

## CHAPITRE 2.2.3.

# MISE AU POINT ET OPTIMISATION DES METHODES DE DETECTION DE L'ACIDE NUCLEIQUE

---

### INTRODUCTION

Les Recommandations de l'OMSA pour la validation fournissent des informations détaillées et des exemples à l'appui de la Norme de validation publiée au Chapitre 1.1.6 Validation des épreuves diagnostiques pour les maladies infectieuses des animaux terrestres du présent Manuel terrestre. L'expression « Norme de validation de l'OMSA » dans le présent chapitre doit être comprise comme renvoyant à ce chapitre.

Un nombre toujours croissant de tests de détection de l'acide nucléique est désormais utilisé pour le diagnostic des maladies infectieuses chez différentes espèces animales comme chez l'homme. Les méthodes les plus courantes sont la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), dont il existe de nombreuses variations, et les méthodes d'amplification isotherme, comme l'amplification isotherme induite par boucle (LAMP). De plus, les biopuces en phase solide ou liquide constituent de nouveaux outils de diagnostic biotechnologique. Les techniques d'amplification utilisées dans les essais confèrent à ceux-ci une sensibilité analytique élevée. Les produits de la réaction d'amplification peuvent être détectés de différentes manières, par exemple par la visualisation dans des gélouses, avec l'utilisation de sondes marquées (TaqMan), par la détection d'une accumulation de produits en temps réel ou au moyen de dispositifs qui capturent des sondes spécifiques à la surface d'une matrice solide ou sur des billes (Lauerman, 2004; Viljoen et al., 2005). Différents essais PCR peuvent être multiplexés pour détecter plusieurs cibles dans un tube ou pour combiner les analytes ciblés et les témoins générant des produits d'amplification différents, et ce, dans un seul tube de réaction. Même si cette technique présente des avantages évidents, cela nécessite une grande attention durant l'optimisation afin de garantir que la performance de l'essai ne soit pas altérée. De manière analogue, des résultats multiples de PCR peuvent être produits avec un seul ensemble d'amorces, mais en utilisant des sondes marquées se fixant aux différentes séquences cibles chez les diverses espèces ou souches détectées par PCR (Wakeley et al., 2005; 2006).

Les techniques d'amplification pour la détection de l'acide nucléique reposent généralement sur le principe d'une amplification exponentielle de la séquence spécifique ciblée lors de la réaction. Cela confère aux tests de détection de l'acide nucléique une sensibilité et une spécificité analytiques élevées. En raison du haut degré de sensibilité généralement atteint par les tests de détection de l'acide nucléique, il faut apporter un soin tout particulier et prendre des mesures de précaution spéciales pour éviter la contamination de l'amplificateur avant l'analyse de l'échantillon. Ce problème est notamment susceptible de survenir lorsque les tubes de réaction sont ouverts dans le laboratoire pour leur traitement ultérieur, par exemple pour réaliser des gels ou pour effectuer des essais emboîtés. Afin d'éviter ce genre de contaminations, des protocoles de laboratoire stricts doivent être utilisés, notamment l'utilisation de salles ou d'enceintes distinctes pour certaines étapes des essais, le changement de blouses et de gants ainsi que des programmes de nettoyage rigoureux (Viljoen et al., 2005; Subcommittee of Animal Health Laboratory Standards). C'est pourquoi les tests reposant sur des systèmes de tubes fermés sont généralement plus appropriés pour les épreuves diagnostiques (Sawyer et al., 2006). Comme pour tous les essais, il est important d'utiliser les témoins appropriés pour démontrer que l'épreuve fonctionne comme prévu. La provenance de tous les échantillons utilisés pour la mise au point de l'essai doit être bien établie et la mise au point doit être faite dans le cadre d'un système qualité garantissant des niveaux adéquats de formation, d'entretien et de contrôle de l'équipement, etc. (Burkhardt, 2000).

