



# anses

Laboratoire  
de Ploufragan-Plouzané-Niort  
Site de Niort

Unité Pathologie et  
Bien-Etre des Ruminants

Laboratoire en charge de la  
référence Paratuberculose

Dossier suivi par :  
Virginie POISSON

Ligne directe :  
05 49 79 61 28

E- mail :  
virginie.poisson.reseaugds@anses.fr

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

Niort, le 9 janvier 2024

**Objet :** Cahier des Charges pour le diagnostic immunologique de  
la paratuberculose bovine – ELISA sérum individuel

Madame, Monsieur,

Ce cahier des charges s'inscrit dans le cadre d'une démarche initiée par le Laboratoire en charge de la référence pour la Paratuberculose de l'Anses de Ploufragan-Plouzané-Niort, site de Niort, pour la validation de nouveaux kits ELISA commerciaux utilisables dans les laboratoires pour la réalisation des analyses paratuberculose. Les kits présentés doivent permettre une détection simple et rapide des anticorps dirigés contre la paratuberculose bovine dans les échantillons de sérums individuels.

Le cahier des charges a été diffusé au SIMV le 01 décembre 2022. Nous restons à votre entière disposition pour tout complément d'information.

Je vous prie d'agréer, Madame, Monsieur, nos sincères salutations.

Virginie POISSON  
Responsable Thématique


**CAHIER DES CHARGES – TYPE  
POUR LA PRÉSENTATION D'UN RÉACTIF  
DE DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE  
AU CONTRÔLE INITIAL DE CONFORMITÉ**

<b>Laboratoire</b>	Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort
<b>Contact</b>	Virginie POISSON
<b>Tél</b>	05.49.79.61.28
<b>Mail</b>	virginie.poisson.reseaugds@anses.fr

<b>Mandat de référence</b>	Laboratoire en Charge de la Référence pour la Paratuberculose
----------------------------	---

<b>Objet</b>	<b>Validation de tests ELISA anticorps Paratuberculose</b>
<b>Cible</b>	<b>Anticorps dirigés contre la Paratuberculose bovine</b>
<b>Méthode</b>	<b>ELISA</b>
<b>Matrice</b>	<b>Sérum individuel</b>

<b>Version</b>	<b>02</b>
<b>Date d'application</b>	<b>13/07/2023</b>

<b>Validation</b>			
<b>Nom/Prénom</b>	<b>Fonction</b>	<b>Date</b>	<b>Signature</b>
<b>POISSON Virginie</b>	<b>Responsable scientifique</b>	<b>13/07/2023</b>	

## Table des matières

<b>1. Introduction</b> .....	3
<b>2. Référentiels et matériaux de référence</b> .....	3
<b>3. Définitions</b> .....	3
<b>4. Contexte et objectifs d'application du réactif</b> .....	3
<b>5. Descriptif du réactif et du lot soumis au contrôle</b> .....	4
<b>5.1 Description</b> .....	4
<b>5.2 Matériel à fournir par le demandeur pour le contrôle de conformité</b> .....	4
<b>5.3 Contrôle qualité interne</b> .....	4
<b>6. Dossier technique à présenter par le demandeur</b> .....	5
<b>6.1 Echantillons (matrices biologiques, individuel ou en mélange)</b> .....	5
<b>6.2 Validation des séries d'essai et modalités d'interprétation des résultats</b> .....	5
<b>6.3 Caractérisation des réactifs sérologiques pour des techniques qualitatives ou semi-quantitatives</b> .....	5
6.3.1 Exclusivité .....	5
6.3.2 Interférences de la matrice (ou sélectivité selon OIE) .....	6
6.3.3 Limite de détection (LD) .....	6
6.3.4 Cohérence de la loi dose-effet .....	6
6.3.5 Répétabilité (intra-essai) .....	6
6.3.6 Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire).....	6
6.3.7 Reproductibilité (reproductibilité inter-laboratoires).....	7
6.3.8 Sensibilité et spécificité diagnostique .....	7
6.3.9 Robustesse.....	8
6.3.10 Stabilité.....	8
<b>6.5 Synthèse des paramètres et des niveaux d'exigence attendus</b> .....	9

## 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 Laboratoire de Référence (LR) 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 LR, 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 LR 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 - Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre des techniques ELISA
- OIE Terrestrial Manual, 2018. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases

## 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

La paratuberculose est une inflammation chronique de l'intestin chez les ruminants due à l'infection par la bactérie *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). Cette maladie entraîne des pertes économiques importantes : baisse de la production laitière, de la fertilité et un amaigrissement important des animaux.

