



anses

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 :
Éric Niqueux

Ligne:
02.96.01.64.11

E- mail :
eric.niqueux@anses.fr

N. Réf. :
220075

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

Ploufragan, le 7 septembre 2022

Objet : appel à manifestation d'intérêt (AMI) pour la campagne 2022 de contrôle initial de conformité des trousses de détection des gènes M, H5 et H7 des virus de l'influenza aviaires par RT-PCR temps réel.

Madame, Monsieur,

Cet appel à manifestation d'intérêt ouvre la campagne 2022 de contrôle initial de conformité des trousses commerciales de détection des gènes M, H5 et H7 des virus de l'influenza aviaire (virus Influenza A) par RT-PCR temps réel, selon les méthodes publiées par le Laboratoire de référence de l'Union européenne d'anticorps. 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 moléculaire de surveillance IA en accord avec le Règlement 2016/429 (« législation sur la santé animale »), les méthodes recommandées par le laboratoire de référence de l'Union européenne et les méthodes recommandées par le manuel OIE.

Le cahier des charges version 2 en date du 7 septembre 2022 décrivant les caractéristiques et performances attendues des trousses de détection des gènes M, H5 et H7 des virus de l'influenza aviaire (virus Influenza A) par RT-PCR temps réel 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 15 octobre 2022 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 (partie administrative, documentaire et technique réalisées par le LNR). La



fourniture des matériaux de référence décrits dans le cahier des charges est faite selon les conditions générales de vente au tarif des prestations de l'Anses (<https://www.anses.fr/fr/system/files/CatalogueTarifsAnses.pdf>).

Le dossier final destiné au contrôle initial de conformité devra nous parvenir le 2 décembre 2022 au plus tard par courriel à la même adresse que précédemment. Les réactifs nécessaires, et en quantité suffisante, devront également nous être envoyés avant le 2 décembre 2022. 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 en février 2023.

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

Éric NIQUEUX
Responsable-Adjoint du LNR Influenza
Aviaire

**CAHIER DES CHARGES POUR LE CONTROLE INITIAL DE CONFORMITE D'UNE
TROUSSE DE DETECTION DES GENES M, H5 et H7 DES VIRUS DE L'INFLUENZA
AVIAIRE PAR RT-PCR TEMPS REEL**

Laboratoire : **Ploufragan-Plouzané-Niort**

Mandat de référence : **influenza aviaire**

Contact

Éric Niqueux

tel : 02.96.01.64.11

e-mail : LNR_influenza_aviaire@anses.fr

Objet	Trousse de détection des gènes M, H5 et H7 des virus de l'influenza aviaire (virus Influenza A) par RT-PCR temps réel, selon les méthodes publiées par le Laboratoire de référence de l'Union européenne
Cible	gènes M, H5 et H7 des virus de l'influenza aviaire (virus Influenza A)
Méthode	RT-PCR temps réel qualitative
Matrice	écouvillons oropharyngés (ou trachéaux), écouvillons cloacaux, organes d'oiseaux, chiffonnettes pour prélèvements dans l'environnement et les bâtiments d'élevage de volailles

Version	2
Date d'application	07/09/2022


Validation			
Nom/Prénom	Fonction	Date	Signature
NIQUEUX Éric	Responsable-adjoint LNR Influenza aviaire	05/09/2022	

Table des matières

1.	Introduction	3
2.	Référentiels et matériaux de référence	3
3.	Définitions	4
4.	Contexte et objectifs d'application du kit	4
5.	Réactif (ou trousse) et lot soumis au contrôle	5
5-1	Description du réactif	5
5.2	Matériel à fournir par le demandeur pour le contrôle de conformité	5
5.3	Contrôle qualité	6
6.	Dossier technique à présenter par le demandeur	6
6.1	Caractéristiques générales de la méthode et des matrices cibles.....	6
6.1.1	Matrice(s) : Préparation de l'échantillon pour analyse.....	6
6.1.2	Extraction	7
6.1.3	RT-PCR temps réel.....	7
6.2	Caractérisation de la RT-PCR qualitative.....	8
6.2.1	Caractérisation de la (RT)PCR : analyse in silico (étude bio-informatique)	8
6.2.2	Inclusivité /exclusivité.....	9
6.2.3	Limite de détection de la RT-PCR (LDRT-PCR).....	10
6.2.4	Limite de détection de la méthode extraction-RT-PCR (LD _{Méthode})	10
6.2.5	Robustesse de la RT-PCR.....	10
6.2.6	Stabilité du réactif	10
6.3	Synthèse des paramètres de performance et des niveaux d'exigence attendus.....	11
7.	Références bibliographiques	12

