



**RÉPUBLIQUE  
FRANÇAISE**

*Liberté  
Égalité  
Fraternité*



**Laboratoire de santé  
animale de Maisons-  
Alfort**

**Unité Zoonoses  
Bactériennes**

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

Maisons-Alfort, le 10 décembre 2021

**Dossier suivi par :**  
María Laura Boschioli  
& Laetitia Charron

**Ligne directe :**  
01.49.77.13.21  
01.49.77.23.04

**E- mail :**  
LNR.tuberculose@anses.fr  
valorisation@anses.fr

**N. Réf. :**

**Objet : appel à manifestation d'intérêts pour la mise au point de kits  
de diagnostic immunologique permettant la détection de la  
tuberculose des suidés**

Madame, Monsieur

Cet appel à manifestation d'intérêt (AMI) s'inscrit dans le cadre d'une démarche initiée par le Laboratoire National de Référence Tuberculose de l'ANSES-Maisons-Alfort pour la validation de nouveaux kits commerciaux utilisables dans les laboratoires agréés pour la réalisation des analyses de première intention de la tuberculose des suidés. Les kits présentés doivent permettre une mise en évidence simple, rapide de l'agent recherché dans les prélèvements d'intérêt tels que les sérums ou les supports buvards. Un cahier des charges sur les performances attendues des kits de détection de la tuberculose des suidés est joint à ce courrier. Ce document décrit également les différentes étapes du processus d'évaluation des kits soumis au LNR.

Nous vous serons reconnaissantes de témoigner votre intérêt et de retourner vos propositions en première intention relatives à ce projet d'ici le **4 février 2022**. Merci d'adresser votre réponse par courrier électronique à l'adresse suivante : LNR.tuberculose@anses.fr

Au-delà de cette date, nous considérerons que vous n'êtes pas intéressé par cette proposition.

Nous vous prions d'agréer, Madame, Monsieur, l'expression de nos salutations distinguées.

María Laura Boschioli

# CAHIER DES CHARGES POUR LA PRESENTATION AU CONTROLE INITIAL DE CONFORMITE de Trousses de DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE (Technique ELISA) de TUBERCULOSE DES SUIDES

Laboratoire de Santé animale de Maisons Alfort

Laboratoire national de référence

Unité Zoonoses Bactériennes

Tuberculose

**Adresse** : 14 rue Pierre et Marie Curie

94701 Maisons-Alfort Cedex

Mandat de Référence : Laboratoire National de Référence « Tuberculose »

**Contact**

**Responsable LNR** : BOSCHIROLI Maria-Laura

**Suivi Dossier** : Sylvie HENault

☎ : 01 49 77 13 26

e-mail : [LNR.tuberculose@anses.fr](mailto:LNR.tuberculose@anses.fr)

<b>Objet</b>	Développement de kits de diagnostics en santé animale
<b>Cible</b>	<b>Mycobactéries</b>
<b>Méthode</b>	ELISA
<b>Matrice</b>	Sérum / Buvard

<b>Version</b>	<b>00</b>
<b>Date d'application</b>	

## Validation

Nom/Prénom	Fonction	Date	Signature
Maria-Laura BOSCHIROLI	Responsable LNR	12/04/2021	MLB

## Table des matières

Avant-propos .....	3
Introduction .....	3
1. Référentiels et matériaux de référence .....	4
2. Définitions .....	4
3. Contexte et objectifs d'application du réactif .....	5
4. Descriptif du réactif et du lot soumis au contrôle .....	5
5. Contrôles qualité (pour les réactifs de catégorie B) .....	6
6. Réactifs à fournir par le demandeur pour le contrôle de conformité.....	6
7. Dossier technique à présenter par le demandeur .....	6
7.1 Echantillons (matrices biologiques) .....	7
7.2 Validation des séries d'essai et modalités d'interprétation des résultats.....	7
7.3 Caractérisation des réactifs sérologiques pour des techniques qualitatives.....	7
Spécificité analytique - exclusivité.....	7
Sensibilité analytique (ou limite de détection).....	7
Cohérence de la loi dose-effet.....	7
Sensibilité et spécificité diagnostique .....	8
Répétabilité intra-essai .....	8
Reproductibilité intra-laboratoire .....	8
Reproductibilité inter-laboratoire .....	8
Robustesse.....	9
Stabilité.....	9
ANNEXE A : Préparation de BUVARDS Suidés avant ELISA .....	10

## Avant-propos

La tuberculose bovine est une maladie dont le diagnostic fait l'objet d'analyses officielles (NOTE DE SERVICE, DGAL/SDSPA/N2010-8305,08/11/2010) pour lesquelles l'Unité Zoonoses Bactériennes du Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort est réglementairement Laboratoire National de Référence « tuberculose » depuis 1999 (Arrêté du 29 décembre 2009 modifié désignant les laboratoires nationaux de référence dans le domaine de la santé publique vétérinaire et phytosanitaire).

