



Laboratoire de Ploufragan-Plouzané

**UNITÉ Virologie, Immunologie, Parasitologie
Aviaires et Cunicoles**
**Laboratoire National de Référence
pour l'Influenza aviaire et
la maladie de Newcastle**

Révision du 8 octobre 2015

Recommandations aux demandeurs d'essais pour l'envoi d'échantillons au LNR influenza aviaire/maladie de Newcastle

1. Nature des échantillons

Sérums, ARN, éluats, organes, liquide allantoïque provenant d'oeufs, écouvillons (oropharyngés, trachéaux, cloacaux...), ...

Les prélèvements de sang total ne sont acceptés qu'à titre dérogatoire exceptionnel et à condition qu'il soit possible d'assurer leur réception par l'U VIPAC dans des conditions garantissant l'absence d'hémolyse.

2. Qualité des échantillons transportés

Sérums : propres, non hémolysés, limpides, réfrigérés ou congelés, en tube sec ou très éventuellement en plaques de 96 cupules (à l'état congelé dans ce cas) et transportés par porteur spécial. A mettre dans un colis différent du matériel infectieux ci-dessous.

Organes : pour recherche virologique : les échantillons sont congelés en carboglace pour transport immédiat ou à défaut conservés de préférence à température $\leq -65^{\circ}\text{C}$ avant transport, et le transport est effectué par porteur spécial en carboglace. Ces échantillons sont à mettre dans un colis différent des ARNs.

ARNs : avec inhibiteur de RNase en respectant les concentrations mentionnées dans la technique RT-PCR temps réel gène M avec contrôle positif interne, Anses, ils sont conservés à $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ et transportés par porteur spécial. Dans l'hypothèse d'absence d'inhibiteur de RNase (ce qui est fortement déconseillé), ils sont conservés en carboglace et annotés de la mention "sans inhibiteur de RNase" dans les commémoratifs.

Écouvillons et/ou éluats pour recherche virologique : Les écouvillons après prélèvements doivent être placés le plus rapidement possible, dans du bouillon nutritif, ou un milieu pour culture cellulaire additionné de pénicilline, streptomycine, gentamicine et fungizone, ou un milieu de conservation et de transport possédant des propriétés équivalentes. Si le délai entre l'obtention de l'échantillon ou sa reconstitution (pour les éluats) et l'arrivée au laboratoire (transport compris) est inférieur à 24 heures, la conservation et le transport peuvent être effectués à $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (conformément au manuel de diagnostic européen pour l'influenza aviaire, Décision 2006/437/CE). Dans le cas contraire, la conservation avant transport doit être faite de préférence à température $\leq -65^{\circ}\text{C}$, et le transport effectué par porteur spécial en carboglace. En tout état de cause, les échantillons ne devraient pas subir plus d'une décongélation avant transport. Ces échantillons sont à mettre dans un colis différent des ARNs.

Liquides allantoïdiens ou amnio-allantoïdiens : congelés et transportés en carboglace, ou réfrigérés si transport rapide (< à 1 heure) par porteur spécial.

3. Volume, nombre et identification des échantillons

Sérums : Les recommandations spécifiques aux contrôles intra Anses- Laboratoire de Ploufragan sont décrites dans les PQ-EOPS pour le contrôle des volailles conventionnelles.

Les recommandations concernant le contexte des enquêtes influenza aviaire sont décrites par les notes de service de la DGAI, complétées par les critères décisionnels pour les laboratoires en charge du criblage des sérums par IHA H5/H7 tels que :

- Quel effectif de sérums tester, en fonction du nombre reçu :

<u>Nombre de sérums reçus par rapport à l'effectif attendu</u>		<u>Décision</u>
> 100%	Hors palmipèdes	Sélectionner et ne tester que l'effectif de sérums correspondant à 100%
	Palmipèdes (volailles et gibier)	Tester la totalité des sérums reçus*
≤ 100%		Tester la totalité des sérums reçus

* Etant donné que pour les palmipèdes la fourchette basse a été prise en compte dans la NS par rapport au nombre de sérums préconisés dans les recommandations européennes.

