



RÉPUBLIQUE  
FRANÇAISE

Liberté  
Égalité  
Fraternité



Laboratoire de Ploufragan-  
Plouzané-Niort

A l'attention des acteurs du diagnostic in vitro,  
producteurs de trousse pour le diagnostic  
en santé animale

Ploufragan, le 15/04/2024

Unité virologie immunologie  
porcines

Laboratoire National de  
Référence pour les pestes  
porcines classique et  
africaine.

Laboratoire National de  
Référence Influenza  
porcin

Laboratoire de Référence  
OMSA et National pour la  
maladie d'Aujeszky

---

**Dossier suivi par :**

Marie-Frédérique Le Potier

**Ligne directe :**

02 96 01 62 90

**Fax direct :**

02 96 01 62 94

**E- mail :**

Marie-frederique.lepotier@anses.fr

**N. Réf. :**

24MFLP048

**Objet :** appel à manifestation d'intérêt (AMI) pour la campagne 2024 de contrôle initial de conformité des trousse de détection du génome du virus de la peste porcine africaine (PPA)

Madame, Monsieur,

Cet appel à manifestation d'intérêt s'inscrit dans le cadre d'une démarche initiée par le Laboratoire National de Référence PPA de l'ANSES pour répondre à la demande de la DGAI de validation de nouvelles matrices dans le cadre du diagnostic officiel réalisé par le réseau de laboratoires agréés pour le diagnostic PPA.

Un cahier des charges sur les performances attendues de la méthode de détection du génome viral PPA est joint à ce courrier. Ce cahier des charges décrit les différentes étapes du processus d'évaluation des kits soumis au laboratoire national de référence (LNR) pour le contrôle initial de conformité et le contrôle de lot.

Le LNR procède au contrôle de tout nouveau lot destiné à la mise en œuvre des analyses officielles par le réseau français des laboratoires agréés, lot qui doit être destiné au moins en partie au marché français au regard du marché national, et ne réalise pas de contrôle de lot sur ceux uniquement destinés aux marchés étrangers.

Deux devis sont disponibles sur demande ([uvip@anses.fr](mailto:uvip@anses.fr)), l'un concerne le processus de contrôle initial (chaque étape réalisée par le LNR sera facturée), l'autre les réactifs biologiques que nous pouvons mettre à votre disposition pour la vérification des performances de vos kits afin d'alimenter le dossier que vous devrez nous retourner.

L'ensemble des documents, courrier AMI, cahier des charges, et formulaire de demande de contrôle, est publié sur le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

Si vous êtes intéressés par cet AMI, je vous serai reconnaissante de nous en informer par courriel ([uvip@anses.fr](mailto:uvip@anses.fr)), en retournant le formulaire de demande de contrôle renseigné et signé ainsi que les devis correspondants signés avant le 15 mai 2024.

Le dossier final destiné à l'évaluation de la conformité initiale devra nous être adressé au plus tard pour le 15 septembre 2024, par courriel ([uvip@anses.fr](mailto:uvip@anses.fr)). Si plusieurs dossiers émanant de différents producteurs devaient nous être soumis, ils seraient étudiés dans l'ordre d'arrivée sous réserve d'être complets. Les certificats de contrôle initial de conformité seront délivrés à tous les producteurs ayant satisfait aux contrôles courant février 2025.

En l'absence d'évolution particulière de la réglementation ou des méthodes de diagnostic recommandées par le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne ou par le manuel OMSA, cette campagne ne sera pas reconduite avant 2029.

Je vous prie d'agréer, Madame, Monsieur, l'expression de mes salutations distinguées.

Dr Marie-Frédérique Le Potier  
Responsable LNR PPA  
Cheffe d'unité Virologie Immunologie Porcines

Pièce jointes :

- Cahier des charges Contrôle de Conformité kit PCR PPA
- Formulaire demande de contrôle de réactif

# CAHIER DES CHARGES POUR LA PRÉSENTATION D'UN RÉACTIF PCR TEMPS RÉEL AUX CONTRÔLES DE CONFORMITE

<b>Laboratoire</b>	<b>Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort Unité Virologie Immunologie Porcines</b>		
<b>Contact</b>	<b>Olivier Bourry – Mireille le Dimna</b> ☎ : 02 96 01 01 39		<b>e-mail : <a href="mailto:uvip@anses.fr">uvip@anses.fr</a></b>