1. Introduction

Ce cahier des charges précise aux demandeurs (producteurs et distributeurs de réactifs), les conditions générales nécessaires à la présentation d'un réactif RT-PCR en temps réel 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

REFERENTIELS

- Norme AFNOR NF U 47-600-1, Méthodes d'analyses en santé animale – PCR (réaction de polymérisation en chaîne) – Partie 1 : Exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR de la PCR en santé animale.
- Norme AFNOR NF U 47-600-2, Méthodes d'analyses en santé animale – PCR (réaction de polymérisation en chaîne) – Partie 2 : Exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale.
- Norme AFNOR NF U 47-301, Méthodes d'analyse en santé animale – Dossier de présentation pour le contrôle des réactifs biologiques
- Norme AFNOR NF U 47-311, Méthodes d'analyse en santé animale – Contrôle de réactifs PCR (réaction de polymérisation en chaîne) utilisés dans le domaine de la santé animale
- Méthodes prises en compte parmi celles recommandées par le LRUE :
 - SOP VIR 018 "Detection of type A avian influenza virus by real-time RT-PCR" (Heine et al., 2015)
<https://www.izsvenezie.com/documents/reference-laboratories/avian-influenza/diagnostic-protocols/sop-vir-018.pdf>
 - SOP VIR 1003 "Detection of type A avian influenza virus by real-time RT-PCR" (Nagy et al., 2021)
<https://www.izsvenezie.com/documents/reference-laboratories/avian-influenza/diagnostic-protocols/sop-vir-1003.pdf>
 - "Detection of influenza A matrix gene by real-time Taqman® RT-PCR" en se limitant à la description de "Spackman M-gene RRT-PCR" (Spackman et al., 2002)
<https://www.izsvenezie.com/documents/reference-laboratories/avian-influenza/diagnostic-protocols/detection-influenza-A-matrix-gene-by-real-time-Taqman-RTPCR.pdf>
 - SOP VIR 143 "Detection of Eurasian H5 avian influenza virus by real-time RT-PCR" (Slomka et al., 2007)
<https://www.izsvenezie.com/documents/reference-laboratories/avian-influenza/diagnostic-protocols/sop-vir-143.pdf>
 - SOP VIR 144 "Detection of Eurasian H7 avian influenza virus by real-time RT-PCR" (Slomka et al., 2009)
<https://www.izsvenezie.com/documents/reference-laboratories/avian-influenza/diagnostic-protocols/sop-vir-144.pdf>

- Détection de génome de virus Influenza Aviaire de type A selon la méthode de RT-PCR temps réel gène M avec contrôle positif interne rRT-PCR AIV M-IPC ; Révision 04 – Mise à jour le 14/03/2013 (disponible à la demande au LNR)
- Détection de génome de virus influenza aviaire de sous-types H5 de la lignée eurasienne selon la méthode de RT-PCR temps réel gène H5-HA2 avec témoin positif « non cible » externe rRT-PCR AIV H5-HA2 avec IPC-M ; Révision 06 – Mise à jour septembre 2017 (disponible en ligne sur le site de l'Anses)
- Détection de génome de virus influenza aviaire de sous-types H7 de la lignée eurasienne selon la méthode de RT-PCR temps réel gène H7-HA2 avec témoin positif non cible externe rRT-PCR AIV H7-HA2 avec IPC-M ; Révision 03 – Mise à jour le 11 février 2015 (disponible à la demande au LNR)

