

CAHIER DES CHARGES



Laboratoire de Niort

Laboratoire Expert

pour la Diarrhée Virale Bovine

Objet	VALIDATION DE RÉACTIFS
Pathologie	Pestivirus bovins
Technique	RT-PCR temps réel qualitative
Matrice	Biopsie auriculaire

Version	02
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

- Mise à jour des critères d'inclusivité correspondant à l'annexe 1.
- Corrections de forme de la version précédente.

Commentaire

Cette version annule et remplace la version du 18/12/2015.

Sommaire

Sommaire.....	2
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 des réactifs examinés	4
6.1 Critères de performance pour les techniques de RT-PCR qualitatives en temps réel	5
6.1.1 Caractérisation de la RT-PCR	5
6.1.2 Caractérisation de la Méthode (extraction et RT-PCR)	6
6.2 Contrôle méthode dérivée d'un réactif RT-PCR	6
7. Annexes	6
Annexe 1 : Critères de conformité des kits de diagnostic PCR – Pestivirus Bovins – Matrice biopsie auriculaire	7

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 PCR pour la détection des pestivirus bovins dans la matrice biopsie auriculaire individuelle et mélange de dix biopsies auriculaires individuelles. 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 PCR ayant une attestation initiale de conformité (Annexe C de la norme XP U47-311).

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 une méthode de RT-PCR 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 U47-311 (annexe B) pour les réactifs RT-PCR.
- Un dossier technique de caractérisation de la méthode comme décrit dans la norme U47-311 pour les réactifs PCR.

4. Définitions

- **RT (transcription inverse) :**

Processus de synthèse de l'ADN à partir d'une matrice d'ARN utilisant l'activité enzymatique d'une transcriptase inverse associée à une amorce de RT dans des conditions appropriées.

- **La Limite de Détection de PCR (LD_{PCR}) (NF U47-600-1/2)**

Le plus petit nombre de copies d'acide nucléique cible par unité de volume qui peut être détecté dans 95% des cas.

- **La Limite de Détection de la méthode d'analyse (LD_{méthode}) (NF U47-600-1/2)**

Plus petite quantité ou teneur de l'analyte par quantité définie de matrice pouvant être détectée de façon répétable dans les conditions expérimentales décrites par la méthode ; elle est établie en prenant en compte toutes les étapes de la méthode d'analyse.

- **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 de dilution 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 $\leq -65^{\circ}\text{C}$.

- **Matériau pour la détermination de LD_{RT-PCR}**

Lorsqu'il sera disponible, le LE-BVD fournira aux producteurs de réactifs un matériau de référence dosé correspondant à la séquence du génome la plus conservée (5'UTR).

- **Matériau pour la détermination de LD_{METHODE}**

Un matériau de référence positif, permettant aux producteurs de réactifs d'atteindre le NED pour la technique PCR, est disponible auprès du LE-BVD.

- **Biopsies négatives pour la dilution du NED**

Neuf matériaux de référence négatifs permettant de réaliser la dilution du NED pour la technique PCR sont disponibles auprès du LE-BVD.

6. Critères de performance des réactifs examinés

La définition des critères de performance est basée sur les normes en vigueur concernant le contrôle des réactifs PCR (U47-600 et U47-311), 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.

6.1 Critères de performance pour les techniques de RT-PCR qualitatives en temps réel

Ce cahier des charges s'applique aux producteurs de réactifs désirant valider une méthode complète associant une méthode de RT-PCR et une ou plusieurs méthodes d'extraction/purification des ARN. Les méthodes complètes de RT-PCR seront validées pour des analyses individuelles et/ou en mélange d'un maximum de 10 biopsies auriculaires.

6.1.1 Caractérisation de la RT-PCR

Celle-ci comprendra l'analyse de la spécificité analytique en termes d'inclusivité et d'exclusivité et la sensibilité analytique avec la détermination de la LD_{RT-PCR} .

• Spécificité analytique de la RT-PCR

Le producteur de réactifs devra présenter une évaluation expérimentale, comme décrit ci-après :

- Exclusivité : la PCR devra être au minimum testée sur les virus présents en France (ex : FCO, BoHV1, BoHV4, Schmallenberg...). En fonction des situations épidémiologiques rencontrées, cette liste devra être adaptée.
- Inclusivité : la PCR devra être testée au minimum sur les génotypes BVDV-1 dont a minima les sous types b, d, e, l, k, BVDV- 2, et BDV avec au moins une souche des génotypes présents en France.

• Sensibilité analytique de la RT-PCR (LD_{RT-PCR})

Le producteur de réactifs apportera les éléments de la détermination de la LD_{RT-PCR} à l'aide d'un ARN dosé fourni par le LE-BVD si disponible ou d'un ARN dosé du producteur de réactif.

• Efficacité de la RT-PCR

La méthode de détection du virus de la BVD par RT-PCR n'est pas quantitative, il est cependant requis d'apporter les éléments décrivant l'efficacité de celle-ci, à partir de dilutions sérielles d'un ARN dosé ou d'un ARN issu d'une souche titrée en DICT50/mL.

• Répétabilité de la RT-PCR

Le producteur de réactifs devra démontrer une répétabilité avec un CV maximum inférieur à 5%. Pour ce faire, à minima, trois essais sur 3 niveaux de charge virale (forte, moyenne, faible) en triplicata devront être réalisés à partir d'un ARN dosé ou d'un ARN issu d'une souche titrée en DICT50/mL.

• Fidélité intermédiaire

Le producteur de réactifs devra démontrer une fidélité intermédiaire avec un CV maximum inférieur à 5 %. Pour ce faire, à minima, trois essais sur 3 niveaux charge virale (forte, moyenne, faible) en triplicata devront être réalisés à partir d'un ARN dosé ou d'un ARN issu d'une souche titrée en DICT50/mL, en faisant varier le maximum de paramètres (matériel et opérateurs).

