



RÉPUBLIQUE  
FRANÇAISE

Liberté  
Égalité  
Fraternité



Laboratoire de Santé  
Animale, site de  
Normandie

Unité physiopathologie  
et épidémiologie des  
maladies équine  
(PhEED)

Laboratoire National  
de Référence pour la  
métrite contagieuse  
équine

Dossier suivi par :  
Sandrine PETRY

Ligne directe :  
02 31 79 79 71

E-mail :  
sandrine.petry@anses.fr

Pièce jointe : Cahier des  
charges Contrôle de  
Conformité kit PCR MCE

A l'attention des acteurs du  
diagnostic *in vitro*, producteurs de kit  
PCR en temps réel pour le diagnostic  
en santé animale

Goustranville, le 08 avril 2024

**Objet : appel à manifestation d'intérêt (AMI) pour le contrôle initial de conformité de kits PCR en temps réel de détection de *Taylorella equigenitalis*, l'agent de la métrite contagieuse équine (MCE)**

Madame, Monsieur,

Cet AMI s'inscrit dans le cadre des missions du Laboratoire National de Référence (LNR) pour la MCE de contrôle initial de conformité de tout nouveau kit PCR en temps réel de détection de *T. equigenitalis* avant son utilisation par le réseau de laboratoires agréés pour le diagnostic de la MCE par PCR.

Un cahier des charges sur les performances attendues de la méthode est joint à ce courrier. Il décrit les différentes étapes du processus d'évaluation des kits soumis au LNR pour le contrôle initial de conformité.

Le présent AMI et le cahier des charges sont publiés sur le site internet de l'Anses (<https://www.anses.fr/fr/content/outils-diagnostiques-contr%C3%B4le-de-r%C3%A9actifs>).

Si vous êtes intéressés par cet AMI, je vous serai reconnaissante de nous en informer par courriel ([sandrine.petry@anses.fr](mailto:sandrine.petry@anses.fr)) d'ici le 06 mai 2024.

Le dossier de validation rattaché au kit PCR destiné à l'évaluation de la conformité initiale devra nous être adressé par courriel ([sandrine.petry@anses.fr](mailto:sandrine.petry@anses.fr)) d'ici le 24 juin 2024. 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 d'ici novembre 2024.

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

**Sandrine Petry**

Responsable du LNR pour la MCE

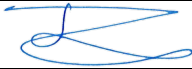



# CAHIER DES CHARGES-TYPE POUR LA PRÉSENTATION D'UN RÉACTIF PCR TEMPS RÉEL AU CONTRÔLE INITIAL DE CONFORMITÉ

<b>Laboratoire</b>	Laboratoire de Santé Animale, site de Normandie
<b>Contact</b>	Sandrine PETRY / Fabien DUQUESNE Unité physiopathologie et épidémiologie des maladies équine (PhEED) ☎ : 02 31 79 22 76 e-mail : <a href="mailto:sandrine.petry@anses.fr">sandrine.petry@anses.fr</a> ; <a href="mailto:fabien.duquesne@anses.fr">fabien.duquesne@anses.fr</a>

<b>Mandat de référence</b>	<b>LNR métrite contagieuse équine</b>
----------------------------	---------------------------------------

<b>Objet</b>	Contrôle initial de conformité d'un réactif ou kit PCR en temps réel pour le diagnostic de la métrite contagieuse équine
<b>Cible</b>	<i>Taylorella equigenitalis</i>
<b>Méthode</b>	Détection de <i>T. equigenitalis</i> par PCR en temps réel à partir de prélèvements génitaux d'équidés
<b>Matrice</b>	Ecouvillon (généralement placé en milieu Amies charbon)

<b>Version</b>	<b>00</b>
<b>Date d'application</b>	<b>1<sup>er</sup> février 2024</b>

<i>Validation</i>			
<i>Nom/Prénom</i>	<i>Fonction</i>	<i>Date</i>	<i>Signature</i>
PETRY Sandrine	Responsable LNR MCE	19/01/2024	
DUQUESNE Fabien	Chargé de projet	19/01/2024	
MELOCCO Marion	Responsable Qualité	19/01/2024	
VALLE-CASUSO José-Carlos	Chef d'Unité	19/01/2024	

