

Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE : ANSES/PPN/MA/5/Rev03

Ref ennov : PPN/INS/0875

Avril 2022

Détection du virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (vNPI) par RT- PCR en temps réel

Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort

**Laboratoire National de Référence pour les maladies réglementées des
poissons**

Historique de la méthode

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

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
V03 **	Mineures	Avril 2022	Suite à audit interne de mars 2022 : <ul style="list-style-type: none"> • Correction d'erreurs de forme dans le texte • § 5.2.3 : témoin processus cible entre 1 et 10 LD_{méthode} (au lieu de 10 à 100) • Mise à jour des textes de référence
V02	Mineures	Sept 2021	Quelques modifications de forme suite à consultation
V01 *	Création	Juin 2021	Version initiale

** La version 03 est la version publiée ;

* La version 01 a fait l'objet d'une consultation en juillet 2021 sur le site de l'Agence.

Avant-propos

La présente méthode a été développée, validée et rédigée par le Laboratoire National de Référence pour les maladies réglementées des poissons :

Anses - Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort

Laboratoire National de Référence pour les maladies réglementées des poissons

Unité Virologie, Immunologie et Ecotoxicologie des Poissons (VIMEP)

CS 10070 – Site Ifremer

29280 PLOUZANÉ

Contact : 02 98 22 44 62

Adresse mail : lnr.poissons@anses.fr

Sommaire

Avant-propos	3
Sommaire	4
Table des figures	5
Table des tableaux	5
Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1 Objet et domaine d'application	8
2 Documents de référence	8
3 Termes, sigles et définitions	8
4 Principe de la méthode	9
4.1 Broyage des organes.....	9
4.2 Extraction des acides nucléiques	9
4.3 Amplification par RT-rPCR et détection	9
5 Réactifs	11
5.1 Tampon PBS et milieu de culture	11
5.2 Extraction des acides nucléiques	11
5.2.1 Kit d'extraction	11
5.2.2 Témoins positifs de processus non-cibles externes exogènes.....	11
5.2.3 Témoin positif de processus cible	12
5.3 Réactifs pour la RT-rPCR	12
5.3.1 Eau.....	12
5.3.2 Réactifs.....	12
5.3.3 Amorces et sondes.....	12
5.4 Témoin positif de PCR.....	12
6 Appareillage et matériels	13
6.1 Matériels et consommables utilisés pour le broyage de l'échantillon	13
6.2 Matériels et consommables utilisés pour l'extraction des acides nucléiques.....	13
6.3 Matériels et consommables utilisés pour la RT-rPCR	13
7 Échantillons	14
7.1 Modalités d'échantillonnage et de transfert des échantillons	14
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	14
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	14
8 Mode opératoire	15
8.1 Broyage des organes.....	15
8.1.1 Broyage en tube à billes et centrifugation.....	15
8.1.2 Broyage en mortier et pilon et centrifugation	15
8.2 Préparation des acides nucléiques.....	15
8.3 Amplification par PCR.....	16
8.3.1 Préparation des mélanges réactionnels de la PCR en temps réel.	16
8.3.2 Échantillons	17
8.3.3 Témoins	17
8.3.4 Programme d'amplification RT-rPCR.....	17

9	Résultats	18
9.1	Calculs et expression des résultats	18
9.2	Contrôle de la validité des résultats	18
9.2.1	<i>Vérification des témoins</i>	18
9.2.2	<i>Analyse du statut des échantillons</i>	19
10	Caractéristiques de performance de la méthode	21
Annexe 1	23
Annexe 2	24
Bibliographie	25
Textes réglementaires	25

Table des figures

Figure 1: Stratégie de diagnostic du vNPI par RT-rPCR à partir de surnageant de broyat d'organes, en incluant l'ensemble des contrôles qualité.	10
Figure 2 : Exemple de profil d'amplification pour des échantillons du génogroupe 5 (poissons d'eau douce) et 2 (poissons marins)	19

Table des tableaux

Tableau 1 : Dénomination des témoins.....	9
Tableau 2 : Référence du kit d'extraction utilisé	11
Tableau 3 : Réactifs utilisés pour la RT-rPCR	12
Tableau 4 : Description des amorces et sondes	12
Tableau 5 : Composition des mélanges réactionnels pour la RT-rPCR.	16
Tableau 6 : Programme d'amplification RT-rPCR pour les cibles vNPI et MS2	17
Tableau 7 : Résultats attendus des différents témoins	18

Introduction

Décrite pour la première fois dans les années 40 aux Etats-Unis (Wood *et al.*, 1955) puis plus tardivement en Europe (Dorson and Torchy, 1981), la Nécrose Pancréatique Infectieuse (NPI) est une maladie s'exprimant majoritairement dans les élevages intensifs de salmonidés, mais elle peut néanmoins toucher un spectre d'espèces hôtes extrêmement large. La pathologie affecte majoritairement les stades précoces de développement, avec des alevins particulièrement sensibles immédiatement après la résorption du sac vitellin et en début de nourrissage, et peut être responsable de très importantes mortalités (jusqu'à 70%). Le virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (vNPI), responsable de cette pathologie, fait partie de la famille des Birnaviridae et du genre Aquabirnavirus. Il s'agit d'un virus à ARN double-brin, non-enveloppé, assez résistant aux conditions environnementales. Le phénomène de mortalité sur alevins est visible sur une fenêtre assez courte du développement du poisson, la mise en place du système immunitaire permettant ensuite à l'hôte de mieux résister. Le virus peut néanmoins persister au sein de l'hôte jusqu'au stade adulte, et être alors transmis à la génération suivante via les fluides génitaux (transmission verticale). La pathologie associée au vNPI se caractérise par des signes tels que le mélanisme, la perte d'appétit ou encore une nage erratique dite « en tire-bouchon » (Wolf, 1988). Le risque de pertes économiques majeures engendré par la présence de ce virus dans les élevages de salmonidés a conduit les éleveurs à réaliser des contrôles réguliers de leurs stocks de géniteurs afin de détecter la présence de virus infectieux dans les fluides génitaux. Autrefois inscrit sur la liste des maladies aquatiques de l'OIE (Code Sanitaire pour les animaux aquatiques, OIE 2000), ce virus a été déclassé mais fait toujours l'objet de garanties additionnelles dans certains états (Suisse, pays du Maghreb, ...). L'exportation d'œufs ou de poissons vers ces pays nécessite donc un certificat sanitaire délivré par l'administration après obtention de résultats d'analyses ciblant le vNPI négatives.

La méthode de confirmation de la présence du vNPI dans des tissus de poissons ou leurs fluides biologiques (liquide ovarien ou séminal) a pendant longtemps reposé sur une phase de mise en culture des échantillons recueillis sur lignées cellulaires adaptées suivie, en cas de visualisation d'effets cytopathiques (ECP), d'une identification par immunofluorescence, séroneutralisation / ELISA ou RT-PCR. Le vNPI est classiquement recherché en parallèle des virus réglementés de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse vNHI ou de la Septicémie Hémorragique Virale vSHV.

