

# CAHIER DES CHARGES POUR LA PRÉSENTATION D'UN RÉACTIF PCR TEMPS RÉEL AU CONTRÔLE INITIAL DE CONFORMITÉ

<b>Laboratoire</b>	<b>UPBER – Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort</b>
<b>Contact</b>	<b>Guy KOUOKAM</b> tel: 05 49 79 96 46 e-mail: <a href="mailto:guy.kouokam.reseaugds@anses.fr">guy.kouokam.reseaugds@anses.fr</a>

<b>Mandat de référence</b>	<b>Laboratoire National de Référence pour la Diarrhée Virale Bovine</b>
----------------------------	---

<b>Objet</b>	<b>VALIDATION DE RÉACTIFS</b>
<b>Cible</b>	<b>Génome du virus de la BVD</b>
<b>Méthode</b>	<b>RT-PCR qualitative en temps réel</b>
<b>Matrice</b>	<b>Mélange de 25 biopsies auriculaires sèches</b>

<b>Version</b>	<b>01</b>
<b>Date d'application</b>	<b>15/02/2022</b>

<i>Validation</i>			
<i>Nom/Prénom</i>	<i>Fonction</i>	<i>Date</i>	<i>Signature</i>
<b>KOUOKAM Guy</b>	<b>Responsable technique</b>	<b>15/02/2023</b>	

## Table des matières

<b>1. Introduction</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Référentiels et matériaux de référence</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Définitions</b> .....	<b>3</b>
<b>4. Contexte et objectifs d'application du kit</b> .....	<b>4</b>
<b>5. Réactif (ou trousse) et lot soumis au contrôle</b> .....	<b>4</b>
5-1 Description du réactif .....	4
5.2 Matériel à fournir par le demandeur pour le contrôle de conformité .....	4
5-3 Contrôle qualité .....	4
<b>6. Dossier technique à présenter par le demandeur</b> .....	<b>6</b>
6.1 Caractérisation de la RT-PCR .....	6
6.1.1 Caractérisation de la RT-PCR : analyse <i>in silico</i> (étude bio-informatique) .....	6
6.1.2 Inclusivité /exclusivité .....	6
6.1.3 Limite de détection de la RT-PCR ( $LD_{RT-PCR}$ ) .....	6
6.1.4 Efficacité de la RT-PCR .....	8
6.1.5 Robustesse de la RT-PCR .....	8
6.1.6 Stabilité du réactif .....	8
6.3 Caractérisation de la méthode complète (préparation échantillon/extraction/(RT-PCR) .....	9
6.3.1 Caractérisation de la méthode .....	9
6.3.1.1 Limite de détection de la méthode ( $LD_{méthode}$ ) .....	9
6.3.1.2 Sensibilité analytique .....	9
6.3.1.3 Sensibilité et spécificité diagnostiques ( $SeD$ et $SpD$ ) .....	9
6.3.1.3 Robustesse de la méthode .....	10
6.4 Synthèse des paramètres de performance et des niveaux d'exigence attendus .....	10

## 1. Introduction

Ce cahier des charges précise aux demandeurs (producteurs et distributeurs de réactifs), les conditions générales nécessaires à la présentation d'un réactif PCR en temps réel (Reverse Transcription-PCR) au contrôle initial de conformité du LNR, en vue de l'obtention d'une attestation initiale de conformité prévue à l'article R. 202-37 du Code rural et de la pêche maritime.

Il vise aussi à décrire le format et le contenu du dossier technique qui devra être présenté par le demandeur, en définissant pour chacun des paramètres spécifiés par le LNR, le niveau de performance attendu et les moyens à mettre en œuvre pour l'évaluer. Il décrit également les caractéristiques vérifiées par l'organisme de contrôle, les modalités de ce contrôle et les valeurs attendues. Les résultats de performance attendus sont notamment basés sur les capacités techniques et sur les besoins en fonction des objectifs d'application. L'ensemble des données fournies au LNR par le demandeur sont et demeurent confidentielles.

