

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

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

Ploufragan, le 30 avril 2019

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

**Objet : appel à manifestation d'intérêt pour la campagne 2019  
de contrôle initial de conformité des trousse de détection du génome  
des virus influenza aviaires (IA) par méthodes de RT-PCR temps réel**

---

**Dossier suivi par :**

Éric NIQUEUX

Madame, Monsieur,

**Ligne directe :**

02 96 01 62 59

**Fax direct :**

02 96 01 62 63

**E- mail :**

eric.niqueux@anses.fr  
LNR\_influenza\_aviaire@anses.fr

**N. Réf. : 190401**

---

Cet appel à manifestation d'intérêt ouvre la campagne 2019 de contrôle initial de conformité des trousse commerciales de RT-PCR temps réel pour la détection des gènes M, H5 et H7 des virus influenza aviaires (IA) de type A, selon les méthodes recommandées par le manuel de diagnostic européen. Ce contrôle est organisé par le Laboratoire national de référence (LNR) pour l'influenza aviaire dans le cadre de ses missions réglementaires, pour répondre à la demande de la Direction générale de l'alimentation d'établir des listes de méthodes officialisées et reconnues pour la réalisation, par les laboratoires agréés et reconnus et dans le périmètre de leurs missions respectives (analyses officielles et auto-contrôles réglementaires), du dépistage de l'infection des oiseaux par les virus IA.

Le cahier des charges (référence VIPAC 190403) décrivant les caractéristiques et performances attendues des méthodes 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 trousse soumises au LNR. L'ensemble des documents, courrier et cahier des charges, est publié sur le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

Si vous êtes intéressés par cet AMI, je vous prie de nous informer par courriel ([LNR\\_influenza\\_aviaire@anses.fr](mailto:LNR_influenza_aviaire@anses.fr)), pour le 31 mai 2019 au plus tard, du nombre et du format des trousse (gènes cibles M, H5, H7 retenus et multiplexage éventuel des cibles) qui seront soumises au contrôle. Nous vous

enverrons en réponse le devis correspondant au processus d'évaluation lui-même (partie administrative et documentaire et partie technique réalisées par le LNR). La fourniture des réactifs et matériaux de référence, mis à disposition pour la constitution du dossier de caractérisation des performances des trousse, est faite aux conditions générales du tarif des prestations de l'Anses.

Le dossier final destiné au contrôle initial de conformité devra nous parvenir le 30 juin 2019 au plus tard par courriel à la même adresse que précédemment. Les réactifs nécessaires, et en quantité suffisante, à la mise en œuvre de la RT-PCR temps réel (et le cas échéant de l'étape d'extraction) devront également nous être envoyés avant le 30 juin 2019. Les dossiers seront étudiés dans leur ordre d'arrivée au LNR, sous réserve qu'ils soient complets.

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



**Éric NIQUEUX**  
*Responsable du LNR pour l'influenza aviaire  
et la maladie de Newcastle*

Ploufragan, le 30 avril 2019

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

**CAHIER DES CHARGES POUR LE CONTROLE INITIAL DE CONFORMITE  
D'UNE TROUSSE RT-PCR TEMPS REEL POUR LA DETECTION DES GENES M, H5 ET H7  
DES VIRUS INFLUENZA AVIAIRES DE TYPE A  
SELON LES METHODES RECOMMANDEES PAR LE MANUEL DE DIAGNOSTIC  
EUROPEEN**

---

**Cadre de l'évaluation et objectif**

---

**Dossier suivi par :**  
Éric NIQUEUX  
Audrey SCHMITZ

**Ligne directe :**  
02 96 01 64 11

**Fax direct :**  
02 96 01 62 63

**E- mail :**  
eric.niqueux@anses.fr  
audrey.schmitz@anses.fr  
LNR\_influenza\_aviaire@anses.fr

**N. Réf. : 190403**

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. En France, cette maladie est classée en danger sanitaire de 1<sup>re</sup> catégorie<sup>1</sup>, selon l'arrêté ministériel du 29 juillet 2013, et donc à prophylaxie et à déclaration obligatoires gérées par l'État (DGAI<sup>2</sup>). 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 toutes les analyses nécessaires au diagnostic de première intention qui consiste à détecter la présence de tout virus influenza A (détection gène M) sur prélèvements animaux / échantillons cliniques / échantillons de diagnostic, 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 des lignées eurasiennes.

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 auto-contrôles (respectivement, pour les laboratoires agréés ou reconnus).

---

<sup>1</sup> Maladie justifiant un engagement financier et humain de l'État sur des actions de surveillance et éventuellement de lutte (ou de maîtrise) en élevage.