La décision d'exécution 2015/1554, applicable au 1er Avril 2016 et portant modalités d'application de la directive 2006/88/CE en ce qui concerne les exigences relatives à la surveillance et aux méthodes de diagnostic, a enrichi le panel d'outils de détection officiels en donnant la possibilité de rechercher les vNHI et vSHV directement par une technique moléculaire de RT-PCR en temps réel (RT-rPCR) (Décision d'exécution UE 2015/1554, abrogée depuis avril 2021 par le règlement 2016/429).

Cette évolution de la réglementation européenne est en phase avec le développement du diagnostic moléculaire observé ces dernières années dans le domaine de la pathologie des poissons et présage d'une utilisation de plus en plus fréquente de ce type d'approche. Elle a conduit l'unité VIMEP à amorcer dès 2015 un travail de développement, d'optimisation et de validation de méthodes avec l'objectif de pouvoir transmettre à moyen terme ces techniques aux laboratoires agréés du réseau national de surveillance, en suivant la priorisation suivante : ① virus réglementés vNHI et vSHV ; ② virus non-réglementé vNPI.

L'unité VIMEP a ainsi développé une méthode RT-rPCR « One step » qualitative de diagnostic spécifique du vNHI adaptée de la technique en « Two step » publiée par Purcell *et al.* (2013) et recommandée dans le chapitre dédié au vNHI du manuel de diagnostic de l'OIE. L'unité a ensuite réalisé un travail similaire à partir de la méthode publiée par Jonstrup *et al.* (2013) en 2012 ciblant le vSHV. Afin de se conformer aux recommandations de la norme NF-U47-600-2 « Méthodes d'analyse en santé animale – PCR – Partie 2 : exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale », ces méthodes ont été développées en utilisant des bactériophages comme contrôle de processus non cible exogène (Ninove *et al.*, 2011), permettant de garantir la qualité des étapes d'extraction et d'amplification. Ces méthodes comprennent également un témoin de processus cible E+, constitué de broyat d'organes de

truites saines dopé avec du surnageant de culture positif pour les virus de la NPI et éventuellement de la NHI et de la SHV.

L'unité VIMEP est accréditée pour la méthode ciblant le vNHI depuis janvier 2018 (annexe d'accréditation n°1-2251 rev5 applicable au 18/01/2018) et pour la méthode ciblant le vSHV depuis mars 2020 (annexe d'accréditation n°1-2251 rev7 applicable au 06/03/2020).

Concernant le vNPI, l'unité VIMEP a porté ses efforts de développement en se basant sur la technique de RT-rPCR spécifique publiée par Hoferer *et al.* (2017) en apportant une légère modification, à savoir une dégénérescence sur une des amorces. Cette méthode a été mise en œuvre en intégrant les contrôles qualité et les conditions décrites pour les méthodes internes de RT-rPCR ANSES/PLOU/MA/3 et 4 ciblant respectivement le vNHI et le vSHV.

Remarque 1 : Pour les laboratoires qui ne souhaitent réaliser qu'une recherche de vNPI ou d'un autre virus à ARN, l'ajout de phage T4 (phage à ADN) est optionnel. Il appartiendra au laboratoire, dans ce cas, de remplacer ce phage T4 par un volume équivalent de PBS. L'absence d'interférence due à la présence ou à l'absence du phage T4 sur la détection du vSHV a été démontrée par une étude complémentaire.

Remarque 2 : Suite aux résultats satisfaisants obtenus à l'issue d'une étude rétrospective menée au LNR afin d'évaluer les écarts de Ct entre les duplicats d'échantillons, le LNR laisse la possibilité aux laboratoires utilisateurs de la méthode de réaliser à leur convenance les dépôts en simplicat ou duplicat.

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.

Le vNPI est un virus à ARN double brin (environ 5,7 kb) de classe 1, pathogène pour un certain nombre d'espèces piscicoles mais non-pathogène pour l'homme.

Le laboratoire met en œuvre les mesures nécessaires à la maîtrise des risques en lien avec ce pathogène et notamment les moyens permettant de prévenir sa dissémination dans l'environnement.

Les acides nucléiques (ARN) étant fragiles, il est fortement recommandé de respecter des bonnes pratiques de laboratoire afin d'éliminer toute activité RNase.

1 Objet et domaine d'application

La présente méthode d'analyse spécifie une méthode de détection moléculaire du vNPI par RT-rPCR utilisant un couple d'amorces et une sonde d'hydrolyse de type TaqMan (méthode en une étape ou « one step »). Cette méthode est qualitative. Elle détecte la présence d'acides nucléiques spécifiques du virus et s'applique à l'analyse de prélèvements d'organes de poissons (rein, rate et cœur et/ou cerveau) ou de surnageants de culture.

La méthode comprend deux témoins positifs de processus externes exogènes, cible et non cible, permettant de valider l'ensemble des étapes.

2 Documents de référence

- NF U47-600-1 : Méthodes d'analyse en santé animale-PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - partie 1 : Exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR en santé animale (version 2015-02-F) ;
- NF U47-600-2 Méthodes d'analyse en santé animale-PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - partie 1 : Exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale (version 2015-02-P) ;
- Hoferer *et al.* (2017) : One-step cross-genogroup multiplex RT-qPCR with an internal control system for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)
- Ninove *et al.* (2011): RNA and DNA bacteriophages as molecular diagnosis controls in clinical virology: a comprehensive study of more than 45,000 routine PCR tests

3 Termes, sigles et définitions

- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- ARN : Acide Ribonucléique
- ECH : Echantillon
- EMT : Ecart Maximal Toléré
- LNR : Laboratoire National de Référence
- NTC : No Template Control
- P/V : Poids/Volume
- PBS : Phosphate Buffer Saline
- PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
- RT : Reverse Transcription
- RT-rPCR : RT-PCR en temps réel
- SVF : Sérum de Veau Fœtal
- vSHV : Virus de la Septicémie Hémorragique Virale
- vNHI : Virus de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse
- vNPI : Virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse

Dénomination des témoins selon le Tableau 1 ci-après :

Tableau 1 : Dénomination des témoins

Dénomination selon la norme NF U47-600 1	Nom dans les documents selon la cible
Échantillon pour analyse : <ul style="list-style-type: none"> cible non cible 	<ul style="list-style-type: none"> Échantillon (ECH) : ECH_{vNPI} Témoin de processus intrinsèque à l'échantillon : ECH_{MS2}
Témoin négatif de processus : <ul style="list-style-type: none"> cible et non cible 	<ul style="list-style-type: none"> E-
Témoin positif de processus : <ul style="list-style-type: none"> cible non cible 	<ul style="list-style-type: none"> E_{vNPI} E_{MS2}
Témoin négatif de PCR	<ul style="list-style-type: none"> NTC_{vNPI} NTC_{MS2}
Témoin positif de PCR	<ul style="list-style-type: none"> Témoin positif d'amplification PCR T_{npi}

4 Principe de la méthode

La méthode s'appuie sur les manuels de diagnostics publiés par le Laboratoire Européen de Référence (LRUE) et comprend les étapes consécutives suivantes :

- 1) Broyage des organes de poissons - en cas d'analyse directe ;
- 2) Extraction des acides nucléiques en intégrant le témoin positif de processus non-cible. Cette étape a été validée avec un kit semi automatisé avec billes magnétiques ;
- 3) Amplification et détection d'une partie du gène VP2 du segment A du vNPI et d'une partie du gène de la réplicase du phage MS2 par RT-rPCR .