## Table des matières

<b>1. Avant-propos</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Introduction</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Référentiels et matériaux de référence</b> .....	<b>3</b>
<b>4. Définitions</b> .....	<b>3</b>
<b>5. Contexte et objectifs d'application du kit</b> .....	<b>4</b>
<b>6. Réactif (ou trousse) et lot soumis au contrôle</b> .....	<b>4</b>
6.1. Description du réactif.....	4
6.2. Matériel à fournir par le demandeur pour le contrôle de conformité .....	4
6.3. Contrôle qualité .....	5
<b>7. Dossier technique à présenter par le demandeur</b> .....	<b>5</b>
7.1. Caractérisation de la PCR pour des techniques qualitative, quantitative ou semi-quantitative/relative à un MRSI .....	5
7.1.1. <i>Caractérisation de la PCR : analyse in silico (étude bio-informatique)</i> ....	5
7.1.2. <i>Inclusivité / Exclusivité</i> .....	5
7.1.3. <i>Limite de détection de la PCR (<math>LD_{PCR}</math>)</i> .....	6
7.1.4. <i>Efficacité de la PCR</i> .....	6
7.1.5. <i>Robustesse de la PCR</i> .....	6
7.1.6. <i>Stabilité du réactif</i> .....	6
7.2. Caractérisation complémentaire de la PCR pour des techniques quantitatives	6
7.3. Caractérisation de la méthode complète (préparation échantillon/extraction/PCR) pour des techniques qualitative, quantitative ou semi-quantitative/relative à un MRSI	6
7.3.1. <i>Caractérisation de la méthode</i> .....	7
7.3.1.1. <i>Limite de détection de la méthode (<math>LD_{METHODE}</math>)</i> .....	7
7.3.1.2. <i>Sensibilité et spécificité diagnostiques (<math>SeD</math> et <math>SpD</math>)</i> .....	7
7.3.1.3. <i>Robustesse de la méthode (optionnel)</i> .....	7
7.3.2. <i>Caractérisation complémentaire pour une méthode quantitative</i> .....	7
7.3.3. <i>Caractérisation de la méthode semi-quantitative/relative à un MRSI</i> .....	7
7.4. Synthèse des paramètres de performance et des niveaux d'exigence attendus	7

## 1. Avant-propos

La métrite contagieuse équine (MCE) est une maladie bactérienne des équidés dont le diagnostic est réalisé par un réseau de laboratoires agréés par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL). L'Anses, Laboratoire de Santé Animale site de Normandie, Unité physiopathologie et épidémiologie des maladies équines est Laboratoire National de Référence (LNR) pour la MCE depuis 2004 selon la NOTE DE SERVICE DGAL/SDRRC/N2004-8259 en date du 04 novembre 2004.

Au niveau national, les méthodes officielles pour le diagnostic de la MCE sont la bactériologie (norme NF U47-108) et la PCR (ANSES/LSA-INS-1433 et kits commerciaux listés sur le site du Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire).

Avant d'être soumis au contrôle initial par le LNR, les nouveaux réactifs ou kits de diagnostic doivent faire l'objet, par le développeur, d'un dossier de validation pour le diagnostic de la MCE.

La liste des laboratoires agréés pour le diagnostic de la MCE est consultable sur le site du Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire.

## 2. 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 et Reverse Transcription-PCR) au contrôle initial de conformité du LNR, en vue de l'obtention d'une attestation initiale de conformité prévue à l'article R. 202-37 du Code rural et de la pêche maritime.

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

## 3. Référentiels et matériaux de référence

- Norme AFNOR NF U47-600-1, 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 U47-600-2, 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 U47-301, Méthodes d'analyse en santé animale - Dossier de présentation pour le contrôle des réactifs biologiques ;
- Norme AFNOR NF U47-311, Méthodes d'analyse en santé animale - Contrôle de réactifs PCR (réaction de polymérisation en chaîne) utilisés dans le domaine de la santé animale ;
- Vadémécum des contrôles de réactifs à l'Anses (adresse page internet Anses) ;
- WOAH Terrestrial Manual 2022, Chapter 3.6.2. contagious equine metritis ;
- ANSES/LSA-INS-1433, Détection de *Taylorella equigenitalis* par PCR temps réel à partir de prélèvements génitaux d'équidés et de souches bactériennes (adresse page internet Anses) ;
- En l'absence de matériaux de référence (MR) externes, le LNR pour la MCE produits des MR internes ; il s'agit de sentinelles (SE) produites à partir des souches *T. equigenitalis* MCE 18 et *Taylorella asinigenitalis* MCE 5 selon le protocole disponible dans la méthode ANSES/LSA-INS-1433.

