

# CAHIER DES CHARGES

## A destination des fabricants de réactifs



Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort

Unité Pathologie et Bien-être des Ruminants

Laboratoire National de Référence

pour la Diarrhée Virale Bovine

<b>Objet</b>	<b>VALIDATION DE RÉACTIFS</b>
<b>Pathologie</b>	<b>Pestivirus bovin</b>
<b>Technique</b>	<b>RT-PCR temps réel qualitative</b>
<b>Matrice</b>	<b>Biopsies auriculaires humide et liquide</b>

<b>Version</b>	<b>02</b>
<b>Date d'application</b>	<b>10/12/2021</b>

### Validation

<b>Nom/Prénom</b>	<b>Fonction</b>	<b>Date</b>	<b>Signature</b>
<b>Guy KOUOKAM</b>	<b>Responsable du LNR-BVD</b>	<b>10/12/2021</b>	

### Diffusion

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

### Suivi des modifications

Modification du temps d'incubation des biopsies auriculaires en tampon ALLFLEX. Nouveau temps d'incubation : une heure

### Commentaire

*Rien à signaler*

## 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 .....	5
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 .....	7
Annexe 1 : Critères de conformité des kits de diagnostic PCR – Pestivirus Bovins – Matrice biopsie auriculaire humide et liquide .....	8

## 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 humide (BAH) et dans son tampon de conservation, ceci que ce soit pour la réalisation d'analyses individuelles ou pour la réalisation d'analyses de mélange (taille du mélange : 10). L'objectif des analyses est la détection des animaux Infectés Permanents Immunotolérants (IPI) dans le cadre fixé par le programme national de lutte contre la diarrhée virale bovine/maladie des muqueuses. Les critères de performance des outils de diagnostic seront étudiés lors de l'examen du dossier de validation transmis par le producteur de réactif.

Le producteur de réactifs devra informer impérativement le LNR-BVD de tout changement appliqué à un réactif PCR ayant une attestation initiale de conformité (Annexe C de la norme XP U47-311).

Note : La procédure de validation est une procédure allégée pour les kits PCR ayant déjà fait l'objet d'un contrôle de conformité favorable par le LNR-BVD sur matrice biopsie auriculaire sèche (voire section 6).

## 2. Contexte

---

En 2010, l'Association de certification en santé animale (ex-Acersa, aujourd'hui 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 BVDV. Les tests de diagnostic direct peuvent être réalisés sur des matrices variées (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. Le programme national de lutte contre la diarrhée virale bovine mis en place le 31 juillet 2019 par arrêté ministériel reprend des exigences formulées par l'AFSE. En juillet 2021 a été vérifié par le LNR-BVD la possibilité de réaliser des analyses virologique BVD sur la matrice biopsie auriculaire incubée dans un tampon de conservation commercialisé par la société ALLFLEX. La matrice biopsie auriculaire humide ainsi que le tampon de conservation sont compatibles avec des analyses virologiques BVD. Par simplification de langage l'expression matrice biopsie auriculaire liquide est utilisée dans ce document pour désigner le tampon de conservation dans lequel a été incubée la matrice biopsie auriculaire. L'expression biopsie auriculaire humide (abrégée BAH) est utilisée pour désigner la biopsie auriculaire séparée du tampon de conservation ALLFLEX (ou de tout autre tampon ayant des performances similaires vérifiées par le LNR-BVD) après son incubation dans ce dernier pendant une durée minimale d'une heure.

## 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 humide et liquide devra fournir :

- *a minima* un dossier administratif 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.

Un allègement de la procédure de validation est prévu lorsqu'un kit PCR a déjà fait l'objet d'un contrôle de conformité favorable par le LNR-BVD sur matrice biopsie auriculaire sèche.

## 4. Définitions

---

- **BAH :**

Biopsie auriculaire sèche ayant été conservée dans un volume de 250 microlitres de tampon de conservation ALLFLEX (ou de tout autre tampon ayant des performances similaires) pendant une durée minimale d'une heure à température ambiante puis reprise pour analyse.

- **BAL :**

Tampon de conservation ALLFLEX (ou tout autre tampon ayant des performances similaires) dans le quel a été incubée à température ambiante une biopsie auriculaire sèche et ceci pendant une durée minimale d'une heure

- **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.

- **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.