Cette maladie causée principalement par *Mycobacterium bovis*, est une pathologie infectieuse majeure en filière bovine qui constitue une problématique sanitaire très coûteuse pour les éleveurs et l'Etat. En effet, pour cette maladie règlementée de catégorie 1, une campagne collective de contrôle, puis d'éradication est en vigueur en France depuis plus de cinquante ans. Ainsi, la France est reconnue indemne de tuberculose bovine (bTB) - moins de 0,1% de cheptels touchés- avec ce statut stratégique qui facilite les échanges commerciaux. Cependant, l'objectif de l'UE est l'éradication de la maladie dans le continent, mais ce but y compris en France, semble s'éloigner notamment par la présence de l'infection par *M. bovis* dans de nombreuses espèces de la faune sauvage dans plusieurs régions où la maladie semble se pérenniser.

Le LNR propose et diffuse les méthodes d'analyses permettant d'effectuer le dépistage de cette maladie selon les exigences de la DGAL. Dans ce cadre, les analyses de dépistage sont règlementées et les kits associés à ces méthodes diagnostic requièrent un contrôle initial et un contrôle de conformité de lots par le LNR (article R200-1 du code rural).

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

## 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 ELISA), 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. 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.

## 1. Référentiels et matériaux de référence

### Référentiels

- 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 - Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre des techniques ELISA
- Manuel Terrestre de l'OIE « Chapitre 1.1.6. Principes de la validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses ».
- Vade-mecum des contrôles de réactifs à l'Anses (adresse page internet)
- Richomme C, Boadella M, Courcoul A, Durand B, Drapeau A, Corde Y, Hars J, Payne A, Fediaevsky A, Boschioli ML. Exposure of wild boar to Mycobacterium tuberculosis complex in France since 2000 is consistent with the distribution of bovine tuberculosis outbreaks in cattle. PLoS one. 2013;8:e77842. (10.1371/journal.pone.0077842)
- Richomme C, Courcoul A, Moyen JL, Reveillaud É, Maestrini O, de Cruz K, Drapeau A, Boschioli ML. Tuberculosis in the wild boar: Frequentist and Bayesian estimations of diagnostic test parameters when Mycobacterium bovis is present in wild boars but at low prevalence. PLoS One. 2019;14(9):e0222661. Published 2019 Sep 24. doi:10.1371/journal.pone.0222661
- Protocole de préparation de buvards avant analyse avec le réactif (Annexe A du présent cahier des charges)

### Matériaux de référence

Actuellement, il n'existe pas de sérum standard international disponible pour la tuberculose porcine. Le laboratoire de référence dispose d'un MRI lyophilisé et d'autres matériaux de statut variable :

Matériel de référence	Titre	Test utilisé
Sérum négatif de porcs	Négatif Sérum porc EOPS	Kit Ingenasa INgezim TB porcine
Sérum positif de porc	Fort positif	Kit Ingenasa INgezim TB porcine
Buvard MRI	Positif faible	Kit Ingenasa INgezim TB porcine
Sérum MRI lyophilisé	Positif faible	Kit Ingenasa INgezim TB porcine

## 2. 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.

### 3. Contexte et objectifs d'application du réactif

#### Contexte

Depuis fin 2010 un programme national de surveillance de la tuberculose dans la faune sauvage, Sylvatub, a été mise en place. Par ailleurs, l'arrêté du 7 décembre 2016 relatif à certaines mesures de surveillance et de lutte contre la tuberculose lors de la mise en évidence de cette maladie dans la faune sauvage (NOR : AGRG1635531A) est en vigueur depuis janvier 2017. Il permet l'encadrement réglementaire de l'action du préfet en matière de prévention, de surveillance et de lutte contre la tuberculose lorsque la faune sauvage est infectée, ainsi que de la régulation des populations, collecte et destruction de viscères, l'intervention dans les parcs/enclos de chasse, ainsi que l'obligation d'obtention du statut sanitaire des animaux d'élevage lâchers.