<sup>2</sup> Direction générale de l'alimentation, ministère chargé de l'Agriculture



## Exigences réglementaires et références normatives

---

Le diagnostic de l'influenza aviaire doit être réalisé conformément

- i. au code sanitaire de l'OIE pour les animaux terrestres ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahc/current/chapitre\\_avian\\_influenza\\_viruses.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahc/current/chapitre_avian_influenza_viruses.pdf))
- ii. au manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres 2016 de l'OIE ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.03.04\\_AI.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf)),
- iii. aux directives européennes et au manuel de diagnostic de l'Union Européenne (cf Directive 2005/94 du 20 décembre 2005 concernant des mesures communautaires de lutte contre l'influenza aviaire et abrogeant la directive 92/40/CEE <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005L0094&from=FR> et de la Décision de la Commission 2006/437/CE portant approbation du manuel de diagnostic pour l'influenza aviaire conformément à la directive 2005/94/CE du Conseil <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006D0437&from=FR>).  
En matière de diagnostic moléculaire, le manuel de diagnostic de l'Union Européenne renvoie vers le site internet (<http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm>, lien actuellement archivé et remplacé par le lien plus récent [https://science.vla.gov.uk/flu-lab-net/AI\\_links.html](https://science.vla.gov.uk/flu-lab-net/AI_links.html)).
- iv. à la norme NF U47-311 sur le protocole de contrôle des réactifs PCR (Réaction de polymérisation en chaîne) utilisés dans le domaine de la santé animale

Ces différents documents précisent les méthodes déjà validées par l'Animal and Plant Health Agency (APHA), Weybridge, UK, et référencées par le manuel de diagnostic de l'UE pour l'influenza aviaire et prescrivent en particulier les stratégies d'échantillonnage (référence iii - manuel de diagnostic pour l'influenza aviaire) ainsi que les séquences des amorces et sondes à utiliser (référence iii).

Les opérations analytiques doivent être réalisées selon les référentiels en vigueur NF EN ISO/IEC 17025, et NF U47-600 - 1 & 2.

## Exigences minimales du LNR Influenza aviaire concernant les caractéristiques de la méthode

---

### 1. Matrice(s) : Nature des prélèvements ciblés

La méthode de la trousse de diagnostic doit être caractérisée sur l'ensemble des prélèvements prévus par la réglementation pour la détection des virus influenza aviaries, à savoir :

- Dans le cadre des analyses officielles :

- des écouvillons cloacaux ou 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<sup>3</sup> provenant d'oiseaux sauvages ou captifs ou de volailles,

- Dans le cadre des auto-contrôles :

- des écouvillons cloacaux ou trachéaux ou oropharyngés provenant 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.

---

<sup>3</sup> Selon le manuel de diagnostic européen pour l'influenza aviaire (cf. référence iii), différents types d'organes peuvent être mélangés de telle manière que les matières fécales soient traitées séparément des organes internes. Toutefois, en plus du mélange intestinal, le LNR préconise de mélanger séparément les organes du tractus respiratoire (poumons et trachées), l'encéphale et les autres organes internes.

## **2. Matrice(s) : Préparation de l'échantillon de laboratoire**

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.

- **Ecouvillons**

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).

- **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 lieu de prélèvement – est broyé afin d'obtenir une suspension d'environ 10-20 % poids/volume en STP<sup>4</sup> (ou similaire) après centrifugation (voir recommandations §8 de la norme NF U 47-210).

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.

## **3. 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.

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.

## **4. 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, à partir d'échantillons biologiques aviaires.

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.

---

<sup>4</sup> Solution tamponnée phosphate

- **Amorces et sondes**

Les amorces et sondes retenues par les autorités françaises parmi celles recommandées par l'APHA Weybridge sont détaillées dans le tableau ci-dessous et ont été sélectionnées car i) elles sont libres de droit, ii) elles permettent la détection des virus faiblement aussi bien que hautement pathogènes et iii) elles ont présenté la meilleure sensibilité analytique lors des travaux de l'APHA Weybridge ou du LNR IA:

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

<u>Nom process</u>	<u>RT-PCR temps réel AIV</u> <u>gène M (Spackman<sup>5</sup>)</u>	<u>RT-PCR temps réel AIV gène</u> <u>H5-HA2 (lignée eurasienne)</u>	<u>RT-PCR temps réel AIV</u> <u>gène H7-HA2 (lignée</u> <u>eurasienne)</u>
Amorce Upper	AIV-M1 u25 5' AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG 3'	AIV H5 LH1 5' ACA TAT GAC TAC CCA CAR TAT TCA G 3'	AIV-H7-LH6 5' GGC CAG TAT TAG AAA CAA CAC CTA TGA 3'
Amorce Lower	AIV-M1 r124 5' TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG 3'	AIV H5 RH1 5' AGA CCA GCT AYC ATG ATT GC 3'	AIV-H7-RH4 5' GCC CCG AAG CTA AAC CAA AGT AT <sup>3'</sup>
Sonde marquée	M1 sonde 64 5' TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA* 3'	AIV H5-PRO 5' TCW ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA* 3'	H7 Pro 11 5' 6-CCG CTG CTT AGT TTG ACT GGG TCA ATC T* <sup>3'</sup>

Références bibliographiques : cf paragraphe iii) dans "Exigences réglementaires et références normatives".