## A. PROCESSUS DE MISE AU POINT DE L'ESSAI

### 1. Définition du ou des objectifs prévus pour un essai

Le premier élément à prendre en compte lors de la mise au point d'un essai est de définir clairement l'objectif spécifique et l'utilisation du test à développer et de

#### Objectif de l'essai

- S'agit-il d'un test de dépistage, d'un test de confirmation ou des deux ?
- Est-il destiné à la détection d'un groupe d'agents pathogènes ?
- Est-il destiné à la détection d'un seul agent pathogène ?
- Est-il destiné à permettre la distinction entre les animaux vaccinés et les animaux infectés ?

comprendre la façon dont il sera utilisé, car cela conditionne plusieurs des décisions à prendre pour son développement. Ainsi, il est possible de mettre au point un test de dépistage de tous les sous-types de l'influenza aviaire ou de leurs variants chez les oiseaux, ce qui nécessitera un test réactif inclusif et large, ou de déterminer le type d'hémagglutinine, ce qui requiert un test plus spécifique. Pour certains tests, le critère d'exigence est de détecter un groupe de virus, à l'instar de la PCR panpestivirus qui détecte les virus de la diarrhée virale bovine (DVB), la pestivirose ovine et la peste porcine classique (PPC). Pour d'autres tests, l'exigence peut consister à détecter un seul agent, voire à permettre une approche DIVA (différenciation des animaux infectés et des animaux vaccinés). Un exemple d'une méthode de ce genre est celui de l'essai de PCR en temps réel récemment publié

pour les virus de la peste porcine classique, développé pour différencier les sangliers naturellement infectés des sangliers vaccinés (Liu *et al.*, 2009).

### 2. Mise au point de l'essai – expérimentation

#### 2.1. Assurance qualité

Il est important que les essais soient mis au point dans des laboratoires où les normes d'assurance qualité sont élevées et où des témoins sont utilisés (voir Chapitre 1.1.5 *Gestion de la qualité dans les laboratoires de diagnostic vétérinaire*). Les données de validation pour le fonctionnement et l'exactitude du test provenant des phases de mise au point et de validation doivent être solides puisqu'elles serviront de base pour l'interprétation du statut sanitaire et pour les actions qui en découleront lorsque l'essai sera utilisé en routine.

#### 2.2. Matériel de référence

Sélection des échantillons (voir Chapitre 1.1.2 *Prélèvement, expédition et stockage des échantillons pour le diagnostic*).

Pour la plupart des maladies, il est probable que les échantillons requis pour les essais de détection de l'acide nucléique soient les mêmes que ceux utilisés pour les méthodes courantes de détection, comme les cultures bactériennes ou l'isolement viral. Ainsi, la détection de l'influenza aviaire par PCR en temps réel ou par isolement viral nécessite des échantillons identiques. Les échantillons prélevés par écouvillonnage de coupes fraîches d'organes sont pratiques, remplaçant ainsi l'homogénéisation laborieuse des prélèvements d'organes. Dans un même ordre d'idées, la tendance est à l'utilisation d'échantillons obtenus par des méthodes non invasives, telle la salive pour la détection du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) chez

- Quel type d'échantillons provenant de la population cible sera utilisé ?
- Quels sont les sites de prédilection de l'agent chez l'hôte ?
- Quelles sont les méthodes de prélèvement, de stockage et de transport prévues pour les échantillons et quelles sont les éventuelles répercussions sur les résultats ?
- Les échantillons seront-ils individuels ou regroupés ?
- Les échantillons du panel de validation seront-ils représentatifs de la population cible ?

les porcs (Prickett *et al.*, 2008) ou comme les échantillons de lait en vrac pour déterminer le statut sanitaire du troupeau par rapport à la DVB. Avant d'opter pour des échantillons mixtes, tel le lait en

vrac, les concepteurs du test doivent examiner et évaluer l'effet de la dilution de l'analyte cible sur la sensibilité diagnostique et l'incorporer au plan de validation (voir ci-dessous).

