

**Laboratoire de
Ploufragan-Plouzané-
Niort**

**Unité Virologie,
Immunologie et
Parasitologie Aviaires et
Cunicoles**

*Laboratoire national de
référence pour l'influenza
aviaire et la maladie de
Newcastle*

Dossier suivi par :
Audrey SCHMTIZ

Ligne:
02.96.01.64.11

E- mail :
audrey.schmitz@anses.fr
LNR_influenza_aviaire@anses.fr

N. Réf. :
240009

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

Ploufragan, le 13 mai 2024

Objet : appel à manifestation d'intérêt (AMI) pour la campagne 2024 de contrôle initial de conformité des trousses de détection d'anticorps dirigés contre l'hémagglutinine de sous-type H5 des virus influenza aviaires (IA) par la méthode ELISA à partir de sérums aviaires.

Madame, Monsieur,

Cet appel à manifestation d'intérêt ouvre la campagne 2024 de contrôle initial de conformité des trousses commerciales de détection d'anticorps dirigés contre l'hémagglutinine de sous-type H5 des virus de l'influenza aviaire (IA) de type A par la méthode ELISA à partir de sérums aviaires. Ce contrôle est organisé par le Laboratoire national de référence (LNR) pour l'influenza aviaire dans le cadre de ses missions réglementaires, dans un objectif d'évolution des outils de diagnostic sérologique de surveillance IA en accord avec le Règlement 2016/429 (« législation sur la santé animale ») et les méthodes recommandées par le manuel OMSA.

Le cahier des charges version 00 en date du 13 mai 2024 décrivant les caractéristiques et performances attendues des trousses de détection d'anticorps dirigés contre l'hémagglutinine de sous-type H5 des virus de l'influenza aviaire (IA) de type A par méthode ELISA qualitative à partir de sérums aviaires individuels est joint à ce courrier. Il décrit également le processus d'évaluation des dossiers de caractérisation (préparés par le fournisseur) et des trousses soumises au LNR. L'ensemble des documents, courrier AMI et cahier des charges, est publié sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

Si vous êtes intéressés par cet AMI, je vous prie de nous informer par courriel (LNR_influenza_aviaire@anses.fr), pour le **31 mai 2024** au plus tard, du nombre de trousses qui seront soumises au contrôle. Nous vous enverrons en réponse le devis correspondant au processus d'évaluation lui-même (parties administrative, documentaire et technique réalisées par le LNR).

La fourniture des matériaux de référence est proposée sur ce même devis et l'ensemble de la prestation et de la vente est réalisée selon les conditions générales de vente de l'Anses, publiées sur le site internet de l'Anses.

Le dossier final destiné au contrôle initial de conformité devra nous parvenir **le 6 septembre 2024** au plus tard par courriel à la même adresse que précédemment. Les réactifs nécessaires, et en quantité suffisante pour le contrôle initial de conformité, devront également nous être envoyés avant le 6 septembre 2024. Les dossiers, sous réserve qu'ils soient complets, seront étudiés dans leur ordre d'arrivée au LNR avec, en cas d'approbation, une émission du certificat fin décembre 2024.

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

Éric NIQUEUX
Responsable-adjoint du LNR Influenza Aviaire

Audrey SCHMITZ
Responsable-adjoint du LNR Influenza Aviaire



CAHIER DES CHARGES POUR LE CONTROLE INITIAL DE CONFORMITE D'UNE TROUSSE DE DETECTION D'ANTICORPS DIRIGES CONTRE L'HÉMAGGLUTININE DE SOUS-TYPE H5 DES VIRUS INFLUENZA AVIAIRES DE TYPE A PAR LA METHODE ELISA A PARTIR DE SERUM AVIAIRE.

Laboratoire	Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort
Contact	Audrey SCHMITZ
Tél	02-96-01-64-11
Mail	LNR_influenza_aviaire@anses.fr

Mandat de référence	LNR pour l'Influenza Aviaire
----------------------------	------------------------------

Objet	Trousses de diagnostic qualitatives pour la détection d'anticorps dirigés contre l'hémagglutinine de sous-type H5 des virus influenza aviaires de type A à partir de sérums aviaire
Cible	Anticorps dirigés contre l'hémagglutinine de sous-type H5 des virus influenza aviaires de type A
Méthode	ELISA qualitatif
Matrice	Sérum aviaire individuel
Version	00
Date d'application	04/2024


Validation			
Nom/Prénom	Fonction	Date	Signature
NIQUEUX Éric	Responsable-adjoint LNR Influenza aviaire	13 mai 2024	

Table des matières

1. Introduction.....	3
2. Référentiels et matériaux de référence	3
3. Définitions	4
4. Contexte et objectifs d'application du réactif.....	4
5. Descriptif du réactif et du lot soumis au contrôle.....	4
5.1 Description	4
5.2 Matériel à fournir par le demandeur pour le contrôle de conformité	5
5.3 Contrôle qualité interne	5
6. Dossier technique à présenter par le demandeur	5
6.1 Échantillons (matrices biologiques : sérums individuels)	6
6.2 Validation des séries d'essai et modalités d'interprétation des résultats	6
6.3 Caractérisation des réactifs sérologiques pour des techniques qualitatives ou semi-quantitatives	6
6.3.1 Inclusivité et exclusivité.....	6
6.3.2 Limite de détection (LD)	7
6.3.3 Cohérence de la loi dose-effet	7
6.3.4 Répétabilité (intraessai)	7
6.3.5 Fidélité intermédiaire (reproductibilité intralaboratoire).....	8
6.3.6 Reproductibilité (reproductibilité interlaboratoires)	8
6.3.7 Sensibilité et spécificité diagnostique	8
6.3.8 Robustesse.....	9
6.3.9 Stabilité.....	9
6.5 Synthèse des paramètres et des niveaux d'exigence attendus	10

1. Introduction

Ce cahier des charges précise aux demandeurs (producteurs et distributeurs de réactifs) les conditions générales nécessaires à la présentation d'un réactif de diagnostic immunologique (technique immunoenzymatique), 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.

2. Référentiels et matériaux de référence

- Norme AFNOR XP U47-310, Méthodes d'analyse en santé animale – Contrôle de réactifs biologiques pour les techniques immunologiques utilisées dans le domaine de la santé animale
- Norme AFNOR NF U 47-301, Méthodes d'analyse en santé animale – Dossier de présentation pour le contrôle des réactifs biologiques utilisés dans le domaine de la santé animale
- Norme AFNOR NF U 47-300, Méthodes d'analyse en santé animale – Terminologie
- Norme AFNOR NF U 47-020, Méthodes d'analyse en santé animale - Guide de bonnes pratiques de traitement de l'échantillon soumis à des analyses immuno-sérologiques
- Norme AFNOR NF U47-019, Méthodes d'analyses en santé animale - Exigences et recommandations pour la validation, l'adoption et la mise en œuvre des techniques ELISA
- Norme AFNOR NF ISO 5725-3. Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 3 : fidélité intermédiaire et plans alternatifs pour les études collaboratives.
- Matériau de référence positif : vendu par le laboratoire Ploufragan/Plouzané/Niort unité VIPAC sur devis
 - sérum hyperimmun de poules immunisées avec la souche H5N3 FP A/muscovyduck/France/070090b/2007
 - sérum hyperimmun de poules immunisées avec la souche H5N8 HP A/decoyduck/France/161105a/2016
 - sérum de canard mulard infectés avec le virus H5N1 HP A/chicken/France/D2107428/2021
- Matériau de référence négatif : vendu par le laboratoire Ploufragan/Plouzané/Niort unité VIPAC sur devis
 - sérum issu de poulets EOPS (exempts d'organisme pathogène spécifié). Toute dilution de sérum positif de poulet devra être réalisée avec ce matériau ou avec tout autre sérum de galiformes de statut négatif démontré vis-à-vis de l'IA.
 - sérum issu de canards barbarie EOPS. Toute dilution de sérum positif de canard (pékin / barbarie / mulard) devra être réalisée avec ce matériau ou avec tout autre sérum de statut de canard (pékin / barbarie / mulard) négatif démontré vis-à-vis de l'IA.

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 cités supra.

4. Contexte et objectifs d'application du réactif

L'influenza aviaire (IA) est une maladie infectieuse causée par des virus Influenza de type A, qui peuvent infecter de très nombreuses espèces d'oiseaux domestiques et sauvages. La surveillance de cette maladie est règlementée au plan international. La surveillance repose sur un maillage étroit du territoire national grâce à un réseau permanent de surveillance et de diagnostic utilisant des méthodes officialisées par le ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, répondant aux exigences du Règlement 2016/429 (« législation sur la santé animale ») et du Règlement 2017/625 (« concernant les contrôles officiels »).