\* fluorochrome

- **Témoins**

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
- 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.

## **Contrôle initial de conformité : approbation par le LNR du dossier de caractérisation de la méthode fournie par le fabricant**

---

Le dossier sera présenté par le fabricant selon les exigences de la norme NF U47-311.

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 différents de mélanges d'organes (voir exemples au paragraphe 2 en page 3/6), comprenant obligatoirement un mélange d'organes internes, seront sélectionnés par le fabricant. La nature exacte des organes mélangés sera précisée.

<sup>5</sup> Spackman *et al.* J. Clin. Microbiol. 40, 3256-3260

Les données brutes des essais sont à fournir selon le chapitre 7 de la norme NF U47-600-2, à savoir :

➤ **Spécificité analytique :**

Compte tenu du fait que la spécificité a été déjà établie par i) les publications initiales (voir références bibliographiques indiquées dans le paragraphe "Exigences réglementaires et références normatives"), ii) l'ensemble des analyses réalisées lors des différentes épizooties de 2006 à 2017 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.

Toutefois, il convient de vérifier que la détection ou l'addition éventuelle de témoin positif "non cible" sélectionné par le fabricant n'a aucune incidence sur la détection des gènes cibles.

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

- 1 virus inactivé IA H5 de lignée eurasienne
- 1 virus inactivé IA H7 de lignée eurasienne
- 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.

➤ **Détermination de la LD<sub>PCR</sub>**

Cette détermination de LD<sub>PCR</sub> sera réalisée à l'aide d'ARN de synthèse 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 (résultats du LNR fournis avec l'ARN de synthèse).

➤ **Détermination de LD<sub>méthode</sub> :**

Cette détermination de LD<sub>méthode</sub> sera réalisée à l'aide d'un virus inactivé fourni par le LNR (nommé 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 devra être au moins aussi sensible que la méthode officielle mise en œuvre par le LNR (recommandations pour le dopage et résultats attendus avec méthode officielle fournis par le LNR).

➤ **Spécificité et sensibilité diagnostiques :**

Toutes autres données disponibles relatives à la caractérisation de la spécificité et de la sensibilité diagnostiques devront être mentionnées dans le dossier. Le statut des échantillons analysés doit avoir été confirmé par une méthode officielle mise en œuvre au sein d'un laboratoire accrédité pour cette analyse.

## **Contrôle initial des réactifs réalisé par le LNR**

---

Le LNR vérifiera la LD<sub>PCR</sub>.

La LD<sub>méthode</sub> sera également vérifiée dans le seul cas où la trousse contiendra les réactifs nécessaires à l'étape d'extraction.

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 (écouvillons trachéaux / cloacaux, issus de poules / dindes / canards, non infectés ou infectés naturellement ou expérimentalement par des virus IA H5 / H7).

*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.*

## **Adoption de la méthode par les laboratoires utilisateurs et mise à disposition de matériaux de référence par le LNR**

---

Afin de permettre aux laboratoires utilisateurs d'adopter les trousse commerciales de RT-PCR temps réel officialisées et reconnues par le ministère de l'Agriculture, le LNR pour l'influenza aviaire pourra fournir de façon limitée aux laboratoires agréés et reconnus qui en feront la demande, des matériaux de référence adéquats (ARN transcrits et virus inactivé) pour la confirmation des LD<sub>PCR</sub> et LD<sub>méthode</sub> conformément à la norme NF U47-600-1.

Toutefois, le LNR pour l'influenza aviaire ne s'engage pas à fournir ces mêmes matériaux directement aux laboratoires agréés et reconnus pour une utilisation en routine des trousse commerciales (par exemple, inclusion à chaque essai comme « sentinelle » permettant de suivre la bonne maîtrise des procédures analytiques). Il est donc de la responsabilité des fabricants de proposer leurs propres réactifs de contrôle.

Afin d'assurer une homogénéité des matériaux qui seront proposés sur le marché par les fabricants, le LNR pourra fournir un virus inactivé (plus concentré que le matériau similaire fourni pour l'adoption) qu'il reviendra ensuite au fabricant de calibrer et de transformer pour obtenir un matériau de contrôle adapté à la trousse commerciale considérée. Cette cession fera l'objet d'un accord de transfert formalisant notre autorisation pour l'utilisation du matériel dans les conditions définies précédemment. Nous recommandons par ailleurs de calibrer ces réactifs de contrôles par rapport aux matériaux de référence utilisables pour l'adoption de méthode, ces derniers pouvant être fournis en quantité limitée en cas de besoin.

## **Documents disponibles auprès du LNR**

---

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

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



Éric NIQUEUX  
*Responsable du LNR pour l'influenza aviaire*  
*Anses, laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort*