

Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE : ANSES/PLOUF/MA2- Version 6

Septembre 2017

Détection de génome de virus influenza aviaire de sous-type 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

Laboratoire de Ploufragan-Plouzané
Laboratoire national de référence pour l'influenza aviaire



Historique de la méthode

Une méthode peut être mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est considérée comme majeure dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

Une modification est considérée comme mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
V6	Révision majeure	Septembre 2017	Changement de référence de la méthode : ANSES/PLOU/MA2-Version 6 en révision de la méthode Anses – rRT-PCR AIV H5-HA2 avec IPC-M – Révision 05 du 04/03/2015. Application de la norme NF U 47-600-1 : Les modifications portent sur le testage de témoin positif « non cible » externe permettant de renseigner le caractère inhibiteur ou non de l'extrait d'acides nucléiques et sur l'interprétation des résultats obtenus. Application du nouveau cartouche « modèle Anses » et modifications apportées suite à la mise en consultation sur le site de l'Anses.



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

ANSES - Laboratoire de Ploufragan-Plouzané

Laboratoire national de référence pour l'influenza aviaire

Adresse : Zoopôle – BP 53 – 22440 PLOUFRAGAN

Contact : Mr Éric NIQUEUX, responsable du Laboratoire national de référence pour l'influenza aviaire, adresse mail eric.niqueux@anses.fr



Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1 Objet et domaine d'application	7
2 Documents de référence.....	7
3 Termes, sigles et définitions	8
4 Principe de la méthode	8
5 Réactifs	11
5.1 Eau	11
5.2 Tampon TE	11
5.3 Kit d'amplification RT-PCR en temps réel.....	11
5.4 Oligonucléotides.....	11
5.5 Autres réactifs.....	12
6 Témoins	12
7 Appareillage et matériels	13
8 Consommables	13
9 Échantillons.....	14
9.1 Conditions d'acceptation des échantillons	14
9.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	14
9.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	14
10 Mode opératoire.....	14
10.1 Principe.....	14
10.2 Déclaration de la plaque (en zone L2)	15
10.3 Préparation des mélanges réactionnels en zone propre.....	15
10.4 Préparation de la microplaque en zone L2 (ARN)	16
10.5 Amplification en zone L2	17
11 Résultats.....	17
11.1 Contrôle de la validité des résultats	17
11.2 Validation des témoins.....	17
11.3 Analyse des échantillons.....	18
11.4 Calculs et expression des résultats	18
12 Caractéristiques de performance de la méthode	20



Introduction

Ce mode opératoire ANSES/PLOUF/MA2 – version 6 portant sur la détection de génome influenza aviaire de sous-type H5 de la lignée eurasienne selon la méthode de RT-PCR temps réel H5-HA2 avec témoin positif « non cible » externe (rRT-PCR AIV H5-HA2 avec IPC-M), est destiné aux laboratoires agréés pour la détection de virus influenza aviaire.

Il est à mettre en œuvre dans un deuxième temps après détection de virus influenza aviaire de type A réalisée selon le mode opératoire rRT-PCR AIV M-IPC version en vigueur [1], pour un ou des échantillons d'acides nucléiques d'origine aviaire détectés.

La présente méthode est une technique de diagnostic par RT-PCR temps réel qualitative. Elle est dérivée de la méthode officielle [2, 3] du laboratoire LRUE (APHA Weybridge) et est recommandée dans le manuel européen de diagnostic de l'influenza aviaire annexé à la Directive 2005/94/CE [4].

Les principales modifications apportées par le Laboratoire National de Référence sont

- L'ajout d'un témoin positif « cible » sous forme d'ARN transcrit ARNt H5 à la phase RT-PCR permettant la validation de la RT-PCR
- L'intégration d'un témoin positif « non cible » externe (IPC-M) dès la phase d'extraction permettant de renseigner le caractère inhibiteur ou non des extraits d'ARN, répondant ainsi aux exigences de la norme PCR en santé animale NF U 47-600 [5, 6]



Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

Seuls les ARN extraits sont travaillés dans ce mode opératoire et par conséquent, ne présentent pas de risque infectieux.

Cependant, selon l'arrêté du 30 avril 2012*, les virus influenza aviaries de type A de sous types H5N1, H7N3 et H7N7 responsables d'infection humaine ainsi que les parties de ces virus constituées de plus de 500 nucléotides font partie des MOT (microorganismes et toxines). Or selon le décret MOT du 30 juin 2010, toute opération de production, de fabrication, de transport, d'importation, d'exportation, de détention, d'offre, de cession, d'acquisition et d'emploi portant sur les MOT est soumise à autorisation préalable délivrée par l'ANSM. Toutefois sont dispensées de cette autorisation les opérations autres que la cession, l'importation et l'exportation réalisées par les établissements recevant des échantillons biologiques aux seules fins d'analyse de biologie médicale ou vétérinaire. Cette dispense vaut seulement pour les échantillons biologiques conservés moins de trente jours au sein de ces établissements, sauf décision contraire du ministre chargé de la santé, du juge administratif ou du juge judiciaire.**

*** Arrêté du 30 avril 2012 fixant la liste des micro-organismes et toxines**

**** Décret n° 2010-736 du 30 juin 2010 relatif aux micro-organismes**



1 Objet et domaine d'application

Ce document décrit une **méthode de détection qualitative** de virus influenza aviaire (VIA) de sous-type H5 de la lignée eurasienne basée sur l'amplification d'une partie du gène d'intérêt H5 dans la région HA2 selon la méthode de RT-PCR en temps réel. Elle est mise en œuvre dans un deuxième temps après détection de virus influenza aviaire de type A réalisée selon le mode opératoire rRT-PCR AIV M-IPC version en vigueur pour un ou des échantillons d'acides nucléiques d'origine aviaire détectés.

La détection du gène « cible » H5 est mesurée par la fluorescence émise au cours de la réaction PCR dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié.

Parallèlement à cette détection, le suivi d'une séquence constituée par le témoin positif « non cible » (IPC-M) ajouté dès l'étape d'extraction d'ARN lors de la méthode rRT-PCR influenza aviaire gène M-IPC, est réalisé. Ce témoin positif « non cible » externe permet de renseigner sur le caractère inhibiteur ou non de l'extrait.

Dans cette méthode, les amplifications sont réalisées à partir des ARN préalablement validés (extraction réalisée selon le mode opératoire de la méthode rRT-PCR AIV M-IPC)

- dans un ou deux puits avec le mélange réactionnel spécifique du gène « cible » H5

Remarque : Le testage en un puits de l'échantillon ne permet pas d'exclure une erreur de dépôt dans le cas d'un résultat négatif pour le gène « cible » H5. Il est conseillé de tester en double un échantillon lorsque ce dernier est issu d'un prélèvement unique (exemple 1 seul ARN ou 1 seul pool d'ARN testé). En revanche, dans un contexte de diagnostic de troupeau, si le nombre et la qualité des échantillons prélevés sont corrects = au moins 20 écouvillons trachéaux ou oropharyngés et 20 écouvillons cloacaux collectés rapidement après le début de la clinique, le laboratoire peut tester en simple chaque ARN issu d'un pool de 5 écouvillons de même nature. Il est laissé à chaque laboratoire d'apprécier la pertinence de cette approche en tenant compte de son propre risque d'erreur.

- dans un puits séparé avec le mélange réactionnel spécifique de la séquence du témoin positif « non cible »

2 Documents de référence

- [1] Mode opératoire portant sur la détection de génome de virus influenza aviaire de type A selon la méthode de RT-PCR en temps réel gène M avec contrôle positif interne : rRT-PCR AIV M-IPC, version en vigueur
- [2] Slomka et al. (2007) Validated H5 Eurasian Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction and its application in H5N1 Outbreaks in 2005-2006. Avian Diseases 51 : 373-377
- [3] Protocole LRUE "Eurasian H5 Avian Influenza Real Time PCR", reference SOP VI.492 edition 11, disponible à l'adresse suivante : <https://science.vla.gov.uk/flu-lab-net/docs/pub-protocol-ai-vi492.pdf>
- [4] Décision 2006/437/CE de la Commission du 4 août 2006 portant approbation d'un manuel de diagnostic pour l'influenza aviaire conformément à la Directive 2005/94/CE du conseil.
- [5] Norme NF U 47-600 1 : Méthodes d'analyse en santé animale PCR – Partie 1 : Exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR en santé animale (Février 2015)



- [6] Norme NF U 47-600 2 : Méthodes d'analyse en santé animale PCR – Partie 2 : Exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale (Février 2015)

3 Termes, sigles et définitions

IPC-M : Témoin positif interne « non cible » de la rRT PCR AIV M-IPC, présentement utilisé comme témoin positif « non cible » externe de la rRT PCR AIV-H5

rRT-PCR : Real Time Reverse transcriptase PCR ou RT-PCR temps réel

Tp TE: Tampon Tris-EDTA

4 Principe de la méthode

La méthode est basée

- d'une part sur l'amplification d'une partie du génome viral de virus influenza aviaire de sous-type H5 de la lignée eurasienne à l'aide d'amorces et d'une sonde TaqMan dégénérées (d'où la présence dans les séquences nucléotidiques des symboles Y, R ou W) de la région HA2 du gène H5. Ces amorces et sonde ont été sélectionnées de manière à détecter un très large panel de VIA H5 (H5N1, H5N2, H5N6, H5N8 HP mais aussi H5 FP européens, etc...). La sonde est marquée en extrémité 5' avec le fluorochrome FAM 6-carboxyfluorescéine et possède en extrémité 3' le fluorochrome TAMRA 6-carboxytetramethylrhodamine.

Les séquences des amorces et sonde sont décrites ci-dessous en 5' → 3' et portent sur la zone plus conservée (HA2) du gène de l'hémagglutinine

Amorce Upper "AIV H5 LH1" 5' **ACA TAT GAC TAC CCA CAR TAT TCA G** 3'
Amorce Lower "AIV H5 RH1" 5' **AGA CCA GCT AYC ATG ATT GC** 3'
Sonde "AIV H5-PRO" 5' **Fam-TCW ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA-Tamra** 3'

La taille du fragment amplifié est de 152 pb.

- d'autre part sur l'amplification concomitante mais dans un autre puits du témoin « non cible » IPC-M (externe dans la présente application comme expliqué supra) à l'aide d'un couple d'amorces (spécifiques du gène M) et d'une sonde TaqMan spécifique de la séquence à amplifier ; ce sont exactement les mêmes que celles décrites dans le mode opératoire rRT PCR AIV M-IPC

Les séquences des amorces et sonde sont décrites ci-dessous en 5' → 3'

Amorce Upper "AIV-M1 u25" 5' **AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG** 3'
Amorce Lower "AIV-M1 r124" 5' **TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG** 3'
Sonde "IPC-M" 5' **Vic-TAC GGG GCA AGT GCA ATA GAG G-Tamra** 3'

La taille du fragment amplifié spécifique du témoin interne est de 174 pb.