<b>Mandat de référence</b>	<b>Peste porcine africaine (PPA)</b>
----------------------------	--------------------------------------

<b>Objet</b>	<b>Cahier des charges pour la présentation d'un réactif PCR Temps Réel aux contrôles de conformité initial et de lot</b>
<b>Cible</b>	<b>Génome du virus de la peste porcine africaine</b>
<b>Méthode</b>	<b>PCR en temps réel qualitative</b>
<b>Matrices obligatoires</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Sang individuel et en mélange de 5</li> <li>2) Sang sur écouvillon sec</li> <li>3) Sang sur buvard qualité Whatman® 3</li> <li>4) Sérum individuel, <i>et équivalent (plasma, surnageant de cultures cellulaires)</i></li> <li>5) Exsudat musculaire</li> <li>6) Organes lymphoïdes : rate, amygdale <i>et équivalent (ganglions lymphatiques)</i></li> <li>7) Chiffonnette (contrôle environnemental)</li> </ol>

<b>Version</b>	<b>V2</b>
<b>Date d'application</b>	<b>15/04/2024</b>

Validation			
Nom/Prénom	Fonction	Date	Signature
LE POTIER Marie-Frédérique	Responsable LNR PPA	15/04/2024	<b>MFLP</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>3</b>
<b>5. Réactif (ou trousse) et lot soumis au contrôle initial</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 .....	5
<b>6. Dossier technique à présenter par le demandeur du contrôle initial</b> .....	<b>5</b>
6.1 Caractérisation de la PCR .....	5
6.1.1 Caractérisation de la PCR : analyse <i>in silico</i> (étude bio-informatique) .....	5
6.1.2 Spécificité analytique (inclusivité et exclusivité) .....	5
6.1.3 Limite de détection de la PCR ( $LD_{PCR}$ ) .....	6
6.1.4 Efficacité de la PCR .....	6
6.1.5 Robustesse de la PCR .....	6
6.1.6 Stabilité du réactif .....	6
6.2 Caractérisation de la méthode complète (préparation échantillon/ extraction/ PCR) pour des techniques qualitatives .....	7
6.2.1 Caractérisation de la méthode .....	7
6.2.1.1 Limite de détection de la méthode ( $LD_{méthode}$ ) .....	7
6.2.1.2 Sensibilité et spécificité diagnostiques ( <i>SeD</i> et <i>SpD</i> ) .....	9
6.3 Synthèse des paramètres de performance et des niveaux d'exigence attendus	10
<b>7. Contrôle de lot</b> .....	<b>11</b>
7.1 Contrôle avant commercialisation d'un lot de réactif .....	11
7.2 Contrôle en cours de commercialisation .....	11

## 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<sup>1</sup> en temps réel (PCR) au contrôle de conformité initial et de lot du LNR, en vue de l'obtention d'une attestation 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 le LNR, 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. Par ailleurs, un dossier dépourvu d'informations confidentielles est fourni par le fabricant aux utilisateurs du kit.

## 2. Référentiels et matériaux de référence

### 2.1 Référentiels :

- 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
- Méthode PCR de référence du LNR : Tignon et al, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.09.007>

### 2.2 Matériaux de référence :

Le niveau exigé de détection (NED) a été déterminé par le LNR sur son matériau de référence (MR), à savoir le lot PPAXIV3D de la souche virale Georgia 2007/1 inactivée, en utilisant sa méthode PCR de référence (Tignon et al, 2011). Ce lot de virus titrait  $10^{7.8}$ HAU/ml avant inactivation.

Les LD<sub>méthodes</sub> ont été déterminées après dopage de la matrice d'intérêt par la souche Georgia 2007/1 inactivée. Le NED, correspondant à la LD<sub>méthode</sub> de la PCR Tignon après extraction à l'aide du kit Macherey Nagel (MN) NucleoMag Vet, est donné pour chaque matrice dans le tableau n°1.

## 3. Définitions

Pour chaque paramètre, la définition est rappelée en introduction du paragraphe correspondant. En l'absence de précision, les définitions des termes employés seront celles des référentiels AFNOR.

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

Le contrôle des kits destinés à la détection du virus de la PPA est réalisé par le Laboratoire National de Référence (LNR) comme exigé réglementairement par le code rural, livre II, chapitre 3, articles R-203-1 à 6.

Le kit sera utilisé dans le cadre des analyses officielles réalisées pour la surveillance de la PPA en France. Il a pour objectif la détection du génome du virus de la PPA à partir d'échantillons de suidés (animal infecté) ou de chiffonnets prélevés sur des surfaces (exemple : vérification d'un protocole de nettoyage/désinfection en abattoir, en atelier de transformation ou dans les camions de transport d'animaux).

Il est demandé à ce que le test PCR soit proposé à la vente sous forme d'une trousse prête à l'emploi.

Le kit présenté au contrôle devra être de type triplex, permettant dans un seul tube l'amplification d'un ADN cible du virus de la PPA, d'un ADN non cible endogène présent dans le génome des suidés (contrôle positif

---

<sup>1</sup> Le document est voué à être évolutif en fonction des nouvelles technologies PCR (ex : PCR digitale)

endogène) et d'un ADN non cible exogène (contrôle positif exogène) permettant de valider le processus d'extraction en l'absence de contrôle positif endogène. Ce contrôle positif exogène doit pouvoir être ajouté soit au moment de l'extraction soit éventuellement au mix réactionnel. A noter que dans le cadre de ce contrôle de conformité, il sera ajouté au mix réactionnel.

La méthode de la trousse de diagnostic doit être caractérisée obligatoirement sur l'ensemble des matrices et types de prélèvements suivants pour la détection du génome du virus PPA, à savoir :

- Le sang prélevé sur EDTA en individuel et en mélange de cinq (1 sang positif + 4 sangs négatifs),
- Le sang récolté sur écouvillon sec,
- Le sang récolté sur buvard Whatman® 3
- Le sérum individuel ou matrices équivalentes (plasma, surnageant de culture cellulaire),
- L'exsudat musculaire,
- La rate
- L'amygdale ou matrice équivalente (ganglions lymphatiques)
- Des prélèvements d'environnement réalisés par chiffonnette (par exemple chiffonnette eau peptonée marque SODIBOX référence 4122C/4121C)

Au-delà de cette liste, le producteur peut valider d'autres matrices s'il le souhaite (ex : moelle osseuse, ou carte FTA). Dans ce cas, il devra intégrer dans la notice du kit ou le manuel d'extraction, un mode opératoire détaillé de la préparation de l'échantillon et de l'extraction. Le LNR ne vérifiera pas les performances de la méthode pour ces matrices complémentaires.

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

### 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 les conditions finales 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 :

- Le certificat ISO 9001 (date d'obtention /renouvellement ; organisme certificateur)
- 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>2</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.

### 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 intralaboratoire, tests de sensibilité, spécificité diagnostiques complémentaires, etc.).

---

<sup>2</sup> à l'exception des données touchant au secret industriel

Le demandeur fournira :

- Les acides nucléiques nécessaires à la vérification de la LD<sub>PCR</sub>
- 2 kits de 100 réactions du lot présenté au contrôle initial

### 5-3 Contrôle qualité

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

## 6. Dossier technique à présenter par le demandeur du contrôle initial

**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 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 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.

La méthode PCR permettra de détecter n'importe quelle souche du virus de la PPA. Le gène cible sera un gène conservé, par exemple tout ou partie du gène B646L codant pour la protéine majeure de la capsid (p72).

#### 6.1.2 Spécificité analytique (inclusivité et 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 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.

L'exclusivité de la PCR doit être testée sur des suspensions (ou autres) de concentration forte de microorganismes ou organismes proches génétiquement et/ou appartenant à la même niche écologique.

**Inclusivité** : la PCR devra être testée sur un panel d'a minima dix souches virales PPA représentant les principaux génotypes du virus PPA.

Pour des questions de biosécurité, un panel d'ADN sera utilisé. Ce type de panel est disponible auprès du LRUE ou du LNR (devis sur demande).



**Exclusivité** : le virus de la PPA étant le seul représentant de sa famille, l'approche de l'exclusivité devra quant à elle écarter la détection du virus de la peste porcine classique (souche inactivée disponible auprès du LNR PPC, devis sur demande) et celle des pathogènes ayant la même niche écologique (ex : SDRP, maladie d'Aujeszký, ...).