Il est important de comprendre la biologie de l'agent pathogène concerné et la nature du dispositif de prélèvement de l'échantillon. Dans le cas de l'influenza aviaire, les différents sous-types ou variants des virus ont des sites de prédilection différents chez les oiseaux hôtes. Par exemple, les échantillons cloacaux sont appropriés pour certains sous-types, alors que les échantillons buccaux sont acceptables pour d'autres. C'est pourquoi les tests destinés à être utilisés dans un programme de surveillance doivent inclure les deux sites de prélèvement et être validés pour les deux types d'échantillons. Un autre facteur important est la matrice dans laquelle se trouve l'analyte chez l'hôte. Les échantillons cloacaux sont plus susceptibles de contenir des inhibiteurs de la PCR que les échantillons buccaux. Un autre facteur de confusion potentielle est le type d'écouvillon utilisé pour collecter les échantillons ; certains contiennent des matières qui inhibent la PCR. Il est donc très important de spécifier précisément le matériel d'échantillon privilégié et de décrire intégralement les écouvillons et le protocole d'écouvillonnage, y compris les milieux tampons ou les milieux de transport de prédilection ainsi que les conditions de stockage.

Il faut également définir si les échantillons doivent être testés individuellement ou en groupes et si ces groupes doivent être constitués de différents échantillons d'un seul animal ou de plusieurs animaux. Toute stratégie de regroupement doit être définie en détail et validée avant l'emploi. Finalement, si la population cible est « oiseaux », l'étude de validation doit couvrir une vaste population représentative de différentes espèces pour montrer que l'essai est largement utilisable tout en se concentrant sur les espèces les plus répandues ou sur celles utilisées comme sentinelles pour l'infection.

### 2.3. Conception de la méthode de test (adéquation aux objectifs)

#### 2.3.1. Choix du test

Pour la plupart des activités de surveillance, les grands nombres d'échantillons peuvent d'abord être testés avec un essai de dépistage. Dans l'exemple ci-dessus de l'influenza aviaire, le test de dépistage décrit doit détecter tous les sous-types ou variants connus de l'influenza A, soit dans une région donnée, soit dans le monde entier. Le test doit avoir une sensibilité très élevée pour ne pas manquer des échantillons vrais positifs et être spécifique d'un point de vue analytique (inclusif) pour détecter tous les virus du groupe de l'influenza A.

L'influenza aviaire a une grande visibilité. Si un nouveau test devait générer une proportion élevée de résultats faux positifs ne pouvant être confirmés par un autre moyen, le statut infectieux des animaux serait difficile à déterminer. L'exclusion d'agents étroitement apparentés, sans importance dans le contexte de l'objectif prévu pour l'essai, est donc essentielle.

Toujours sur la base de l'exemple du dépistage de l'influenza aviaire (IA), il est également important pour le test de fournir rapidement des résultats afin que les mesures de lutte contre la maladie puissent être appliquées tout aussi rapidement. Aussi, pour la détection de l'influenza aviaire, le choix logique de test est celui d'une PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan ou d'un essai sur le terrain. Pour un essai de dépistage de l'influenza aviaire, les amorces et les sondes seront probablement basées sur le gène de Matrice (M) connu pour être présent dans tous les isolats d'influenza de type A. Selon l'adéquation assignée aux objectifs, les scientifiques peuvent choisir de mettre au point un essai supplémentaire à utiliser en conjonction avec le test de dépistage afin de déterminer si une souche donnée d'influenza aviaire est présente et si cette souche est hautement pathogène, cela ayant une grande incidence sur les exigences de

- Le test est-il destiné à être utilisé dans une région donnée ou dans le monde entier ?
- Est-il suffisamment sensible et la cible analytique est-elle suffisamment inclusive pour ne pas manquer les échantillons positifs ?
- Réfléchissez aux conséquences d'une proportion élevée de résultats faux positifs qui ne peuvent pas être confirmés.
- Des résultats rapides sont-ils possibles et/ou nécessaires ?
- Des tests de confirmation (outils analytiques) seront-ils utilisés pour déterminer/confirmer le pathotype de l'agent pathogène (souche) ?
- La détermination de la souche aura-t-elle une forte incidence sur les mesures prises ?

