

# CAHIER DES CHARGES

**Laboratoire de Niort****Laboratoire Expert****pour la Diarrhée Virale Bovine (LE-BVD)**

<b>Objet</b>	<b>Validation des kits ELISA anticorps BVD</b>
<b>Pathologie</b>	<b>Diarrhée Virale Bovine (BVD)</b>
<b>Technique</b>	<b>ELISA</b>
<b>Matrice</b>	<b>Sérum individuel, sérum de mélange, lait de mélange</b>

<b>Version</b>	<b>01</b>
<b>Date d'application</b>	

## Validation

<i>Nom/Prénom</i>	<i>Fonction</i>	<i>Date</i>	<i>Signature</i>
Guy Kouokam	Responsable Thématique	30/11/2018	

## Diffusion

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

## 1. Contexte et Objectifs

En 2010, l'Association de certification en santé animale (l'ACERSA dont les missions ont été reprises par l'AFSE) 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 virus BVDV. Les tests de diagnostic indirect peuvent être réalisés sur des matrices variées (sérum, lait), 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.

Ce cahier des charges précise aux producteurs de réactifs les conditions générales nécessaires à la validation d'une méthode ELISA pour la détection d'anticorps dirigés contre les protéines (p80, E0, protéines totales) du virus de la diarrhée virale bovine – dénommée par la suite kit ELISA AC BVD– à partir de sérums individuels, de sérums de mélange (pools de 10 sérums) et de lait de mélange. Il vise à décrire les conditions administratives et techniques nécessaires à la demande de contrôle initial de conformité des kits ELISA AC BVD, les paramètres de performance évalués et les critères de conformité.

## **2. Présentation d'un dossier de validation**

---

Chaque producteur de réactifs désirant soumettre au contrôle de conformité un kit ELISA AC BVD devra fournir :

- Un dossier administratif *a minima* comme décrit dans les normes NF U47-301 et XP U47-310 (Annexe B).
- Un dossier technique de caractérisation de la méthode comme décrit dans la norme XP U47-310.

## **3. Critères de performance évalués par le fabricant de réactifs**

---

La définition des critères de performance est basée sur la norme U47-310 ainsi que sur les caractéristiques attendues de la méthode.

Les critères de performances évalués par le producteur de réactifs et présentés dans le dossier de validation sont présentés dans le tableau 1.

Si les performances du réactif sont conformes à celles attendues, le contrôle initial de conformité est effectué par le LE-BVD.



**Tableau 1. Critères évalués *a minima* par le fabricant et présentés dans le dossier de validation**

Critères		Exigences	Résultats attendus
Définition des modalités d'interprétation et du (ou des) seuil(s) d'interprétation	Toute matrice	Analyses réalisées sur un minimum de 150 échantillons	Fournir les données
Sensibilité analytique	Sérum individuel	Sérum NED* BVD anticorps (SerAC BVD) testé en double sur 2 séries i.e testé 10 fois par plaque et sur deux plaques	positif ou douteux 10 fois sur 10
	Sérum de mélange	Sérum NED BVD anticorps (SerAC BVD) dilué au 1/5 et analysé en 10 répétitions sur 2 séries	80% positifs ou douteux
	Lait de mélange	Lait de référence (NED) positif analysé à la dilution fixée par le LE-BVD et testé en 10 répétitions sur 2 séries	80% positifs ou douteux
Spécificité analytique	Inclusivité	- Sérums issus d'animaux infectés par du virus BVDV-1 (évaluer au moins les sous-génotypes 1b, 1e et 1d) ou par du virus BDV. - Sérums issus d'animaux infectés par du virus BVDV-2	100% positifs
	Exclusivité	- Sérums issus d'animaux infectés par d'autres virus déjà identifiés en élevages bovins français (virus FCO, BoHV1, BoHV4, Schmallerberg...). Evaluer au moins quatre types d'infection virale	100% négatifs
Cohérence de la loi dose-effet	Toute matrice	2 séries d'au moins 8 dilutions de raison 2 couvrant la zone de linéarité : évolution de la positivité vers la négativité.	
Spécificité diagnostique	Sérum individuel	≥ 1000 sérums issus de plusieurs cheptels bovins européens n'ayant aucun historique d'infection par du virus BVDV	99,3% de négatifs
	Sérum de mélange	≥ 100 sérums de mélange (mélanges de 10 sérums) issus de plusieurs cheptels bovins européens n'ayant aucun historique d'infection par le virus BVDV	97% de négatifs
	Lait	≥ 400 laits individuels issus de plusieurs cheptels européens n'ayant aucun historique d'infection par le virus BVDV	99% de négatifs
Sensibilité diagnostique	Sérum individuel	≥ 200 sérums issus de différents bovins issus de cheptels bovins européens infectés par du virus BVDV	99,5% de positifs
	Sérum de mélange	≥ 50 sérums de mélange (mélanges équimolaire de 1 sérum positif et 9 sérums négatifs) issus de cheptels bovins européens infectés par le virus BVDV.	100 % positifs
	Lait de mélange	≥ 50 laits de mélange issus de cheptels bovins européens infectés par le virus BVDV	100% de positifs