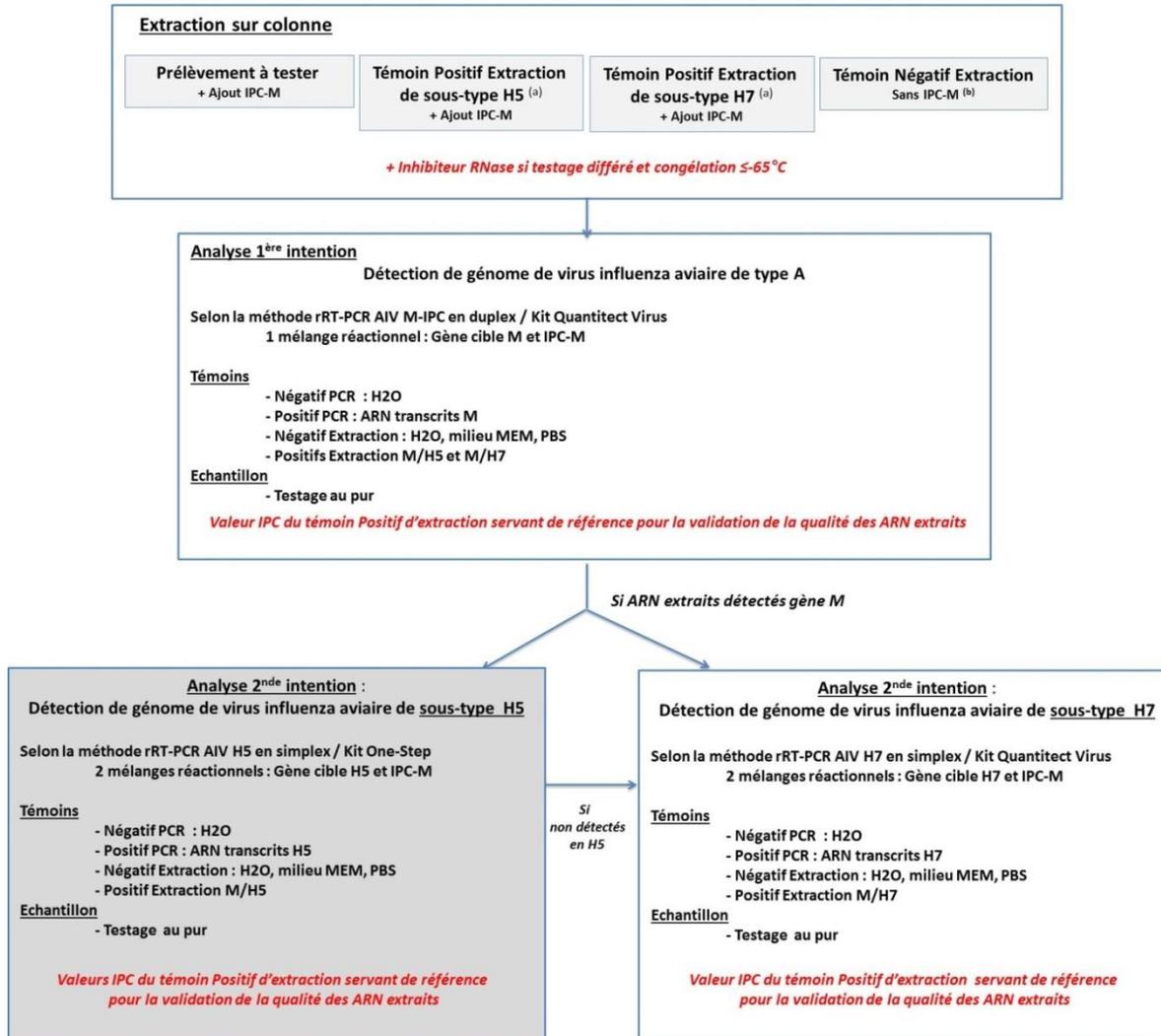
L'ajout d'un témoin positif « non cible » permet de tester uniquement l'échantillon au pur et supprime le besoin de le tester dilué au 1/10^{ème} en parallèle (cf mode opératoire rRT-PCR AIV gène H5, révision 04 du 22/06/2006) sauf dans un second temps si ce témoin n'est pas conforme.

Afin de répondre rapidement aux exigences de la norme NF U 47-600, l'utilisation du kit d'amplification One-Step (Qiagen) est conservée par rapport à la version précédente. Il n'est pas prévu dans l'immédiat l'utilisation du kit Quantitect Virus (même kit d'amplification que celui mentionné pour les méthodes rRT PCR AIV M-IPC et rRT-PCR AIV H7 avec IPC-M).



Un schéma organisationnel est décrit ci-dessous. La zone en grisé concerne la méthode rRT-PCR AIV H5-HA2 avec IPC-M.

Schéma organisationnel



(a) Sans contexte particulier, dans l'attente d'un témoin polyvalent (mélange des deux sous-types H5 et H7), il est préférable de disposer des deux témoins positifs d'extraction (sous-types H5 et H7) lesquels permettront de valider non seulement la méthode rRT-PCR AIV M-IPC mais aussi la méthode employée rRT-PCR AIV H5-HA2 avec IPC-M ou rRT-PCR AIV H7-HA2 avec IPC-M lors de l'analyse de 2^{de} intention.

Ainsi le témoin positif d'extraction noté M/H5 peut servir à la validation de la rRT-PCR AIV M-IPC et rRT-PCR AIV H5 avec IPC-M et celui noté M/H7 à la validation de la rRT-PCR AIV M-IPC et rRT-PCR AIV H7-HA2 avec IPC-M.

Dans des contextes particuliers (retour d'enquête notamment) où un seul sous-type est recherché, il est possible de privilégier l'extraction d'un seul témoin positif d'extraction.

(b) Afin de s'assurer de l'absence d'inter-contamination, il est souhaitable d'avoir un témoin négatif d'extraction vis-à-vis du gène « cible » recherché mais aussi du témoin positif « non cible » IPC-M. C'est pourquoi, il n'est pas prévu d'ajouter de l'IPC-M.



5 Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.1 Eau

Eau de qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire, exempte de nucléases

5.2 Tampon TE

Tampon TE de molarité : 1 mM Tris-HCl pH 8.0 / 0.01 mM EDTA, exempt de nucléases. Selon les recommandations données par le prestataire d'amorces et de sondes, un tampon TE de fabrication commerciale et de composition similaire peut également être employé, sous réserve d'obtention de résultats comparables.

5.3 Kit d'amplification RT-PCR en temps réel

Kit One-Step RT-PCR : référence 210212, Qiagen

Remarque : Seule cette référence de kit a fait l'objet d'une caractérisation complète de la méthode. Un autre conditionnement du kit One-Step pourra être utilisé. L'utilisation d'un autre kit devra faire l'objet d'une nouvelle caractérisation complète de la méthode.

5.4 Oligonucléotides

Les séquences des amorces et sondes sont décrites dans le paragraphe 4.