notification et sur les mesures de lutte potentielles. Certaines méthodes de test peuvent être adaptées pour servir d'outils analytiques secondaires appliqués à l'analyte détecté dans les premiers essais et elles peuvent être utilisées pour mieux caractériser le produit détecté lors du test de dépistage (voir Norme de validation de l'OMSA, Section B.1.4). Cet exemple de méthode analytique inclurait une analyse séquentielle de l'amplimère PCR de la matrice détecté lors du dépistage de l'IA. La mise au point d'essais de confirmation jumelés, tels les essais PCR en temps réel ciblant d'autres gènes comme l'hémagglutinine ou la neuraminidase de l'IA pour identifier le sous-type ou le pathotype, nécessiterait que ces essais soient soumis à toutes les étapes de la mise au point, de l'optimisation et de la validation. Un nouvel essai PCR basé sur une amorce Plexus a été mis au point dans le Centre collaborateur de l'OMSA pour le diagnostic biotechnologique des maladies infectieuses à Uppsala (Suède). Cet essai permet de déterminer simplement et rapidement différents pathotypes de virus ARN. Par exemple, les virus de l'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle peuvent être détectés et évalués avec un équipement au coût faible (machine PCR) et dans un délai très court (moins de trois heures), dans des laboratoires équipés simplement, voire sur le terrain en situation d'épidémie (Leijon et al., 2011 ; Yacoub et al., 2012). Cela montre la rapidité du développement et de la simplification dans le domaine des tests diagnostiques de détection de l'acide nucléique pour des utilisations sur le terrain.

### 2.3.2. Conception de la méthode de test

La méthode doit être soigneusement conçue afin d'atteindre l'objectif défini initialement. Parmi les facteurs importants à prendre en compte figurent l'utilisation, le type et le nombre d'échantillons à tester. Cela mène aux réflexions logistiques et pratiques pour l'essai candidat, par exemple, pour savoir s'il sera effectué dans un laboratoire, avec ou sans automatisation pour atteindre un débit élevé, ou sur le terrain avec un test rapide. Toutes les informations disponibles, publications, séquences déposées dans des bases de données, données de séquençage internes, doivent être utilisées. Un logiciel sophistiqué existe pour optimiser la conception des amorces et des sondes ; la modélisation informatique des séquences probables à utiliser dans l'essai constitue une première étape.

- L'essai a-t-il d'abord été évalué sur un panel réduit d'échantillons (six à huit) pour évaluer la viabilité de l'approche ?
- La séparation des résultats de test entre les échantillons négatifs et positifs était-elle bonne ?
- Un test préliminaire a-t-il été effectué avec une série de dilution dans la matrice pour évaluer la sensibilité analytique relative initiale ?

## 2.4. Études de faisabilité

Avant de se lancer dans la validation d'un prototype d'essai récemment mis au point, une étude de faisabilité doit être effectuée au moyen d'un panel réduit d'environ six à huit échantillons bien caractérisés pour évaluer si le système est viable. Ce panel doit être constitué d'échantillons distribués sur la plage de fonctionnement de l'essai, dont au moins deux négatifs, deux indiscutablement positifs et, idéalement, des échantillons figurant dans le milieu de la plage. Ces échantillons doivent idéalement provenir d'animaux différents. L'essai doit permettre autant que possible une séparation des résultats de test entre les échantillons fortement positifs et les échantillons négatifs de ce panel. À ce stade, il peut s'avérer utile de tester une série de dilutions (analyte dilué dans la matrice) pour évaluer la sensibilité analytique relative si le test est le remplaçant potentiel d'une méthode où la sensibilité est un critère important (voir Chapitre 2.2.8 *Comparabilité des épreuves suite à des changements introduits dans une méthode de test validée*).

## 2.5. Mise au point et optimisation

- Lieu optimal ? Utiliser une salle blanche ou un système d'enceinte pour minimiser les contaminations.
- Méthode optimale d'extraction pour préparer les échantillons ? Manuelle ou automatisée ?

Le but de cette étape est de définir et d'optimiser la méthode qui sera utilisée pour réaliser le test lors des analyses de routine à venir. Cela comprend la description des installations appropriées pour effectuer l'essai. Il est important de prendre en compte la méthode d'extraction requise pour préparer les échantillons en vue du test ainsi que le procédé de l'essai. Pour tout essai de type PCR, il est nécessaire de définir des protocoles de salle blanche

pour minimiser la contamination. Si de grands nombres d'échantillons sont prévus, il peut être nécessaire de choisir une procédure automatisée d'extraction (Jungkind, 2001).

