



A l'attention des producteurs de trousse de PCR en temps réel pour le diagnostic en santé animale

Maisons Alfort, le 16/01/2025

Objet Appel à manifestation d'intérêt (AMI) pour le contrôle initial de conformité de kits RT-PCR en temps réel pour la détection spécifique du génome du virus de la fièvre catarrhale ovine de sérotype 12 (BTV-12)

Madame, Monsieur

Cet appel à manifestation d'intérêt s'inscrit dans le cadre d'une démarche initiée par le Laboratoire National de Référence (LNR) FCO de l'ANSES et de la Direction Générale de l'Alimentation pour répondre à la nouvelle problématique que constitue l'émergence d'un nouveau sérotype du virus FCO (BTV-12) en Europe du Nord. Cette analyse sera utilisée en seconde intention suite à une PCR tout genotype positive.

Un cahier des charges sur les performances attendues de la méthode de détection du génome viral BTV-12 est joint à ce courrier. Ce cahier des charges décrit les différentes étapes du processus d'évaluation des kits soumis au LNR FCO pour le contrôle initial de conformité.

L'ensemble des documents, courrier AMI, cahier des charges, et formulaire de demande de contrôle, est publié sur le site internet de l'Anses (Outils diagnostiques, contrôle de réactifs | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail).

Si vous êtes intéressés par cet AMI, je vous serai reconnaissante de nous en informer par courriel (corinne.sailleau@anses.fr / emmanuel.breard@anses.fr), en retournant le formulaire de demande de contrôle renseigné et signé.



Le dossier final destiné à l'évaluation de la conformité initiale devra nous être adressé au plus tard pour le 11 avril 2025, par courriel (corinne.sailleau@anses.fr). Les demandes qui seraient reçues après la date-limite de réponse à cet AMI ne seront pas prises en compte par le LNR. En l'absence d'évolution particulière de la réglementation, cette campagne ne sera pas reconduite avant 2029.

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

Corinne SAILLEAU
Responsable adjointe LNR FCO

CAHIER DES CHARGES-TYPE POUR LA PRÉSENTATION D'UN RÉACTIF PCR TEMPS RÉEL AUX CONTRÔLES DE CONFORMITÉ

Version 2: Date d'application 21 mars 2024

| | |
|--------------------|---|
| Laboratoire | Laboratoire de santé animale |
| Contact | Corinne SAILLEAU-Emmanuel BREARD ☎ : 01 49 77 27 07 e-mail : : corinne.sailleau@anses.fr; emmanuel.breard@anses.fr |

| | |
|----------------------------|--------------------------------------|
| Mandat de référence | Fièvre Catarrhale Ovine (FCO) |
|----------------------------|--------------------------------------|

| | |
|----------------|--|
| Objet | Contrôle initial de conformité d'un kit PCR en temps réel pour le typage du Virus FCO sérotype 12 |
| Cible | Génome du virus de la fièvre catarrhale ovine de sérotype 12 (FCO 12) |
| Méthode | PCR en temps réel |
| Matrice | Sang/Rate |

| | |
|---------------------------|-------------|
| Version | V1 |
| Date d'application | 2024 |

| Validation | | | |
|-------------------|--------------------------|-------------|------------------|
| Nom/Prénom | Fonction | Date | Signature |
| SAILLEAU Corinne | Responsable adjointe LNR | | |

Table des matières

| | |
|---|----------|
| Table des matières | 2 |
| 1. Introduction | 2 |
| 2. Référentiels et matériaux de référence | 3 |
| 3. Définitions | 3 |
| 4. Contexte et objectifs d'application du kit | 3 |
| 5. Réactif (ou trousse) et lot soumis au contrôle initial | 3 |
| 5-1 Description du réactif..... | 3 |
| 5.2 Matériel à fournir par le demandeur pour le contrôle de conformité | 4 |
| 5-3 Contrôle qualité..... | 4 |
| 6. Dossier technique à présenter par le demandeur du contrôle initial | 4 |
| 6.1 Caractérisation de la (RT)PCR pour des techniques qualitative, quantitative ou semi-quantitative/relative à un MRSI | 5 |
| 6.1.1 Caractérisation de la (RT)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 (RT)-PCR ($LD_{(RT)-PCR}$) | 5 |
| 6.1.4 Efficacité de la (RT)PCR..... | 5 |
| 6.1.5 Robustesse de la (RT)PCR | 5 |
| 6.1.6 Stabilité du réactif..... | 6 |
| 6.2 Caractérisation de la méthode complète (préparation échantillon/extraction/(RT)-PCR) pour des techniques qualitative, quantitative ou semi-quantitative/relative à un MRSI6 | 6 |
| 6.2.1 Limite de détection de la méthode ($LD_{méthode}$) | 6 |
| 6.2.2 Sensibilité et spécificité diagnostiques (<i>SeD</i> et <i>SpD</i>) | 6 |
| 6.2.3 Robustesse de la méthode (optionnelle) | 7 |
| 6.3 Synthèse des paramètres de performance et des niveaux d'exigence attendus | 7 |

1. Introduction

Ce cahier des charges précise aux demandeurs (producteurs et distributeurs de réactifs), les conditions générales nécessaires à la présentation d'un réactif PCR¹ en temps réel (PCR et Reverse Transcription-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 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. Par ailleurs, un dossier dépourvu d'informations confidentielles est fourni par le fabricant aux utilisateurs du kit.