- Aide aux conclusions en fonction des résultats du criblage, compte-tenu du nombre de sérums interprétables testés :

Nombre de sérums utilisables et interprétables ¹ Fonction de l'espèce			Nombre de sérums positifs en IHA de criblage ³	Interprétation à l'issue du criblage	Destination des sérums ainsi testés
Canards et oies (demandés : 20) ²	Gallus, dindes, ... (préconisé : 10) ²	Oiseaux gibier autre que canards (préconisé : 20) ²			
≥ 17 ⁴	≥ 5 ⁵	≥ 12	≥ 1	Lot à soumettre à un test IHA de confirmation	A transférer au LNR ⁶ pour l'étape de confirmation
			0	Lot déclaré négatif en IHA	Restent au LVD
< 17 ⁴	< 5 ⁵	< 12	≥ 1	Lot à soumettre à un test IHA de confirmation	A transférer au LNR ⁶ pour l'étape de confirmation
			0	Lot déclaré non interprétable : doute lié au nombre restreint de sérums interprétables	Restent au LVD

- Sérums de titre auto-hémagglutinant résiduel ≤8 sans ou après traitement avec des hématies de poules.
- Selon la NS en vigueur concernant l'enquête sérologique IA en élevage en accord avec la version en cours de la décision UE correspondante, concernant la réalisation par les États membres de programmes de surveillance de l'influenza aviaire chez les volailles et les oiseaux sauvages.
- Sérums interprétables de titre IHA ≥16 vis à vis de l'antigène H5 ou/et de l'antigène H7 utilisés en première intention.
- Effectif minimum nécessaire par lot de prélèvements à analyser de manière à obtenir une probabilité de 99% d'identifier au moins un sérum présentant une réaction positive à l'influenza aviaire si la proportion de sérums séropositifs est de 10%.
- Effectif minimum selon la version en vigueur de la décision UE correspondante, concernant la réalisation par les États membres de programmes de surveillance de l'influenza aviaire chez les volailles et les oiseaux sauvages.
- Fournir au LNR :
 - les documents d'accompagnement : identification, fiche DAP, fiche de prélèvement, résultats individuels de titres auto-hémagglutinants et de titres IHA vis-à-vis des antigènes H5 et H7 utilisés en première intention
 - les sérums non traités aux hématies

Pour tout autre contexte, il est conseillé de prendre contact avec le LNR, avec nécessité d'un minimum de 20 sérums pour les élevages commerciaux.

ARN, Organes, écouvillons : Le LNR déléguant les analyses de première intention aux laboratoires agréés, n'est pas censé en règle générale recevoir directement du terrain des organes et/ou écouvillons dans le cadre de surveillance événementielle ou de retours en élevage suite aux enquêtes sérologiques ou de surveillance active. Pour autant, dans l'éventualité où le LNR serait sollicité, les échantillons recommandés doivent se conformer aux préconisations de la réglementation. Selon la directive 92/66/CEE du Conseil et le manuel européen de diagnostic de l'influenza aviaire précité, dans le cas de suspicion de maladie d'influenza aviaire ou maladie de Newcastle, les organes (intestins à traiter séparément, encéphale trachée poumons foie rate et autres pouvant être regroupés) doivent provenir au moins de 5 animaux représentatifs, en début d'apparition de la maladie autant que possible, sacrifiés ou venant de mourir. Des écouvillons peuvent être transmis en plus ou à la place des organes : ils doivent comprendre au moins 20 écouvillons oropharyngés (ou trachéaux) et 20 écouvillons cloacaux (avec une charge de fèces -idéalement de 1g-) ou à défaut des fèces fraîches, prélevés à partir d'oiseaux malades. Si le nombre d'oiseaux est inférieur, les écouvillons doivent être prélevés à partir de tous les oiseaux présents dans l'élevage. En revanche le LNR reçoit de façon systématique les ARN extraits à partir des échantillons précités regroupés au maximum par pool de 5 se révélant positifs au criblage et les aliquots individuels correspondants. L'ARN correspondant au témoin positif d'extraction des RT-PCR temps réel mises en œuvre par les laboratoires agréés, est impérativement transmis en même temps. Dans les autres circonstances, les demandeurs d'essai se renseignent au préalable auprès du LNR.

Lorsque le colis contient plusieurs types de prélèvements ou des prélèvements provenant de différentes origines ou de différents animaux identifiés, chaque prélèvement doit être facilement reconnaissable. Le système d'identification utilisé doit résister aux éventuels changements de température (décongélation) ou fuites de liquide.

Le tableau ci-dessous annonce à titre indicatif le volume minimal approximatif nécessaire pour chaque technique par échantillon. Cependant, le volume minimal est variable car il est fonction du nombre d'analyses effectuées en totalité (exemple : testage d'un sérum vis-à-vis de 5 antigènes différents selon la technique d'IHA, analyse d'un éluat issu d'un écouvillon en RT-PCR temps réel gène M avec contrôle positif interne et gène H5 mais aussi selon la technique NF U 47-210...)