En règle générale, il est nécessaire d'évaluer différentes méthodes de test et de faire varier les concentrations de réactifs, les adjonctions de matrice et les temps de réaction pour optimiser l'extraction et l'essai. Il est important de modifier une seule variable à la fois ou d'utiliser un concept et une analyse multifactoriels (voir la Norme de validation de l'OMSA, Section A.2.5, à propos de la robustesse). Il est aussi important d'identifier les facteurs ayant une plage étroite d'activité, ceux-ci étant les points critiques du procédé de l'essai, susceptibles d'influencer sa robustesse. En général, les étapes de l'essai sont relativement simples à optimiser, mais il faut veiller à garantir la robustesse de l'extraction de l'acide nucléique et s'assurer d'optimiser et d'ajuster tous les réactifs de l'essai ainsi que les étapes du procédé pour une utilisation de routine en laboratoire (Burkhardt, 2000).

- Les concentrations de réactifs ont-elles été testées quant à leur réactivité optimale ?
- L'extraction a-t-elle été optimisée ?
- Quels sont les adjonctions de matrice et les temps de réaction permettant d'optimiser l'essai ?
- Quels sont les facteurs qui ont une plage étroite à l'intérieur de laquelle ils fonctionnent de manière optimale ?
  - Cette plage a-t-elle été définie ?

Pour la PCR, les témoins sont nombreux et variés. Il est important d'inclure des témoins appropriés afin de montrer que l'essai fonctionne comme prévu. Voici quelques exemples de témoins à prendre en compte.

### 2.5.1. Témoin de l'espèce hôte

Ce témoin montre que l'espèce cible a été correctement échantillonnée. Dans l'exemple de dépistage de l'IA, le témoin apporte la vérification que l'échantillon récolté a bien été en contact avec l'espèce cible et que l'échantillon contient de l'acide nucléique d'« oiseau », disponible pour l'extraction selon un protocole défini. Une cible possible pour ce témoin est un gène domestique telle la  $\beta$ -actine, présent dans l'espèce hôte cible. C'est relativement simple si l'espèce de l'hôte est une espèce unique (p. ex. poulet) mais cela devient plus compliqué de trouver une cible adéquate pour tous les échantillons « oiseaux ». Ce type de témoin peut ne pas être requis si l'échantillon est ajouté directement au procédé d'extraction, à l'instar d'un morceau de tissu ou de sang, mais il est recommandé pour les échantillons « indirects », tels ceux récoltés sur des échantillons ; dans ces cas, le témoin de l'espèce hôte doit être utilisé pour chaque échantillon testé.

### 2.5.2. Témoin sans matrice

Ce témoin signale si une contamination de l'échantillon a eu lieu, résultant dans un produit amplifié alors qu'aucun produit amplifié ne devrait être présent, l'échantillon ne contenant pas de cible. Il faut prendre en compte le nombre et le placement des témoins sans matrice dans le dispositif de l'essai. En règle générale, un certain nombre (environ 5 % des puits) de témoins sans matrice sont distribués de manière aléatoire au sein de l'essai ou sur la plaque lorsque des formats de plaques 96 et 386 puits sont utilisés.

Avez-vous inclus tous les témoins nécessaires pour démontrer que l'essai fonctionne comme prévu ?

- Témoin négatif ?
- Témoin d'inhibition ?
- Témoin positif ?
- Pour les essais ARN – témoin de la transcription inverse ?

### 2.5.3. Témoin positif

Un témoin positif dont le seuil de cycle (Ct) se situe dans la plage de fonctionnement définie pour l'essai est utilisé sur chaque plaque. Un plasmide contenant la séquence cible, utilisable pour contrôler le niveau attendu d'amplification de l'essai, peut constituer un choix adéquat pour ce témoin. Cependant, cela ne permet pas d'évaluer l'efficacité du procédé d'extraction qui nécessite, pour sa part, un échantillon prélevé sur le terrain ou son équivalent (échantillon provenant d'une infection expérimentale par exemple).

#### 2.5.4. Témoin d'inhibition

Ce témoin est nécessaire pour détecter d'éventuels inhibiteurs de la réaction PCR. Si un témoin d'inhibition produit un résultat négatif, cela signifie que l'échantillon contient des substances inhibitrices et que les résultats négatifs du test ne peuvent pas être interprétés comme « négatifs », l'essai n'ayant pas fonctionné correctement.