Elle a été validée pour la matrice surnageant de broyat d'organes à 10% P/V.

4.1 Broyage des organes

Le broyage des organes peut se faire selon la méthode utilisée classiquement pour la culture cellulaire, avec mortier et pilon, ou en tube à billes avec un broyeur mécanique.

Cette étape est détaillée dans le paragraphe 8.1.

4.2 Extraction des acides nucléiques

L'extraction des acides nucléiques est réalisée à l'aide d'un automate (KingFisher DuoPrime, Thermo Scientific) et d'un kit commercial utilisant des billes magnétiques (voir 5.2.1).

Ce kit est recommandé pour l'extraction des acides nucléiques des virus à ARN et à ADN.

Afin d'avoir un contrôle de l'ensemble du processus (de la phase d'extraction à la RT-rPCR), deux témoins de processus non-cibles sont ajoutés à l'échantillon au démarrage de l'étape d'extraction (un phage à ARN (MS2) et éventuellement un phage à ADN (T4)).

Cette étape est détaillée dans le paragraphe 8.2.

4.3 Amplification par RT-rPCR et détection

Deux amplifications distinctes (RT-rPCR simplex) sont prévues (voir 5.3) :

- L'une amplifie un fragment de 75pb dans le gène de VP2 du Segment A du vNPI ;
- L'autre amplifie un fragment de 101pb dans le gène de la réplicase du phage MS2. Le vNPI étant un virus à ARN, la détection du phage T4 n'est pas nécessaire.

Cette étape est détaillée dans le paragraphe 8.3.

Le principe de la méthode est présenté dans le schéma ci-dessous :

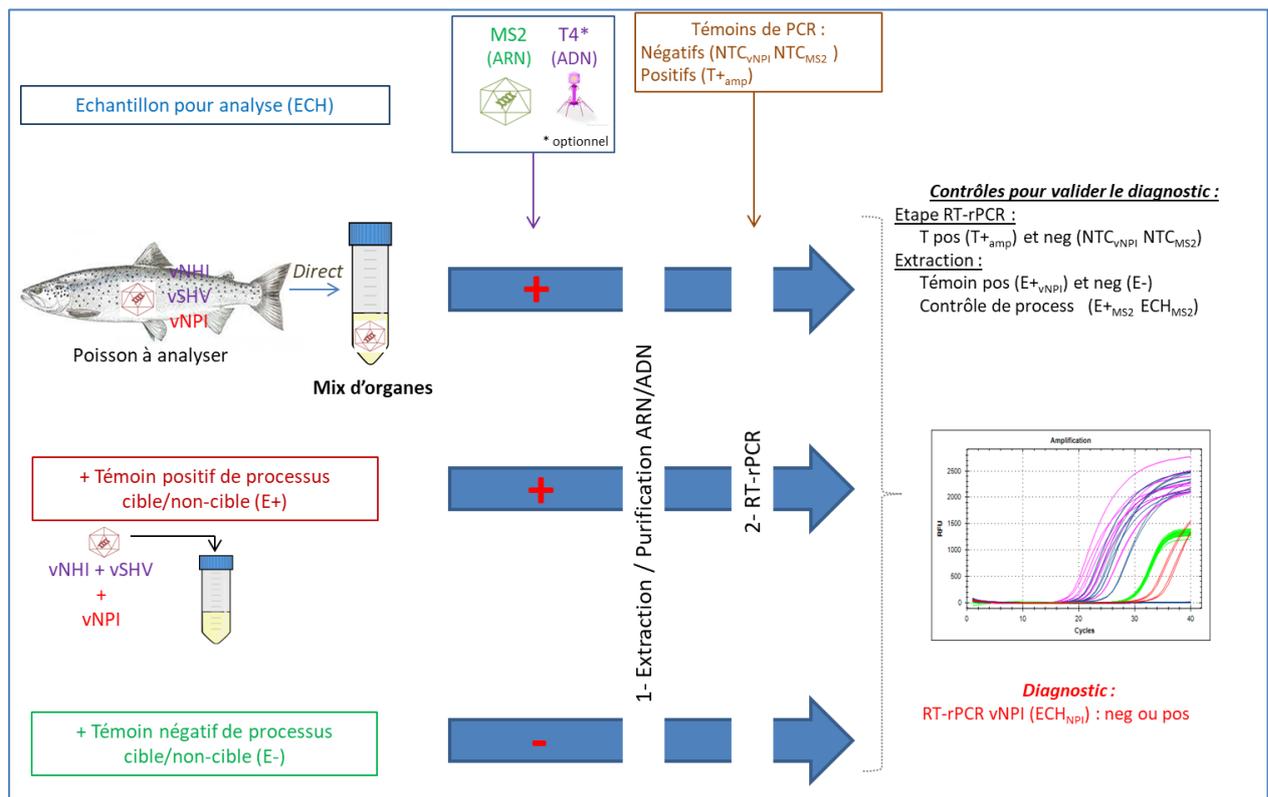


Figure 1: Stratégie de diagnostic du vNPI par RT-rPCR à partir de surnageant de broyat d'organes, en incluant l'ensemble des contrôles qualité.

5 Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient 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.

Pour l'ensemble des étapes, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et des consommables adaptés aux applications de biologie moléculaire et certifiés exempts de RNases et DNases, tel que spécifié dans la norme NF U 47-600-1.

5.1 Tampon PBS et milieu de culture

Ces réactifs sont utilisés dans les phases de broyage et servent de témoin négatif de processus d'extraction « E- ».

Le pH du tampon PBS utilisé est compris entre 7,2 et 7,3. A titre d'exemple, le PBS peut avoir la composition suivante : Chlorure de sodium : 7,65g/l, Phosphate disodique : 0,724g/l et Phosphate monopotassique : 0,21g/l.

Les milieux de culture sont à utiliser de préférence sans SVF.

5.2 Extraction des acides nucléiques

5.2.1 Kit d'extraction

La référence du kit d'extraction utilisé au laboratoire est détaillée à titre indicatif dans le Tableau 2 :

Tableau 2 : Référence du kit d'extraction utilisé

	Produit	Fabricant	Référence	Packaging
Extraction avec automate et billes magnétiques	ADIAMAG™	BioX / Adiagène	NADI003	200 réactions
			NADI003-XL	800 réactions

L'automate utilisé au laboratoire pour les extractions avec kits à billes magnétiques est le modèle KingFisher Duo Prime, de marque Thermo Scientific.

5.2.2 Témoins positifs de processus non-cibles externes exogènes

Les témoins positifs de processus non-cibles ajoutés à l'échantillon initial avant extraction proviennent de suspensions stocks de phages MS2 et T4 produites par infection de bactéries *E.coli* sensibles puis titrées par la technique des plages de lyse (titres infectieux). Les niveaux de charge de ces suspensions ont été déterminés par RT-rPCR.

Les phages ont été produits en suivant un protocole adapté de la norme NF EN ISO 10705-1 et des recommandations du fournisseur ATCC (ATCC, 2015; ATCC, 2016).

Les suspensions de phages sont conservées à 5°C ± 3°C.

5.2.3 Témoin positif de processus cible

Un témoin de processus contenant la cible (E+) est intégré à chaque séance d'extraction. Ce témoin est constitué de la matrice broyat d'organes dopée par une quantité de surnageant de culture de vNPI (souche Q26P45) comprise entre 1 et 10 fois la limite de détection de la méthode ($LD_{\text{méthode}}$).

Afin de pouvoir être utilisé pour d'autres systèmes RT-rPCR, le témoin « E+ » peut également contenir des quantités équivalentes de surnageant de culture du virus de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse (vNHI) et du virus de la Septicémie Hémorragique Virale (vSHV).

5.3 Réactifs pour la RT-rPCR

5.3.1 Eau

Il est fortement recommandé d'utiliser de l'eau exempte de RNase et DNase, type eau PPI ou eau ultrapure.

5.3.2 Réactifs

Les références des différents réactifs utilisés au laboratoire sont détaillées à titre indicatif dans le Tableau 3 :

Tableau 3 : Réactifs utilisés pour la RT-rPCR

Produit	Fabricant	Référence	Packaging
SuperScript III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit	InVitrogen	11732-020	100 x 50µL reactions
		11732-088	500 x 50µL reactions

5.3.3 Amorces et sondes

Les séquences des amorces et des sondes employées pour la détection particulière des séquences du vNPI et du MS2 sont répertoriées dans le Tableau 4 :

Tableau 4 : Description des amorces et sondes

Cible	Nom	Séquence	%GC	Longueur	Taille amplicon	Référence	Autre nom
vNPI	oPVP525	CAACAGGGTTCGACAARCCAT (un nucléotide dégénéré par rapport à la publication)	48	21	75 pb	Hoferer <i>et al.</i> , 2017	IPN(2-5)-F (modifié)
	oPVP526	TGGCCCCGTTCATTGAC	59	17			IPN(2-5)-R
	tqPVP31	[FAM]-TCCGCCTAGAGGACGAGACACCCC-[BHQ1]	66	24			IPN(2-5)-Probe
MS2	oPVP446	CTCTGAGAGCGGCTCTATTGGT	54	22	101 pb	Ninove <i>et al.</i> , 2011	MS2F
	oPVP447	GTTCCCTACAACGAGCCTAAATTC	46	24			MS2R
	tqPVP25	[FAM] TCAGACACGCGGTCCGCTATAACGA [BHQ1]	56	25			MS2probe

5.4 Témoin positif de PCR

Un ARN (synthétique ou extrait à partir d'un surnageant de culture positif en vNPI) appelé « T_{NPI} », calibré à environ $10 LD_{\text{PCR}}$ est utilisé comme témoin positif cible de PCR pour vérifier le bon déroulement des étapes de RT et d'amplification.

Une suspension calibrée à une concentration comprise entre 1 et 10 fois la limite de détection de la PCR (LD_{PCR}) peut être préparée en grande quantité, aliquotée et conservée à une température $\leq -65^{\circ}\text{C}$.

6 Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient 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.

Le matériel doit être approprié conformément à la norme NF U 47-600-1 et, en particulier, ce qui suit :

6.1 Matériels et consommables utilisés pour le broyage de l'échantillon

- Micropipettes et pointes à filtres, pour des volumes compris entre 5µL et 1000µL ;
- Tubes de broyage à billes certifiés RNase free, de type « Lysing Matrix D » (MP Biomedicals) ;
- Broyeur mécanique de type « Fast Prep » ou ensemble mortier / pilon / sable stérile.

6.2 Matériels et consommables utilisés pour l'extraction des acides nucléiques

- Micropipettes et pointes à filtres, pour des volumes compris entre 5µL et 1000µL ;
- Microtubes d'une capacité de 1,5 et 2mL ;
- Mélangeur de type vortex ;
- Centrifugeuse pour des microtubes de 1,5 et 2mL.
- Automate de type Thermo Scientific KingFisher Duo Prime
- Consommables pour automates : plaques Deep Well 96, peignes, tubes (selon modèle automate)

6.3 Matériels et consommables utilisés pour la RT-rPCR

- Micropipettes et pointes à filtres, d'une capacité comprise entre 5µL et 1000µL ;
- Distributeur pouvant délivrer des volumes de 20µL ;
- Tubes pour centrifugeuse, d'une capacité de 1,5 et 2mL ;
- Barrettes et bouchons pour PCR temps réel ;
- Mini-centrifugeuse pour barrettes ;
- Thermocycleur temps réel avec des longueurs d'ondes permettant la lecture du fluorophore FAM et avec un EMT de $\pm 2^{\circ}\text{C}$;
- Logiciel de détection et d'analyse approprié.

7 Échantillons

7.1 Modalités d'échantillonnage et de transfert des échantillons

Elles suivent les recommandations de la Décision d'Exécution 2015/1554, notamment concernant les tissus à prélever :

« La quantité de tissus de poisson nécessaire pour un examen virologique par RT-qPCR dépend de la taille des poissons. On prélèvera à l'aide d'instruments à dissections stériles l'alevin entier si la longueur du corps est inférieure à 4 cm, les viscères, y compris les reins si la longueur du corps est comprise entre 4 et 6 cm ou, dans le cas des poissons de plus grande taille, les reins, la rate, le cœur et/ou l'encéphale en ne prenant qu'un fragment de ces organes de façon à avoir un échantillon d'environ 1g. Les tissus de 10 poissons peuvent être rassemblés dans un tube pour constituer un échantillon global. Toutefois, si la quantité d'inoculum est faible, on regroupera les tissus provenant de cinq poissons au maximum. »

Il est préférable que l'échantillon soit réfrigéré après prélèvement puis transféré au laboratoire sous le régime du froid en 48h, dans du milieu de transport (selon la législation européenne en vigueur) ou à sec (tolérance des normes françaises de culture cellulaire). Dans le cas où le transport de l'échantillon du site de récolte au laboratoire n'est pas consécutif au prélèvement, l'échantillon peut être congelé à une température égale ou inférieure à -16°C puis transporté sous régime du froid.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Avant mise en analyse, les échantillons doivent être conservés dans les conditions suivantes :

- En réfrigération à +5°C ± 3°C pendant 24 heures ;
- En congélation à une température inférieure à -16°C si l'analyse est différée.

La durée totale entre le prélèvement et la prise en charge par le laboratoire (début de l'analyse ou congélation du prélèvement) ne doit pas excéder 72 heures.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Les broyats des échantillons ainsi que les acides nucléiques extraits sont conservés à une température inférieure à -16°C pendant au minimum 1 mois, l'analyse devant pouvoir être reconduite en cas d'anomalie constatée à la lecture des résultats.

8 Mode opératoire

8.1 Broyage des organes

Le broyage s'effectue sur un pool d'organes (paragraphe 7.1) soit en tube à billes avec un broyeur, soit en mortier et pilon avec un ratio d'environ 10% P/V de PBS (broyage en tube à billes) ou de milieu de culture (broyage en mortier et pilon).