## 4. 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.

---

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

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

Selon les recommandations internationales (WOAH Terrestrial Manuel 2022, Chapter 3.6.2. contagious equine metritis), le diagnostic de la MCE repose sur l'isolement et l'identification de *T. equigenitalis* (France : norme AFNOR NF U47-108) et sur la détection de *T. equigenitalis* par PCR (France : ANSES/LSA-INS-1433 et kits commerciaux listés sur le site du Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire).

Les réactifs/kits PCR utilisés pour le diagnostic de la MCE peuvent l'être pour une analyse de première intention ou une analyse de confirmation. Dans tous les cas le résultat attendu est qualitatif. La méthode ne nécessite donc pas une quantification de la cible recherchée.

Ces réactifs/kits PCR doivent être en capacité de détecter *T. equigenitalis* à partir de la matrice « écouvillon génital d'équidé » généralement placé en milieu Amies charbon. La matrice « semence » peut également être utilisée mais uniquement en complément et non comme un substitut à l'écouvillonnage du cheval ; il est d'ailleurs précisé dans le Chapter 3.6.2 - WOAH Terrestrial Manuel 2022 que les méthodes disponibles pour le diagnostic de la MCE ont été validées pour une utilisation avec des écouvillons génitaux mais ne sont pas validées avec de la semence.

Toutes les méthodes d'extraction peuvent être utilisées incluant la lyse directe par chauffage. Un témoin interne de détection (endogène ou exogène) est nécessaire et doit être ajouté au plus tôt dans le processus analytique.

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

### 6.1. 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 :

- 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 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.

### 6.2. 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

Généralement une quantité suffisante pour réaliser au moins 250 réactions d'amplification et autant de réactifs de la ou des méthodes d'extraction proposées sont demandés. Le nombre de réactions à fournir sera ajouté après la première lecture du dossier de validation du demandeur soumis au LNR.

### 6.3. Contrôle qualité

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

## 7. Dossier technique à présenter par le demandeur

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

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

### 7.1. Caractérisation de la PCR pour des techniques qualitative, quantitative ou semi-quantitative/relative à un MRSI<sup>3</sup>

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

#### 7.1.1. 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.

#### 7.1.2. Inclusivité / Exclusivité

L'inclusivité est la capacité à détecter l'analyte cible y compris les différents sous-types ou autres variants pertinents compte tenu des objectifs d'utilisation du réactif. La PCR doit être testée sur un nombre pertinent de variants de l'organisme cible. L'inclusivité devra être testée avec un panel de souches de *T. equigenitalis* représentatif de la diversité génomique de l'espèce.

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 devra être testée à l'aide de souches bactériennes classiquement rencontrées dans la flore génitale des équidés (liste à titre d'exemple et non exhaustive : *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Mannheimia haemolytica*, *Nocardia* sp., *Oligella urethralis*, *Pantoea* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*) mais également avec des souches de *T. asinigenitalis*, seconde espèce du genre *Taylorella*.

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.

<sup>3</sup> Matériaux de référence au seuil d'interprétation

### 7.1.3. 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).

En cas de PCR multiplexe la  $LD_{PCR}$  devra *a minima* être déterminée sur la cible *T. equigenitalis* mais elle n'est pas requise pour le témoin positif non cible. Néanmoins les essais doivent inclure ce témoin positif non cible pour la détermination de la(les)  $LD_{PCR}$ . La norme AFNOR NF U47-600-2 préconise les modalités expérimentales de détermination d'une  $LD_{PCR}$ .

### 7.1.4. 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 ADN/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.

### 7.1.5. 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 gène de contrôle interne). Le niveau de 3 fois la  $LD_{PCR}$  du gène d'intérêt déterminé lors des essais d'évaluation de la sensibilité par le producteur ou le Niveau Exigé de Détection (NED) fixé par le LNR doit toujours être retrouvé positif, avec au moins 3 répétitions de l'analyse, quelles que soient les conditions expérimentales. La robustesse est testée avec l'échantillon ayant servi à la détermination de la  $LD_{PCR}$  (ADN ou plasmide dosé).

