

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	Sérum

Version	02
Date d'application	13/06/2018

Validation

<i>Nom/Prénom</i>	<i>Fonction</i>	<i>Date</i>	<i>Signature</i>
KOUOKAM Guy	Responsable thématique	13/06/2018	
TEILLET Aurore	Responsable technique	13/06/2018	

Diffusion

A l'attention des producteurs de réactifs

Suivi des modifications

- Modification du nombre d'échantillons à tester
- Modification du diluant à utiliser pour la dilution du NED en mélange de 20
- Modification du mode de diffusion du cahier des charges

Commentaire

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	4
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 – <u>Pestivirus Bovins</u> – 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 sérum individuel pour les animaux de tous âges, et en mélange de 20 sérums individuels pour les animaux de plus de trois mois. 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 réactifs.

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 sérum devra fournir :

- Un dossier administratif a 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 sérum 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.

- **Sérums Négatifs**

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 volume de quelques microlitres conservé à une température $\leq 18^{\circ}\text{C}$.

- **Sérums Positifs**

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 volume de quelques microlitres conservé à une température $\leq 18^{\circ}\text{C}$.

- **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.

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 de sérum individuels pour les animaux de moins de 3 mois et en mélange de maximum 20 sérums pour les animaux de plus de 3 mois

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 géotypes BVDV-1 dont a minima les sous types b, d, e, l, k, BVDV- 2, et BDV avec au moins une souche des géotypes présents en France.

• **Limite de détection 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 réactifs.

• **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, a 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 10 %. Pour ce faire, a 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, 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 15%. 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, a 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 sérums positifs et de 70 sérums négatifs dont 20 sérums issus de bovins âgés de moins de 3 mois dans chacun des groupes devra être testé. 10 sérums positifs et 10 sérums négatifs de cet échantillonnage devront également être testés en mélange de 20. En plus de ces échantillons, le producteur de réactifs devra tester également 30 sérums positifs et 30 sérums négatifs fournis par le LE-BVD. Le producteur de réactifs devra apporter les éléments de caractérisation de tous les échantillons testés.

Le producteur de réactifs devra apporter la preuve que les échantillons qu'il utilise pour la validation de la méthode sont bien des échantillons d'animaux IPI âgés de moins de 3 mois pour les échantillons testés en individuel ou âgés de plus de 3 mois pour les échantillons testés en mélange de 20. Le statut sérologique p80, le statut obtenu avec un autre kit (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 l'une ou les deux conditions suivantes :

- NED pur pour les réactifs proposant une analyse individuelle pour les animaux de tout âge,
- NED au 1 /20 pour les réactifs proposant une analyse de mélange de 20 sérums pour les animaux de + 3 mois. Le Ned sera dilué dans un sérum négatif fourni par le LE-BVD.

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 sérum

Critères de performance	Echantillons	Nombre d'échantillons	Nombre d'essais	Protocole	Critères de conformité
SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE	Exclusivité	Virus testés a minima : FCO, BoHV1, BoHV4, Schmollenberg,...	1	Selon spécifications du producteur de réactifs	100 % Négatif
	Inclusivité	1 souche de chaque génotype 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 100 bovins dont : - au moins 20 âgés de moins de 3 mois - 30 de la collection du LE-BVD - 10 sérums à tester en mélange de 20	1		99 % [95%]
	Collection Référence Négative LE-BVD et européen	Minimum 100 bovins dont : - au moins 20 âgés de moins de 3 mois - 30 de la collection du LE-BVD - 10 sérums à tester en mélange de 20	1		99 % [95%]
NIVEAU EXIGÉ DE DETECTION	NED pur et NED dilué au 1/20 ^{ème}	2 positifs	10 essais en pur 10 essais pour la dilution 1/20 ^{ème}		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 INTERLABORATOIRE	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