MATERIAUX DE REFERENCE

- ARNt AIV-M : ARN transcrit correspondant à une partie du gène codant pour la protéine de matrice du virus de l'influenza aviaire, pour détermination de la LD_{PCR} (Témoin positif PCR pour la détection de virus influenza aviaire selon la méthode de RT-PCR temps réel gène M, référence S00691, <https://www.anses.fr/fr/system/files/CatalogueTarifsAnses.pdf>)
- ARNt AIV-H5 : ARN transcrit correspondant à une partie du gène codant pour l'hémagglutinine (sous-type H5) du virus de l'influenza aviaire, pour détermination de la LD_{PCR} (Témoin positif PCR pour la détection de virus influenza aviaire selon la méthode de RT-PCR temps réel gène H5, référence S00692, <https://www.anses.fr/fr/system/files/CatalogueTarifsAnses.pdf>)
- ARNt AIV-H7 : ARN transcrit correspondant à une partie du gène codant pour l'hémagglutinine (sous-type H7) du virus de l'influenza aviaire, pour détermination de la LD_{PCR} (Témoin positif PCR pour la détection de virus influenza aviaire selon la méthode de RT-PCR temps réel gène H7, référence S00693, <https://www.anses.fr/fr/system/files/CatalogueTarifsAnses.pdf>)
- Témoin positif d'extraction pour la détection de virus influenza aviaire selon les méthodes de RT-PCR temps réel gènes M, H5 et H7 (référence S00694 ou S00695, <https://www.anses.fr/fr/system/files/CatalogueTarifsAnses.pdf>)

3. Définitions

Pour chaque paramètre, la définition est rappelée en introduction du paragraphe correspondant. En l'absence de précision, les définitions des termes employés seront celles des référentiels AFNOR.

4. Contexte et objectifs d'application du kit

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. Un réseau de laboratoires vétérinaires accrédités par le Cofrac et agréés ou reconnus par le ministère de l'Agriculture est encadré par le laboratoire national de référence (LNR) pour l'influenza aviaire à l'Anses - laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort. Ce réseau est opérationnel pour effectuer rapidement les analyses nécessaires au criblage de première intention qui consiste à détecter la présence de tout virus influenza A (détection gène M) à partir de différents prélèvements issus d'oiseaux ou de l'environnement de ces derniers, puis le cas échéant selon la réglementation en vigueur, pour les échantillons positifs à compléter ces analyses par une recherche des gènes HA des virus de sous-types H5 et H7.

Ce document présente le cahier des charges établi par le LNR IA, pour décrire les caractéristiques et performances minimum que doivent présenter les trousse de diagnostics pour la détection de virus influenza aviaires de type A par PCR temps réel, ciblant les gènes M, H5 et H7, afin que lesdites trousse soient déclarées conformes en vue du dépistage des virus IA, dans le cadre des analyses officielles ou des autocontrôles.

5. Réactif (ou trousse) et lot soumis au contrôle

5-1 Description du réactif

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

La description précise de la méthode (référence(s) bibliographiques le cas échéant) et des matières premières critiques pour les performances (composants biologiques utilisés, procédés de fabrication...) 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 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 NF U47 – 311, et dans laquelle le fabricant identifiera sans ambiguïté les matrices et types de prélèvements pour lesquels la conformité au présent cahier des charges est revendiquée,
- 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.

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

Le demandeur mettra gratuitement à disposition la quantité de réactif nécessaire pour réaliser le contrôle initial et vérifier les autres paramètres que le LNR jugera nécessaire de contrôler (exemple : limite de détection de la PCR, de la méthode, test de répétabilité, tests de sensibilité, spécificité diagnostiques complémentaires, etc).

¹ à l'exception des données touchant au secret industriel

5.3 Contrôle qualité

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

6. Dossier technique à présenter par le demandeur

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 alors 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.

6.1 Caractéristiques générales de la méthode et des matrices cibles

La méthode de la trousse de diagnostic doit être caractérisée sur l'ensemble des matrices et types de prélèvements suivants pour la détection des virus influenza aviaires, à savoir :

- des écouvillons cloacaux et des écouvillons trachéaux ou oropharyngés provenant d'oiseaux sauvages ou captifs ou de volailles, conservés en milieu de transport ou dans un dispositif de conservation de composition similaire à celle indiquée dans la norme NF U47-210,
- des surnageants de broyats d'organes ou des organes provenant d'oiseaux sauvages ou captifs ou de volailles,
- des prélèvements d'environnement par chiffonnette et pédichiffonnette

6.1.1 Matrice(s) : Préparation de l'échantillon pour analyse

Le fabricant indiquera dans le mode opératoire fourni avec la trousse de diagnostic les modalités précises de préparation utilisées lors de la caractérisation de la méthode.