### 7.1.6. 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 satisfaisants 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).

## 7.2. Caractérisation complémentaire de la PCR pour des techniques quantitatives

Sans objet

## 7.3. Caractérisation de la méthode complète (préparation échantillon/extraction/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. 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.

### 7.3.1. Caractérisation de la méthode

#### 7.3.1.1. Limite de détection de la méthode ( $LD_{METHODE}$ )

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 AFNOR U47-600-2.

En cas de PCR multiplexe la  $LD_{METHODE}$  devra *a minima* être déterminée sur la cible *T. equigenitalis* mais elle n'est pas requise pour le témoin positif non cible.

En l'absence d'un échantillon biologique dosé, il est recommandé au demandeur de suivre la méthodologie 2 de la norme AFNOR NF U47-600-2 : utilisation d'une solution contenant la cible biologique (*T. equigenitalis*) qui servira à doper la matrice écouvillon. Il n'est pas nécessaire de déterminer la  $LD_{METHODE}$  pour la matrice souche bactérienne, celle-ci correspondant à la  $LD_{PCR}$ . Si la matrice semence est préconisée dans la notice du réactif/kit PCR du demandeur alors la  $LD_{METHODE}$  devra également être déterminée avec cette matrice.

La  $LD_{METHODE}$  devra être déterminée en fonction des méthodes d'extraction préconisées dans la notice du réactif/kit PCR du demandeur.

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

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

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

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.

Les écouvillons de terrain utilisés devront être de statut connu au regard de la cible et ce, sur la base d'un résultat d'analyse par culture selon la norme AFNOR NF U47-108 ou par PCR selon la méthode ANSES/LSA-INS-1433 ou l'aide d'un kit PCR listé sur le site du Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire (une analyse par immunofluorescence selon la norme AFNOR NF U47-110 est également possible).

En l'absence d'écouvillons de terrain positifs, la sensibilité diagnostique pourra être déterminée à l'aide d'un panel d'écouvillons de terrain de statut négatif dopés avec des suspensions de *T. equigenitalis*. Au moins deux niveaux de positivité (faible et fort positif) devront être testés.

#### 7.3.1.3. Robustesse de la méthode (optionnel)

La robustesse est définie comme la capacité de la méthode à ne pas être affectée par de petits changements dans les paramètres jugés critiques par le développeur, tels que temps et température d'incubation, concentrations des réactifs... L'étude de robustesse permet ainsi de valider les conditions d'emploi du protocole du réactif/kit PCR. Elle doit être évaluée sur les paramètres opératoires jugés les plus critiques tels que la méthode d'extraction, le thermocycleur voire la durée et les conditions de conservation de la matrice écouvillon avant sa mise en œuvre.

### 7.3.2. Caractérisation complémentaire pour une méthode quantitative

Sans objet

### 7.3.3. Caractérisation de la méthode semi-quantitative/relative à un MRSI

Sans objet

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

Les paramètres, niveaux de performance et résultats attendus sont synthétisés dans un tableau au format présenté du Tableau 1 ci-après. Le fournisseur utilisera ce modèle de tableau pour synthétiser l'ensemble des résultats qu'il aura obtenus.



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

Paramètres	Performance à évaluer	Moyens mis en œuvre (échantillons et conditions)	Résultats attendus	Résultats obtenus
Sensibilité analytique (LD <sub>PCR</sub> )	Oui			
Efficacité / linéarité de la PCR	Oui			
Limite de quantification de la PCR	Non			
Spécificité analytique : analyse <i>in silico</i>	Oui			
Spécificité analytique : inclusivité	Oui		100% détection	
Spécificité analytique : exclusivité	Oui		100% non détection	
Robustesse de la PCR	Oui		100% détection	
Vérification de la stabilité	Oui		Pas de diminution significative des valeurs de Ct	
Limite de détection de la méthode (LD <sub>METHODE</sub> )	Oui			
Sensibilité diagnostique	Oui		100% détection	
Spécificité diagnostique	Oui		≥ 95% non détection	
Limite de quantification de la méthode (PCR quantitative)	Non			
Domaine de validation, justesse et fidélité (Profil d'exactitude de la PCR quantitative)	Non			
Fidélité au seuil d'interprétation (PCR relative à un MRSI)	Non			
Robustesse de la méthode	Optionnel			