- Les avantages et les inconvénients d'inclure un témoin interne ont-ils été pris en compte ?
- L'objectif et l'utilisation du témoin d'inhibition ont-ils été clairement spécifiés dans le protocole de l'essai ?

Certains échantillons comme les fèces ou le sperme contiennent souvent des inhibiteurs. Cela est moins problématique lorsqu'il s'agit de tester des échantillons de sang ou d'organismes cultivés (Ballagi-Pordány et Belák, 1996). Les données collectées sur le fonctionnement de l'essai pendant le procédé de validation en ciblant les matrices des échantillons permettront de décider, sur la base du risque, si un témoin d'inhibition doit être inclus pour chaque échantillon ou si le système de test est peu susceptible de subir une inhibition. Si les substances inhibitrices constituent un problème majeur, un témoin d'inhibition doit être inclus avec chaque échantillon de test.

Le débat est nourri pour déterminer les témoins d'inhibition les plus adéquats et les plus efficaces. En voici quelques exemples.

- i) Une cible artificielle, par exemple un segment d'ADN contenu dans un plasmide, est ajoutée à l'échantillon extrait et amplifiée avec la même amorce que la cible du test mais de taille différente ou contenant une séquence interne différente de manière à être identifiée comme le témoin interne lors du test (Sawyer *et al.*, 2006). L'avantage de cette méthode est qu'elle utilise la même amorce que celle employée dans le test et que le témoin peut être ajouté à une concentration précise. Comme la cible pour l'essai et pour le témoin est la même, la compétition pour l'amorce et pour les quatre bases peut réduire la sensibilité analytique de l'essai. L'optimisation de l'essai doit être faite avec soin, de manière à ce que la sensibilité analytique de l'essai n'en soit pas altérée. Un autre inconvénient est que le témoin (élément ajouté) ne vérifie que ce stade de l'essai et ne témoigne pas de la phase d'extraction.
- ii) Une autre stratégie pour un témoin d'inhibition est d'amplifier un gène domestique ou structurel comme la  $\beta$ -actine, toujours présente dans le tissu cible et donc dans l'échantillon. Si le gène domestique est inhibé par des substances présentes dans l'échantillon, on en déduira que l'amplification du gène ciblé par le test peut également avoir été inhibée. Cette conclusion n'est pas toujours justifiée. Les gènes domestiques sont souvent présents en abondance et peuvent parfois être détectés, même en présence de substances inhibitrices, alors que des quantités plus restreintes des séquences ciblées par l'essai peuvent être inhibées dès l'amplification. Dans ce cas, le gène domestique amplifié et détecté ne constitue pas un témoin suffisant pour les inhibiteurs et il en résulte un risque important de déduction fautive pour le résultat du test. Toutefois, si l'on connaît le risque associé aux gènes domestiques, naturellement présents dans l'échantillon, ceux-ci peuvent être un témoin utile des inhibiteurs pour l'ensemble de l'essai, y compris le prélèvement, le stockage et l'extraction.

#### 2.6. Facteurs inhibiteurs dans la matrice de l'échantillon

Pour les méthodes de détection de l'acide nucléique, les cultures pures, le sang et la plupart des tissus constituent les échantillons de prédilection parce que, généralement, l'extraction et la récupération d'acide nucléique amplifiable réussissent. Les échantillons de fèces, de sperme ou de tissus autolysés peuvent être plus délicats à utiliser, car ils contiennent souvent plus d'inhibiteurs pour les tests de détection de l'acide nucléique. Il est primordial de disposer d'une procédure d'extraction de l'échantillon robuste et répétable (automatisée si nécessaire), appropriée au nombre d'échantillons à manipuler, et d'utiliser des témoins d'inhibition le cas échéant (voir section ci-dessus).

## 2.7. Plage de fonctionnement de l'essai

La plage de fonctionnement de l'essai doit être déterminée en diluant un échantillon fortement positif et en reportant la gamme des résultats obtenus par rapport aux quantités connues d'acide nucléique (concentration, dilution, nombre de copies génomiques, etc.). Cet échantillon de référence doit se trouver

dans la même matrice que l'échantillon à tester ; il n'est donc pas approprié de déterminer la plage de fonctionnement avec un échantillon dilué dans une solution tampon si la matrice usuelle est le sang.

