



RAPPORT DU GROUPE AD HOC ÉLECTRONIQUE SUR LE VIRUS DU TILAPIA LACUSTRE¹
Février à août 2018

Le Groupe *ad hoc* sur le virus du tilapia lacustre (TiLV) de l'OIE a été établi en novembre 2017 afin de passer en revue les méthodes de détection du TiLV, qu'elles aient ou non fait l'objet d'une publication, de décrire l'étape à laquelle le processus de validation se trouve pour chacune d'elles, de déterminer les exigences additionnelles à satisfaire pour leur validation, de recommander le développement de tout essai complémentaire qui pourrait s'avérer nécessaire, de faciliter l'approvisionnement et la distribution de matériaux de contrôle positif bien caractérisés aux fins de l'évaluation des méthodes et de d'organiser la réalisation d'essais interlaboratoires.

Ce rapport répertorie les activités et les accomplissements du Groupe *ad hoc* entre février et août 2018. La liste des participants et des termes de référence sont respectivement présentés en annexes I et II.

Activités, accomplissements et prochaines étapes

Suite à la requête formulée par la Commission sanitaire pour les animaux aquatiques, les pays ayant reporté la présence du virus du tilapia lacustre (TiLV) ont été contactés en mai 2018 par la Directrice générale de l'OIE. Elle leur a demandé de bien vouloir fournir des matériaux de contrôle positif pour le TiLV au Centre collaborateur de l'OIE pour les maladies nouvelles et émergentes ainsi que pour la validation de tests de diagnostic, localisé en Australie (laboratoire Australian Animal Health Laboratory - AAHL, CSIRO). Ces matériaux seront nécessaires à l'évaluation des méthodes moléculaires et à la conduite des essais interlaboratoires.

Le Groupe *ad hoc* a été heureux d'annoncer qu'à ce jour, des échantillons de matériaux infectieux en provenance du Taipei Chinois, d'Israël, du Pérou et la Thaïlande avaient été reçus (ou étaient en cours d'envoi).

À l'heure actuelle, les travaux du Groupe *ad hoc* se concentrent essentiellement sur le point 5 des Termes de référence, qui relève de la compétence du Centre collaborateur pour les maladies nouvelles et émergentes (Australian Animal Health Laboratory, Australie), c'est-à-dire :

Point 5 des Termes de référence : élaborer et mettre en œuvre un programme de travail pour les essais interlaboratoires ; objectif 1) développer et mettre en œuvre un programme d'essais interlaboratoires afin de valider les méthodes moléculaires de détection du TiLV suivantes :

1. la méthode mettant en œuvre une RT-PCR semi-nichée (RT-nPCR) conventionnelle, décrite par Dong *et al.* (2017) ;
2. la méthode mettant en œuvre une RT-PCR en temps réel (RT-qPCR) et le colorant fluorescent SYBR, décrite par Tattiyapong *et al.* (2017) ;
3. la méthode mettant en œuvre une RT-PCR en temps réel (RT-qPCR), non publiée à ce jour, et qui a été communiquée par un membre du Groupe *ad hoc*, le Dr Hong.

¹ Note : les points de vue et opinions exprimés dans le rapport du présent groupe ad hoc traduisent l'opinion des experts qui l'ont rédigé et ne reflètent pas nécessairement une prise de position de l'OIE. Ce rapport doit être lu parallèlement au rapport de la réunion de septembre 2018 de la Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques, car il intègre les considérations et observations émanant de ladite Commission. Il est disponible en cliquant sur le lien suivant : <http://www.oie.int/fr/normes/commissions-specialisees-et-groupes-de-travail-ad-hoc/commission-des-animaux-aquatiques-et-rapports/rapports/>

Méthodologie :

Réception des matériaux infectieux par le laboratoire AAHL

Les sources d'approvisionnement en matériaux infectieux pouvant être utilisés seront déterminées par les membres du Groupe *ad hoc*. Ils seront envoyés au laboratoire situé à Geelong, en Australie (CSIRO, Australian Animal Health Laboratory – AAHL). Des accords de transfert de matériau devront être conclus afin de garantir que le matériau faisant l'objet du transfert sera uniquement utilisé dans le cadre des activités du Groupe *ad hoc*. À réception des matériaux infectieux par le laboratoire AAHL, il sera procédé à la confirmation de la présence du TiLV par une méthode de PCR conventionnelle suivie d'une analyse de la séquence du génome du virus. Le virus sera mis en culture sur la lignée cellulaire E-11 en vue de sa multiplication puis conservé dans l'azote liquide.