8.1.1 Broyage en tube à billes et centrifugation

Une quantité de 0,1g d'organes pour 1mL de tampon PBS est ajoutée dans un tube à billes de 2mL de type « Lysing Matrix D » (MP Biomedicals). Le tube est soumis à un broyage en « Fast Prep » à raison d'un cycle de 20 secondes à la vitesse 4 à température ambiante. Une centrifugation de 3 minutes à 5000g est effectuée avant de récupérer le surnageant.

8.1.2 Broyage en mortier et pilon et centrifugation

Une quantité connue d'organes est transférée dans un mortier, puis broyée à l'aide d'un pilon et de sable. L'homogénéat est repris par du milieu de culture supplémenté en antibiotiques de façon à avoir un ratio d'environ 10% P/V. L'ensemble est homogénéisé, transféré dans un tube et centrifugé 15 minutes à une vitesse comprise entre 2000 et 4000g à une température inférieure à 14°C.

8.2 Préparation des acides nucléiques

Un mode opératoire d'extraction des acides nucléiques approprié pour les virus à ARN doit être utilisé.

L'extraction d'ARN est réalisée avec l'automate KingFisher Duo Prime et le kit ADIAMAG™ (Bio-X diagnostics) (kit compatible avec les appareils KingFisher ML et 96/Flex ; se référer à la notice du fournisseur).

Le mode opératoire utilisé est brièvement rappelé ci-dessous.

Une plaque Deep Well 96 puits est préparée en fonction du nombre d'échantillons à extraire, avec 350µL de tampon de lavage W3 par puit de la rangée C, 350µL de tampon de lavage W4 par puit de la rangée D, 350µL d'éthanol à 80% par puit de la rangée E, et 100µL de tampon d'élution par puit de la rangée F. Un peigne (protection des aimants) est également placé dans la rangée A.

Le tampon de lyse LB1 est réparti dans des microtubes de 2mL à raison de 100µL par tube (ou dans les puits de la rangée B de la plaque Deep Well). Sont ajoutés (par tube de 2 mL ou par puit de la rangée B de la plaque) la protéinase K (10µL) ainsi que les phages MS2 (5µL) et T4 ou PBS* (5µL) (il est possible de préparer extemporanément un mix contenant le tampon LB1, la protéinase K et les phages pour le nombre total d'échantillon). Un volume de 90µL d'échantillon (ECH) (broyat d'organes centrifugé) est ensuite déposé dans chacun des tubes (ou des puits de la rangée B de la plaque). L'ensemble est mélangé (vortex léger ou homogénéisé à la pipette) puis incubé 15 minutes à température ambiante. Un tube « E+ » (contenant la matrice broyat d'organes dopée par du surnageant viral) est traité en parallèle. Un tube « E- » (contenant uniquement le tampon LB1, la protéinase K et 100µL de PBS) est également préparé.

Il est conseillé de préparer le tampon de capture extemporanément avant de lancer le programme. Préparer un mélange avec 600µL de tampon B2 et 13µL de billes magnétiques ADIAMAG Beads (bien mélanger la solution) par échantillon. Un volume de 600µL de ce tampon de capture est déposé dans chaque puit de la rangée B de la plaque.

Si la lyse des échantillons a été effectuée en microtubes de 2mL, la totalité du volume est transférée dans le puit contenant le tampon de capture de la rangée B de la plaque. En revanche, si la lyse a été effectuée dans

la plaque, le tampon de capture est ajouté directement à l'échantillon. Une homogénéisation par pipetage est effectuée.

La plaque Deep Well est prête à être chargée dans l'automate. Le programme adapté est lancé selon les recommandations du fournisseur. En fin de programme, les acides nucléiques extraits (rangée F) sont transférés dans des tubes Eppendorf ou des barrettes et sont conservés comme indiqué ci-dessous.

Un schéma récapitulatif des différentes phases d'extraction des acides nucléiques est présenté en Annexe 1.

Les acides nucléiques extraits doivent être transférés à une température de $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ et peuvent être soumis directement à la RT-rPCR. Ils doivent être conservés au froid négatif ($\leq -16^{\circ}\text{C}$ ou $\leq -65^{\circ}\text{C}$) pour une conservation de longue durée.

* Comme indiqué dans l'introduction, les laboratoires ne ciblant qu'exclusivement le virus à ARN vNPI, l'ajout de phage T4 (phage à ADN) est optionnel. Il conviendra au laboratoire de remplacer ce phage T4 par un volume équivalent de PBS.

8.3 Amplification par PCR

Toutes les exigences concernant l'amplification par PCR sont spécifiées dans la NF U 47-600-1.

8.3.1 Préparation des mélanges réactionnels de la PCR en temps réel.

La méthode est décrite pour un volume final de 25 μL par réaction de RT-rPCR en utilisant les réactifs répertoriés dans le Tableau 5. Un volume de 5 μL d'échantillon, ou de témoins négatifs ou positifs, ainsi que 20 μL de mélange réactionnel, sont déposés dans chaque puits.

Attention, un aliquot de l'ARN extrait (quantité nécessaire pour la PCR) doit être dénaturé 5 min à 95°C préalablement au dépôt en plaque avec le mélange réactionnel.

Tableau 5 : Composition des mélanges réactionnels pour la RT-rPCR.

Réactif Concentration initiale	Détection vNPI		Détection MS2	
	Concentration finale	Volume par échantillon (μL)	Concentration finale	Volume par échantillon (μL)
2x Reaction Mix InVitrogen	1X	12,50	1X	12,50
SSIII RT / Platinum Taq Mix		0,50		0,50
Amorce F (20 μM)	800nM	1,00	400nM	0,50
Amorce R (20 μM)	800nM	1,00	400nM	0,50
Sonde (20 μM)	100nM	0,125	100nM	0,125
Eau		4,88		5,875
Volume du mix :		20μL		20μL
Ajout échantillon (ECH)		5 μL		5 μL
Volume final		25μL		25μL

8.3.2 Échantillons

Chaque échantillon est testé en simplicat ou en duplicat à la convenance du laboratoire*, pour chacune des cibles vNPI et MS2. Le résultat de la cible vNPI (ECH_{vNPI}) correspond au statut de l'échantillon, et celui de la cible MS2 (ECH_{MS2}) au témoin de processus intrinsèque à l'échantillon. A minima, les valeurs de Ct minimales et maximales obtenues pour la cible MS2 de la série sont enregistrées dans une carte de contrôle (ECH_{MS2}) et permettent de valider le bon déroulement du processus de la série.

* Comme indiqué dans l'introduction, le LNR laisse la possibilité aux laboratoires utilisateurs de déposer les échantillons et témoins en simplicat ou duplicat (l'étude rétrospective sur plusieurs dizaines d'échantillons menée par le LNR a mis en évidence des écarts de Ct inférieurs à 1,5 entre 2 dépôts d'un duplicat).

8.3.3 Témoins

8.3.3.1 **Témoin négatif de processus « E- »**

A chaque séance d'extraction, un témoin négatif « E- » ne contenant ni l'organisme cible, ni les phages, est ajouté à la série. Il sert de témoin négatif de processus pour les cibles vNPI et MS2.