Ce document présente le cahier des charges établi par le laboratoire national de référence (LNR) pour l'influenza aviaire pour décrire les caractéristiques et performances minimum que doivent présenter les trousse de diagnostic qualitatives pour la détection d'anticorps dirigés contre l'hémagglutinine de sous-type H5 des virus influenza aviaries de type A à partir de sérums aviaries, afin que les dites trousse soient déclarées conformes en vue du dépistage des virus IA de sous-type H5, dans le cadre des analyses de surveillance du virus influenza aviaire.

Les trousse présentées au contrôle de conformité doivent permettre le diagnostic indirect de l'infection par des virus de l'IA de sous-type H5 chez les volailles et la détermination du statut immunitaire des troupeaux de volailles après vaccination vis-à-vis des virus de sous-type H5. La méthode retenue doit être un ELISA qualitatif, utilisable sur un éventail de sérums individuels d'espèces aviaries incluant a minima : poule, dinde, canard pékin, canard barbarie et canard mulard.

5. Descriptif du réactif et du lot soumis au contrôle

5.1 Description

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 (références 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 du réactif et la durée de validité du lot 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 (indiquer les critères de définition d'un lot, étant entendu que pour un numéro de lot donné de chaque trousse correspond à un ensemble unique de numéros de lots de chaque constituant dans leur forme finale). Le numéro, la taille du lot, sa durée de validité ainsi que le numéro de lot des différents constituants du réactif sont décrits.

Le demandeur joint en annexe du 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 fabrication¹, 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 XP U47-310,
- 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...) doivent être décrites pour tous les types d'échantillon.

5.2 Matériel à fournir par le demandeur pour le contrôle de conformité

Le demandeur mettra gratuitement à disposition la quantité de réactif nécessaire et précisée par le LNR pour réaliser le contrôle initial et de vérifier d'autres paramètres que le LNR jugera nécessaire de vérifier.

5.3 Contrôle qualité interne

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

NB : il est conseillé au fabricant de créer un matériau de référence interne de niveau équivalent au NED, à tester et vérifier lors de chaque validation de lot.

6. Dossier technique à présenter par le demandeur

Avertissement important : La liste et les définitions des paramètres décrits ci-dessous sont fondées sur la Norme XP U47-310. 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 contrôle, 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 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 alors avoir été mis en œuvre par des laboratoires prestataires indépendants du fabricant. L'intégralité des résultats bruts et, le cas échéant, transformés selon la notice du fabricant, validée par le responsable du laboratoire prestataire concerné, doit être communiquée au LNR.

¹ à l'exception des données touchant au secret industriel

6.1 Échantillons (matrices biologiques : sérums individuels)

Le demandeur doit décrire les échantillons pouvant être analysés au moyen du réactif proposé. Dans le cas où plusieurs types d'échantillons peuvent être analysés, l'évaluation des performances du réactif doit être menée pour chacun des types d'échantillon.

Le demandeur doit préciser les modalités de préparation des échantillons et de prise d'essai.

6.2 Détermination du seuil d'interprétation (ou seuil diagnostique), validation des séries d'essai et modalités d'interprétation des résultats

Le demandeur doit décrire la méthodologie suivie (nombre et description des échantillons, calculs et statistiques) et les résultats obtenus pour déterminer les seuils selon les objectifs d'application.

Les conditions de validation des séries d'essais indiquées dans la notice doivent être justifiées par les résultats d'essais appropriés.

Les modalités d'interprétation (critères de validité de l'essai, formule de calcul, ...) et 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.

6.3 Caractérisation des réactifs sérologiques pour des techniques qualitatives ou semi-quantitatives

Le demandeur doit présenter les essais réalisés pour déterminer les valeurs des paramètres évalués et les résultats obtenus, comme décrit ci-après.

6.3.1 Inclusivité et exclusivité

L'inclusivité est la capacité d'un réactif à détecter l'analyte cible visé, y compris les différentes sous-catégories d'analytes (en fonction de l'analyte ciblé, souches ou sous-types d'une même espèce, d'un même genre ou d'un groupe d'organismes ou anticorps correspondants).

Il est demandé au fabricant de tester a minima 5 sérums présentant des anticorps dirigés contre le sous-type IA H5, en précisant la pathogénicité du virus impliqué dans l'infection ou immunisation, et toute information disponible précisant le lignage génétique de l'hémagglutinine H5 du virus. Le LNR complètera les tests à l'aide d'un panel de sérums issus d'infections ou d'immunisations avec des souches IA H5 faiblement pathogènes et hautement pathogènes. Le critère d'acceptabilité est 100% de détection d'anticorps pour l'ensemble des sérums testés dans le cadre de l'évaluation de l'inclusivité.