#### Objectifs d'application du réactif

Un test sérologique avec le seul kit commercial disponible à ce jour (Ingenasa INgezim TB porcine) est utilisé depuis 2018. Or il est important que les analyses officielles puissent s'appuyer sur d'autres kits commerciaux d'où la nécessité de valider de nouveaux kits. Ces tests sérologiques officiels pourront être utilisés dans le cadre du programme précité pour la faune sauvage libre mais aussi pour le dépistage de la tuberculose porcine dans des régions comme la Corse où cette maladie sévit dans la filière porcine.

La méthode doit être transférable dans les laboratoires vétérinaires départementaux du réseau de laboratoires agréés créée pour la réalisation des analyses de première intention (en cours).

Les kits présentés doivent permettre une mise en évidence simple, rapide (dans la journée) de l'agent recherché dans les prélèvements d'intérêts que sont les sérums ou sur support de buvards.

Les résultats attendus dans ce cahier de charges doivent être conformes à l'objectif défini. Parmi les objectifs figurent :

- Contribuer à la démonstration de l'absence d'infection dans une population donnée ;
- certifier l'absence d'infection ou la présence de l'agent infectieux chez des animaux à titre individuel ou dans des produits à des fins de commerce/déplacement ;
- contribuer à l'éradication d'une maladie ou à l'élimination d'une infection au sein de populations données;
- confirmer le diagnostic de cas cliniques (incluant la confirmation des tests de dépistage positifs) ;
- estimer la prévalence d'une infection ou d'une exposition pour permettre l'analyse du risque ;
- déterminer le statut immunitaire d'animaux à titre individuel ou de populations.

### 4. Descriptif du réactif et du lot soumis au contrôle

Le demandeur fournit un descriptif précis de son réactif : nom commercial et dénomination, conditionnement(s), lieu(x) de fabrication, de contrôle et de conditionnement du produit fini, principe analytique, composition et conditions d'emploi (protocoles d'utilisation, types de prélèvements, domaine(s) d'utilisation, précautions d'emploi...).

La description précise de la méthode 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. 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 fabrication<sup>1</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 U47-310,
- Les modèles d'étiquettes du réactif ou de chacun des composants,
- Les certificats de contrôle de qualité interne du lot soumis au contrôle.

## 5. Contrôles qualité (pour les réactifs de catégorie B)

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

## 6. Réactifs à fournir par le demandeur pour le contrôle de conformité

Le fabricant/ fournisseur fournira au minimum gratuitement un kit complet d'au moins 2000 réactions (à préciser avec le LNR au moment du dépôt du dossier). Ces réactions permettront au LNR de faire notamment un contrôle initial de lot et de vérifier d'autres paramètres que le LNR jugera nécessaire de vérifier (Exemple : limite de détection de la méthode, test de répétabilité et reproductibilité intra-laboratoire, tests de sensibilité, spécificité diagnostiques complémentaires, etc).

Si la méthode nécessite réglementairement un contrôle de réactifs lot par lot, le fabricant/fournisseur s'engage à fournir ultérieurement gratuitement un kit de réactif par lot fabriqué. Si le contrôle de lot par lot n'est pas réglementairement obligatoire le LNR peut être amené à effectuer des contrôles ponctuels en cours de validités des kits et dans ce cas le fabricant/fournisseur s'engage également à fournir gratuitement, le matériel nécessaire aux essais de vérification.

## 7. Dossier technique à présenter par le demandeur

**Avertissement important** : La liste et les définitions des paramètres décrits ci-dessous sont fondées sur la Norme NF U47-310. Les données doivent être présentées dans le dossier de validation selon les exigences définies par le LNR dans ce CdC. 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 chacune des matrices pour laquelle le test s'applique et pour chacun des protocoles techniques différents proposés dans la notice.

---

<sup>1</sup> à l'exception des données touchant au secret industriel

**Externalisation** : Toutes ou parties des études permettant de caractériser les réactifs peuvent être réalisées dans un ou plusieurs laboratoires prestataires externes. Les essais doivent alors avoir été mis en œuvre par des laboratoires prestataires indépendants du fabricant et, dans la mesure du possible, accrédités voire agréés pour la mise en œuvre de la technique de diagnostic considérée. 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.

### 7.1 Echantillons (matrices biologiques)

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.

### 7.2 Validation des séries d'essai et modalités d'interprétation des résultats

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.