Multiplification du TiLV et production du matériau de contrôle positif

Le TiLV sera mis en culture sur la lignée cellulaire E-11. Afin de s'assurer de l'adéquation du matériau utilisé pour la constitution du panel nécessaire aux essais interlaboratoires, la valeur limite inférieure (= plus petite concentration en virus pouvant être quantifiée) sera déterminée par dilution décimale des échantillons, et ce, pour chacun des méthodes moléculaires employés. Cela permettra également de comparer la sensibilité analytique (Ase) les différentes méthodes moléculaires. Le surnageant des cultures cellulaires préalablement clarifié sera irradié par des rayons gamma (50 kGy) puis testé afin de mesurer le degré de dégradation de l'ARN du TiLV causé par les radiations. Le laboratoire AAHL a mis en évidence, lors de précédents travaux, que l'utilisation de cette méthode sur d'autres virus affectant des poissons ne rendait pas impropre à l'usage le matériau irradié.

Dans le cas où la réalisation de tests moléculaires pour la détection du TiLV se déroulerait conformément aux attentes, une évaluation préliminaire de la spécificité analytique (Asp) de chacun de ces tests serait alors conduite, en utilisant les acides nucléiques extraits de divers virus affectant des poissons et détenus par le laboratoire AAHL.

Panel constitué aux fins de la réalisation des essais interlaboratoires

Le panel utilisé dans le cadre des essais interlaboratoires sera composé de 20 échantillons positifs et 10 échantillons négatifs, préparés de la façon suivante :

1. sept échantillons obtenus par dilution décimale en série afin de permettre l'estimation de l'efficacité des méthodes moléculaires en temps réel ;
2. au moins deux échantillons fortement positifs;
3. au moins deux échantillons moyennement positifs ;
4. au moins deux échantillons faiblement positifs ;
5. échantillons obtenus par dilution décimale d'échantillons moyennement et faiblement positifs ;
6. échantillons positifs présentant des titres viraux variés afin de produire les 20 échantillons positifs ;
7. dix échantillons négatifs, préparés à partir du surnageant des cultures de lignées cellulaires non infectées.

Le matériau sera fourni sous forme de surnageant de culture cellulaire irradié par les rayons gamma. Une vérification de l'absence de dégradation de l'ARN viral sera réalisé sur un volume de 50 µL extrait du surnageant irradié.

Le fait que la description de la composition du panel ne soit pas précisément détaillée ne doit pas être considéré comme un test de la capacité des laboratoires respectifs des membres du Groupe *ad hoc*. Il s'agit simplement d'une bonne pratique de laboratoire que de fournir des échantillons en aveugle aux participants de ce type d'évaluation des tests. Pour chacun des différents échantillons, de multiples aliquotes seront prélevées en vue de leur conservation.

L'homogénéité des échantillons sera testée en prélevant 10 aliquotes pour chacune des différentes concentrations, avec un coefficient de variation < 5%, garant de leur homogénéité. La stabilité des échantillons sera également testée pour différentes températures et durées (20° C, 4° C et 22° C, à J0, J7 et J14), en prélevant 3 aliquotes par échantillon. Cet essai devrait permettre de prévenir tout problème de stabilité en lien avec les délais de livraison du panel d'échantillons destiné aux essais interlaboratoires et auxquels participeront les laboratoires respectifs des membres du Groupe *ad hoc*. Les tests de stabilité seront considérés comme totalement achevés lorsque l'ensemble des laboratoires aura communiqué les résultats des vérifications de la stabilité effectuées sur les échantillons conservés par AAHL et qui leur auront été adressés.

Les laboratoires participant recevront les échantillons sous forme de tubes numérotés et les testeront à l'aveugle au moins trois fois. Les résultats seront communiqués au président du Groupe *ad hoc* afin qu'il les compile. Il les communiquera en retour sous un format non codé aux laboratoires participants afin de pouvoir initier les discussions. La duplication des échantillons et l'utilisation de dilutions décimales permettront d'effectuer l'analyse statistique nécessaire à la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité.