## 2. Référentiels et matériaux de référence

- Norme AFNOR NF U 47-600-1, Méthodes d'analyses en santé animale – PCR (réaction de polymérisation en chaîne) – Partie 1 : Exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR de la PCR en santé animale.
- Norme AFNOR NF U 47-600-2, Méthodes d'analyses en santé animale – PCR (réaction de polymérisation en chaîne) – Partie 2 : Exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale.
- Norme AFNOR NF U 47-301, Méthodes d'analyse en santé animale – Dossier de présentation pour le contrôle des réactifs biologiques
- Norme AFNOR NF U 47-311, Méthodes d'analyse en santé animale – Contrôle de réactifs PCR (réaction de polymérisation en chaîne) utilisés dans le domaine de la santé animale
- Vadémécum des contrôles de réactifs à l'Anses (adresse page internet)
- Matériaux de référence BVD : biopsie auriculaire sèche NED, biopsie auriculaire sèche négative, biopsie auriculaire sèche positive.

## 3. 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.

- **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<sub>PCR</sub>)** (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<sub>méthode</sub>)** (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, dont l'extraction des acides nucléiques.

- **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%.

## 4. Contexte et objectifs d'application du kit

Ce cahier des charges complémentaire au cahier des charges de validation des kits de RT-PCR en temps réel qualitative pour détection de pestivirus de bovins sur matrice biopsie auriculaire individuelle et mélanges de 10 biopsies auriculaires (version 02 du 26/01/2017) liste les critères évalués par le LNR-BVD pour la validation des kits RT-PCR en temps réel destinés au diagnostic virologique de la BVD sur mélanges de 25 biopsies auriculaires.

## 5. Réactif (ou trousse) et lot soumis au contrôle

### 5-1 Description du réactif

Le demandeur fournit un descriptif précis de son réactif : nom commercial, dénomination et code produit, conditionnement(s), lieu(x) de fabrication, de contrôle et de conditionnement du produit fini, principe analytique, composition et conditions d'emploi (protocoles d'utilisation et numéro de version, types de prélèvements, domaine(s) d'utilisation, précautions d'emploi...).

La description précise de la méthode (référence(s) bibliographiques le cas échéant) et des matières premières critiques pour les performances (composants biologiques utilisés, procédés de fabrication...) est communiquée, à l'exception des données touchant au secret industriel. Le LNR est tenu de garder confidentielles les informations contenues dans le dossier.

Les modalités de conservation et la durée de validité sont précisées ainsi que toutes les informations relatives aux essais ayant permis de les établir (modalités et résultats des tests de vieillissement en particulier).

Le lot soumis au contrôle doit être un lot fabriqué, et conditionné dans la forme finale de commercialisation et identifié par un numéro unique (critères de définitions d'un lot à préciser, étant entendu que pour un numéro de lot donné correspondent des numéros de lots identiques des constituants du réactif dans leur forme finale). Le numéro, la taille du lot, la durée de validité ainsi que le numéro de lot des différents constituants du réactif sont décrits.

Le demandeur joint en annexe au dossier technique :

- Pour chacun des principes actifs (composants biologiques) et chacune des matières premières (composants chimiques), la description, le nom et les coordonnées du fabricant, le procédé de fabrication<sup>1</sup>, le mode de conditionnement (nature du récipient, mode de fermeture, volume), les modalités de conservation et la fiche de sécurité,
- Le projet de notice ***a minima* en français**, rédigé selon les recommandations figurant dans l'annexe B de la Norme NF U47 – 311,
- Les modèles d'étiquettes du réactif ou de chacun des composants (*a minima* en français),
- La procédure de contrôle qualité et les certificats correspondants au lot soumis au contrôle.
- Les modalités d'interprétation des résultats d'analyses (seuils de détection, inhibition, ...) doivent être décrites pour tous les types d'échantillons / témoins possibles.