L'exclusivité est la capacité d'un réactif à ne pas détecter d'autres analytes que la cible, pouvant potentiellement provoquer des réactions croisées.

Il est demandé au fabricant de tester des sérums présentant des anticorps dirigés contre des pathogènes autres que IA de sous-type H5, en privilégiant les maladies respiratoires : a minima 5 sérums présentant des anticorps contre un virus IA autre que H5 (dont au moins un sérum présentant des anticorps contre un virus IA de sous-type H2) et 3 sérums présentant des anticorps contre un virus autre que IA, par exemple APMV1, bronchite infectieuse, laryngotrachéite infectieuse, métapneumovirus aviaire. Le LNR complètera les tests à l'aide d'un panel de sérums. Le critère d'acceptabilité est 100% d'absence de détection d'anticorps pour l'ensemble des sérums testés dans le cadre de l'évaluation de l'exclusivité.

6.3.2 Limite de détection (LD)

La limite de détection (ou sensibilité analytique), correspond à la quantité minimale d'analyte décelable avec un niveau de confiance défini, correspondant à la quantité minimale d'analyte donnant une réponse positive avec le réactif considéré.

La LD est évaluée en analysant trois matériaux de référence permettant de vérifier le niveau exigible de détection (NED) défini pour chacun de ces matériaux de référence, en conditions de répétabilité intra séries (répliques) et inter séries (séries indépendantes).

Il est demandé au fabricant de tester 10 répétitions de chaque NED réalisées 3 fois en condition de fidélité intermédiaire en faisant varier le maximum de paramètres (manipulateur/jour/pipettes) des trois matériaux de référence aux dilutions suivantes :

- sérum hyperimmun de poules immunisées avec la souche H5N3 A/muscovyduck/France/070090b/2007 : référence « Sp_H5N3_070090b lot 7 » à la dilution 1/2
- sérum hyperimmun de poules immunisées avec la souche H5N8 A/decoyduck/France/161105a/2016 : référence « Sp_H5N8_161105a lot 2 » à la dilution 1/5
- sérum de canard mulard infectés avec le virus H5N1 HP A/chicken/France/D2107428/2021 : référence « MR5_ELISA H5 » à la dilution 1/5.

Le critère d'acceptabilité est 100% de détection d'anticorps pour l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de la vérification de la limite de détection.

6.3.3 Cohérence de la loi dose-effet

A partir d'un matériau de référence fortement positif permettant à certains niveaux de dilution de couvrir la zone de linéarité et les points d'inflexion, et encadrant le NED, la loi dose-effet est vérifiée sur un minimum de 4 dilutions à déterminer par le LNR.

Il est demandé de tester le sérum hyperimmun de poules immunisées avec la souche H5N8 A/decoyduck/France/161105a/2016 lot 2, a minima aux dilutions de pur, 1/5, 1/10, 1/20 et 1/50, deux répétitions par niveau répétées sur deux plaques.

Les valeurs numériques transformées (par exemple rapport de DO, pourcentage d'inhibition) doivent être présentées, montrant la variation monotone du signal par rapport à la variation de la quantité d'analyte présent.

6.3.4 Répétabilité (intra-essai)

La répétabilité est l'étroitesse de l'accord entre des analyses répétées d'un même échantillon, avec un même réactif, dans un même laboratoire au cours du même essai (même réactif, conditions opératoires identiques). Dans le cas où la méthode nécessite un prétraitement ou une dilution de l'échantillon, ces étapes doivent être mises en œuvre pour chacune des répliques.

Il est demandé de tester le sérum hyperimmun de poules immunisées avec la souche H5N8 A/decoyduck/France/161105a/2016 lot 2 à la dilution la plus proche de la limite de positivité, associée au seuil d'interprétation, de la trousse étudiée (en se rapprochant des résultats obtenus lors des essais de la cohérence loi dose-effet) ou tout autre sérum calibré à un niveau de concentration équivalent par le fabricant, sur trois plaques entièrement remplies dans des conditions de répétabilité.

Les résultats doivent être exprimés sous la forme d'un coefficient de variation (CV) de répétabilité intra plaque, calculé sur les valeurs brutes (DO).