Le panel initial destiné aux essais interlaboratoires sera obtenu à partir de différentes dilutions d'une solution préparée à partir d'un seul type d'isolat de TiLV. A_{Sp} et A_{se} seront déterminés dès lors que d'autres isolats du TiLV, en provenance d'aires géographiques différentes, seront fournis. Il pourra être nécessaire de conduire de nouveaux essais si les résultats indiquent qu'une ou plusieurs des méthodes moléculaires mises en œuvre ne permet(tent) pas de détecter l'ensemble des isolats. Le cas échéant, un second essai interlaboratoire pourra être planifié conformément à la description figurant ci-dessus, mais en utilisant divers isolats de TiLV provenant respectivement de différentes aires géographiques. Cela permettra de mieux caractériser les paramètres de performance de la méthode à évaluer, notamment la robustesse et la répétabilité.

Le panel destiné aux essais interlaboratoires sera également fourni à des laboratoires autres que ceux des membres du Groupe *ad hoc*, sous réserve que ces derniers contribuent aux activités du Groupe *ad hoc*/ fournissent en retour des matériaux infectieux utilisables dans le cadre des activités du Groupe *ad hoc*.

Compte-rendu des résultats

Un modèle de feuille de résultats sera élaboré. Il y sera requis d'y inscrire le plus d'informations possibles concernant la procédure de mise en œuvre de la méthode au sein de chaque laboratoire. Parmi les informations à faire figurer devront se trouver les méthodes/kits d'extraction utilisé(s) (avec le détail du volume extrait et du volume élué), les réactifs/le kit employé(s) choisis pour la méthode moléculaire (avec le détail du volume réactionnel et du volume modèle utilisés), le recodage des résultats et leur interprétation ; le choix du cycle seuil pour les tests moléculaires en temps réel et la détermination des seuils de positivité (= cut-off) devront également être présentés. Ces informations seront communiquées préalablement à l'envoi du panel destiné aux essais interlaboratoires, sous la forme d'un projet de document destiné aux membres du Groupe *ad hoc* afin qu'ils formulent leurs commentaires. Il serait hautement appréciable que la réalisation des tests et la communication des résultats au Groupe *ad hoc* aient lieu dans le mois suivant la réception du panel.

Prochaines étapes

Le Groupe *ad hoc* poursuivra ses travaux et communiquera sur leur progression lors de la prochaine réunion de la Commission des animaux aquatiques, qui se tiendra en février 2019.

Références bibliographiques :

DONG, H., SIRIROOB, S., MEEMETTA, W., SANTIMANAWONG., W., GANGNONNGIW, W., PIRARAT, N., KHUNRAE, P., & RATTANAROJPONG, T., VANICHVIRIYAKIT, R. & SENAPIN, S. (2017). Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection. *Aquaculture*, **476**, 111-118.

TATTIYAPONG P., SIRIKANCHANA K. & SURACHETPONG W. (2017). Development and validation of a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction for tilapia lake virus detection in clinical samples and experimentally challenged fish. *Journal of Fish Diseases*, **41**(2), 255-261.

.../Annexes

RAPPORT DU GROUPE AD HOC ÉLECTRONIQUE SUR LE VIRUS DU TILAPIA LACUSTRE**Liste des participants****MEMBRES DU GROUPE AD HOC ÉLECTRONIQUE**

Dr Axel Colling (Président)
OIE Collaborative Centre for Diagnostic
Test Validation Science
Po bag 24 Geelong VIC 3220
AUSTRALIE
Tél. : +61 3 5227 5255
Tél. : +61 457 515 014
Mèl. : Axel.Colling@csiro.au

Dr Mona Dverdal Jansen
Veterinarian, Researcher, PhD
Norwegian Veterinary Institute
PO Box 750 Sentrum
NO-0106 Oslo
NORVÈGE
Tél. : + 47 23 21 64 79
Tél. : + 47 934 99 808
Mèl. : mona-dverdal.jansen@vetinst.no
www.vetinst.no

Dr Navad Davidovich
Veterinary Services and Animal Health
Ministry of Agriculture & Rural
Development
P.O. Box 12, Bet Dagan 5025001,
ISRAEL
Tél. : +972-50-6241511
Tél. : Office: +972-3-9681728
Mèl. : Nadavd@moag.gov.il

Dr Prof. Hong Liu
Director
OIE SVC reference laboratory
NACA regional resource centre
State Key laboratory of aquatic animal
health
Shenzhen Custom
General administrations of China Customs
Room 907 of 1011 building, Fuqiang Road,
Futian Qu
Shenzhen, Guangdong province, 518045
RÉPUBLIQUE POPULAIRE DE CHINE
Mèl. : 709274714@qq.com