8.3.3.2 **Témoin positif de processus cible « E+ »**

A chaque séance d'extraction, un témoin positif « E+ » contenant l'organisme cible et les phages est ajouté à la série. Il sert de témoin positif de processus pour les cibles vNPI et MS2. Les valeurs de Ct obtenues pour les 2 cibles sont des valeurs de référence et sont enregistrées dans une carte de contrôle (E_{vNPI} et E_{MS2}).

8.3.3.3 **Témoin négatif de PCR (NTC)**

De l'eau exempte de RNase et DNase est utilisée en tant que témoin négatif (No Template Control ou NTC). Un volume de 5µL est déposé dans le mélange réactionnel.

8.3.3.4 **Témoin positif de PCR**

Le témoin positif de PCR (T_{+npi}) est inséré à chaque série de RT-rPCR. (voir 5.4). Un volume de 5µL est déposé dans le mélange réactionnel. Les valeurs de Ct obtenues sont des valeurs de référence et sont enregistrées dans une carte de contrôle.

8.3.4 Programme d'amplification RT-rPCR

Attention, une dénaturation préalable de l'ARN de 5 min à 95°C doit être réalisée avant dépôt du mélange réactionnel.

Le programme d'amplification (températures, durées) est décrit dans le Tableau 6. Ce programme est le même que celui utilisé pour les amplifications des virus vNHI et vSHV.

Tableau 6 : Programme d'amplification RT-rPCR pour les cibles vNPI et MS2

Transcription inverse	30 minutes à 50°C
Activation et dénaturation initiale	15 minutes à 95°C
Nombre de cycles (amplification)	40
Amplification	15 secondes à 94°C
	60 secondes à 60°C
	Mesure de la fluorescence FAM

9 Résultats

9.1 Calculs et expression des résultats

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel associé au thermocycleur utilisé, selon les recommandations des fournisseurs.

La ligne de seuil doit être positionnée de telle sorte qu'elle croise la courbe de fluorescence de chaque contrôle positif durant la phase d'accroissement exponentielle de l'amplification, généralement le milieu de la zone de linéarité lorsque les valeurs de fluorescence sont représentées en échelle logarithmique.

Pour chaque signal observé et pour chacune des cibles, sont à prendre en considération les éléments suivants :

- L'absence ou la présence de courbes d'amplification ;
- Leurs aspects et leurs caractéristiques ;
- La cohérence entre les duplicats (sauf pour les dépôts en simplicat) (variation tolérée ≤ 1 Ct) ;
- Le nombre de cycles nécessaires pour que les fluorescences émises se distinguent du bruit de fond (valeurs de Ct) ;

9.2 Contrôle de la validité des résultats

Un arbre décisionnel résumant les modalités d'interprétation des résultats est présenté en Annexe 2.

9.2.1 Vérification des témoins

Les résultats des témoins analysés en parallèle des échantillons doivent être conformes aux résultats attendus selon le Tableau 7 ci-dessous :

Tableau 7 : Résultats attendus des différents témoins

	Nom dans les documents selon la cible	Résultats attendus
Témoins de PCR	NTC_{vNPI}	Absence d'amplification en vNPI
	NTC_{MS2}	Absence d'amplification en MS2
	Témoin positif de PCR (T_{+npi})	Amplification en vNPI soumis à carte de contrôle
Témoins de processus	Témoin négatif de processus « E- »	Absence d'amplification en vNPI Absence d'amplification en MS2
	Témoin positif de processus « E+ »	Amplification en vNPI soumis à carte de contrôle Amplification en MS2 soumis à carte de contrôle
	Echantillon (ECH) : Témoin de processus intrinsèque à l'échantillon : ECH_{MS2}	Amplification en MS2 soumis à carte de contrôle (à minima valeurs minimales et maximales de la série)

Si certains contrôles ne sont pas validés, l'étape d'extraction et/ou d'amplification devra être répétée.

9.2.2 Analyse du statut des échantillons

Tous les contrôles doivent être validés (NTC, E-, E+_{vNPI}, E+_{MS2} et T+_{npi}) avant l'analyse du statut de l'échantillon. Les valeurs du témoin de processus intrinsèque à l'échantillon (ECH_{MS2}) doivent être conformes aux valeurs attendues. Le signal obtenu pour la cible vNPI est alors analysé, et la valeur du Ct obtenu est vérifiée.

Un signal tardif se définit par une valeur de Ct supérieure à celle du Ct correspondant à la LD_{méthode} alors qu'un signal précoce correspond à une valeur de Ct inférieure.

Plusieurs cas peuvent se présenter (Schéma décisionnel en Annexe 2) :

- ECH positifs en vNPI avec signal précoce : le virus est **détecté** dans l'échantillon, et cela, quelle que soit la valeur de l'ECH_{MS2} ;
- ECH positifs en vNPI avec signal tardif :
 - > si l'ECH_{MS2} est validé, alors le résultat est **ininterprétable**,
 - > si l'ECH_{MS2} n'est pas validé, il est nécessaire de refaire la RT-rPCR en diluant l'échantillon au 1/10^{ème} et/ou de refaire une extraction ;
- ECH négatifs en vNPI :
 - > si l'ECH_{MS2} est validé, alors le virus n'est **pas détecté** dans l'échantillon,
 - > si l'ECH_{MS2} n'est pas validé, il est nécessaire de refaire la RT-rPCR en diluant l'échantillon au 1/10^{ème} et/ou refaire une extraction.

Remarque :

Concernant les échantillons du génogroupe 2, la technique décrite par Hoferer *et al.* (2017), bien qu'adaptée pour sa détection, présente toutefois quelques mésappariements entre les amorces et/ou sonde vis à vis de certaines souches du génogroupe 2. Un signal est obtenu, mais plus ou moins atypique (courbe aplatie, voir Figure 1 Figure 2).

Les commémoratifs associés aux échantillons à tester doivent systématiquement être pris en compte dans l'analyse des signaux. En effet, les souches de vNPI appartenant au génogroupe 2 sont principalement détectées sur poissons marins. Dans ce cas, l'observation de courbes d'amplification en RT-rPCR atypiques est possible et un résultat « virus détecté » pourra être émis.