### 7.3 Caractérisation des réactifs sérologiques pour des techniques qualitatives

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

#### *Spécificité analytique - exclusivité*

La spécificité analytique est la probabilité du réactif à obtenir une réponse négative pour un échantillon dépourvu de l'analyte cible.

L'exclusivité est la capacité d'un réactif à détecter spécifiquement un analyte cible tout en ne détectant aucun des autres analytes pouvant potentiellement provoquer des réactions croisées.

Le fabricant doit préciser la détermination du nombre d'échantillons, l'origine et la nature des échantillons ainsi que le statut des animaux. Ces échantillons doivent également être analysés par une autre méthode reconnue.

Le contrôle d'exclusivité doit être réalisé sur des échantillons dépourvus d'anticorps dirigés contre la tuberculose, en incluant des échantillons présentant ou susceptibles de présenter des réactions sérologiques faussement positives.

La réactivité croisée doit être nulle (Spécificité à 100 %).

Tous les résultats obtenus doivent être présentés au LNR.

#### *Sensibilité analytique (ou limite de détection)*

La sensibilité analytique (ou limite de détection) correspond à la quantité minimale d'analyte donnant une réponse positive avec le réactif considéré. La sensibilité analytique est évaluée en analysant la dilution d'un ou de plusieurs matériaux de référence, dont celui qui définit le niveau exigible de détection (NED). Autour de la dilution 1/64 sérum « Corse 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.

### *Sensibilité et spécificité diagnostique*

La sensibilité « diagnostique » (SeD) est la proportion d'un nombre d'échantillons représentatifs de la population correspondant aux domaines et limites d'utilisation précisés dans la notice et définis comme positifs pour la cible (infectés ou vaccinés par exemple ; cf. chapitre « définitions » de ce cahier des charges) et donnant un résultat positif avec le réactif soumis au contrôle selon le(s) seuil(s) défini(s) par le demandeur ou la réglementation en vigueur.

La spécificité « diagnostique » SpD est la proportion d'un nombre d'échantillons représentatifs de la population correspondant aux domaines et limites d'utilisation précisés dans la notice et définis comme négatifs pour la cible donnée (indemnes par exemple ; cf. chapitre « définitions » de ce cahier des charges) et donnant un résultat négatif avec le réactif soumis au contrôle selon le(s) seuil(s) défini(s) par le demandeur ou la réglementation en vigueur.

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

Ces critères sont estimés à partir d'un panel d'échantillons terrain de statut connu positif et négatif (déterminé par une méthode de référence bactériologique et/ou PCR et également vis-à-vis du contexte épidémiologique de la tuberculose bovine au niveau régional) représentatif de la région (pays) où le test sera utilisé. Le nombre d'échantillons doit tenir compte du degré de confiance souhaité pour leur estimation et de leur disponibilité. Le LNR recommande de cibler un niveau de confiance de 95%, avec 5% ou 2% d'erreur dans l'estimation de la SeD ou de la SpD.

Selon l'usage prévu pour le test, différents résultats sont acceptables mais le LNR recommande une SpD d'au moins 96 % et une SeD d'au moins 73 %.

### *Répétabilité intra-essai*

La répétabilité est l'écart entre des analyses répétées d'un même échantillon dans un même laboratoire au cours du même essai (même réactif, conditions opératoires identiques).

Un échantillon de niveau de détectabilité comparable au NED doit être analysé sur 3 plaques entières dans des conditions de répétabilité.

Un coefficient de variation (CV) inférieur à 10 % est attendu. Les valeurs brutes des 3 plaques et les 3 CV doivent être comparables.

### *Reproductibilité intra-laboratoire*

Écart 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.

La reproductibilité intra-laboratoire doit être estimée à partir de 3 niveaux de dilution d'un même échantillon, situés dans la gamme linéaire, dont un niveau de détectabilité est comparable au NED. Ces essais doivent être analysés dans 6 séries d'analyse différentes en faisant varier les facteurs les plus susceptibles d'influer sur la fidélité de l'essai et être effectués sur plusieurs jours par au moins 2 opérateurs différents.

Un coefficient de variation (CV) inférieur à 20 % est attendu.

### *Reproductibilité inter-laboratoire*

Écart entre des analyses répétées d'un même échantillon dans des laboratoires différents avec un même réactif en suivant le même protocole technique.

Lorsque les données le permettent (données chiffrées), les écart-types de répétabilité et de reproductibilité ainsi que les coefficients de variation associés sont calculés sur les données transformées (unités, pourcentage d'inhibition par exemple).