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

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

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

La limite de détection de la PCR ( $LD_{PCR}$ ) doit être déterminée par le demandeur à partir d'un acide nucléique cible. Le demandeur apportera tous les éléments de la détermination de la  $LD_{PCR}$  y compris la méthode utilisée pour la production, le dosage et la quantification de son étalon.

### 6.1.4 Efficacité de la 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 PCR peut être évaluée à partir d'une gamme réalisée à partir d'un plasmide quantifié ou d'un ADN extrait de l'organisme cible. Cette efficacité est d'autant plus importante dans les essais quantitatifs mais reste toutefois informationnelle pour des essais qualitatifs.

L'efficacité de la PCR devra être comprise entre 90 et 110%

Elle sera déterminée, *a minima*, à partir de cinq points de gammes (dilutions décimales) répétées au moins deux fois.

### 6.1.5 Robustesse de la PCR

La robustesse doit être évaluée afin de vérifier la capacité de la 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 PCR et sur les différentes cibles (gène d'intérêt et gènes de contrôle endogène et exogène). Le niveau de 3 fois la  $LD_{PCR}$  du gène d'intérêt déterminé lors des essais d'évaluation de la sensibilité par le producteur 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  $LD_{PCR}$  (ADN/plasmide dosé).

Notamment :

- Température d'hybridation +/- 2°C
- Volume d'ADN +/- 10%
- Volume de mix +/- 10%

### 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 doivent porter au minimum sur 2 échantillons négatifs, 2 échantillons NED (ou équivalent du NED) (ou à défaut 3X la  $LD_{PCR}$ ) et 2 échantillons positifs, et devront donner des résultats conformes au statut (établi a priori par composition) des échantillons testés, pendant une durée supérieure à la durée de conservation fixée par le demandeur. Les principes d'acceptabilité de variation des résultats pour chaque type d'échantillon devront être définies 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).

## 6.2 Caractérisation de la méthode complète (préparation échantillon/ extraction/ PCR) pour des techniques qualitatives

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.

Le demandeur devra décrire dans sa notice (notice du kit PCR ou manuel d'extraction) un mode opératoire précisant la préparation de l'échantillon et la prise d'essai pour chacune des matrices demandées.

### 6.2.1 Caractérisation de la méthode

#### 6.2.1.1 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, 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.

Dans le cas présent, **la limite de détection de la méthode devra être déterminée sur l'ensemble des matrices** (échantillons biologiques prélevés sur suidés) suivantes pour la détection du virus de la PPA, à savoir :

- Le sang prélevé sur tube EDTA en individuel
- Le sang prélevé sur tube EDTA en mélange de cinq (1 sang positif + 4 sangs négatifs)
- Le sang récolté sur écouvillon sec
- Le sang récolté sur buvard de qualité Whatman® 3
- Le sérum individuel (ou matrices équivalentes : plasma, surnageant de culture cellulaire)
- L'exsudat musculaire
- La rate
- L'amygdale (ou matrice équivalente : ganglions lymphatiques)

Et les prélèvements d'environnement réalisés par chiffonnette (par exemple chiffonnette eau peptonée marque SODIBOX référence 4122C/4121C)

La limite de détection de la méthode complète par matrice sera déterminée à partir d'un échantillon représentatif de la matrice initialement négative vis-à-vis du virus de la PPA, et enrichie avec une souche virale titrée et inactivée (voir 2.2) fournie par le LNR. **Le niveau exigé de détection (NED) a été déterminé pour différentes matrices (Tableau 1) ; pour ces matrices la  $LD_{\text{méthode}}$  se devra d'être inférieure ou égale à ce NED.**



Tableau n°1 : définition du NED par matrice testée

Matrice	Dilution du MR	NED
Sang	1/ 2 000	$10^{4,5}$ <sub>HAU/ml</sub>
Mélange de 5 sangs	1 sang positif à $10^{4,5}$ <sub>HAU/ml</sub> parmi 4 sangs négatifs	$10^{3,8}$ <sub>HAU/ml</sub>
Écouvillon sanguin	1/ 1 000	$10^{4,8}$ <sub>HAU/ml</sub>
Buvard	1/ 1 000	$10^{4,8}$ <sub>HAU/ml</sub>
Sérum	1/ 20 000	$10^{3,5}$ <sub>HAU/ml</sub>
Exsudat musculaire	1/ 20 000	$10^{3,5}$ <sub>HAU/ml</sub>
Rate	1/ 10 000	$10^{3,8}$ <sub>HAU/ml</sub> de lysat
Amygdale	1/ 10 000	$10^{3,8}$ <sub>HAU/ml</sub> de lysat
Chiffonnettes	1/ 100	$10^{5,8}$ <sub>HAU/ml</sub>

#### 6.2.1.1.1 Protocoles opératoires à respecter pour la détermination de la LD<sub>méthode</sub> par le demandeur pour le contrôle initial du réactif

L'approche de la LD<sub>méthode</sub> se fera par dilution de raison 10 de la souche Georgia 2007/1 inactivée dans les différentes matrices et selon le protocole suivant :

##### 6.2.1.1.1.1 Préparation de l'échantillon :

###### - Prélèvement de sang ou sérum :

Ajouter le volume nécessaire de la souche Georgia 2007/1 dans un volume de sang négatif pour être à la charge voulue puis extraire. Par exemple : 10µl de souche  $10^{-(x-1)}$  +90 µl sang.

###### - Prélèvement de 5 sangs :

Ajouter le volume nécessaire de la souche Georgia 2007/1 dans un volume de sang négatif pour être à la charge voulue puis ajouter 4 volumes de sang négatif (idéalement prélevés de 4 autres porcs).

###### - Prélèvement de sang sur écouvillon sec :

Imprégner un écouvillon sec avec 100 µl de sang enrichi avec la souche Georgia 2007/1 diluée  $10^{-(x-1)}$ , laisser sécher. Ajouter 1 ml de PBS ou de milieu de culture dans le tube de l'écouvillon, mélanger (Vortex) et prélever le volume nécessaire pour faire l'extraction.

###### - Prélèvement de sang sur buvard Whatman® 3 :

Déposer 100 µl de sang enrichi avec la souche Georgia diluée  $10^{-(x-1)}$ , sur environ ¼ de la surface du buvard. Laisser sécher. Puis à l'aide d'une perforatrice découper 5 disques et les mettre dans un tube. Ajouter 1 ml de PBS. Incuber 10-15 min, mélanger (Vortex) et prélever le volume nécessaire pour faire l'extraction.

###### - Exsudat musculaire :

L'exsudat musculaire est récupéré à partir d'un morceau de viande fraîche ou congelée. Par exemple prendre 25 g de muscle préalablement « tailladé », le déposer dans un tube adapté qui sera congelé ( $T^{\text{re}} < -20^{\circ}\text{C}$ ), puis décongelé pour récupérer l'exsudat (environ 200 µl.)

Ajouter le volume nécessaire de la souche Georgia 2007/1 pour être à la charge voulue puis extraire. Par exemple : 10µl de souche  $10^{-(x-1)}$  +90 µl exsudat.

###### - Rate et amygdale :

Peser 20-30mg d'organe négatif, ajouter 1 ml de PBS ou milieu et 10 µl de la souche Georgia diluée  $10^{-(x-2)}$ . Broyer 2 min à 30 Hz. Centrifuger 3 min à 1000g. Prélever le volume nécessaire pour faire l'extraction.

###### - Prélèvements d'environnement par chiffonnette

Mettre 100 µl de PBS enrichi avec la souche Georgia 2007/1 diluée  $10^{-(x-2)}$  sur une surface propre (type plateau inox), essuyer la surface avec la chiffonnette, replacer cette dernière dans son sac et ajouter 10 ml de PBS ou milieu de culture. Malaxer et récupérer le surnageant dans un tube.

#### 6.2.1.1.2 Extraction

Pour le contrôle initial de conformité, le demandeur devra *a minima* présenter les données obtenues avec la méthode d'extraction automatisée par adsorption sur billes magnétiques avec le kit MN NucleoMag Vet en respectant les consignes du tableau 2.

Tableau 2 : protocole extraction avec le kit MN NucleoMag Vet

Matrice	Matrice équivalente	Prise d'essai de la préparation	Lyse	Volume d'élution
Sang (sur tube EDTA)	/	100 µl +100µl de PBS	+ 20 µl protéinase K +180 µl VL1	100 µl
Mélange de 5 sangs récolté sur EDTA	/			
Sérum (sur tube sec)	Plasma, surnageant de cultures cellulaires			
Exsudat musculaire				
Sang récolté sur écouvillon sanguin	/	200 µl	15 min à température ambiante	
Sang récolté sur Buvard	/			
Rate	/			
Amygdale	Ganglion lymphatique			
Chiffonnettes	/			

**NB : Si le demandeur souhaite valider d'autres kits d'extraction, en plus de celui imposé, il se devra de réaliser une estimation de la  $LD_{méthode}$  (selon les modalités précisées au paragraphe 7.3.1.2 de la norme NF U47-600-2), pour chaque kit d'extraction et pour chaque matrice, mais ne sera pas tenu de faire l'étude de la spécificité et sensibilité diagnostique avec ces autres méthodes d'extractions.**

#### 6.2.1.2 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 présentant un résultat négatif au test soumis au contrôle selon le(s) seuil(s) défini(s) par le demandeur parmi les échantillons définis comme négatifs au regard de la cible donnée (cf. chapitre « définitions » de ce CdC).

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.

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.

Pour des questions de biosécurité interdisant la sortie d'échantillons non inactivés pour le virus de la PPA, le LNR dispose d'un panel constitué de 46 échantillons de natures différentes. Ce panel sera extrait en absence du témoin interne exogène au LNR par la méthode d'extraction automatisée sur billes NucleoMag Vet. Le panel anonymisé sera expédié au demandeur (devis sur demande). Le décodage sera envoyé dès réception des résultats obtenus afin que le demandeur puisse intégrer ces résultats à son dossier.

Ces extraits seront utilisés pour évaluer la sensibilité et la spécificité diagnostiques du kit soumis au contrôle. Il est attendu 100% de concordance entre les résultats obtenus avec le kit PCR présenté au contrôle et la méthode de référence du LNR (les échantillons attendus détectés/non-détectés ne seront pas pris en compte dans l'évaluation de cette concordance)

### 6.3 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 3 ci-après. Le fournisseur utilisera ce modèle de tableau pour synthétiser l'ensemble des résultats qu'il aura obtenus.

Un tableau de synthèse des différents paramètres évalués doit être établi dans lequel les données pour chacune des matrices et des méthodes d'extraction proposées seront présentées

**Tableau 3. Paramètres évalués *a minima* par le demandeur et présentés dans le dossier technique pour un test qualitatif**

Paramètres	Performance à évaluer	Moyens mis en œuvre (échantillons et conditions)	Critères d'acceptation	Paramètre vérifié par le LNR
Spécificité analytique° Analyse <i>in silico</i>	Qualitatif	Séquences nucléotidiques disponibles dans les bases de données internationales	Détection de tous les génotypes de virus PPA	Non
Spécificité analytique° inclusivité	Qualitatif	Panel disponible auprès du LRUE ou du LNR	100% détectés	Non
Spécificité analytique exclusivité	Qualitatif	Panel du fabricant + souche PPC inactivée fournie par le LNR	100% non détectés	Non
Sensibilité analytique (LD <sub>PCR</sub> )	Qualitatif	Etalon du fabricant : 8 réplicats, 3 PCR indépendantes, 24 résultats par point de gamme	Au moins 23/24 échantillons détectés	Oui
Efficacité / linéarité de la PCR	Qualitatif	Etalon du fabricant : 5 à 6 points de gamme de dilution selon la linéarité	90 à 110%	Non
Robustesse de la PCR	Qualitatif	Etalon du fabricant : point 3xLD <sub>PCR</sub> testé selon différentes conditions (ex : variation de 10% du volume d'ADN/réactifs, +/-2°C pour l'étape d'hybridation)	100% détectés	Non
Vérification de la stabilité	Qualitatif	2 échantillons négatifs, 2 échantillons positifs et 2 échantillons positifs au point 3xLD <sub>PCR</sub> testés à plus de 6 mois au-delà de la date de péremption revendiquée	100% non détectés pour les négatifs. 100% détectés pour les positifs	Non
Limite de détection de la méthode (LD <sub>METHODE</sub> )	Qualitatif	Par matrice : 4 réplicats par point de la gamme du MR, testés 2 fois par kit d'extraction	Par matrice : 8/8 détectés	Vérification pour les matrices avec NED*
Sensibilité diagnostique	Qualitatif	Panel d'échantillons biologiques du LNR	100% détectés	Non
Spécificité diagnostique	Qualitatif	Panel du fabricant + Panel d'échantillons biologiques du LNR	100% non détectés	Non

\* : Pour les matrices pour lesquelles le LNR n'a pas déterminé de NED, le LNR s'assurera de la cohérence des résultats avec les matrices équivalentes

Le LNR se réserve, le cas échéant, le droit de vérifier d'autres paramètres en fonction des résultats présentés par le demandeur.