- **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 dans des élevages bovins en partenariat avec GDS France. Chaque biopsie auriculaire a un diamètre de 2 à 3 mm et son statut (positif ou négatif) a été vérifié par différentes techniques. Dans le cadre des essais techniques réalisés par le fabricant de réactif des biopsies auriculaires sèches fournies par le LNR-BVD doivent être incubées dans un volume de 250 microlitres de tampon de conservation fourni par la société ALLFLEX (ou de tout autre tampon ayant des performances similaires contrôlées par le LNR-BVD) pendant une durée minimum d'une heure à température ambiante. A l'issue de cela, la biopsie auriculaire humide (BAH) ainsi que son tampon de conservation (BAL) sont soumis aux essais d'analyse. Ces deux matrices doivent être conservées à une température inférieure ou égale à 18°C.

**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](http://www.anses.fr).**

- **Matériau pour la détermination de LD<sub>RT-PCR</sub>**

Lorsqu'il sera disponible, le LNR-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 LNR-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 LNR-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 LNR-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

L'étape de caractérisation de la PCR ne concerne pas les kits PCR ayant fait l'objet d'un contrôle de conformité favorable par le LNR-BVD (ou l'ancien LE-BVD) sur matrice biopsie auriculaire sèche.

La caractérisation de la PCR comprend l'évaluation des points suivants :

- **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<sub>RT-PCR</sub>)**

Le producteur de réactifs apportera les éléments de la détermination de la LD<sub>RT-PCR</sub> à l'aide d'un ARN dosé fourni par le LNR-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 LNR-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<sub>RT-PCR</sub> définie par le producteur de réactifs doit toujours être la même quelles que 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%

- **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<sub>RT-PCR</sub> doit toujours être retrouvée positive 10 fois sur 10.

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

La vérification des caractéristiques de la méthode complète est obligatoire pour tout couple de technique extraction d'acide nucléique/RT-PCR soumis au contrôle initial de conformité. Elle portera sur l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité diagnostiques et la vérification du niveau exigé de détection.

- **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). Pour les analyses individuelles un échantillonnage de 50 biopsies auriculaires humides et liquides positives et négatives dont 40 positives et 40 négatives fournies par le LNR-BVD devra être analysé. Pour les analyses de mélanges un panel composé de 10 mélanges de 10 biopsies négatives et sur 10 mélanges réalisés à partir de 9 biopsies négatives et d'une biopsie positive. Les deux matrices BAL et BAH devront être évaluées. 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 LNR-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.

Quel que soit le type de contrôle envisagé (initial ou dérivé) le LNR-BVD réalise également des contrôles techniques après avoir émis un avis favorable sur le dossier de validation du fabricant de réactif.

## 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 humide et liquide

Critères de performance	Echantillons	Nombre d'échantillon*	Nombre d'essai	Protocole	Critères de conformité
SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE	Exclusivité	Virus testés à 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 <sup>2</sup> et % efficacité
SENSIBILITÉ DIAGNOSTIQUE	Collection Référence Positive LNR-BVD et européen	- Analyser individuellement : un minimum de 50 BAH* et BAL** positives dont 40 de la collection du LNR-BVD - Analyser en mélange : un minimum de 10 mélanges contenant chacun 1 BAL ou BAH positive et 9 BAH ou BA négatives	1		100 %
SPÉCIFICITÉ DIAGNOSTIQUE	Collection Référence Négative LNR-BVD et européen	- Analyser individuellement : minimum 50 BAH et BAL négatives dont 40 de la collection du LNR-BVD - Analyser en mélange : un minimum de 10 mélanges contenant chacun 10 BAH ou BAL négatives	1		100 %
NIVEAU EXIGÉ DE DETECTION	NED pur (analyse individuelle) NED dilué au 1/10 (analyse de mélange)	2 BAH et BAL et 2 BAH et BAL positives + 9 BAL* et BAH négatives	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)
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 LNR-BVD	Dans les conditions opératoires des différents laboratoires	CV < 15%

**Légende** : BAH = biopsie auriculaire humide, BAL= biopsie auriculaire liquide

**Note** : Pour des kits PCR ayant déjà fait l'objet d'un contrôle de conformité favorable seules les vérifications du niveau exigé de détection, de la sensibilité et spécificité diagnostiques sont à vérifier.