Le critère d'acceptabilité est un CV maximum intra-plaque de répétabilité de 20%, et un écart, soit une différence inférieure à 10%.entre le plus grand et le plus petit

6.3.5 Fidélité intermédiaire (reproductibilité intralaboratoire)

Étroitesse de l'accord entre des analyses répétées d'un même échantillon, avec un même réactif, au sein du même laboratoire dans plusieurs séries d'essais faisant varier les conditions opératoires d'un même protocole technique (manipulateurs, matériel, jours, moment de la journée...).

Il est demandé de tester le sérum hyperimmun de poules immunisées avec la souche H5N8 A/decoyduck/France/161105a/2016 lot 2 en utilisant trois niveaux de dilutions, dont un niveau équivalent au NED et un niveau correspondant à la dilution la plus proche de la limite de positivité, associée au seuil d'interprétation de la trousse étudiée (en se rapprochant des résultats obtenus lors des essais de la cohérence loi dose-effet). Ces trois niveaux de dilutions doivent être situés dans la gamme linéaire, et sont analysés dans six séries d'analyse différentes en faisant varier les facteurs les plus susceptibles d'influer sur la fidélité d'un essai. Ces essais doivent inclure au moins 2 opérateurs sur plusieurs jours différents. Lorsque les résultats bruts sont chiffrés, les données transformées (pourcentage de DO, pourcentage d'inhibition, par exemple) permettent de calculer le CV de fidélité intermédiaire.

L'écart-type et le CV de fidélité intermédiaire sont calculés, en tenant compte du nombre de répliques analysées par niveau de dilution et série d'analyses réalisée, en utilisant la méthodologie adéquate de la norme NF ISO 5725-3.

Le critère d'acceptabilité pour chaque niveau est un CV de fidélité intermédiaire maximum de 20%.

6.3.6 Reproductibilité (reproductibilité interlaboratoires)

Étroitesse de l'accord entre des analyses répétées d'un même échantillon, avec un même réactif, dans des laboratoires différents en suivant le même protocole technique.

Ce paramètre est non exigé ici.

6.3.7 Sensibilité et spécificité diagnostique (par rapport à un seuil d'interprétation)

La sensibilité « diagnostique » (SeD) est la proportion d'échantillons donnant un résultat positif avec la trousse soumise au contrôle selon le(s) seuil(s) défini(s) par le demandeur ou la réglementation en vigueur parmi ceux définis comme positifs pour la cible selon les critères du LNR ou de la réglementation

La spécificité « diagnostique » (SpD) est la proportion d'échantillons donnant un résultat négatif avec la trousse soumise au contrôle selon le(s) seuil(s) défini(s) par le demandeur ou la réglementation en vigueur parmi ceux définis comme négatifs pour la cible selon les critères du LNR ou de la réglementation (indemnes par exemple ; cf. chapitre « définitions » de ce cahier des charges).

Ces caractéristiques de la méthode doivent être mesurées à partir d'un panel représentatif d'échantillons du terrain correspondant aux domaines et limites d'utilisation précisés dans la notice, a minima :

- 20 sérums positifs H5 du terrain issus d'infections ou immunisation avec des souches faiblement pathogènes (minimum 5) et des souches hautement pathogènes (minimum 5)
- 50 sérums négatifs du terrain

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 paramètres de sensibilité et spécificité diagnostique seront également évalués par le LNR.

Les interprétations seront faites, lorsque cela est applicable, au niveau du lot de sérums testés (notion de conclusion sur un troupeau ; un lot correspond à des prélèvements provenant d'un même élevage, même INUAV, même date de prélèvement). Les critères d'acceptabilité au niveau des lots seront d'au moins 98% de spécificité (SpD) et 95% de sensibilité (SeD).

6.3.8 Robustesse

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, etc ».

L'étude de robustesse permet ainsi de valider les conditions d'emploi du protocole.

Elle doit être évaluée sur les paramètres opératoires jugés les plus critiques de la méthode.

La vérification des conditions d'emploi / robustesse doit être effectuée aux bornes des fourchettes indiquées pour un protocole technique spécifié.

Au minimum, les caractéristiques de performance décrites au point 6.3.2 (Limite de détection) doivent être évaluées, avec les mêmes critères d'acceptabilité que définis plus haut.

6.3.9 Stabilité

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 de stabilité doivent porter au minimum sur 2 échantillons négatifs, 2 échantillons au NED ou équivalent du NED 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 doivent être définis au début de l'étude.