Répétabilité intra-essai	Toute matrice	3 séries de 92 répétitions (test monocupule) ou de 44 répétitions (test bicupule) avec un échantillon faiblement positif : - Faire varier la position des témoins - Vérifier l'absence d'effet bord	*CV ≤ 10%
Reproductibilité intra-laboratoire (fidélité intermédiaire)	Toute matrice	≥ 3 opérateurs à différents jours sur 3 niveaux de dilutions d'un seul échantillon : test à réaliser en triplicat et sur 6 essais.	CV ≤ 15%
Reproductibilité inter-laboratoires	Toute matrice	4 essais sur 3 niveaux différents de sérums testés 3 fois (analyses en triplicat) pour chaque protocole réalisé, dans 5 laboratoires différents (en aveugle) Echantillons à tester : sérum positif, sérum négatif, équivalents NED *fournir données brutes des laboratoires	CV ≤ 20%
Robustesse et Stabilité	Toute matrice	- Vérification des paramètres critiques (température et temps d'incubation, lavages manuels et automatiques) - Vérification au 2/3 de vie du réactif et à la date de péremption (dans la mesure du possible). Dans chaque cas trois échantillons devront être testés en duplicate	Fournir les données

\*NED = niveau exigible de détection

\*CV = coefficient de variation = rapport de l'écart-type des données numériques à leur moyenne, obtenues dans des conditions de répétibilité ou de reproductibilité.

#### 4. Restitution des résultats et rapport

Le dossier de validation préparé par le producteur de réactif sera soumis au LE-BVD. Si il est jugé conforme aux exigences énoncées ci-dessus alors une évaluation technique du kit ELISA AC BVD fourni par le producteur de réactif sera effectuée par le LE-BVD. L'expression des résultats de cette évaluation sera rendue sous la forme de fiches de synthèse des résultats et d'un rapport de contrôle.

Le rapport de contrôle se prononce sur la conformité ou non des résultats obtenus par rapport aux critères d'évaluation.

Lorsque les performances du réactif contrôlé sont satisfaisantes, le kit ELISA est ajouté, dans un délai de 10 jours, au listing des kits contrôlés par le LE-BVD. Ce listing est porté à la connaissance des utilisateurs et des gestionnaires sur le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

#### 5. Facturation

Le contrôle initial de conformité des réactifs réalisé par le LE-BVD est facturé au fournisseur. Les prix inscrits au tarif des prestations de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)) sont valables pour 1 matrice et 1 mode opératoire. Le contrôle des kits proposant plusieurs matrices et/ou plusieurs modes opératoires sera facturé autant de fois que de contrôles différents seront nécessaires.



# CAHIER DES CHARGES



Laboratoire de Niort

Laboratoire Expert

pour la Diarrhée Virale Bovine (LE-BVD)

<b>Objet</b>	<b>Validation de tests ELISA anticorps BVD</b>
<b>Pathologie</b>	<b>Diarrhée Virale Bovine (BVD)</b>
<b>Technique</b>	<b>ELISA</b>
<b>Matrice</b>	<b>Sérum individuel, sérum de mélange, lait de mélange</b>

<b>Version</b>	<b>Complément de la version 01 du 30/11/2018</b>
<b>Date d'application</b>	

## Validation

<i>Nom/Prénom</i>	<i>Fonction</i>	<i>Date</i>	<i>Signature</i>
Guy Kouokam	Responsable Thématique	18/12/2018	

## Diffusion

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

## 1. Compléments

Le test ELISA anticorps BVD devra être capable également de détecter un animal positif dans un mélange de 20 sérums. Dans ce cadre :

- Le sérum NED BVD anticorps devra être détecté positif ou douteux dans 80 % des cas lorsque analysé en mélange de 20 sérums (4 volumes de sérum NED BVD anticorps dans 16 volumes de sérums négatifs).
- Un minimum de 50 sérums de mélange (mélanges équimolaires de 1 sérum positif et 19 sérums négatifs) devra être testé (sensibilité diagnostique attendue : 99,5%)



- Un minimum de 100 sérums de mélange négatifs (mélanges équimolaires de 20 sérums négatifs) devra être testé (spécificité diagnostique minimale attendue : 97 %).

Le statut positif des échantillons de sérums individuels analysés (tests de sensibilité diagnostique) devra avoir été confirmé par un test de séroneutralisation virale.

Les échantillons négatifs utilisés pour les analyses du producteur de réactifs devront provenir d'élevages européens n'ayant pas d'historique récent d'infection par le virus BVD. Ceci implique une absence de détection d'animaux virémiques transitoires, d'animaux infectés permanent immunotolérants au cours des trois dernières années **et** un statut négatif des échantillons avec un autre kit ELISA ou un test de séroneutralisation virale. L'ensemble des échantillons négatifs et positifs devront provenir d'au moins 20 élevages distincts

## **2. Panel d'échantillons fournis par le LE-BVD**

---

Le LE-BVD pourra fournir aux producteurs de réactifs un panel de 30 sérums négatifs et 30 sérums positifs.  
Le LE-BVD ne fournira pas aux producteurs de réactifs des échantillons de laits