- Écouvillons cloacaux ou trachéaux ou oropharyngés

Selon le contexte,

- Soit l'extraction d'ARN est réalisée à partir du surnageant individuel.
- Soit l'extraction d'ARN est réalisée à partir d'un mélange de surnageants, en différenciant les prélèvements oropharyngés/trachéaux et cloacaux. Le regroupement se fait par un mélange de 5 échantillons au maximum selon le type de prélèvement, et sauf indication différente selon l'espèce d'oiseaux, le lieu géographique, la date de prélèvement. Dans ce cas, un volume équivalent de chaque surnageant individuel est prélevé puis regroupé par type de prélèvements (cloacal ou trachéal).

- Surnageants de broyats d'organes ou des organes

Chaque type ou mélange d'organe(s) (foie-rate-rein-pancréas-cœur, intestin, poumon-trachée, encéphale) – avec la possibilité de mélanger les mêmes organes de 5 individus maximum de même espèce, même lieu géographique et même date de prélèvement – est broyé afin d'obtenir une suspension d'environ 10-20 % poids/volume en STP (ou similaire), utilisable après centrifugation (voir recommandations §8 de la norme NF U 47-210) pour extraction des acides nucléiques.

- Prélèvements d'environnement par chiffonnette

D'autres matrices de types prélèvements d'environnement par chiffonnette peuvent être analysées. Les reprises des chiffonnettes sont réalisées dans du tampon STP (ou similaire tel qu'indiqué dans la norme NF U47-210) dans un volume maximal de 40 ml par chiffonnette et 70 ml par pédichiffonnette. Après homogénéisation, une étape de clarification par centrifugation est nécessaire (voir recommandations §8 de la norme NF U 47-210).

Afin de permettre la validation à l'étape de la RT-PCR des résultats d'extraction et d'amplification obtenus avec ce type de matrice non animale, il faudra ajouter un contrôle interne non cible exogène au cours de la préparation des échantillons pour analyse ou de l'extraction des acides nucléiques à partir de ceux-ci. Le fabricant doit donc indiquer dans le mode opératoire une référence de contrôle interne à ajouter lors de la préparation des échantillons pour analyse ou de leur extraction, ainsi que ses modalités d'utilisation.

Quelle que soit la matrice, il devra rester un minimum de 500 µl de chaque surnageant individuel, afin de répondre aux exigences du manuel de diagnostic européen en permettant la réalisation des analyses complémentaires (isolement viral).

Il est recommandé de conserver le reste du surnageant à une température inférieure ou égale à -65°C.

6.1.2 Extraction

La ou les méthodes d'extraction d'ARN recommandées et caractérisées seront précisées par le fabricant dans le mode opératoire de la trousse RT-PCR temps réel (mention des références des trousse commerciales d'extraction à employer ou des méthodes d'extraction décrites dans la littérature scientifique). Les réactifs nécessaires à l'étape d'extraction pourront être inclus ou non dans la trousse.

Le fabricant indiquera dans le mode opératoire fourni avec la trousse de diagnostic les modalités précises de préparation utilisées lors de la caractérisation de la méthode.

Le fabricant indiquera les modalités d'utilisation de contrôle interne non cible exogène à ajouter dans l'échantillon, en cas de besoin.

Toute modification de(s) la méthode(s) d'extraction par l'utilisateur de la trousse impliquera la nécessité pour celui-ci de vérifier les critères de performances de la méthode RT-PCR temps réel et de préciser et justifier les critères de jugement retenus pour évaluer les performances obtenues.

6.1.3 RT-PCR temps réel

La méthode de RT-PCR se doit d'être en temps réel et en une seule étape (afin de limiter les risques de contaminations croisées de l'environnement analytique et de réduire le délai d'obtention des résultats), de type qualitatif.

Il est demandé que le test soit proposé à la vente sous forme d'une trousse prête à l'emploi.