Si au moment du dépôt des dossiers, les données disponibles ne correspondent pas à la durée et aux modalités de conservation prévues sur la notice ou sur l'emballage (exemple vieillissement rapide), le demandeur s'engage à les actualiser en suivant la stabilité sur au moins 3 lots fabriqués dans les conditions finales de production et de commercialisation et à transmettre les données au fur et à mesure au LNR.

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.

6.5 Synthèse des paramètres et des niveaux d'exigence attendus

Les paramètres et niveaux de d'exigence attendus par le LNR sont synthétisés dans le Tableau 1 ci-dessous. Un tableau est établi pour chacune des matrices ou des différents types d'échantillon proposés. Le fournisseur utilisera ce modèle de tableau pour synthétiser l'ensemble des résultats qu'il aura obtenus.

Tableau 1. Critères évalués *a minima* par le demandeur et présentés dans le dossier de validation pour un test qualitatif

Paramètres	Moyens mis en œuvre (Nombre d'échantillons et conditions testés)	Résultats attendus
Inclusivité/Exclusivité	5 sérums présentant des anticorps dirigés contre les sous-types IA H5. 5 sérums présentant des anticorps dirigés contre IA autre que H5 (dont au moins un sérum présentant des anticorps contre un virus IA de sous-type H2). 3 sérums présentant des anticorps contre virus autre que IA.	100% en inclusivité 100% en exclusivité
Limite de détection	10 répétitions de trois NED réalisées 3 fois en condition de fidélité intermédiaire. 3 matériaux de référence : Sp_H5N3_070090b lot 7 à la dilution 1/2 Sp_H5N8_161105a lot 2 à la dilution 1/5 MR5_ELISA H5 testé à la dilution 1/5	100% de détection d'anticorps
Cohérence de la loi dose-effet	Matériau de référence testé aux dilutions indiquées, deux répétitions par niveau répétées sur deux plaques : Sp_H5N8_161105a lot 2 testé aux dilutions de pur, 1/5, 1/10, 1/20 et 1/50	Variation monotone du signal.
Répétabilité intra-essai	Sérum Sp_H5N8_161105a lot 2 à la dilution la plus proche de la limite de positivité, associée au seuil d'interprétation, de la trousse étudiée Testé sur trois plaques entièrement remplies dans des conditions de répétabilité.	CV max intra-plaque de 20%, écart maximum de 10% entre les 3 CV.
Fidélité intermédiaire	Matériau de référence Sp_H5N8_161105a lot 2 en utilisant trois niveaux de dilutions, dont un niveau équivalent au NED et un niveau correspondant à la dilution la plus proche de la limite de positivité, associée au seuil d'interprétation, de la trousse étudiée Test des trois niveaux de dilutions dans six séries d'analyse différentes en faisant varier les facteurs les plus susceptibles d'influer sur la fidélité d'un essai.	CV de fidélité intermédiaire maximum de 20%.
Sensibilité diagnostique	Panel représentatif d'échantillons du terrain correspondant aux domaines et limites d'utilisation précisés dans la notice, a minima : 20 sérums positifs H5 du terrain issus d'infections ou immunisation avec des souches faiblement pathogènes (minimum 5) et des souches hautement pathogènes (minimum 5)	≥ 95% de sensibilité diagnostique

Spécificité diagnostique	Panel représentatif d'échantillons du terrain correspondant aux domaines et limites d'utilisation précisés dans la notice, a minima : 50 sérums négatifs du terrain	≥ 98% de spécificité diagnostique
Robustesse Vérification des conditions d'emploi	Évaluée sur les paramètres opératoires jugés les plus critiques de la méthode.	Obtention des critères définis ci-dessus. Au minimum, la limite de détection doit être évaluée, avec les mêmes modalités et critères d'acceptabilité que définis plus haut.
Vérification de la stabilité	Sur 2 échantillons négatifs, 2 échantillons au NED ou équivalent du NED et 2 échantillons positifs	Résultats qualitatifs concordants

Le LNR vérifiera également certains paramètres, *a minima* la limite de détection (sensibilité analytique), la cohérence de la loi dose-effet, la sensibilité diagnostique et la spécificité diagnostique, selon les critères d'acceptabilité décrits plus haut.

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 Direction générale de l'alimentation (DGAI) de la disponibilité d'un nouveau réactif contrôlé. La liste ou les certificats des trousse contrôlées conformes sont disponibles sur le site de l'Anses en précisant la technique, le nom du fabricant, le nom et le code de la trousse, le protocole d'utilisation de la trousse, la matrice et la date d'attestation de conformité.