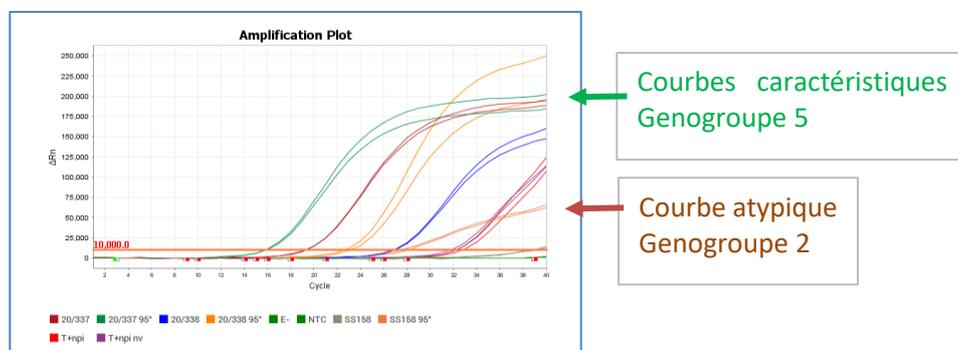


Figure 2 : Exemple de profil d'amplification pour des échantillons du génogroupe 5 (poissons d'eau douce) et 2 (poissons marins)

Le résultat final pour la présence de génome de vNPI dans l'échantillon analysé est exprimé de l'une des façons suivantes :

- Virus responsable de la Nécrose Pancréatique Infectieuse **non détecté** par RT-PCR temps réel dans l'échantillon analysé ;
- Virus responsable de la Nécrose Pancréatique Infectieuse **détecté** par RT-PCR temps réel dans l'échantillon analysé ;
- Résultat **ininterprétable** pour la recherche du génome de vNPI par RT-PCR temps réel dans l'échantillon analysé.

10 Caractéristiques de performance de la méthode

CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE	
Titre de la méthode	Détection du virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (vNPI) par RT-PCR en temps réel.
Type de méthode	Méthode qualitative
Principe	Cette méthode est à appliquer pour la détection du vNPI. Cette méthode intègre un témoin positif de processus non cible externe exogène (phages) permettant de contrôler les étapes d'extraction et d'amplification.
Matrice testée	Broyat d'organes 10% P/V
Espèce animale	Toutes espèces piscicoles.
Analytes	vNPI : segment A Phage MS2 : gène de la réplique
Témoin positif de processus non cible externe exogène	Phage MS2
Témoin positif cible de PCR	Dilution d'un extrait d'ARN d'une production de vNPI Q26P45 calibré à 10 LD _{PCR}
Etapas de la méthode	Broyage d'organes ; Extraction d'acides nucléiques par méthode automatisée (kit Adiamag) ; Dénaturation préalable des acides nucléiques ; Amplification par RT-PCR en temps réel.
Objectifs	Disposer d'une méthode qualitative rapide et fiable (intégration de contrôles qualité adaptés) de RT-PCR en temps réel permettant de détecter du génome de vNPI avec un niveau de sensibilité comparable à la culture cellulaire, et facilement transférable aux laboratoires.
Documents de référence	Norme NF U 47-600-1 et 2 : Méthodes d'analyse en santé animale PCR.
Méthodes de référence	Hoferer <i>et al.</i> , 2017 Ninove <i>et al.</i> , 2011

CRITÈRES DE ROBUSTESSE DE LA PCR	
<u>Variation de $\pm 20\%$ d'amorces et sondes</u>	Résultats obtenus à partir d'une amplification en 8 réplicats du NED _{PCR} 1X en faisant varier les concentrations en amorces et sonde de $\pm 20\%$ comparé à la condition normale. Détection de 24/24 réplicats, avec un écart type de 0,26 et un CV de 0,93
<u>Variation de $\pm 10\%$ de la prise d'essai</u>	Résultats obtenus à partir d'une amplification en 8 réplicats du NED _{PCR} 1X en faisant varier la prise d'essai de $\pm 10\%$ comparé à la condition normale. Détection de 24/24 réplicats, avec un écart type de 0,22 et un CV de 0,78
<u>Variation de $\pm 2^\circ\text{C}$ des températures du thermogramme</u>	Résultats obtenus à partir d'une amplification en 8 réplicats du NED _{PCR} 1X en faisant varier le thermogramme de $\pm 2^\circ\text{C}$ comparé à la condition normale. Détection de 24/24 réplicats, avec un écart type de 0,17 et un CV de 0,62

CRITÈRES DE PERFORMANCES DE LA PCR	
<u>Spécificité analytique</u>	<p>Résultats obtenus à partir d'un panel de 35 échantillons de vNPI regroupant 3 des 5 génogroupes connus, et 24 échantillons de 9 autres virus ont été inclus dans l'étude :</p> <p>Les tests d'inclusivité et d'exclusivité ont permis de montrer que la PCR est spécifique.</p> <p>Profil d'amplification atypique possible avec les souches de génotypes 1 (non présentes en France) et 2 (caractéristiques des poissons marins)</p>
<u>Limite de détection de la PCR</u> <u>LD_{PCR}</u>	<p>Résultats obtenus lors de 3 séances de RT-rPCR, 8 réplicats par niveau de dilution :</p> <p>La LD_{PCR} a été établie au niveau de dilution $5 \cdot 10^{-5}$ d'un ARN Q26P45 calibré correspondant à un titre infectieux théorique de 750 DICT₅₀/mL</p>

CRITÈRES DE PERFORMANCE DE LA MÉTHODE COMPLÈTE	
<u>Sensibilité et spécificité diagnostique</u>	<p>Résultats obtenus à partir d'un panel de 18 échantillons de vNPI regroupant 3 des 5 génogroupes connus, 29 autres virus ou échantillons négatifs ont été inclus dans l'étude.</p> <p>Comparaison avec les résultats obtenus en culture cellulaire et/ou séquençage.</p> <p>Profil d'amplification atypique possible avec les souches de génotypes 1 (non présentes en France) et 2 (caractéristiques des poissons marins)</p> <p>Sensibilité : 100%</p> <p>Spécificité : 100%</p>
<u>Limite de détection de la méthode</u> <u>LD_{méthode}</u>	<p>Résultats obtenus lors de 2 séances d'extraction suivies de RT-rPCR, 4 réplicats par niveau de dilution sur 2 productions virales distinctes :</p> <p>La LD_{méthode} a été établie à une dilution $1 \cdot 10^{-5}$ d'un surnageant de culture calibré correspondant à un titre infectieux situé entre 15 et 150 DICT₅₀/mL pour les surnageants de broyats d'organes.</p>

Annexe 1

Schéma récapitulatif des étapes du protocole d'extraction des acides nucléiques sur KingFisher DuoPrime avec le kit « ADIAMAG » (Bio-X Diagnostic) et une plaque DeepWell (DW96) (selon les recommandations du fournisseur)

- Lyse des échantillons : 100µl LB1 + 10µl PK + 5µl MS2 + 5µl T4
- Préparation tampon de capture (sur la base de 600µl B2 + 13µl beads)

**Distribution des réactifs /
puits :**

600µL tampon de capture
(600µl B2 + 13µL beads)

350µL W3

350µL W4

350µL Ethanol 80%

100µL E6

A
B
C
D
E
F
G
H

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Plaque DW96

Etapes :