Le dossier descriptif à constituer par le fabricant sera présenté selon les exigences de la norme NF U47-311. Il devra mentionner les réactifs et appareils utilisés par le fabricant lors de la caractérisation de la méthode, notamment le type de thermocycleur employé.

Un ensemble de témoins doit être intégré permettant de valider l'ensemble des étapes du processus analytique (extraction d'ARN + RT-PCR temps réel).

Les témoins suivants doivent donc être présents *a minima* :

- Témoin positif non cible tel que défini dans NF U47-600, pour chaque échantillon. Pour la matrice prélèvement d'environnement par chiffonnette, les exigences spécifiques concernant ce témoin non-cible sont décrites aux paragraphes 6.1.1 et 6.1.2 ; pour les autres matrices, les exigences générales de la norme NF U47-600 s'appliquent.
- Témoin positif cible tel que défini dans NF U47-600, pour chaque série analytique
- Témoin négatif représentatif de l'ensemble du processus analytique, pour chaque série analytique

Les caractéristiques minimales attendues de ces témoins sont celles définies par la norme NF U47-600.

La nature des témoins positifs cibles utilisés devra être précisée. La référence des souches virales d'origine et la séquence correspondante devront également être indiquées dans le dossier présenté par le fabricant : des séquences dérivées de souches d'IA hautement pathogène de sous-types H5 ou H7 ne doivent pas être utilisées pour la fabrication de ces témoins.

6.2 Caractérisation de la RT-PCR qualitative

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

Les données présentées devront différencier les matrices suivantes :

- Pour les surnageants d'écouvillons : surnageants d'écouvillons oropharyngés/trachéaux et surnageants d'écouvillons cloacaux,
- Pour les surnageants de broyats d'organes : au moins deux types de mélanges d'organes (voir exemples au paragraphe 6.1.1), comprenant obligatoirement un mélange d'organes internes, seront sélectionnés par le fabricant. La nature exacte des organes mélangés sera précisée.
- les prélèvements d'environnement par chiffonnette

6.2.1 Caractérisation de la (RT)PCR : analyse in silico (étude bio-informatique)

- **Choix du « design » amorces/sonde(s)**

Les amorces et sondes retenues par les autorités françaises sont détaillées dans les protocoles énoncés ci-dessous ; elles ont été sélectionnées car i) elles sont libres de droit, ii) elles permettent la détection des virus faiblement aussi bien que hautement pathogènes, iii) elles sont recommandées par le LRUE et iv) leur utilisation par le LNR dans le cadre des essais inter-laboratoires organisés par le LRUE a montré l'obtention de résultats conformes :

- SOP VIR 018 "Detection of type A avian influenza virus by real-time RT-PCR" (Heine et al., 2015)
<https://www.izsvenezie.com/documents/reference-laboratories/avian-influenza/diagnostic-protocols/sop-vir-018.pdf>
- SOP VIR 1003 "Detection of type A avian influenza virus by real-time RT-PCR" (Nagy et al., 2021)
<https://www.izsvenezie.com/documents/reference-laboratories/avian-influenza/diagnostic-protocols/sop-vir-1003.pdf>

- "Detection of influenza A matrix gene by real-time Taqman® RT-PCR" en se limitant à la description de "Spackman M-gene RRT-PCR" (Spackman et al., 2002)
<https://www.izsvenezie.com/documents/reference-laboratories/avian-influenza/diagnostic-protocols/detection-influenza-A-matrix-gene-by-real-time-Taqman-RTPCR.pdf>
- SOP VIR 143 "Detection of Eurasian H5 avian influenza virus by real-time RT-PCR" (Slomka et al., 2007)
<https://www.izsvenezie.com/documents/reference-laboratories/avian-influenza/diagnostic-protocols/sop-vir-143.pdf>
- SOP VIR 144 "Detection of Eurasian H7 avian influenza virus by real-time RT-PCR" (Slomka et al., 2009)
<https://www.izsvenezie.com/documents/reference-laboratories/avian-influenza/diagnostic-protocols/sop-vir-144.pdf>

Le dossier présenté par le fournisseur devra préciser la séquence des amorces et sondes utilisées.