• Reproductibilité inter-laboratoire

Le producteur de réactifs devra démontrer une reproductibilité inter-laboratoire avec un CV maximum inférieur à 10%. Pour ce faire, l'essai devra être réalisé en aveugle dans au moins 4 laboratoires différents accrédités en PCR et dans le LE-BVD. Pour ce faire, à minima, trois essais sur 3 niveaux de Ct différents (fort, moyen, faible) en triplicata devront être réalisés à partir d'un ARN dosé ou d'un ARN issu d'une souche titrée en DICT50/mL. 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 de la RT-PCR

Elle devra être évaluée sur les paramètres les plus critiques pour une réaction de RT-PCR, sur les différentes cibles (gène d'intérêt et gène de contrôle interne). La LD_{RT-PCR} définie par le producteur de réactifs doit toujours être la même quelques soient les conditions expérimentales (au moins testées en triplicata). Elle sera réalisée avec l'échantillon ayant servi à la détermination de la LD_{RT-PCR} (ARN dosé).

Pour exemple :

- Température d'hybridation +/- 1°C
- Temps d'hybridation +/- 10%
- Volume d'ARN +/- 10%

- **Stabilité de la RT-PCR**

Les données sont à fournir et la méthode d'évaluation à justifier (ex : vérification au 2/3 de vie du réactif et à la date de péremption du kit). La LD_{RT-PCR} doit toujours être retrouvée positive 10 fois sur 10.

6.1.2 Caractérisation de la Méthode (extraction et RT-PCR)

Pour rappel, le producteur de réactifs devra réaliser la caractérisation de la méthode complète.

- **Sensibilité et spécificité diagnostiques**

Elles devront être réalisées à l'aide d'un panel d'échantillons de bovins infectés permanents immunotolérants vis-à-vis du BVDV (IPI) et de bovins indemnes de pestivirus (négatifs) issus de cheptels européens (à préciser par le producteur de réactifs). Afin de vérifier au minimum une spécificité de 99% et une sensibilité 99% avec un niveau de confiance de 95%, un échantillonnage de 70 biopsies positives et négatives dont 30 positives et 30 négatives fournis par le LE-BVD est nécessaire. Le producteur de réactifs devra apporter les éléments de caractérisation de tous les échantillons testés.

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.

- **Niveau Exigé de Détection**

Un matériau de référence est disponible pour vérifier le NED. Il devra être toujours trouvé positif 10 fois sur 10, dans les conditions suivantes :

- NED pur pour les réactifs proposant une analyse individuelle,
- NED au 1 /10 pour les réactifs proposant une analyse de mélange de 10. La dilution sera réalisée dans un lysat de biopsies négatives.

6.2 Contrôle méthode dérivée d'un réactif RT-PCR

Un producteur de réactifs voulant modifier une méthode complète ayant déjà une attestation initiale de conformité de réactifs du couple extraction/RT-PCR, pourra présenter un dossier administratif et technique pour un protocole dérivé.

7. Annexes

Annexe 1 : Critères de conformité des kits de diagnostic PCR

Annexe 1 : Critères de conformité des kits de diagnostic PCR – Pestivirus Bovins – Matrice biopsie auriculaire

<i>Critères de performance</i>	<i>Echantillons</i>	<i>Nombre d'échantillon</i>	<i>Nombre d'essai</i>	<i>Protocole</i>	<i>Critères de conformité</i>	
SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE	Exclusivité	Virus testés à minima : FCO, BoHV1, BoHV4, Schmallenberg,...	1	Selon spécifications du producteur de réactifs	100 % Négatif	
	Inclusivité	1 souche de chaque géotype présent en France (BVDV-1,-2) et BDV	1		100 % Positif	
EFFICACITÉ	ARN Dosé ou ARN issu souche titrée DICT 50/ml	1	1		Fournir le R ² et % efficacité	
SENSIBILITÉ DIAGNOSTIQUE	Collection Référence Positive LE-BVD et européen	minimum 70 dont 30 de la collection du LE-BVD	1		99 % [95%]	
SPÉCIFICITÉ DIAGNOSTIQUE	Collection Référence Négative LE-BVD et européen	minimum 70 dont 30 de la collection du LE-BVD	1		99 % [95%]	
NIVEAU EXIGÉ DE DETECTION	NED pur et NED dilué au 1/10	2 positifs + 9 négatifs	1 essai en pur 1 essai dilué au 1/10		100 % Positif	
RÉPÉTABILITÉ	ARN Dosé ou ARN issu souche titrée DICT 50/ml	3 niveaux Ct différents (fort, moyen, faible)	3 essais		CV < 5 %	
FIDÉLITÉ INTERMÉDIAIRE	ARN Dosé ou ARN issu souche titrée DICT 50/ml	3 niveaux Ct différents (fort, moyen, faible)	3 essais		Faire varier les facteurs pouvant influencer sur la fidélité (matériel, opérateurs) CV < 10 %	
REPRODUCTIBILITÉ INTER LABORATOIRE	ARN Dosé ou ARN issu souche titrée DICT 50/ml	3 niveaux Ct différents (fort, moyen, faible)	3 essais par laboratoire en triplicat /5 laboratoires dont le LE-BVD		Dans les conditions opératoires des différents laboratoires	CV < 15%
ROBUSTESSE et STABILITÉ	Vérification paramètres critiques (ex: température d'hybridation +/- 1°C ; temps d'hybridation +/- 10% ; volume d'ARN +/- 10%) Vérification au 2/3 de la vie du réactif et à la date de péremption				Fournir les données	