- Pour déterminer la plage de fonctionnement de l'essai, les échantillons ont-ils été dilués dans la matrice à laquelle le test est destiné ?
- La plage de fonctionnement de l'essai correspond-elle aux normes attendues pour ce type d'essai ?

## 2.8. Robustesse

Pour être efficace et fournir des résultats reproductibles lorsqu'il est utilisé dans plusieurs laboratoires, un essai doit tolérer de petits changements de concentration des réactifs et/ou de légères variations des temps ou des températures de traitement lors des différentes étapes de l'essai. Cela peut être déterminé au cours de l'optimisation de l'essai, une fois les étapes essentielles du procédé, les réactifs et l'équipement définis. Les aspects susceptibles de causer une variabilité inacceptable lorsqu'ils ne sont pas respectés doivent être bien décrits dans le protocole de l'essai, de manière à ce que des procédés particulièrement rigoureux soit garantis lors de son exécution. Il s'agit d'un processus laborieux dont la précision et l'exactitude sont parfaitement contrôlées par l'analyse simultanée d'échantillons de contrôle de qualité internes et externes.

## 2.9. Étalonnage de l'essai par rapport aux échantillons de référence

Idéalement, des étalons de référence nationaux ou internationaux doivent être utilisés pour étalonner l'essai. Ceux-ci ne sont cependant pas toujours accessibles et il peut s'avérer nécessaire de produire un étalon de référence interne (voir Chapitre 2.2.6 *Sélection et utilisation des échantillons et panels de référence*). Un ou des étalons de travail, destinés à être inclus dans tous les cycles de l'essai, doivent être produits, répartis en aliquotes et stockés en quantités suffisantes pour être utilisés dans chaque cycle du processus de

validation ainsi qu'en routine, une fois la validation effectuée. Le ou les étalons de travail peuvent prendre la forme de plusieurs aliquotes d'un échantillon donné, susceptibles d'être utilisés dans chaque cycle d'essai. Ils peuvent également consister en un plasmide contenant la séquence faisant l'objet du test, ajouté à la matrice de l'échantillon. L'utilisation de ce dernier permet au concepteur du test de déterminer le nombre de copies génomiques susceptibles d'être détectées par l'essai. Dans certains cas, les résultats de l'échantillon de test sont « normalisés » par rapport à l'étalon ou aux étalons de travail inclus dans chaque cycle de l'essai. Cela permet une comparaison directe des données inter-cycles (Huggett *et al.*, 2005 ; et Norme de validation de l'OMSA).

- Avez-vous étalonné l'essai par rapport à des étalons externes ?
- Si aucun étalon externe n'est accessible, avez-vous produit des étalons internes ?
- Avez-vous produit des étalons de travail en quantités suffisantes pour être utilisés dans toutes les expériences de mise au point et de validation ?

## B. PROCÉDE DE VALIDATION D'UN ESSAI

Une fois que le protocole de l'essai a été mis au point et optimisé, il doit être arrêté et demeurer constant durant son évaluation au fil des étapes du processus de validation ainsi que lors de son utilisation de routine. Des changements mineurs apportés à un essai validé peuvent être évalués au moyen d'études comparatives afin de documenter que l'essai continue à fonctionner de la manière définie initialement (voir Chapitre 2.2.8).

## 1. Étape 1 – Critères de performance analytique

### 1.1. Répétabilité (PCR en temps réel ou PCR qualitative conventionnelle)

La répétabilité de l'essai est un indicateur de la concordance entre les résultats (intra-cycle et inter-cycles) d'une même méthode de test dans un laboratoire. En règle générale, un petit panel de trois échantillons (ou cinq de préférence) couvrant la plage de fonctionnement de l'essai est sélectionné et testé sur l'ensemble du

- La répétabilité intra-cycle et inter-cycles a-t-elle été déterminée ?
- La répétabilité est-elle dans les limites admises du coefficient de variation (CV) ?