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

Compte tenu du fait que la spécificité a été déjà établie par i) les publications initiales (voir références bibliographiques indiquées ci-dessus), ii) l'ensemble des analyses réalisées lors des différentes épizooties de 2006 à 2022 et iii) les analyses complémentaires réalisées par le LNR IA lors d'infections expérimentales, la robustesse de la spécificité analytique, principalement liée au choix des amorces et sondes, justifie un contrôle restreint de celle-ci comme précisé ci-dessous.

Il convient donc toutefois de vérifier que la détection ou l'addition éventuelle de contrôle interne non cible sélectionné par le fabricant n'a aucune incidence sur la détection des gènes cibles.

Pour cela, un minimum de trois virus inactivés devra être testé sur chacune des matrices et avec chacune des méthodes, correspondant à :

- 1 virus inactivé IA H5 de lignée eurasiennne
- 1 virus inactivé IA H7 de lignée eurasiennne
- 1 virus inactivé différent d'un virus IA

Pour cela, le fabricant préparera lui-même les échantillons en dopant artificiellement et individuellement chaque type de matrice (matrices négatives non fournies par le LNR, provenant de poules, dindes ou canards dont le statut négatif IA aura été vérifié) avec chacun des différents virus inactivés répondant aux caractéristiques ci-dessus.

De plus, il sera nécessaire d'évaluer plus largement l'exclusivité de chaque méthode en tenant compte de la présence potentielle, dans les prélèvements issus de l'environnement d'élevage, de micro-organismes autres que ceux hébergés par les oiseaux ou infectant ces derniers. Pour cela, le fabricant devra fournir les éventuelles données dont il pourrait disposer, pour chacune des méthodes caractérisées, permettant de montrer l'absence de signaux d'amplification faussement positifs vis-à-vis de virus pathogènes ou commensaux des mammifères domestiques d'élevage.

6.2.3 Limite de détection de la RT-PCR (LD_{RT-PCR})

La limite de détection de la RT-PCR (LD_{RT-PCR}) est le plus petit nombre de copies d'acide nucléique cible par unité de volume qui peut être détecté dans 95% des cas.

Cette détermination de LD_{RT-PCR} sera réalisée à l'aide d'ARN de synthèse caractérisé fourni pour chaque gène cible par le LNR. La méthode devra être au moins aussi sensible que la méthode officielle mise en œuvre par le LNR (référence des méthodes mentionnées dans le tableau 1 ; résultats du LNR fournis avec l'ARN de synthèse).

6.2.4 Limite de détection de la méthode extraction-RT-PCR ($LD_{Méthode}$)

Cette détermination de $LD_{Méthode}$ sera réalisée à l'aide d'un virus inactivé fourni par le LNR (comme témoin d'extraction) en dopant individuellement selon les recommandations du LNR chaque type de matrice (matrices négatives non fournies par le LNR, provenant de poules, dindes ou canards dont le statut négatif IA aura été vérifié).

La méthode devrait être au moins aussi sensible que la méthode officielle mise en œuvre par le LNR (référence des méthodes mentionnées dans le tableau 1 ; recommandations pour le dopage et résultats attendus avec la méthode officielle fournis par le LNR dans le certificat du témoin d'extraction).

6.2.5 Robustesse de la RT-PCR

La robustesse doit être évaluée afin de vérifier la capacité de la RT-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 RT-PCR et sur les différentes cibles (gène d'intérêt et gène de contrôle interne). Le Niveau Exigé de Détection (NED) fixé par le LNR doit toujours être retrouvé positif, avec au moins 3 répétitions de l'analyse, quelles que soient les conditions expérimentales. La robustesse est testée avec l'échantillon ayant servi à la détermination de la LD_{RT-PCR} .

6.2.6 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_{RT-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).