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

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 kit sera utilisé dans le cadre des analyses officielles réalisées pour la surveillance de la FCO en France. L'objectif est la détermination du sérotype viral suite à une analyse positive au virus de la FCO en PCR en temps réel tout génotype. La trousse commerciale développée devra être de type duplex, permettant dans un seul tube l'amplification d'un ARN cible du virus de la FCO et d'un ARN de ménage présent dans le génome de ruminants (Internal Positive Control-IPC). La trousse commerciale devra détecter spécifiquement le sérotype 12 du virus de la FCO.

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...)

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

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, voir NF U 47-311). 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 fabrication², le mode de conditionnement (nature du récipient, mode de fermeture, volume), les modalités de conservation et la fiche de sécurité.
- Le projet de notice **à 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 SH.

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 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.).

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 les Normes NF U 47-311 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 ou reconnus 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.

² à l'exception des données touchant au secret industriel

6.1 Caractérisation de la (RT)PCR pour des techniques qualitative, quantitative ou semi-quantitative/relative à un MRSI³

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.

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 détecter à minima l'ARN de la souche BTV-12 ND 2024 et, si possible, les ARN issus de différentes souches de sérotype 12 du virus de la FCO.
- **Exclusivité** : la PCR devra être testée, à minima, sur les ARN des autres sérotypes du virus de la FCO présents en Europe et sur le virus de la MHE (à minima sur EHDV-8 FR2023). Certains de ces ARN peuvent être fournis sur demande par le LNR.

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/ADN ou d'un plasmide dosé en conditions de répétabilité intra série (répliques) et inter série (séries indépendantes).

La $LD_{(RT)-PCR}$ n'est pas requise pour le témoin non cible mais les essais pour la détermination de la LD ciblant le virus de la FCO-12 doivent se faire en présence des ARN ciblés par la RT-PCR IPC. Le demandeur apportera tous les éléments de la détermination de la $LD_{(RT)-PCR}$ (y compris la méthode et le matériel utilisés pour le dosage de son étalon).

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

A minima, quatre points de gamme répétés au moins deux fois devront être réalisés.

6.1.5 Robustesse de la (RT)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.

³ Matériaux de référence au seuil d'interprétation

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 exigé de détection (NED) fixé par le LNR ou, si aucun NED n'est fixé, 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 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-ADN/plasmide dosé).

Pour exemple :

- Température d'hybridation +/- 1°C

- Volume d'ARN +/- 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 3 fois la LD PCR) et 2 échantillons positifs, et devront donner des résultats conformes au statut des échantillons testés, pendant une durée supérieure à la durée de conservation fixée par le demandeur.

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/(RT)-PCR) pour des techniques qualitative, quantitative ou semi-quantitative/relative à un MRSI

Le demandeur doit préciser les modalités de préparation des échantillons et de prise d'essai si elles n'ont pas été définies par le LNR.

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.

6.2.1 Limite de détection de la méthode (LDméthode)

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.

La limite de détection de la méthode complète par matrice sera déterminée pour chaque kit d'extraction à partir d'un échantillon représentatif de la matrice initialement négative vis-à-vis du BTV12 ND et enrichie avec une souche virale titrée et inactivée fournie par le LNR.

6.2.2 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.

La spécificité diagnostique devra être déterminée à l'aide d'un panel d'une centaine d'échantillon de ruminants domestiques non infectés par le virus de la FCO-12 (la moitié du panel pourrait être infecté par le sérotype 8 ou 3). La sensibilité diagnostique devra être déterminée à partir d'un maximum d'échantillons positifs au virus de la FCO 12. Ces prélèvements devront contenir des charges virales représentatives du terrain (fortes et faibles). Le producteur de réactifs devra apporter les éléments de caractérisation de tous les échantillons testés.

6.2.3 Robustesse de la méthode (optionnelle)

Sans Objet

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

Un tableau doit être établi pour chacune des matrices et méthodes d'extraction proposées.

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) | Critères d'acceptation | Vérification LNR |
|--|-----------------------|---|---|------------------|
| Spécificité analytique° Analyse <i>in silico</i> | Qualitatif | Séquences disponibles dans les bases de données internationales + données LNR éventuelles | Détection de toutes les souches BTV-12 | non |
| Spécificité analytique° inclusivité | Qualitatif | Sur ARN de différentes souches de BTV-12 | Détection | oui |
| Spécificité analytique exclusivité | Qualitatif | Sur ARN des autres sérotypes BTV et EHDV présents en Europe | Pas de détection | oui |
| Limite de détection de la méthode (LD _{PCR}) | Qualitatif | Cf Norme PCR 47-600 partie2 | Détermination du nombre de copies de cible /prise d'essai | non |
| Efficacité / linéarité de la PCR | Qualitatif | A minima 4 points de gamme X 2 | Entre 75% et 125 % | oui |
| Robustesse de la PCR | Qualitatif | Faible(s) positif(s) sur variations volume/ température d'hybridation | Détection | non |
| Vérification de la stabilité | Qualitatif | Cf cahier des charges | 100 % de détection | Non |
| Limite de détection de la méthode (LD _{METHODE}) | Qualitatif | Cf cahier des charges | Nombre de copies de cible /prise d'essai | Non |
| Sensibilité diagnostique | Qualitatif | Sur échantillons disponibles | 100 % sur les échantillons à charge virale forte | Oui |

| | | | | |
|--------------------------|------------|--|-------|-----|
| Spécificité diagnostique | Qualitatif | A minima 100 échantillons négatifs en BTV-12 | >99 % | Non |
|--------------------------|------------|--|-------|-----|

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

À 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 conforme 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.