A l'issue du contrôle des documents envoyés par le demandeur et des résultats des paramètres vérifiés par le LNR, ce dernier établit et envoie au demandeur un rapport de contrôle initial ainsi qu'un certificat de contrôle concluant sur la conformité ou non du réactif au cahier des charges du LNR. Dans le cas d'un résultat conforme, le LNR informe la DGAL de la disponibilité d'un nouveau réactif. La liste des kits contrôlés conformes est disponible sur le site de l'ANSES en précisant la technique, le nom du fabricant, le nom et code du kit, le protocole, la matrice et la date de validation.

## 7. Contrôle de lot

### 7.1 Contrôle avant commercialisation d'un lot de réactif

*Le LNR procède au contrôle de tout nouveau lot destiné à la mise en œuvre des analyses officielles par le réseau français des laboratoires agréés, lot destiné au moins en partie au marché français au regard du marché national, et ne réalise pas de contrôle de lot sur ceux uniquement destinés aux marchés étrangers.*

Pour les réactifs nécessitant avant leur mise sur le marché, un contrôle de lot (contrôle lot par lot ou de certains lots) de la part du LNR, le demandeur doit fournir au LNR :

- Le formulaire de demande de contrôle reprenant :
  - nom et adresse du demandeur (coordonnées de la personne à qui adresser les résultats ou à contacter si nécessaire)
  - nom et adresse du fabricant
  - nom commercial, dénomination et code produit du réactif
  - nature des échantillons pour lesquels le réactif est utilisable
  - référence de l'acceptation du dossier pour le contrôle initial du réactif (date d'acceptation)
  - numéro de lot et date de péremption du réactif soumis au contrôle
  - taille du lot du réactif (nombre de réactions)
  - liste des éléments du kit avec leur numéro de lot et date de péremption
  - numéro de version de la notice avec identification des éventuels changements.
- Un certificat de contrôle reprenant les résultats des contrôles réalisés par le demandeur avec *a minima* ceux concernant la limite de détection (sensibilité analytique, 6.1.3)
- La quantité de réactif nécessaire (*100 réactions*) pour réaliser les contrôles prévus et pour vérifier éventuellement d'autres paramètres jugés nécessaires par le LNR, en fonction par exemple de retours terrain ou de difficultés observés sur un lot précédent.

*Le LNR vérifie a minima la spécificité et la sensibilité diagnostiques sur un panel d'échantillons préparés au LNR, mais se réserve le droit de vérifier d'autres paramètres. Le LNR effectue ce contrôle dans un délai maximal d'un mois à réception de la demande et des réactifs.*

A l'issue du contrôle des documents envoyés par le demandeur et des résultats des paramètres vérifiés par le LNR, ce dernier établit un certificat de contrôle, concluant sur la conformité ou non du lot au cahier des charges du LNR, qui est envoyé au demandeur et, si conforme, à la DGAL. La liste des lots contrôlés conforme ou leur certificat est disponible sur le site de l'ANSES en précisant la technique, le nom du fabricant, le nom et code du kit, le numéro de lot, le numéro de notice, la date de validation et la date de péremption.

Dans le cas d'une évaluation non conforme, le LNR avertit le demandeur en précisant la cause du rejet du lot présenté.

### 7.2 Contrôle en cours de commercialisation

En cas d'anomalie d'un réactif rencontrée sur le terrain, le LNR peut décider de procéder à un nouveau contrôle du lot incriminé et éventuellement d'autres lots en cours de commercialisation. Les paramètres contrôlés dépendront du type d'anomalie observées et pourront correspondre à certains paramètres contrôlés uniquement lors du contrôle initial.

\*\*\*