6.3 Synthèse des paramètres de performance et des niveaux d'exigence attendus

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

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

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

Paramètres	Performance à évaluer	Moyens mis en œuvre (échantillons et conditions)	Résultats attendus
Spécificité analytique° Analyse <i>in silico</i>	Qualitatif	Dessin imposé des amorces et sondes	Mention des amorces et sondes utilisées
Spécificité analytique° inclusivité et exclusivité	Qualitatif	- 1 virus inactivé IA H5 de lignée eurasienne - 1 virus inactivé IA H7 de lignée eurasienne - 1 virus inactivé différent d'un virus IA	Statuts conformes à la composition de l'échantillon testé
Sensibilité analytique (LD _{RT-PCR})	Qualitatif	ARN de synthèse spécifique de chacune des cibles	≤ LD _{RT-PCR} ou LD _{Méthode} déterminée pour la méthode correspondante publiée par le LNR : RT-PCR AIV M-IPC ; Révision 04 / rRT-PCR AIV H5-HA2 avec IPC-M ; Révision 06 / rRT-PCR AIV H7-HA2 avec IPC-M ; Révision 03
Limite de détection de la méthode (LD _{Méthode})	Qualitatif	Témoin extraction fourni par le LNR	(NED fixé par le LNR : information fournie avec le document d'accompagnement de l'ARN de synthèse ou du témoin d'extraction)
Robustesse de la PCR	Qualitatif	Conditions opératoires jugées les plus critiques, en testant au moins 3 répétitions de l'analyse au NED	Statut conforme
Vérification de la stabilité	Qualitatif	Test sur 3 lots, au minimum sur 2 échantillons négatifs, 2 échantillons NED ou équivalent du NED (ou à défaut 3x la LD _{RT-PCR}) et 2 échantillons positifs	Statut conforme
Spécificité et Sensibilité diagnostique	Qualitatif	Toutes autres données disponibles relatives à la caractérisation de la spécificité et de la sensibilité diagnostiques devront être mentionnées dans le dossier	Statut des échantillons analysés confirmé par une méthode officielle mise en œuvre au sein d'un laboratoire accrédité pour cette analyse

De plus il convient d'évaluer plus largement l'exclusivité de chaque méthode en tenant compte de la présence potentielle, dans les prélèvements issus de l'environnement d'élevage, de micro-organismes autres que ceux hébergés par les oiseaux ou infectant ces derniers. Pour cela, le fabricant devra fournir les éventuelles données dont il pourrait disposer, pour chacune des méthodes caractérisées, permettant de montrer l'absence de signaux d'amplification faussement positifs vis-à-vis de virus pathogènes ou commensaux des mammifères domestiques d'élevage.

Le LNR vérifiera la LD_{RT-PCR}.

La LD_{Méthode} sera également vérifiée dans le seul cas où la méthode complète de RT-PCR de la trousse contrôlée est indivisible (réactifs d'extraction/purification et de PCR indissociables).

Pour ces deux vérifications, les modalités de contrôle seront conformes aux exigences de la norme NF U 47-311 et les critères d'acceptation seront l'obtention de résultats démontrant une sensibilité au moins équivalente à celle de la méthode Anses.

Selon les données de spécificité et de sensibilité diagnostiques fournies par le fabricant, le LNR complètera au besoin cette étude par l'analyse d'un panel constitué d'au minimum 20 échantillons de statut connu et confirmé par la méthode officielle.

Remarque : A la demande du LNR IA, Le fabricant fournira à titre gracieux le nombre de réactions nécessaires pour réaliser les différentes vérifications associées au contrôle initial.

7. Références bibliographiques

Heine HG, Foord AJ, Wang, J et al. (2015) Detection of highly pathogenic zoonotic influenza virus H5N6 by reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction. *Virology* 12, 18. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0250-3>

Nagy A, Černíková L, Kunteová K et al. (2021) A universal RT-qPCR assay for "One Health" detection of influenza A viruses. *PLoS One* 16(1):e0244669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244669>

Slomka MJ, Pavlidis T, Banks J et al. (2007) Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. *Avian Dis* 51(1 Suppl):373-7. <https://doi.org/10.1637/7664-060906R1.1>

Slomka MJ, Pavlidis T, Coward VJ et al. (2009) Validated RealTime reverse transcriptase PCR methods for the diagnosis and pathotyping of Eurasian H7 avian influenza viruses. *Influenza Other Respir Viruses* 3(4):151-64. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2009.00083.x>

Spackman E, Senne DA, Myers TJ et al. (2002) Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 40(9):3256-60. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3256-3260.2002>

*