Amorce Upper "AIV H5 LH1". Il est recommandé d'utiliser une qualité de purification HPLC pour application dans les méthodes de RT-PCR temps réel. Elle est reprise dans du tampon TE comme préconisé par le fabricant de façon à obtenir une concentration de 50 µM puis répartie sous petits volumes et stockée à ≤-16°C.

Amorce Lower "AIV H5 RH1". Il est recommandé d'utiliser une qualité de purification HPLC pour application dans les méthodes de RT-PCR temps réel. Elle est reprise dans du tampon TE comme préconisé par le fabricant de façon à obtenir une concentration de 50 µM puis répartie sous petits volumes et stockée à ≤-16°C.

Sonde "AIV H5-PRO". Il est recommandé d'utiliser une qualité de purification HPLC pour application dans les méthodes de RT-PCR temps réel. Elle est reprise dans du tampon TE comme préconisé par le fabricant de façon à obtenir une concentration de 10 µM puis répartie et stockée à ≤-16°C à l'abri de la lumière.

Remarque : Sur un recul des 9 lots de sonde (marquage Fam-Tamra) issus de 2 fournisseurs différents (Applied Biosystems et Eurogentec) testés au 20/10/2016, le LNR n'a pas observé de différence de qualité.

Amorce Upper "AIV-M1 u25". Il est recommandé d'utiliser une qualité de purification HPLC pour application dans les méthodes de RT-PCR temps réel. Elle est reprise dans du tampon TE comme



préconisé par le fabricant de façon à obtenir une concentration de 50 µM puis répartie sous petits volumes et stockée à $\leq -16^{\circ}\text{C}$.

Amorce Lower "AIV-M1 r124". Il est recommandé d'utiliser une qualité de purification HPLC pour application dans les méthodes de RT-PCR temps réel. Elle est reprise dans du tampon TE comme préconisé par le fabricant de façon à obtenir une concentration de 50 µM puis répartie sous petits volumes et stockée à $\leq -16^{\circ}\text{C}$.

Sonde "IPC-M". Il est recommandé d'utiliser une qualité de purification HPLC pour application dans les méthodes de RT-PCR temps réel. Elle est reprise dans du tampon TE comme préconisé par le fabricant de façon à obtenir une concentration de 10 µM puis répartie sous petits volumes et stockée à $\leq -16^{\circ}\text{C}$ à l'abri de la lumière.

Remarque : Il a été observé, de façon récurrente, une différence de qualité dans les différentes productions de la sonde (marquage Vic-Tamra). C'est pourquoi, il est fortement déconseillé de commander une synthèse à 6000 pmol, la purification n'étant pas réalisée de la même manière. Comme il n'est pas prévu pour le moment de tester d'autres marquages et que le fournisseur Applied Biosystems a l'exclusivité du marquage "Vic", il est demandé d'apporter une attention particulière avant de valider chaque nouveau lot.

5.5 Autres réactifs

ROX reference Dye : à titre indicatif référence 12223-012 sous 500 µl, Invitrogen

MgCl₂, 25mM : à titre indicatif référence R0971, Life Technologies

Inhibiteur RNase : Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor 40 U/µl : à titre indicatif référence N2511, Proméga

6 Témoins

Témoins négatifs d'amplification : eau ultrapure en lieu et place du dépôt d'ARN sinon mêmes mélanges réactionnels (gène H5 et IPC) (voir ci-après tableau des mélanges réactionnels). Il convient de prévoir :

- Un témoin négatif d'amplification en premier dépôt
- En fonction du taux de remplissage de la plaque, un ou plusieurs autres témoins négatifs H₂O à intercaler entre les échantillons à tester (Par exemple tous les 10 dépôts)

Témoins positifs d'amplification : ARNt H5 à diluer en fonction du lot de fabrication. L'ARNt H5 est produit par transcription *in vitro* à partir d'un produit PCR contenant la séquence « cible ». Chaque lot est identifié et possède des caractéristiques précises ainsi que des recommandations d'emploi fournies par l'ANSES – Laboratoire de Ploufragan.

Compte tenu de l'assemblage par le laboratoire utilisateur des différents réactifs, et notamment des amorces et sondes, le contrôle du processus analytique en conditions de fidélité intermédiaire inclut le suivi de l'efficacité de la réaction et de la dispersion des résultats obtenus à partir d'une gamme de dilution décimale à trois niveaux de concentration de l'ARN transcrit (fonction du lot) déposés en double. Le dernier point de la gamme se situe entre 1 et 10 fois la LD_{PCR}. Ces ARNs ne sont incorporés qu'au mélange réactionnel gène H5 (voir ci-après tableau des mélanges réactionnels).



Témoin négatif de la méthode complète (extraction + amplification). Il s'agit du témoin négatif d'extraction décrit dans la méthode rRT-PCR AIV M-IPC censée être mise en œuvre dans l'étape précédente et qui doit être testé négatif par cette méthode. Si, dans un contexte particulier, la méthode rRT PCR-H5 est mise en œuvre d'emblée, après l'étape d'extraction, il est impératif de tester ce témoin constitué d'eau ultrapure, de milieu MEM ou de PBS (et sans l'ajout d'ARN encapsidé M-IPC), en lieu et place d'éluat d'écouvillon(s) ou de broyat d'organes ou de liquide allantoidien, , additionné des mêmes mélanges réactionnels (gène H5 et IPC) (voir ci-après tableau des mélanges réactionnels).

Témoin positif de la méthode complète (extraction + amplification). Afin de procéder à la validation de la méthode complète, il est préférable de disposer d'un témoin constitué par un virus inactivé de sous-type H5 et calibré de façon à se situer entre 1 et 100 LD_{Méthode}. Bien que l'étape d'extraction ait été validée lors de la mise en œuvre de la méthode rRT-PCR M-IPC, les ARN extraits sont également incorporés avec l'un et l'autre des mélanges réactionnels (gène H5 et IPC) (voir ci-après tableau des mélanges réactionnels). Les valeurs de C_T du témoin « non cible » IPC-M sont prises en référence (voir chapitre 11 « Résultats », sous-chapitres 11-2).

7 Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Thermocycleur de PCR en temps réel, son logiciel de traitement des données et ses consommables (tubes PCR 0.2 ml ou microplaque de 96 puits de qualité optique)

Remarque : A titre informatif, seuls les thermocycleurs ABI 7000 et ABI 7500 de Applied Biosystems ainsi que le thermocycleur CFX96 de Biorad ont été utilisés par le LNR pour la caractérisation de cette méthode. Pour une application sur un autre thermocycleur, une adaptation sera peut être nécessaire.

Matériel courant de laboratoire : micropipettes de précision contrôlées au plan métrologique, agitateur produisant une agitation de type vortex, centrifugeuse de paillasse permettant de centrifuger à +300 tours/mn les microplaques et tubes 0.5 ml.

8 Consommables

Plaque 96 puits de qualité optique (à titre indicatif référence N801-0560, Life Technologies pour les thermocycleurs ABI 7000 et ABI 7500) ou équivalent

Adhésif pour plaque 96 puits de qualité optique (à titre indicatif référence 4311971, Life Technologies pour les thermocycleurs ABI 7000 et ABI 7500) ou équivalent

Microtubes et pointes à filtre exempt de nucléases de différents volumes



9 Échantillons

9.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les prélèvements concernés sont des ARN issus de surnageants d'écouvillons oropharyngés/trachéaux, surnageants d'écouvillons cloacaux provenant d'oiseaux sauvages, d'oiseaux captifs ou de volailles.

Les ARN ont été extraits sur colonne à l'aide du kit RNeasy de Qiagen selon la méthode décrite dans le mode opératoire rRT-PCR AIV M-IPC (version en vigueur), dans lesquels dix unités d'inhibiteurs de RNase ont pu être rajoutées permettant de ralentir les dégradations liées à l'activité enzymatique RNase résiduelle.

La présente méthode n'a pas encore été validée pour des ARN extraits à l'aide de l'automate d'extraction M48 (cf mode opératoire rRT-PCR AIV M-IPC, version en vigueur).

De même, la présente méthode n'a pas encore été validée pour d'autres types d'échantillons notamment des surnageants de broyats d'organes mais les modalités d'amplification du gène « cible » H5 restent inchangées par rapport à la version précédente de la méthode, à l'exception de l'ajout du témoin positif « non cible » IPC-M au moment de l'extraction. L'ajout de ce témoin « non cible » s'est révélé non préjudiciable à l'amplification d'autres gènes (M et H7) aussi l'application de la présente méthode à ces échantillons ne devrait *a priori* pas poser de problèmes.

9.2 Conservation des échantillons avant analyse

Si le testage de ces ARN est réalisé peu de temps après l'extraction, une conservation sous couvert du froid à $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ est suffisante (\leq à 24 heures).

Si le testage de ces ARN est différé, il est conseillé d'ajouter des inhibiteurs de RNase à raison de 10 unités par extrait et de les conserver à une température $\leq -65^{\circ}\text{C}$.

9.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Après analyse, les ARN sont conservés à une température de $\leq -65^{\circ}\text{C}$.

10 Mode opératoire

10.1 Principe

Le kit "One-Step RT-PCR" de Qiagen est conçu pour réaliser la transcription inverse et l'amplification par PCR en une seule étape à partir des ARN extraits. Il n'est pas prévu dans l'immédiat de travailler en duplex ni d'utiliser un autre kit d'amplification tel que le kit Quantitect Virus (Qiagen).

Deux mélanges réactionnels sont réalisés en quantité suffisante de façon à prévoir

- le testage du gène d'intérêt (en simple ou double, en fonction du contexte et de la décision prise par le laboratoire, cf paragraphe 1). La réalisation en simple ne permet pas d'exclure un problème de pipetage dans le cas d'un résultat négatif (non-amplification du gène d'intérêt).
- le testage du témoin positif « non cible ».

Chaque puits réactionnel est réalisé sous un volume de 25 μl final.



10.2 Déclaration de la plaque (en zone L2)

La disposition des échantillons extraits et des témoins positifs et négatifs (d'amplification et de la méthode complète) est renseignée sur chaque plan de plaque.

La première étape consiste à définir les détecteurs utilisés

Gène d'intérêt H5 : Nom et type de chimie fluorescente employée (Fam-Tamra)

Témoin IPC : Nom et type de chimie fluorescente employée (Vic-Tamra)

Utilisation du "ROX" comme "Passive Reference" (si le thermocycleur le nécessite)

La deuxième étape permet de définir les puits et de leur assigner un type de détecteur selon le schéma de plaque préétabli. Il est important de répartir des témoins négatifs sur la plaque, le témoin positif d'extraction H5 et de terminer par les témoins positifs d'amplification ARNt H5, (voir Témoins, chapitre 6) afin de limiter les risques de contamination. La position de ces témoins devra varier de façon à vérifier l'homogénéité des lectures au cours du temps.

10.3 Préparation des mélanges réactionnels en zone propre

Remarque : Le travail est à réaliser dans de la glace ou à l'aide de portoirs réfrigérés

Remarque : Le tube mère de ROX se conserve à $\leq -16^{\circ}\text{C}$ à l'abri de la lumière mais il est possible de prendre un aliquot et de le conserver plusieurs jours à $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Remarque : les différents composants sont décongelés à température ambiante puis homogénéisés par vortexage.

Pour les acides nucléiques extraits sur colonne, prévoir par puits un dépôt de 23 μl de chacun des mélanges réactionnels et 2 μl d'ARN.

Les mélanges sont préparés dans des tubes exempts de nucléases en volume suffisant, à savoir 23,125 μl par réaction pour avoir un volume réactionnel final à déposer de 23 μl par puits.

- Comptabiliser le nombre de puits réactionnels (échantillons, témoins négatifs/positifs d'amplification et de la méthode complète) et ajuster le volume nécessaire. Il est possible d'assurer un volume excédentaire en majorant le nombre de réactions (par exemple, avec n puits réactionnels, prévoir n+2 réactions).

Remarque : le témoin positif d'amplification constitué par la gamme d'ARNt H5 n'est incorporé qu'au mélange réactionnel gène H5.

Remarque : l'ARN correspondant au témoin positif de la méthode complète de sous-type H5 est incorporé à la fois au mélange réactionnel du gène « cible » H5 et au mélange réactionnel du témoin « non cible » IPC-M.

**Tableau des mélanges réactionnels**

	Volume par réaction ARN extrait sur colonne	
	Mélange réactionnel Gène H5	Mélange réactionnel IPC-M
H2O « RNase free »	13.125 µl	13.375 µl
Tp 5X RT-PCR	5 µl	5 µl
ROX (si le thermocycleur le nécessite)	0.5 µl	0.5 µl
dNTP	1 µl	1 µl
Amorce AIV H5 LH1 (50 µM)	0.2 µl	/
Amorce AIV H5 RH1 (50 µM)	0.2 µl	/
Sonde AIV H5 PRO (10 µM)	0.75 µl	/
Amorce M1 u 25 (50 µM)	/	0.2 µl
Amorce M1 r 124 (50 µM)	/	0.2 µl
Sonde IPC-M (10 µM)	/	0.50 µl
MgCl2 (25 mM)	1.25 µl	1.25 µl
RNase Inhibitor (40 u/µl)	0.1 µl	0.1 µl
Enzyme one-step	1 µl	1 µl
	23.125 µl	23.125 µl

Remarque : Le volume d'H2O « RNase free » est à ajuster suivant l'ajout ou pas de ROX (fonction du thermocycleur) ou suivant le volume ajouté d'amorces et sondes (adapté en fonction de leurs molarités initiales).

10.4 Préparation de la microplaque en zone L2 (ARN)

Le travail est à réaliser sous hotte ou dans toute autre zone adaptée, assurant l'absence de contamination lors de cette étape.

- Conserver chaque échantillon d'ARN extrait sous froid.
- Prélever la microplaque et la déposer sur un support, ou utiliser tous autres tubes appropriés
- Déposer 23 µl de mélange réactionnel selon le schéma de plaque préétabli.
- Déposer les différents échantillons
 - o 2 µl d'eau "Témoin Négatif d'amplification" de début de plaque
 - o 2 µl des ARN à tester (des échantillons, des témoins de la méthode complète) au pur
 - o 2 µl d'eau "Témoin Négatif d'amplification" dispersés sur la plaque (si le nombre d'échantillons est important, prévoir d'incorporer davantage de témoins négatifs)
- Réaliser la gamme d'ARNt H5 (Témoin positif d'amplification) sous glace. Pour cela effectuer des dilutions successives de 1/10 en 1/10 (par exemple à raison de 2 µl dans 18 µl d'eau), en changeant de pointe à chaque fois et en mélangeant vigoureusement chaque dilution
- Déposer en double sous 2 µl trois points de la gamme (Faible, Moyen, Fort) en commençant par la dilution la plus élevée (quantité la plus faible). Les dilutions à effectuer sont fonction du lot d'ARNt H5. Le point faible de la gamme se situe entre 1 et 10 fois la LD_{PCR}. Il est souhaitable de faire varier la position de cette gamme sur la plaque



- Sceller la plaque ou les tubes de réactions PCR avec le dispositif approprié.
- Effectuer une légère centrifugation pour éliminer les bulles introduites lors de l'étape de pipetage du mélange réactionnel et/ou de l'échantillon ARN.

10.5 Amplification en zone L2

- Déposer ensuite la plaque sur le block PCR du thermocycleur.
- Mettre un coussinet de compression marron/gris lorsque le thermocycleur ABI prism 7000 est utilisé.
- Configurer l'appareil selon les conditions suivantes :
 - o Etape 1 : 30 min à +50°C
 - o Etape 2 : 15 min à +95°C
 - o Etape 3 : 40 cycles de (10 sec à +95°C) (30 sec* à +54°C) (10 sec à +72°C).

** Il est à noter que l'ABI Prism 7500 n'accepte pas de réaliser une lecture à 30 sec. Dans ce cas il faut mettre 32 sec.*

- o Volume final : 25 µl
- o Data collection : Etape 3, séquence 2 : 30 sec* à +54°C. La lecture de la fluorescence se fait à ce niveau.

L'utilisation de l'ABI Prism 7500 nécessite de sélectionner le "Run Mode" en "Emulation 9600", de façon à rester compatible avec l'ABI Prism 7000.

11 Résultats

11.1 Contrôle de la validité des résultats

L'analyse des résultats bruts est réalisée selon les recommandations du fabricant et celles décrites par le laboratoire en observant les courbes de fluorescence mesurées par l'appareil de PCR en temps réel et le logiciel associé. Elle se fait "detector" par "detector" en modifiant si nécessaire la ligne de base pour chaque detector.

11.2 Validation des témoins

Pour mémoire le "detector Fam" correspond au gène « cible » H5 et le "detector Vic" au témoin positif « non cible » externe IPC-M.

La validation des résultats est réalisée par le valideur technique lorsque

- Les Témoins Négatifs d'amplification présentent des valeurs de C_T indéterminées ou des courbes d'"amplification" non exponentielles pour le gène « cible » H5 ainsi que pour l'IPC-M => Absence de contamination croisée accidentelle
- Le(s) témoin(s) Négatif(s) de la méthode complète présente(nt) des valeurs de C_T indéterminées ou des courbes d'"amplification" non exponentielles pour le gène « cible » H5 ainsi que pour l'IPC-M => Absence de contamination croisée accidentelle
- Les témoins Positifs d'amplification (différents points de la gamme d'ARNt H5) présentent des valeurs de C_T pour le gène « cible » H5 compatibles avec celles obtenues par le



laboratoire en conditions de fidélité intermédiaire. Les doublons doivent être identiques avec moins de 1 C_T de différence. Cependant, un écart supérieur pourra être admis pour le point de la gamme le plus proche de la limite de détection si chacune des valeurs obtenues reste dans l'intervalle des valeurs obtenues par le laboratoire en conditions de fidélité intermédiaire.

- La pente de la gamme est comprise entre -2.839 et -4.115, ce qui représente une efficacité comprise entre 75 et 125% => Validation du mélange réactionnel « Gène H5 »
- La valeur de C_T pour le gène « cible » H5 du témoin positif de la méthode complète spécifique de sous-type H5 est compatible avec celle obtenue par le laboratoire en conditions de fidélité intermédiaire => Validation des conditions d'extraction et d'amplification mais aussi des conditions de conservation des ARN
- La valeur de C_T pour le témoin « non cible » IPC-M provenant du témoin positif de la méthode complète de sous-type H5 est compatible avec celle obtenue par le laboratoire en conditions de fidélité intermédiaire => Cette valeur est prise comme référence pour la validation des extractions des échantillons (cf dossier de validation).

11.3 Analyse des échantillons

La validation de la qualité des ARN extraits est réalisée lorsque

- Une amplification du témoin « non cible » IPC-M est présente avec une courbe exponentielle.
- La valeur de C_T du témoin « non cible » IPC-M de l'échantillon est inférieure ou égale à [la valeur de C_T du témoin « non cible » IPC-M du témoin positif de la méthode complète de sous-type H5 ajoutée de 3 C_T]
$$\text{IPC échantillon} \leq [\text{IPC témoin positif d'extraction} + 3 C_T]$$

Une valeur plus tardive de l'IPC-M de l'échantillon par rapport à celle de l'IPC-M du témoin positif de la méthode complète ajoutée de 3 C_T peut évoquer la présence d'inhibiteurs, un défaut d'extraction ou la dégradation des ARN, néanmoins elle ne rend le résultat ininterprétable qu'en l'absence d'amplification du gène « cible ».

11.4 Calculs et expression des résultats

Le tableau ci-dessous représente les différentes possibilités d'expression des résultats au plan qualitatif ; toutefois compte tenu des investigations à poursuivre en cas de positivité, il est nécessaire d'apporter (du moins pour le LNR qui prend le relais) une indication sur la richesse du prélèvement de manière à ce que le LNR puisse sélectionner les plus riches d'entre eux si le choix est possible, en fournissant en complément à titre indicatif les valeurs de C_t obtenus pour le gène « cible » H5.



Situation	Detector AIV-H5 (Fam)	Detector IPC-M (Vic)	Conclusion
A	Absence d'amplification ou courbe non exponentielle ou en dessous de la ligne de base	Amplification ^(a)	Absence de détection du gène H5 de virus influenza de sous-type H5
B	Absence d'amplification	Absence d'amplification ou amplification tardive ^(a)	Ininterprétable – Présence possible d'inhibiteurs PCR, dépôt insuffisant voire absent de l'échantillon à tester, défaut d'extraction, dégradation de l'ARN... ARN à re-tester au pur et au 1/10 et/ou à ré-extraire si les résultats fournis par les autres échantillons de la même origine ne sont pas suffisants pour statuer
C	Amplification	Amplification ^(a)	Détection du gène H5 de virus influenza de sous-type H5
D	Amplification	Absence d'amplification ou amplification tardive ^(a)	Détection du gène H5 de virus influenza de sous-type H5 malgré un témoin positif « non cible » non conforme

(a) Les valeurs de C_T obtenues pour le témoin positif « non cible » IPC avec l'échantillon à tester doivent être inférieures ou égales à [celle obtenue avec le témoin positif de la méthode complète de sous-type H5 + $3C_T$].

12 Caractéristiques de performance de la méthode

La PCR en temps réel ainsi que la méthode complète a été caractérisée selon la norme NF U 47-600. Les résultats présents dans le dossier de validation sont synthétisés dans le tableau suivant.

Critères de performance	Critères de validité attendus	Performances observées
Spécificité analytique	100 %	<p>La spécificité (inclusive et exclusive) a été initialement établie par Slomka à partir de 51 souches d'influenza aviaire de sous-type H5 de la lignée eurasienne et de 52 souches de virus influenza aviaire appartenant à d'autres sous-types [2]. Elle a été complétée par le LNR sur des souches d'influenza aviaire de sous-type H5 issues des suspicions 2006 et 2007 ainsi que dans le cadre de la surveillance de l'avifaune sauvage.</p> <p>L'addition de Témoin Positif « non cible » IPC-M avant extraction n'ayant aucune incidence sur la détection du gène « cible » H5, il n'a pas été jugé nécessaire de refaire la spécificité à partir des extraits en présence de témoin positif « non cible » externe IPC-M, les conditions concernant l'amplification du gène « cible » étant identiques à la méthode de référence.</p> <p>Les détections des souches d'influenza aviaire H5HP issues de la crise sanitaire IA HP du Sud-Ouest 2015-2016 ainsi que celle 2016-2017 avec notamment la détection de la souche IAHP H5N8 (26/11/2016 sur des canards sauvages) et extraites en présence d'IPC-M selon la méthode de RT-PCR AIV M-IPC (version en vigueur) complètent cette spécificité.</p> <p>Les résultats obtenus en terme d'inclusivité et d'exclusivité sont conformes au critère attendu.</p>
Limite de détection PCR	≤ 2000 copies d'ARNt / réaction PCR	<p>La limite de détection de la PCR a été déterminée selon la méthodologie de la norme NF U 47-600 : résultats obtenus lors de 3 séances avec 8 répétitions par niveau de dilution</p> <p>La LD_{PCR} à 95 % est considérée atteinte à 2000 copies/puits pour le lot d'ARNt CS.</p>
Efficacité de la PCR en conditions de fidélité intermédiaire (test initial)	<p>Efficacité comprise entre 75 et 125 %</p> <p>Coefficient de variation inférieur à 10%</p>	<p><u>Données facultatives car test qualitatif</u></p> <p>En conditions de fidélité intermédiaire, l'efficacité moyenne est de 88 % sur 3 séances initiales avec un coefficient de variation de 2.66 % pour le dernier point de la gamme se situant à 1 LD_{PCR}.</p>



Efficacité de la PCR en conditions de fidélité intermédiaire (utilisation de routine)	Efficacité comprise entre 75 et 125 % Coefficient de variation inférieur à 10 %	En conditions de fidélité intermédiaire (75 valeurs, période du 28/03/2012 au 26/10/2016, sur 4 thermocycleurs, 5 opérateurs, 15 lots différents de kits d'amplification One-step, 4 lots d'amorces et sondes), l'efficacité mesurée lors de chaque séance se répartit entre 78 et 113 % avec une moyenne située à 91 % et des coefficients de variation compris entre 3.51 et 4.43 %
Limite de détection de la méthode Matrice : MEM Extraction : Colonne	< à 10 ⁴ DIE ₅₀ /ml	La limite de détection de la méthode a été déterminée selon la méthodologie de la norme NF U 47-600 par dopage de la matrice avec la souche H5N3_A/mallard/France/100205b/2010_lot 3.1 titrée à 10 ^{8.5} DIE ₅₀ /ml : résultats obtenus lors de 2 séances (extraction + rRT-PCR) avec 4 répétitions par niveau de dilution. Limite de détection sur matrice « MEM » = 10 DIE ₅₀ /ml avant extraction cad 0.08 DIE ₅₀ /puits
Limite de détection de la méthode Matrice : Liquide allantoïdien Extraction : Colonne	< à 10 ⁴ DIE ₅₀ /ml	La limite de détection de la méthode a été déterminée selon la méthodologie de la norme NF U 47-600 par dopage de la matrice avec la souche H5N3_A/mallard/France/100205b/2010_lot 3.1 titrée à 10 ^{8.5} DIE ₅₀ /ml : résultats obtenus lors de 2 séances (extraction + rRT-PCR) avec 4 répétitions par niveau de dilution. Limite de détection sur matrice « Liquide Allantoïdien » = 100 DIE ₅₀ /ml avant extraction cad 0.8 DIE ₅₀ /puits
Limite de détection de la méthode Matrice : surnageant écouvillons oropharyngés Extraction : Colonne	< à 10 ⁴ DIE ₅₀ /ml	La limite de détection de la méthode a été déterminée selon la méthodologie de la norme NF U 47-600 par dopage de la matrice avec la souche H5N3_A/mallard/France/100205b/2010_lot 3.1 titrée à 10 ^{8.5} DIE ₅₀ /ml : résultats obtenus lors de 2 séances (extraction + rRT-PCR) avec 4 répétitions par niveau de dilution. Limite de détection sur matrice « Surnageants Ecouvillons Oropharyngés ^(a) » = 100 DIE ₅₀ /ml avant extraction cad 0.8 DIE ₅₀ /puits (a) Les écouvillons trachéaux sont considérés de même nature que les écouvillons oropharyngés
Limite de détection de la méthode Matrice : surnageant écouvillons cloacaux Extraction : Colonne	< à 10 ⁴ DIE ₅₀ /ml	La limite de détection de la méthode a été déterminée selon la méthodologie de la norme NF U 47-600 par dopage de la matrice avec la souche H5N3_A/mallard/France/100205b/2010_lot 3.1 titrée à 10 ^{8.5} DIE ₅₀ /ml : résultats obtenus lors de 2 séances (extraction + rRT-PCR) avec 4 répétitions par niveau de dilution. Limite de détection sur matrice « Surnageants Ecouvillons Cloacaux » = 100 DIE ₅₀ /ml avant extraction cad 0.8 DIE ₅₀ /puits
Répétabilité de la méthode	Coefficient de variation inférieur à 10%	<u>Données facultatives car test qualitatif</u> La répétabilité de la méthode a été évaluée sur les différentes matrices à partir des données obtenues lors de la détermination des LD _{Méthodes} . Les coefficients de variation sont compris entre 0.56 % et 2.61 %.
Fidélité intermédiaire de la méthode	Coefficient de variation inférieur à 10%	La fidélité intermédiaire de la méthode a été évaluée à partir du témoin positif d'extraction testé lors de chaque séance (54 valeurs, période du 17/09/2015 au 26/10/2016, sur 2 thermocycleurs, 4 opérateurs, 5 lots différents de kits d'amplification One-Step, 2 lots d'amorces et sondes). Le coefficient de variation obtenu est de 2.81 %.

Spécificité et Sensibilité diagnostiques par rapport à la méthode de référence rRT-PCR AIV H5	Minimum de 90 %	Compte-tenu i) que la méthode LRUE a fait l'objet d'une étude approfondie de la spécificité ii) qu'aucune modification des amorces et sonde n'a été faite dans cette présente méthode avec extraction en présence d'IPC-M et iii) que l'ajout d'IPC-M n'a aucune incidence sur la détection du gène « cible » H5, la spécificité et la sensibilité diagnostiques n'ont pas été réévaluées par rapport à la méthode de référence.
Comparaison des modalités de validation des extractions - Testage du témoin « non cible » ou testage des ARN au 1/10	Cohérence de l'interprétation des résultats obtenus (ARN au pur et ARN au 1/10 pour le gène « cible » vs ARN au pur pour le gène « cible » et le témoin « non cible »)	<p>Une comparaison des modalités de validation a été effectuée sur 69 ARN extraits en présence de témoin « non cible » avec testage au pur et au 1/10 vis-à-vis du gène « cible » et au pur vis-à-vis de l'IPC-M</p> <p>Aucune ambiguïté n'a été observée sur le statut final des échantillons. Seuls 3 échantillons n'ont pas eu d'amplification vis-à-vis du gène « non cible » mais ont été retrouvés détectés vis-à-vis du gène H5.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sur les 30 échantillons détectés H5 au pur et au 1/10 : 29 avaient des valeurs IPC compatibles avec celles attendues, 1 avec IPC non détecté - Sur les 10 échantillons détectés H5 au pur et non détectés au 1/10 : 8 avaient des valeurs IPC compatibles avec celles attendues, 2 avec IPC non détecté - Sur les 29 échantillons non détectés H5 au pur et au 1/10 : 29 avec des valeurs IPC compatibles avec celles attendues