Peigne

Echantillons lysés dans tampon LB1 +
protéinase K

1^{er} lavage

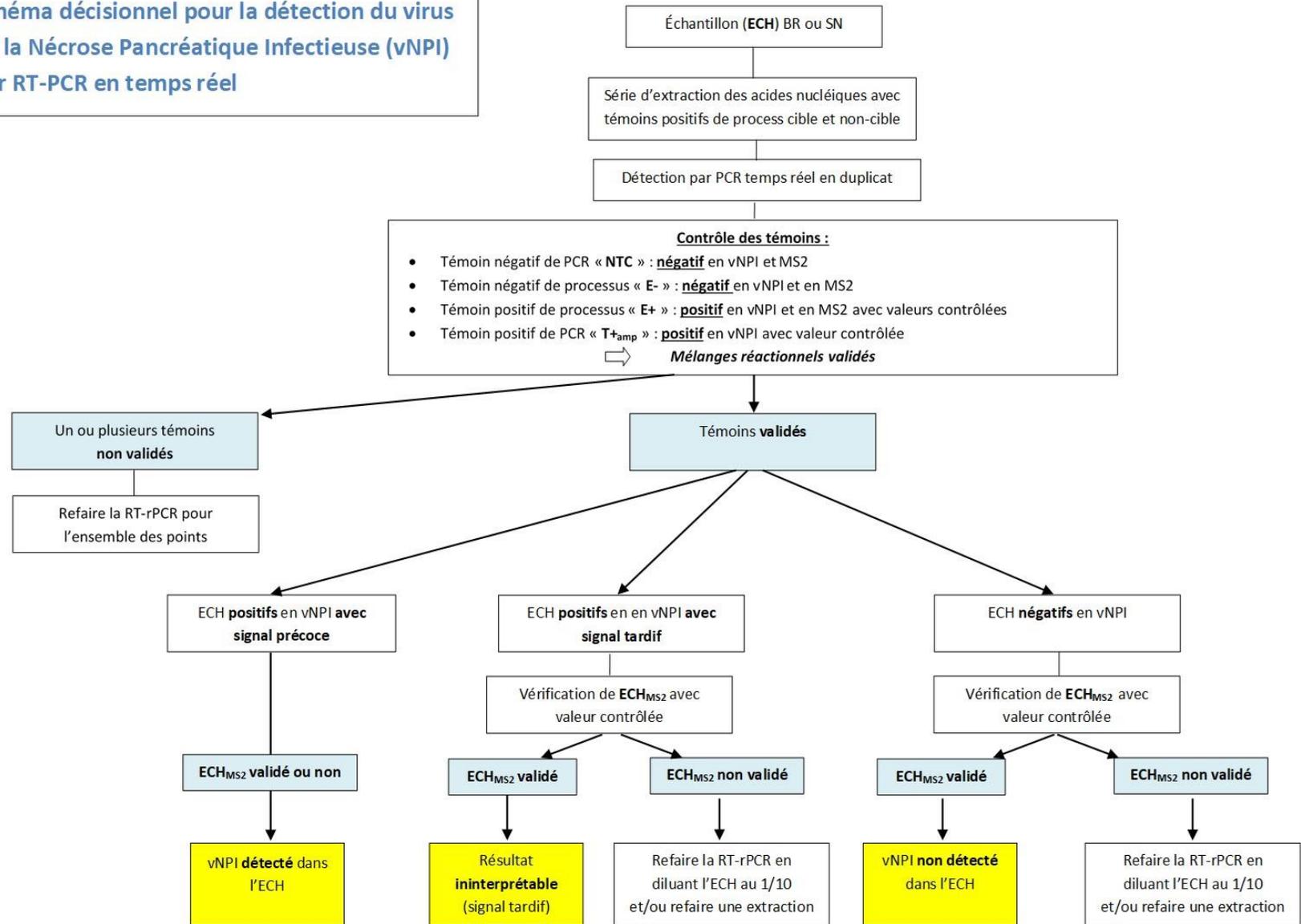
2^{ème} lavage

3^{ème} lavage

Elution et récupération des échantillons

Annexe 2

Schéma décisionnel pour la détection du virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (vNPI) par RT-PCR en temps réel



Bibliographie

- ATCC. 2015. Echerichia coli bacteriophage T4 (ATCC® 11303-B40™). [En ligne]; (Consulté le 26/03/2019). <https://www.lgcstandards-atcc.org/~ps/11303-B40.ashx>
- ATCC. 2016. Echerichia coli bacteriophage MS2 (ATCC® 15597-B1™). [En ligne]; (Consulté le 26/03/2019). <https://www.atcc.org/~ps/15597-B1.ashx>
- Dorson, M. and Torchy, C. 1981. The influence of fish age and water temperature on mortalities of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, caused by a European strain of infectious pancreatic necrosis virus. *J Fish Dis* 4, 213-221, doi:
- Hoferer, M., Braun, A., Skrypski, J., Bock, S., Thalheim, S. and Sting, R. 2017. One-step cross-genogroup multiplex RT-qPCR with an internal control system for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J Virol Methods* 247, 68-76, doi: 10.1016/j.jviromet.2017.05.015.
- Jonstrup, S.P., Kahns, S., Skall, H.F., Boutrup, T.S. and Olesen, N.J. 2013. Development and validation of a novel Taqman-based real-time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Fish Dis* 36, 9-23, doi: 10.1111/j.1365-2761.2012.01416.x.
- Ninove, L., Nougairede, A., Gazin, C., Thirion, L., Delogu, I., Zandotti, C., Charrel, R.N. and De Lamballerie, X. 2011. RNA and DNA bacteriophages as molecular diagnosis controls in clinical virology: a comprehensive study of more than 45,000 routine PCR tests. *PLoS One* 6, e16142, doi:
- Purcell, M.K., Thompson, R.L., Garver, K.A., Hawley, L.M., Batts, W.N., Sprague, L., Sampson, C. and Winton, J.R. 2013. Universal reverse-transcriptase real-time PCR for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Dis Aquat Organ* 106, 103-115, doi: 10.3354/dao02644.
- Wolf, K. 1988. *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Pp p476 In: Ithaca, N., USA (Ed), *Cornell University Press*, pp. p476.
- Wood, E.M., Snieszko, S.F. and Yasutake, W.T. 1955. Infectious pancreatic necrosis in brook trout. *AMA Arch Pathol.* 60(1), doi:

Textes réglementaires

- Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales. Version consolidée au 16 mars 2017.
- RÈGLEMENT (UE) 2016/429 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 9 mars 2016 relatif aux maladies animales transmissibles et modifiant et abrogeant certains actes dans le domaine de la santé animale (« législation sur la santé animale »)
- NF U47-600-1 : « Méthodes d'analyse en santé animale PCR : exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR en santé animale » (version 2015-02-F).
- NF U47-600-2 : « Méthodes d'analyse en santé animale – PCR – Partie 2 : exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale » (version 2015-02-P).
- NF EN ISO 10705-1 Octobre 2001 Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 1 : dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques.
- Manuel LRUE : « Diagnostic methods and procedures for the surveillance and confirmation of infection with VHSV and IHNV », version 2021.2 [En ligne]; (Consulté le 08/04/2022) <https://www.eurl-fish-crustacean.eu/fish/diagnostic-manuals/vhs>

Textes abrogés

Directive 2006/88/CE de conseil du 24 octobre 2006 relative aux conditions de police sanitaire applicables aux animaux et aux produits d'aquaculture, et relative à la prévention de certaines maladies chez les animaux aquatiques et aux mesures de lutte contre ces maladies.

Décision d'exécution (UE) 2015/1554 de la commission du 11 septembre 2015 portant modalités d'application de la directive 2006/88/CE en ce qui concerne les exigences relatives à la surveillance et aux méthodes de diagnostic.