*A l'exception du projet de notice et des modèles d'étiquette, ces éléments ne sont pas demandés pour les fabricants de réactifs pour lesquels le couple de méthodes extraction/RT-PCR proposé à la validation a déjà été contrôlé conforme par le LNR-BVD sur matrice biopsie auriculaire sèche (individuelle et mélange de 10) ou matrice sérum (individuel et mélange de 25), et dont la formulation du kit n'a pas changé depuis la date du contrôle*

### 5.2 Matériel à fournir par le demandeur pour le contrôle de conformité

Le demandeur mettra gratuitement à disposition la quantité de réactif nécessaire pour réaliser le contrôle initial et vérifier d'autres paramètres que le LNR jugera nécessaire de vérifier (exemple : limite de détection de la PCR, de la méthode, test de répétabilité et reproductibilité intra-laboratoire, tests de sensibilité, spécificité diagnostiques complémentaires, etc.).

### 5-3 Contrôle qualité

Le fournisseur devra présenter les procédures de contrôle qualité réalisées et les critères d'acceptation pour la libération de lot.

*Ces éléments ne sont pas demandés pour les fabricants de réactifs pour lesquels le couple de méthodes extraction/RT-PCR proposé à la validation a déjà été contrôlé conforme par le LNR-BVD sur matrice biopsie auriculaire sèche (individuelle et mélange de 10) ou matrice sérum (individuel et mélange de 25), et dont la*

---

<sup>1</sup> à l'exception des données touchant au secret industriel

*formulation du kit n'a pas changé depuis la date du contrôle et à la condition que les procédures et critères de contrôle qualité soient les mêmes"*

## 6. Dossier technique à présenter par le demandeur

**Avertissement important** : La liste et les définitions des paramètres sont fondées sur la Norme NF U47-311 et NF U47-600-1. Les données doivent être présentées dans le dossier technique selon les exigences définies par le LNR dans ce cahier des charges. Le demandeur doit en particulier indiquer pour chacun des paramètres, les différents types d'échantillons (de référence, de contrôles, de terrain) utilisés en précisant leur mode de sélection et de caractérisation (provenance, statut, ...). Il doit également préciser les méthodologies de vérification (protocoles ...) mises en œuvre et inclure les données brutes relatives aux résultats obtenus. L'évaluation des performances doit être réalisée pour chacune des matrices définies par le LNR pour laquelle le test s'applique et pour chacun des protocoles techniques différents proposés dans la notice.

**Externalisation** : Toutes ou parties des études permettant de caractériser les réactifs peuvent être réalisées dans un ou plusieurs laboratoires prestataires externes. Ces essais, notamment quand ils sont exigés par le LNR, doivent avoir été mis en œuvre par des laboratoires prestataires indépendants du fabricant et, dans la mesure du possible, agréés voire accrédités pour la mise en œuvre de la technique de diagnostic considérée. L'intégralité des résultats bruts et, le cas échéant, transformés, validés par le responsable du laboratoire prestataire concerné, doit être communiquée au LNR.

### 6.1 Caractérisation de la RT-PCR

Le demandeur doit présenter les moyens mis en œuvre pour déterminer les valeurs des paramètres évalués et les résultats obtenus, comme décrit ci-après.

#### 6.1.1 Caractérisation de la RT-PCR : analyse *in silico* (étude bio-informatique)

- **Choix du « design » amorces/sonde(s)**

Le demandeur doit fournir des informations sur la localisation du design « amorces et sondes » (gène ciblé et position sur le gène) et assurer une vérification *in silico* de ses designs, notamment lorsqu'il a été alerté par le LNR de l'apparition de nouvelles souches ou de nouveaux variants.

- **Spécificité du « design »**

La spécificité *in silico* du système PCR en temps réel peut être évaluée en alignant la séquence nucléotidique ciblée (incluant la séquence ciblée par les amorces et sondes) avec les séquences disponibles dans les bases de données de séquences (ex NCBI (National Center of Biotechnology Information)). Cette étape ne peut se substituer à une évaluation expérimentale de la spécificité.

*Ces éléments ne sont pas demandés pour les fabricants de réactifs pour lesquels le couple de méthodes extraction/RT-PCR proposé à la validation a déjà été contrôlé conforme par le LNR-BVD sur matrice biopsie auriculaire sèche (individuelle et mélange de 10) ou matrice sérum (individuel et mélange de 25), et dont la formulation du kit n'a pas changé depuis la date du contrôle.*

#### 6.1.2 Inclusivité /exclusivité

L'inclusivité est la capacité à détecter l'analyte cible y compris les différents sous-types ou autres variants pertinents compte tenu des objectifs d'utilisation du réactif. La RT-PCR doit être testée sur un nombre pertinent de variants de l'organisme cible.

L'exclusivité est la capacité d'un réactif à ne pas détecter d'autres analytes que la cible, pouvant potentiellement provoquer des réactions croisées, notamment ceux liés à des virus circulant dans les élevages français. Les Virus testés à minima sont FCO, BoHV1, BoHV4, Schmallenberg.

La RT-PCR doit être testée sur des suspensions (ou autres) de concentration forte de virus BVDV-1,-2) et BDV.

*Ces éléments ne sont pas demandés pour les fabricants de réactifs pour lesquels le couple de méthodes extraction/RT-PCR proposé à la validation a déjà été contrôlé conforme par le LNR-BVD sur matrice biopsie auriculaire sèche (individuelle et mélange de 10) ou matrice sérum (individuel et mélange de 25), et dont la formulation du kit n'a pas changé depuis la date du contrôle.*

#### 6.1.3 Limite de détection de la RT-PCR ( $LD_{RT-PCR}$ )

La limite de détection de la RT-PCR ( $LD_{RT-PCR_{95\%}}$ ) est le plus petit nombre de copies d'acide nucléique cible par unité de volume qui peut être détecté dans 95% des cas.

La  $LD_{RT-PCR}$  doit être déterminée à partir d'un ARN dosé en conditions de répétabilité intra série (répliques) et inter série (séries indépendantes).

*Ces éléments ne sont pas demandés pour les fabricants de réactifs pour lesquels le couple de méthodes extraction/RT-PCR proposé à la validation a déjà été contrôlé conforme par le LNR-BVD sur matrice biopsie auriculaire sèche (individuelle et mélange de 10) ou matrice sérum (individuel et mélange de 25), et dont la formulation du kit n'a pas changé depuis la date du contrôle.*

#### 6.1.4 Efficacité de la RT-PCR

L'efficacité évalue le rendement de la réaction de PCR en temps réel. Elle est calculée dans le domaine de linéarité. La linéarité d'un test est sa capacité à générer des résultats proportionnels à la concentration de cibles présentes dans une gamme donnée et modélisable par une fonction linéaire : chaque cycle équivaut théoriquement à une multiplication par 2, l'efficacité est de 100% lorsque la pente est -3,3.

L'efficacité de la RT-PCR peut être évaluée à partir d'une gamme réalisée à partir d'un ARN quantifié ou d'un ARN extrait d'une souche virale titrée de BVDV.

*Ces éléments ne sont pas demandés pour les fabricants de réactifs pour lesquels le couple de méthodes extraction/RT-PCR proposé à la validation a déjà été contrôlé conforme par le LNR-BVD sur matrice biopsie auriculaire sèche (individuelle et mélange de 10) ou matrice sérum (individuel et mélange de 25), et dont la formulation du kit n'a pas changé depuis la date du contrôle.*

#### 6.1.5 Robustesse de la RT-PCR

La robustesse doit être évaluée afin de vérifier la capacité de la RT-PCR à ne pas être affectée par de petits changements dans les paramètres jugés critiques tels que la température d'incubation et le volume des réactifs notamment.

Elle doit être évaluée sur les conditions opératoires jugées les plus critiques de la réaction de RT-PCR et sur les différentes cibles (gène d'intérêt et gène de contrôle interne). Le niveau de 3 fois la  $LD_{RT-PCR95\%}$  du gène d'intérêt déterminé lors des essais d'évaluation de la sensibilité par le producteur ou le Niveau Exigible de Détection (NED) fixé par le LNR doit toujours être retrouvé positif, avec au moins 3 répétitions de l'analyse, quelles que soient les conditions expérimentales. La robustesse est testée avec l'échantillon ayant servi à la détermination de la  $LD_{RT-PCR95\%}$  (ARN dosé ou issu d'une souche virale titrée de BVDV).

*Ces éléments ne sont pas demandés pour les fabricants de réactifs pour lesquels le couple de méthodes extraction/RT-PCR proposé à la validation a déjà été contrôlé conforme par le LNR-BVD sur matrice biopsie auriculaire sèche (individuelle et mélange de 10) ou matrice sérum (individuel et mélange de 25), et dont la formulation du kit n'a pas changé depuis la date du contrôle.*

#### 6.1.6 Stabilité du réactif

##### **Stabilité du kit (non ouvert)**

Des éléments de stabilité du réactif dans le temps doivent être fournis par le demandeur (selon la méthode choisie par celui-ci, vieillissement accéléré par exemple). Les études doivent être réalisées sur 3 lots fabriqués dans les conditions finales de production et de commercialisation. Pour le dossier technique, les résultats des études porteront sur au moins un lot, le fournisseur s'engageant à fournir les résultats portant sur deux autres lots au fur et à mesure de leur disponibilité.

L'ensemble des études de stabilité doit porter au minimum sur 2 échantillons négatifs, 2 échantillons NED (ou équivalent du NED) (ou à défaut 3X la  $LD_{RT-PCR}$ ) et 2 échantillons positifs, et ces études devront donner des résultats satisfaisants pendant une durée supérieure à la durée de conservation fixée par le demandeur. Les critères d'acceptabilité de variation des résultats pour chaque type d'échantillon devront être définis au début de l'étude.

##### **Stabilité du kit après ouverture et de ses composants reconstitués**

Dans le cas où un ou plusieurs composants du réactif peuvent être utilisés plusieurs fois après ouverture ou reconstitution, le demandeur doit fournir des données de stabilité relatives aux durées et conditions de conservation indiquées dans la notice (dont, si nécessaire, le nombre de cycles de congélation/décongélation possible).

*Ces éléments ne sont pas demandés pour les fabricants de réactifs pour lesquels le couple de méthodes extraction/RT-PCR proposé à la validation a déjà été contrôlé conforme par le LNR-BVD sur matrice biopsie auriculaire sèche (individuelle et mélange de 10) ou matrice sérum (individuel et mélange de 25), et dont la formulation du kit n'a pas changé depuis la date du contrôle.*

## 6.3 Caractérisation de la méthode complète (préparation échantillon/extraction/(RT-PCR))

Le demandeur doit préciser les modalités de préparation des échantillons et de prise d'essai. Les modalités d'interprétation (critères de validité de l'essai, formule de calcul, ...) et de définition du (ou des) seuil(s) d'interprétation sont laissées à l'appréciation du demandeur. Le demandeur doit décrire la méthodologie suivie (nombre et description des échantillons, calculs et statistiques) et les résultats obtenus pour déterminer le(s) seuil(s) selon le(s) objectif(s) d'application.

Le demandeur doit présenter les moyens mis en œuvre pour déterminer les performances des paramètres évalués et les résultats obtenus, comme décrit ci-après.

### 6.3.1 Caractérisation de la méthode

#### 6.3.1.1 Limite de détection de la méthode ( $LD_{\text{méthode}}$ )

La limite de détection de la méthode est la plus petite quantité ou teneur de l'analyte par quantité définie de matrice pouvant être détectée de façon répétable (8 fois sur 8 répétitions) dans les conditions expérimentales décrites par la méthode en condition de fidélité intermédiaire ; elle est établie en prenant en compte toutes les étapes de la méthode d'analyse (prise d'essai, préparation de l'échantillon, extraction, RT-PCR, etc.) vis-à-vis d'une matrice biologique donnée.

La limite de détection de la méthode complète doit être déterminée selon les recommandations de la norme NF U47-600 partie 2.

*Ces éléments ne sont pas demandés pour les fabricants de réactifs pour lesquels le couple de méthodes extraction/RT-PCR proposé à la validation a déjà été contrôlé conforme par le LNR-BVD sur matrice biopsie auriculaire sèche (individuelle et mélange de 10) ou matrice sérum (individuel et mélange de 25), et dont la formulation du kit n'a pas changé depuis la date du contrôle.*

#### 6.3.1.2 Sensibilité analytique

Le fabricant devra apporter la preuve que son kit RT-PCR peut détecter positivement le matériau biopsie auriculaire sèche NED en mélange de 25 biopsies auriculaires (1 biopsie auriculaire NED + 24 biopsies auriculaires négatives)

#### 6.3.1.3 Sensibilité et spécificité diagnostiques ( $SeD$ et $SpD$ )

La sensibilité « diagnostique » est la proportion d'échantillons donnant un résultat positif au test soumis au contrôle selon le(s) seuil(s) défini(s) par le demandeur parmi ceux renfermant la cible selon les critères du LNR ou de la réglementation.

La spécificité « diagnostique » est la proportion d'échantillons définis comme négatifs au regard de la cible donnée (cf. chapitre « définitions » de ce CdC) et présentant un résultat négatif au test soumis au contrôle selon le(s) seuil(s) défini(s) par le demandeur.

Ces caractéristiques de la méthode doivent être mesurées à partir d'un panel représentatif d'échantillons du terrain ou issus d'une infection expérimentale.

Un intervalle de confiance des pourcentages est déterminé, intervalle calculé en fonction du nombre d'échantillons testés.

La sensibilité diagnostique devra être évaluée sur un minimum de **26 mélanges de biopsies auriculaires constitués chacun de 24 biopsies auriculaires négatives et 1 biopsie auriculaire positive**. Chacun des mélanges devra être différent en terme de composition de biopsies auriculaires.

La Spécificité diagnostique devra être évaluée sur un minimum de 26 mélanges de biopsies auriculaires constitués chacun de 25 biopsies auriculaires négatives.

Si le développeur fait appel à un prestataire, il doit transmettre le rapport complet de l'étude collaborative réalisée contenant l'ensemble des résultats obtenus par le prestataire.

*Cas particulier des fabricants de réactifs ayant déjà un couple de méthodes extraction/RT-PCR contrôlé conforme par le LNR-BVD sur matrice biopsie auriculaire sèche (individuelle et mélange de 10) ou matrice sérum (individuel et mélange de 25), et dont la formulation du kit n'a pas changé depuis la date du contrôle : les fabricants devront analyser a minima 5 mélanges de biopsies auriculaires constitués chacun de 24 biopsies auriculaires sèche négatives et 1 biopsie auriculaire sèche positive.*

### 6.3.1.3 Robustesse de la méthode

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<sub>RT-PCR</sub> 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<sub>RT-PCR</sub> (ARN dosé).

Pour exemple :

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

*Ces éléments ne sont pas demandés pour les fabricants de réactifs pour lesquels le couple de méthodes extraction/RT-PCR proposé à la validation a déjà été contrôlé conforme par le LNR-BVD sur matrice biopsie auriculaire sèche (individuelle et mélange de 10) ou matrice sérum (individuel et mélange de 25), et dont la formulation du kit n'a pas changé depuis la date du contrôle.*

## 6.4 Synthèse des paramètres de performance et des niveaux d'exigence attendus

Les paramètres, niveaux de performance et résultats attendus sont synthétisés dans un tableau au format présenté du Tableau 1 ci-après. Le fournisseur utilisera ce modèle de tableau pour synthétiser l'ensemble des résultats qu'il aura obtenus. Les paramètres évalués par le LNR-BVD sont listés dans le tableau 2 (en page11)

**Tableau 1. Paramètres évalués *a minima* par le demandeur et présentés dans le dossier de technique pour un test qualitatif, quantitatif ou semi-quantitatif**