Technique	Echantillons	Volume minimal par échantillon (Environ)
NF U 47-011	Sérums	Environ 100 µl par antigène + 250 µl supplémentaires pour traitement éventuel aux globules rouges
NF U 47-036 et IHA vis à vis des autres sous types de virus influenza aviaries	Sérums	Environ 100 µl par antigène + 250 µl supplémentaires pour traitement éventuel aux globules rouges
NF U 47-013	Sérums	Environ 300 µl
NF U 47-210	Ecouvillons	Environ 500 µl (dilution 1/3 en prévision)
	Liquide allantoïque	Environ 2 ml
Identification d'un virus hémagglutinant aviaire par IHA à l'aide d'anti-sérums/AcMo de référence	Liquide allantoïque	Quantité suffisante pour avoir 25 ml à 4 unités hémagglutinantes
Extraction - rRT-PCR	Ecouvillons	Environ 300 µl de surnageant ou 1 écouvillon par extraction
	ARN	Environ 20 µl par RT-PCR temps réel
RT-PCR/Séquençage	ARN	Environ 20 µl pour la réalisation d'un ADN complémentaire
		Environ 20 µl pour la réalisation d'une RT-PCR one-step

4. Emballage

L'emballage doit être conforme aux recommandations et réglementations relatives au transport de matières biologiques périssables, infectieuses ou non.

Il doit être hermétique et non contaminant pour l'environnement, et doit assurer la conservation des échantillons à une température permettant d'exploiter les prélèvements, ceci durant toute la durée du transport jusqu'au laboratoire.

Au minimum, doit figurer sur l'emballage du colis le nom de l'unité VIPAC, ou bien celui du LNR "Influenza aviaire/maladie du Newcastle". Dans la mesure où la personne concernée par l'analyse demandée est connue du demandeur d'essais, son nom doit aussi être indiqué sur l'emballage.

5. Commémoratifs

Ils doivent permettre de renseigner les rubriques suivantes :

- Identité de l'expéditeur des prélèvements, qui sera considéré sauf mention contraire ou cadre réglementaire particulier, comme seul demandeur de l'essai (Nom, prénom, organisme d'affiliation, téléphone, télécopie),
- Renseignements administratifs concernant l'éleveur (Nom, prénom, adresse), ou référence sous laquelle ces renseignements sont connus de l'expéditeur,
- Nature et origine des prélèvements (date de prélèvement, nom et référence du préleveur, nature et quantité, prélèvement individuel ou mélange, statut clinique des individus prélevés - apparemment sain, malade ou mort-, espèce précise et zone géographique s'il s'agit d'oiseaux sauvages, type de production s'il s'agit d'oiseaux de rente), dans ce dernier cas renseignements concernant le troupeau (date de mise en place, référence de lot ou de bâtiment)
- Rapport d'essai du laboratoire de criblage indiquant les premiers résultats obtenus
- Motif de la demande,
- Nature des prestations demandées,
- Adresse de la facturation,
- Adresse souhaitée pour envoi des résultats cependant les résultats virologiques concernant des suspicions ou des compléments d'enquête en élevage, sont adressés exclusivement à la DGAL qui se charge ensuite de la diffusion des résultats via la DD(CS)PP concernée.

6. Information/Accord préalable

Les demandes d'essais ne peuvent être prises en compte que si ces essais correspondent aux missions de l'Unité VIPAC. Pour toutes les demandes d'analyses de confirmation via le réseau des laboratoires agréés, une information préalable du LNR de préférence par mail via la liste des responsables techniques communiquée à ces laboratoires, doit précéder tout envoi d'échantillons. Dans les autres situations, les demandeurs d'essais doivent prendre contact avec le LNR et obtenir son accord préalablement à tout envoi d'échantillons.

Pour toute réception d'échantillons transmis sans accord préalable, le LNR se réserve le droit de les retransmettre au laboratoire agréé le plus proche s'il considère que la demande d'analyses ne rentre pas dans ses missions. Le laboratoire se réserve le droit d'utiliser la méthode la plus adaptée à l'échantillon si le client ne prévoit pas la méthode à mettre en œuvre.

7. Horaires de réception

Les échantillons acheminés par porteur spécial sont réceptionnés les jours ouvrés, du Lundi au Jeudi de 8.30 h à 12 h et de 13.30 h à 17.00 h ; le vendredi et veille de jour férié de 8.30 h à 12 h et de 13.30 à 16.30 h. Ces horaires ne concernent pas les réceptions d'échantillons adressés dans un contexte d'urgence reconnue.

Adresse de livraison : Anses – Laboratoire de Ploufragan
A l'attention de ¹.....
Unité VIPAC/ LNR influenza aviaire/maladie de Newcastle
Zoopôle
35, rue de Beaucemaine
22440 PLOUFRAGAN

*

¹ Pour les enquêtes sérologiques nationales influenza aviaire, le scientifique concerné est Mme Audrey Schmitz
Pour les autres demandes, les scientifiques concernés sont M. Eric Niqueux et Mme Audrey Schmitz