En l'absence de traitements curatifs et préventifs pour lutter contre cette maladie, la gestion des cheptels touchés demeure indispensable pour limiter la diffusion de la Paratuberculose. Cette gestion repose sur le dépistage des animaux infectés, dans le cadre d'un contrôle lors de l'introduction ou d'un plan de surveillance.

Le diagnostic de la Paratuberculose peut être réalisé soit par des méthodes de diagnostic direct (coloration, culture ou PCR) qui détectent la bactérie, soit par des méthodes de diagnostic indirect (ELISA) qui détectent la réponse immunitaire induite par Map. Actuellement, en France, le diagnostic de la Paratuberculose bovine repose à 99% sur la détection des anticorps dirigés contre la bactérie et présents dans le sérum des animaux infectés.

Les outils de détection des anticorps par ELISA seront utilisés, pour les analyses sur sérums individuels, dans le cadre du référentiel de garantie (Réf\_PT\_01C\_2018) ou du plan de maîtrise nationale (PN\_PT\_01B), actuellement en cours de mise à jour (travaux de l'AFSE à la demande de GDS France).

## 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 LR 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 correspond des numéros de lots identiques des constituants du réactif 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 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 (*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 LR pour réaliser le contrôle initial et vérifier d'autres paramètres que le LR jugera nécessaire de vérifier (exemples : limite de détection de la méthode, tests de répétabilité et reproductibilité intra-laboratoire, tests de stabilité...).

### 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.

---

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

## 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 NF U47-310. Les données doivent être présentées dans le dossier technique selon les exigences définies par le LR 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 chacune des matrices définies par le LR 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 LR, doivent alors avoir été mis en œuvre par des laboratoires prestataires indépendants du fabricant et, dès lors qu'ils existent, 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 LR.

### 6.1 Echantillons (matrices biologiques, individuel ou en mélange)

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 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) 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 Exklusivité

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

L'intradermotuberculisation peut interférer avec les résultats des tests ELISA Paratuberculose. C'est pourquoi, une phrase d'avertissement devra figurer dans la notice afin de préciser les limites d'utilisation de ces tests ELISA Paratuberculose.

### 6.3.2 *Interférences de la matrice (ou sélectivité selon OIE)*

La sélectivité (ou interférences de la matrice) est définie par l'OIE comme la faculté du test à distinguer les analytes cibles et les autres substances de la matrice. Son étude prend donc en compte les variations possibles dans la composition de la matrice (sérum hémolysé...) et indirectement les interactions liées à l'ajout de composants lors du prélèvement (différents anticoagulants, conservateurs...) ou d'un prétraitement. Le fabricant doit identifier les variations de composition de la matrice pouvant impacter le niveau de réaction (diminution ou augmentation).

Le fabricant doit préciser dans la notice du kit la nécessité d'écarter de l'analyse les échantillons présentant des caractéristiques à l'origine d'interférences trop importantes (exemple : sérum hémolysé). Si ces préconisations sont absentes, le fabricant devra fournir les données montrant qu'elles ne sont pas nécessaires et qu'il n'y a pas d'interférence.

### 6.3.3 *Limite de détection (LD)*

La limite de détection (ou sensibilité analytique, SeA), correspond à la quantité minimale d'analyte décelable avec un niveau de confiance défini. Pour des techniques qualitatives, elle correspond à la quantité minimale d'analyte donnant une réponse positive avec le réactif considéré. Pour des techniques semi-quantitatives, le LR doit déterminer à quel niveau cette sensibilité analytique doit être évaluée. La LD est évaluée en analysant la dilution d'un ou de plusieurs matériaux de référence, dont celui qui définit le niveau exigible de détection (NED), en conditions de répétabilité intra séries (répliques) et inter séries (séries indépendantes).