La reproductibilité inter-laboratoires doit être réalisée au moins 3 fois par au moins 3 laboratoires (y compris le LNR) différents qui testent le même panel d'échantillons présentant les caractéristiques suivantes : analyse en aveugle, panel de minimum 10 échantillons, comprenant environ 20 % d'échantillons négatifs et 80 % d'échantillons positifs et incluant 3 niveaux de dilution d'un même échantillon positif, situés dans la gamme linéaire, dont un niveau de détectabilité est comparable au NED.

Les essais sont réalisés avec le même protocole, les mêmes réactifs et des équipements comparables.

Un coefficient de variation (CV) inférieur à 20 % est attendu.

### *Robustesse*

Etrottesse de l'accord entre des analyses répétées d'un même échantillon avec un même réactif au sein du même laboratoire dans les conditions opératoires limites prévues par le protocole technique.

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

Elle doit être évaluée sur les paramètres les plus critiques de la méthode en testant en double le NED ou un équivalent du NED, un échantillon moyennement positif, un échantillon fort positif et un échantillon négatif.

La robustesse est testée sur 3 échantillons répartis sur la gamme de linéarité et répétés en double. Les résultats ne doivent pas être significativement différents pour chaque échantillon.

Variation des paramètres suivants souhaités :

- Condition d'incubation (si elles sont proposés dans la notice) :
  - Température
  - Temps d'incubation
- Type de lavage (manuel / automatique)
- « Temps d'arrêt » avant la lecture finale

### *Stabilité*

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).

Le fabricant doit définir les points critiques pouvant influencer sur la validité des réactifs.

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.

L'ensemble des études de stabilité doivent porter au minimum sur 2 échantillons négatifs, 2 échantillons au NED ou équivalent du NED et 2 échantillons positifs, et doivent être réalisées sur une durée supérieure d'au moins 10 % à la durée de conservation fixée par le demandeur. Les principes d'acceptabilité de variation des résultats pour chaque type d'échantillon doivent être définies 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 renvoyer les données au fur et à mesure au LNR.

## ANNEXE A : Préparation de BUVARDS Suidés avant ELISA

1. Découper des disques de 5-6 mm environ de diamètre dans les buvards et les placer dans une plaque à fond plat.
2. Ajouter 200  $\mu\text{L}$  de diluant du kit approprié (exemple : INGENASA INgezim TB porcine 11.TBP.K1) dans chaque puits contenant des buvards (*plaque intermédiaire*).
3. Filmer la plaque et l'incuber 16 à 20 heures en étuve à 21°C.

### Exemple d'ELISA

*L'ELISA doit être réalisé selon les recommandations du fournisseur  
Attention il est important d'équilibrer tous les réactifs à température ambiante.*

1. Dans la plaque ELISA distribuer :
  - 100  $\mu\text{L}$  de témoins positifs dans 2 puits et 100  $\mu\text{L}$  de témoins négatifs dans 2 autres (sans dilution).
  - Le MRI LNR dilué au 1/20 : pré dilution au 1/10 dans la plaque intermédiaire (10  $\mu\text{L}$  sérum + 90  $\mu\text{L}$  tampon dilution) puis 95  $\mu\text{L}$  de tampon de dilution dans plaque ELISA et 5  $\mu\text{L}$  de la dilution précédente.
  - Les échantillons : 50  $\mu\text{L}$  de diluant approprié (exemple : Ingenasa) et y ajouter 50  $\mu\text{L}$  de diluât (*dilution au 1/2*).
2. Filmer la plaque et incuber 60 minutes à température ambiante (18-25°C).
3. Laver la plaque à 3 reprises comme indiqué dans le mode opératoire du fournisseur.
4. Ajouter 100  $\mu\text{L}$  de conjugué prêt à l'usage dans chaque puits.
5. Filmer la plaque et incuber 30 minutes à température ambiante (18-25°C).
6. Laver la plaque à 5 reprises comme indiqué dans le mode opératoire du fournisseur.
7. Ajouter 100  $\mu\text{L}$  de substrat dans chaque puits.
8. Incuber 10 minutes à température ambiante (18-25°C).
9. Ajouter 100  $\mu\text{L}$  de solution stop dans chaque puits en suivant le même ordre que celui suivi pour l'ajout du substrat.
10. Lire à 450 nm sur un lecteur ELISA.