Paramètres	Performance à évaluer	Moyens mis en œuvre (échantillons et conditions)	Résultats attendus
<b>Sensibilité analytique (LD<sub>RT-PCR</sub>)</b>	Qualitatif	ARN Dosé ou ARN issu d'une souche de BVDV titrée DICT 50/ml	<b>Indiquer la LD<sub>RT-PCR</sub></b>
<b>Sensibilité analytique (analyse du NED en mélange de 25 biopsies auriculaires)</b>	Qualitatif	NED en mélange de 25	<b>positif</b>
<b>Efficacité / linéarité de la RT-PCR</b>	Qualitatif/quantitatif	ARN Dosé ou ARN issu d'une souche de BVDV titrée DICT 50/ml	<b>fournir le R<sup>2</sup> et % efficacité</b>
<b>Spécificité analytique Analyse <i>in silico</i></b>	Quantitatif	Comparaison avec les banques de données génétiques	<b>Présenter les données et résultats</b>
<b>Spécificité analytique inclusivité</b>	Qualitatif	1 souche de chaque génotype présent en France (BVDV-1,-2) et BDV	<b>100 % positif</b>
<b>Spécificité analytique exclusivité</b>	Qualitatif	Virus testés à minima : FCO, BoHV1, BoHV4, Schmallenberg,...	<b>100 % négatif</b>
<b>Robustesse de la RT-PCR</b>	Qualitatif/quantitatif	Vérification de 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	<b>CV &lt; 15%</b>
<b>Vérification de la stabilité de la RT-PCR</b>	Qualitatif/quantitatif	Vérification de 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	<b>CV &lt; 15%</b>
<b>Limite de détection de la méthode (LD<sub>METHODE</sub>)</b>	Qualitatif/quantitatif	Souche virale titrée de BVDV et diluée en série	<b>Fournir les données</b>
<b>Sensibilité diagnostique sur mélanges de 25 biopsies auriculaires (mélange de 1 biopsie auriculaire positive + 24 biopsies auriculaires négatives)</b>	Qualitatif	26 mélanges ou 5 mélanges	<b>99 % positif [95%]</b>
<b>Spécificité diagnostique sur mélanges de 25 biopsies auriculaires individuelles négatives</b>	Qualitatif	26 mélanges	<b>99 % négatif [95%]</b>
<b>Reproductibilité inter-laboratoire</b>	Qualitatif/quantitatif	3 essais par laboratoire en triplicat /5 laboratoires dont le LNR-BVD Analyses réalisées sur ARN Dosé ou ARN issu souche titrée DICT 50/ml	<b>CV &lt; 15%</b>
<b>Fidélité intermédiaire</b>	Qualitatif/quantitatif	3 essais sur ARN dosé ou issue de souches titrées de BVD. Faire varier les opérateurs	<b>CV &lt; 10%</b>

*Note : Les exigences apparaissant en grisé dans le tableau ne sont pas demandés pour les fabricants de réactifs ayant déjà un couple de méthodes extraction/RT-PCR contrôlé conforme par le LNR-BVD sur matrice biopsie auriculaire sèche (individuelle et mélange de 10) ou matrice sérum (individuel et mélange de 25), et dont la formulation du kit n'a pas changé depuis la date du contrôle*

**Tableau 2 : paramètres évalués par le LNR**

<b>Paramètres</b>	<b>Performance à évaluer</b>	<b>Moyens mis en œuvre (échantillons et conditions)</b>	<b>Résultats attendus</b>
<b>Efficacité / linéarité de la RT-PCR</b>	Qualitatif/quantitatif	ARN Dosé ou ARN issu d'une souche de BVDV titrée DICT 50/ml	<b>Appréciation du R<sup>2</sup> et % efficacité</b>
<b>Sensibilité analytique (analyse du NED en mélange de 25 biopsies auriculaires)</b>	Qualitatif	NED en mélange de 25	<b>100% positif</b>
<b>Sensibilité diagnostique sur mélanges de 25 biopsies auriculaires (mélange de 1 biopsie auriculaire positive + 24 biopsies auriculaires négatives)</b>	Qualitatif	15 mélanges de 25 biopsies auriculaires	<b>99 % positif [95%]</b>
<b>Spécificité diagnostique sur mélanges de 25 biopsies auriculaires individuelles négatives</b>	Qualitatif	15 mélanges de 25 biopsies auriculaires	<b>99 % négatif [95%]</b>
<b>Déteçtabilité des biopsies auriculaires équivalent NED en mélange de 25 biopsies auriculaires</b>	Qualitatif	5 biopsies auriculaires analysées chacune en mélange de 25	<b>100%</b>
<b>Répétabilité</b>	Qualitatif/quantitatif	NED en mélange de 25	<b>CV &lt; 15%</b>