La limite de détection doit être déterminée sur le sérum NED ou sur des dilutions en sérum de celui-ci à partir de 10 réplicats testés sur deux plaques différentes. Le sérum NED devra être trouvé à 100% positif ou douteux.

### 6.3.4 *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 LR.

Deux séries d'au moins 4 niveaux de dilutions de raison 2 couvrant la zone de linéarité seront réalisées sur deux plaques différentes.

### 6.3.5 *Répétabilité (intra-essai)*

La répétabilité est l'écart 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).

Un échantillon faiblement positif, le plus proche possible du seuil ou des bornes de la zone douteuse, sera analysé sur 3 plaques entières en vérifiant l'absence d'effet bord.

L'écart type et le coefficient de variation intra-plaques seront calculés. Le coefficient de variation devra être inférieur ou égal à 10%.

### 6.3.6 *Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)*

Ecart 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...).

Avec trois niveaux de dilution (dont un proche du seuil), un même échantillon situé dans la gamme linéaire sera analysé en triplicat sur 6 séries différentes par au moins 2 opérateurs différents sur plusieurs jours.

L'écart type et le coefficient de variation de fidélité intermédiaire seront calculés. Le coefficient de variation devra être inférieur ou égal à 15%.

### **6.3.7 Reproductibilité (reproductibilité inter-laboratoires)**

Etroitesse 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.

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

Trois niveaux différents de sérums dans la zone de linéarité : fort (niveau équivalent à au moins 3 fois le seuil de négativité), faible (proche du seuil) et négatif seront analysés en triplicat sur 4 essais différents dans 5 laboratoires différents (en aveugle).

Le coefficient de variation sera calculé et devra être, pour les échantillons positifs, inférieur ou égal à 20%. Les données brutes de laboratoires devront être jointes au dossier.

### **6.3.8 Sensibilité et spécificité diagnostique**

La sensibilité « diagnostique » (SeD) est la proportion d'échantillons 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 parmi ceux définis comme positifs pour la cible selon les critères du LR ou de la réglementation

La spécificité « diagnostique » (SpD) est la proportion d'échantillons 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 parmi ceux définis comme négatifs pour la cible selon les critères du LR 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.

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

Si le développeur fait appel à un prestataire, il doit transmettre le rapport complet de l'étude collaborative réalisée contenant l'ensemble des résultats obtenus par le prestataire.

Pour l'évaluation de la sensibilité diagnostique, un panel de plus de 200 sérums issus de bovins considérés infectés issus de différents cheptels infectés par la paratuberculose sera analysé. Les critères d'inclusion (analytiques et épidémiologiques) de ces animaux devront être précisés dans le dossier. Une sensibilité diagnostique d'au moins 80% devra être obtenue.

Pour l'évaluation de la spécificité diagnostique, un panel de plus de 400 sérums, issus de différents cheptels français sous garantie paratuberculose ou de cheptels étrangers avec des exigences équivalentes, seront analysés. Les critères d'inclusion (analytique et épidémiologiques) de ces animaux devront être précisés dans le dossier. Une spécificité diagnostique d'au moins 99% devra être obtenue.

### **Définition des statuts des échantillons évalués**

Les réactifs de diagnostic ELISA seront évalués au LR sur des échantillons terrain caractérisés sur l'ensemble des kits ELISA monocapules disponibles sur le marché français. Pour définir le statut des échantillons, vous devrez les tester avec au moins 2 autres kits différents du votre.

- Les échantillons de statut positif devront provenir d'élevages en plan de maîtrise avec au moins 4 animaux séropositifs.
- Les échantillons donnant un résultat positif avec tous les tests seront considérés comme ayant un statut Positif.