Dr Sergio Hernan Marshall Gonzalez
Pontificia Universidad Católica
de Valparaiso
Av. Brazil 2950
Valparaiso
CHILI
Tél. : +55 32-2273444
Mèl. : sergio.marshall@pucv.cl

Dr Nick Moody
Senior Research Scientist
Team Leader – Aquatic Diagnostic
Capability
CSIRO AAHL Fish Diseases Laboratory
5 Portarlington Rd, East Geelong VIC
3219
Private Bag 24, Geelong VIC, 3220
AUSTRALIE

Dr Dong Thanh
Researcher, Department of Microbiology,
Faculty of Science, King Mongkut's
University of technology Thonburi
(KMUTT)
Bangkok 10140
THAÏLANDE
Mèl. : hadongntu@gmail.com

Dr Henrique César Pereira Figueiredo
Head
National Reference Laboratory for Aquatic
Animal Diseases/MAPA
Federal University of Minas Gerais
BRÉSIL
Tél. : +55 31 3409-2077
Mèl. : figueiredoh@yahoo.com

Dr Avi Eldar
Head, Fish Disease Laboratory
The Veterinary Services-Kimron Vet.
Inst.
Agricultural Ctr.
POB 50250
ISRAEL
Mèl. : eldar@moag.gov.il

REPRÉSENTANT DE LA COMMISSION SANITAIRE POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES

Dr Edmund Peeler
(Vice-Président)
Group Manager Aquatic Pest & Pathogens
CEFAS
Barrack Road, Weymouth
Dorset, DT4 8UB ROYAUME-UNI
Mèl. : ed.peeler@cefas.co.uk

Annexe I (suite)

SIÈGE DE L'OIE

Dr Stian Johnsen
Chargé de mission
Service des normes
s.johnsen@oie.int

Termes de référence

Le Groupe *ad hoc* électronique doit :

1. examiner de façon critique l'ensemble de la littérature traitant des méthodes de détection du TiLV ainsi que les méthodes n'ayant pas fait l'objet de publication et qui seraient également disponibles ;
2. formuler des recommandations sur les exigences requises en matière de développement de méthodes additionnelles ;
3. formuler des recommandations sur les exigences requises en matière de validation des méthodes ;
4. déterminer les sources d'approvisionnement en matériau de contrôle positif bien caractérisé, viable et non viable, aux fins de l'évaluation des méthodes et de leur mise en place dans les laboratoires ;
5. élaborer un programme de travail pour les essais interlaboratoires ;
6. élaborer un rapport, avant la fin janvier 2018, qui sera examiné par la Commission des animaux aquatiques lors de sa réunion de février 2019.

Les membres du Groupe *ad hoc* doivent prendre connaissance du chapitre 1.2. portant sur les critères d'inclusion des maladies des animaux aquatiques dans la liste de l'OIE, des définitions figurant dans le glossaire du *Code aquatique* ainsi que des principes et méthodes de validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses décrites dans le chapitre 1.1.2. sur les « Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases » du *Manuel aquatique*.

© Organisation mondiale de la santé animale (OIE), 2018

Le présent document a été préparé par des spécialistes réunis par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE). En attendant son adoption par l'Assemblée mondiale des Délégués, les points de vue qui y sont exprimés traduisent exclusivement l'opinion de ces spécialistes.

Toutes les publications de l'OIE sont protégées par la législation internationale sur les droits d'auteur. Des extraits peuvent être copiés, reproduits, traduits, adaptés ou publiés dans des périodiques, documents, ouvrages, supports électroniques ou tout autre média destiné au public, dans un but informatif, éducatif ou commercial, sous réserve de l'autorisation écrite préalable de l'OIE.

Les désignations et dénominations employées ainsi que la présentation des données de cette publication ne reflètent aucune prise de position de l'OIE quant au statut de quelque pays, territoire, ville ou zone que ce soit, à leurs autorités, aux délimitations de leur territoire ou au tracé de leurs frontières.

Les points de vue exprimés dans les articles signés relèvent de la seule responsabilité de leurs auteurs. La mention de sociétés commerciales ou de produits fabriqués, brevetés ou non, n'implique pas que ces sociétés ou produits soient approuvés ou recommandés par l'OIE de préférence à d'autres, de nature similaire et non cités.