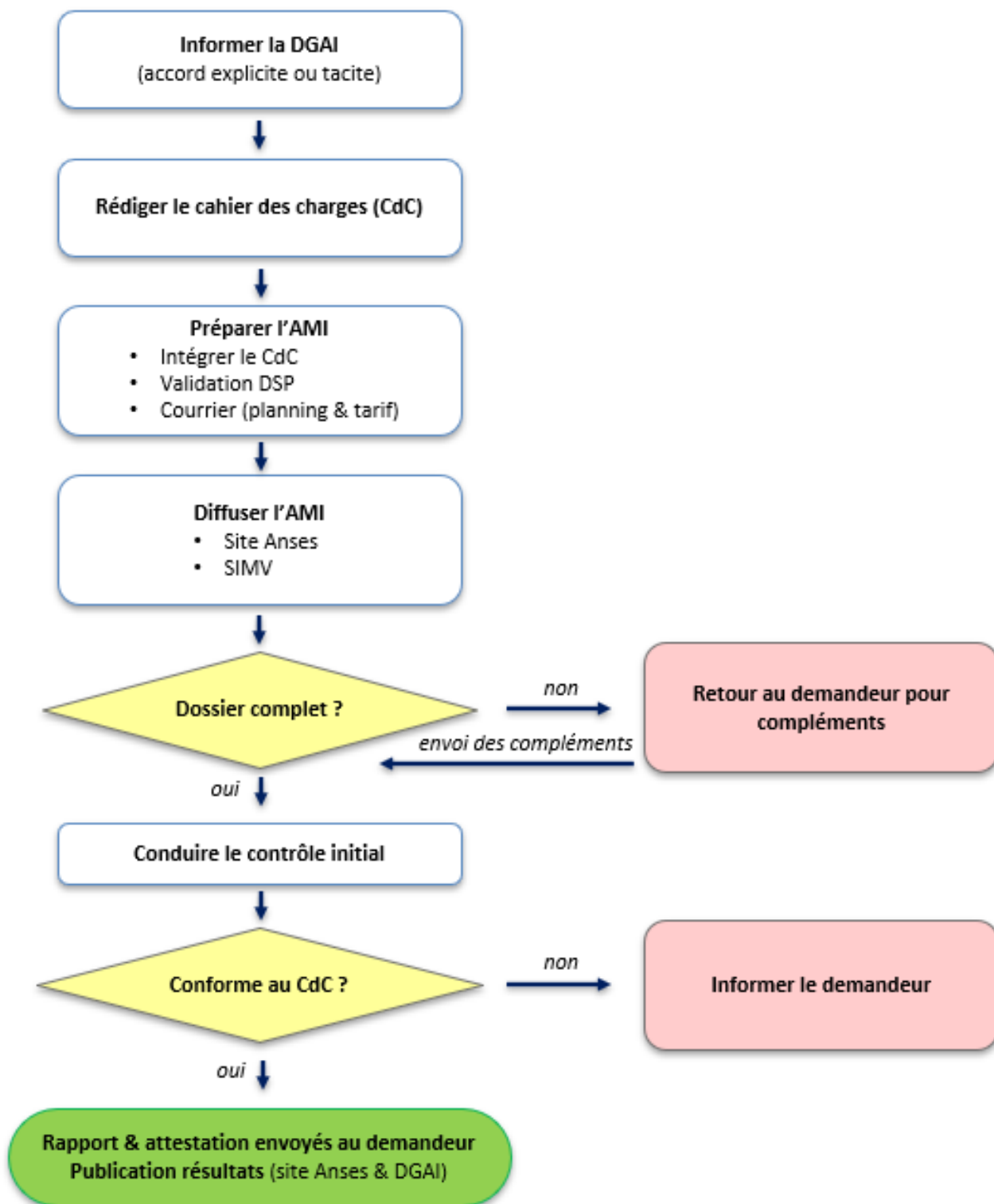
Cette information se fait via la mise en ligne de :

- l'attestation initiale ([ANSES/FGE/331](#)) pour un contrôle initial ;
- la mise à jour du tableau listant les lots conformes pour un contrôle de lot (réactif de catégorie C), cf trame ci-jointe.

Informez le Bureau des laboratoires de la DGAI.

★ **À retenir Chapitre 4 : voir logigramme ci-après**

³ Dans la suite de cet article, le cas d'un demandeur sera indiqué par souci de simplification rédactionnelle mais il s'applique à l'ensemble des demandeurs.