- Les échantillons donnant un résultat négatif avec tous les tests seront considérés comme ayant un statut Négatif
- En cas de divergence entre les kits, le degré de divergence devra être évalué selon les critères suivants :  
 La divergence sera caractérisée de mineure si elle est comprise dans la zone comprise entre le seuil de non-négativité et - 50% de ce seuil.  
 La divergence sera caractérisée de majeure si elle est en dehors de la zone comprise entre le seuil de non-négativité et - 50% de ce seuil.
  - o En cas de divergence mineure, le statut sera défini comme positif.
  - o En cas de divergence majeure, le statut sera défini par le résultat de la PCR sur fèces.
- Tous les échantillons provenant d'élevages sous garantie (Réf\_PT\_01C\_2018) depuis au moins 3 ans seront considérés comme ayant un statut négatif.

### 6.3.9 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.

Lorsqu'un protocole technique fait apparaître des fourchettes, par exemple : temps de pré-incubation, temps d'incubation, température, nombre et durée de lavage, ces paramètres devront être impérativement testés en valeur minimale et maximale.

### 6.3.10 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 proches du seuil 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 LR.

#### 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 LR 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, quantitatif ou semi-quantitatif**

Paramètres	Performance à évaluer	Moyens mis en œuvre (Nombre d'échantillons et conditions testés)	Résultats attendus
Exclusivité	Qualitatif	Préconisations d'utilisation	Présence de préconisations
Interférences (Sélectivité)	Qualitatif	Préconisations d'utilisation	Présence de préconisations Si absence de préconisations, fournir les données
Limite de détection	Qualitatif	Sérum NED ou dilution en sérum du NED à tester en 10 répliquats sur 2 plaques indépendantes	100% positifs ou douteux
Cohérence de la loi dose-effet	Qualitatif	2 séries d'au moins 4 niveaux de dilution de raison 2 couvrant la zone de linéarité sur 2 plaques différentes	Fournir les données
Sensibilité diagnostique	Qualitatif	≥ 200 sérums de bovins infectés issus de cheptels infectés par la paratuberculose	80 % d'animaux positifs  Fournir les critères d'inclusion (analytiques et épidémiologiques) des sérums utilisés

Spécificité diagnostique	Qualitatif	≥ 400 sérums de bovins issus de différents cheptels sous garantie	99 % d'animaux négatifs Fournir les critères d'inclusion (analytiques et épidémiologiques) des sérums utilisés
Répétabilité intraessai	Qualitatif	3 plaques entières avec un échantillon faiblement positif (proche du seuil) : - vérifier l'absence d'effet bord	CV* ≤ 10 %
Fidélité intermédiaire	Qualitatif	3 niveaux de dilution (dont un proche du seuil) d'un même échantillon situé dans la gamme linéaire (analyse en triplicat) sur 6 séries différentes par au moins 2 opérateurs sur différents jours	CV* ≤ 15 %
Reproductibilité interlaboratoires	Qualitatif	3 niveaux différents de sérums : forts, faible (proche du seuil) et négatif, analysés en triplicat sur 4 essais différents dans 5 laboratoires différents (en aveugle)	CV* ≤ 20 % Fournir les données brutes des laboratoires
Robustesse Vérification des conditions d'emploi	Qualitatif	Vérification des paramètres critiques faisant apparaitre une fourchette (température, temps de pré-incubation, temps d'incubation...) sur 3 échantillons de niveaux différents (fort, faible et négatifs)	Fournir les données brutes

Vérification de la stabilité	Qualitatif	<p>Au minimum sur 2 échantillons positifs, 2 échantillons proches du seuil et 2 échantillons négatifs</p> <p>pendant une durée égale ou supérieure à la durée de conservation fixée</p>	<p>Pas de diminution significative des DO</p> <p>Fournir les données brutes</p>
------------------------------	------------	---	---

\* CV : Coefficient de variation

Le LR vérifiera certains paramètres tels que la limite de détection (sensibilité analytique), la cohérence de la loi dose effet, la répétabilité, la sensibilité et la spécificité, mais il se réserve le droit d'en vérifier d'autres.