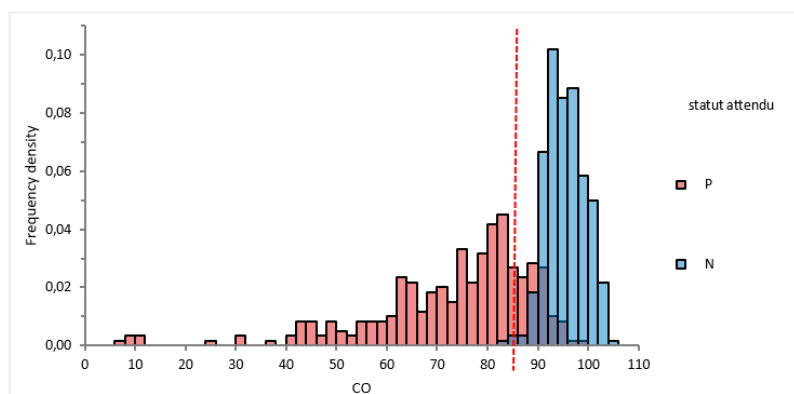


ANNEXE 1 : Étude de l'impact de variations de *cut-off* sur la sensibilité et la spécificité diagnostiques : robustesse des niveaux de performance diagnostique des tests immunologiques

Lorsque les données le permettent (tests semi-quantitatifs), l'évaluation de la robustesse de la sensibilité et de la spécificité permet d'estimer l'impact de toute variation du *cut-off* (CO) sur ces performances obtenues. En effet, les performances sont entièrement dépendantes de la valeur du CO, CO dont le niveau va obligatoirement varier d'un lot à l'autre suivant la calibration du kit, mais aussi d'une série à l'autre : le CO de la série dépend en effet des valeurs de témoins déposés dans un nombre limité de puits. Cette évaluation permet également de mesurer les niveaux de performances aux bornes de la zone douteuse, quand elle existe.

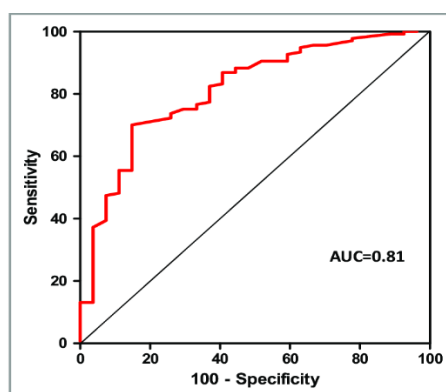
L'analyse, en fonction du CO, des performances de sensibilité et de spécificité diagnostiques peut être facilitée par divers types de représentation :

- Histogramme de l'ensemble des valeurs obtenues par les échantillons avec un statut positif et par les échantillons avec un statut négatif : voir exemple ci-dessous. Une forte discrimination (CO séparant distinctement les 2 populations) entre les répartitions des valeurs obtenues avec les échantillons de statut négatif et ceux de statut positif met en évidence un faible impact des variations liées à la répétabilité et la reproductibilité (inter-essais, inter-laboratoires, inter-lots). Au contraire, une superposition partielle des valeurs met en évidence l'impact potentiel des variations liées à la fabrication et à l'utilisation des kits sur les performances.



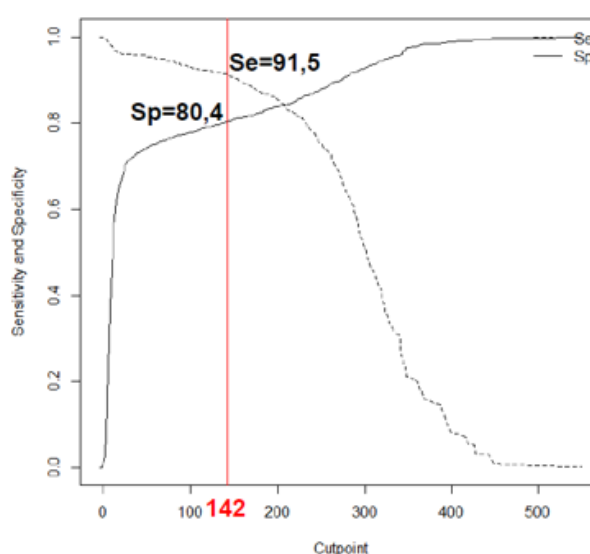
Cette représentation a l'avantage de visualiser facilement la répartition des valeurs des échantillons à statut attendu positif ou négatif, mais ne donne pas les valeurs de sensibilité et de spécificité en fonction du CO.

- Courbe ROC (*Receiver Operating Characteristic*) classique avec en ordonnée la sensibilité et, en abscisse, (1- spécificité), exemple ci-dessous :

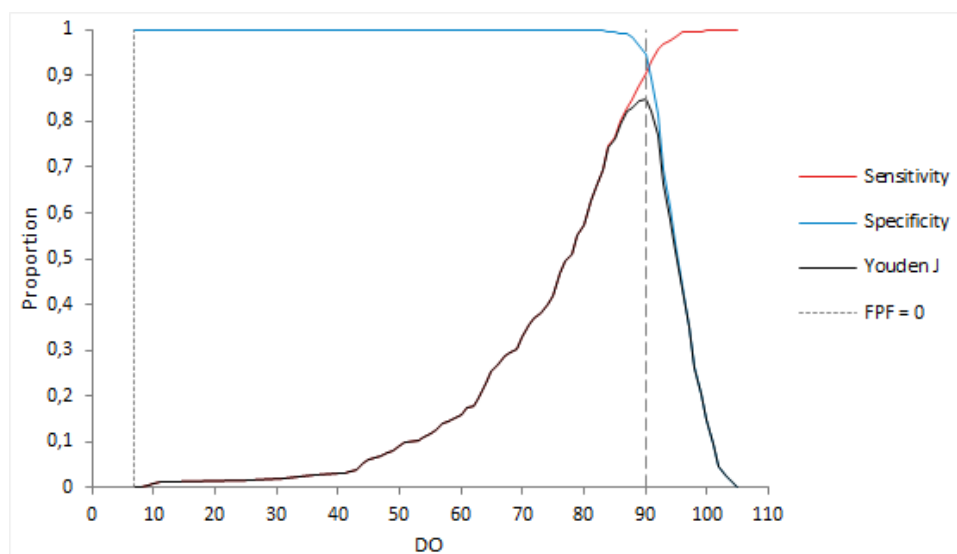


Cette représentation permet de voir les niveaux de sensibilité et de spécificité en fonction du CO, mais il est difficile de déterminer quels CO ont donné les différentes valeurs obtenues et de mesurer l'impact de leur variation. Ce type de représentation présente plutôt un intérêt lors de comparaisons entre différentes méthodes, la méthode ayant une aire sous la courbe (AUC) plus importante étant celle susceptible de donner les meilleures performances.

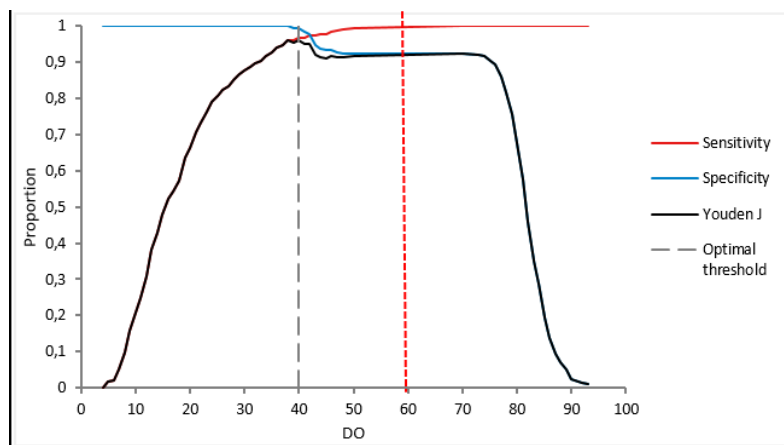
- Graphe double entrée, avec en abscisse les valeurs du CO et en ordonnée la sensibilité et la spécificité : voir exemple ci-dessous. Cette représentation est beaucoup plus informative que la courbe ROC car elle permet de visualiser l'impact d'une modification de CO sur les performances du réactif. Plus les courbes de sensibilité et de spécificité sont aplaties autour du CO, moins le kit est sensible à des variations liées aux lots ou à la mise en œuvre des réactifs. On peut par exemple faire varier le CO de ± 2 écart-types, écart-types déterminés lors de l'étude de reproductibilité.



Dans l'exemple ci-dessous, même si les performances au niveau du CO sont acceptables, la moindre variation de CO se traduit par un effondrement des performances de sensibilité ou de spécificité.



Au contraire, dans l'exemple suivant, avec un CO à 60, le kit n'est absolument pas sensible aux variations.



Prendre en compte cette robustesse dans le choix du CO. Il est souvent préférable d'avoir des performances moindres mais reproductibles plutôt que des performances *a priori* meilleures mais très variables d'une manipulation à l'autre, ou d'un lot à l'autre.

Bibliographie

Branscum, A. J., I. A. Gardner, and W. O. Johnson. 2005. "Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling." *Prev Vet Med* 68 (2-4) : 145-63. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.12.005>.)

Lurier T, Rousset E, Gasqui P, Sala C, Claustre C, Abrial D, Dufour P, de Crémoux R, Gache K, Delignette-Muller ML, Ayral F, Jourdain E. Evaluation using latent class models of the diagnostic performances of three ELISA tests commercialized for the serological diagnosis of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants. *Vet Res.* 2021 Apr 14;52(1):56. doi: 10.1186/s13567-021-00926-w. PMID: 33853678; PMCID: PMC8048088.