procédé (y compris l'extraction d'acide nucléique). La variation intra-cycle sera déterminée en utilisant plusieurs copies (au moins cinq) de chaque échantillon de ce panel dans un seul cycle de l'essai. Les variations inter-cycles seront déterminées en analysant ces échantillons sur plusieurs jours, avec plusieurs opérateurs et pour un minimum de 20 cycles. Le panel de répétabilité doit être analysé en traitant tous les échantillons et chacune de leurs copies exactement comme des échantillons diagnostiques individuels et en les soumettant à chacune des étapes, de la préparation des échantillons jusqu'à l'analyse des données. Par conséquent, chaque copie de chaque échantillon sera soumise à une extraction indépendante. Cela permet de déterminer la répétabilité intra-cycle et inter-cycles de l'essai, simulant les cycles futurs de l'essai une fois mis en œuvre pour une utilisation diagnostique. Une variation minimale en matière de répétabilité est importante, notamment à proximité des seuils qui définissent les plages positives, incertaines et négatives, une variabilité élevée pouvant conduire à des interprétations erronées (voir Chapitre 2.2.4 *Incertitude des mesures*).

La répétabilité peut s'exprimer par un coefficient de variation (voir Chapitre 2.2.5 *Méthodes statistiques de validation*). L'essai doit être conçu de telle sorte que le seuil de décision se situe sur la partie la plus raide de la courbe Ct de la PCR en temps réel. Si c'est le cas, la répétabilité sera optimale au point essentiel de l'essai. (Des CV plus élevés aux extrémités positives et négatives de la plage de fonctionnement de l'essai peuvent survenir, mais ont peu d'incidence sur l'interprétation des résultats de test.)

### 1.2. Spécificité analytique (SpA)

Selon l'objectif prévu de l'essai, sa spécificité analytique est déterminée par la ou les séquences génétiques sélectionnées du ou des organismes ciblés par l'essai. L'essai peut être conçu pour être très sélectif, avec une spécificité analytique pour une seule séquence génétique dont l'absence d'autres organismes ou d'autres souches de l'organisme ciblé est connue. On dira d'un tel essai qu'il montre un caractère exclusif, caractéristique d'un test de confirmation à la SpA élevée.

Sinon, l'essai peut être conçu pour cibler une séquence génétique conservée, commune à plusieurs souches d'une espèce donnée ou à plusieurs espèces d'un genre. Un tel essai aura une SpA montrant un caractère inclusif, ce qui le rendra utile comme test de dépistage. Pour un essai de dépistage inclusif, la spécificité analytique doit être déterminée en analysant toutes les lignées, souches, espèces, etc. que l'essai est censé détecter. L'essai devra ensuite être évalué pour sa capacité à exclure des organismes apparentés, comme les souches non pathogènes qui ne présentent pas d'intérêt pour l'objectif prévu du test candidat.

- Un panel aussi grand que possible d'isolats bien caractérisés de l'agent pathogène cible, comprenant des isolats de différentes zones géographiques et de différents hôtes, a-t-il été testé ?
- Les organismes et agents pathogènes responsables de syndromes cliniques similaires ont-ils été testés ?

Dans l'exemple d'un test de dépistage de l'IA, l'essai doit être évalué par rapport à autant d'isolats bien caractérisés du virus qu'il est possible d'en obtenir afin de s'assurer que toutes les souches de différentes zones géographiques et de différents hôtes soient détectées (pour en démontrer le caractère inclusif). Cela se fait généralement en utilisant des souches/cultures de laboratoire ou de l'acide nucléique extrait. Pour l'IA, différentes lignées du virus existent : asiatique, européenne et nord-américaine. Il est important de réfléchir à la manière dont l'essai sera utilisé et à la zone géographique où il sera déployé. Cela aidera à déterminer s'il est nécessaire d'évaluer toutes les lignées ou seulement certaines d'entre elles. L'importance de cette exigence est bien démontrée avec les tests rapides et

simples de pathotypage des virus ARN récemment mis au point, tests qui ont été appliqués à un large ensemble de virus de l'IA et de la maladie de Newcastle, provenant aussi bien de l'hémisphère est que de l'hémisphère ouest (Leijon *et al.*, 2011 ; Yacoub *et al.*, 2012), en collaboration avec différents Centres collaborateurs de l'OMSA. Le fait que les virus puissent changer rapidement et que les mutations qui en résultent puissent rendre un test diagnostique sous-optimal est un autre facteur important. Un exemple de ce cas de figure est donné par l'apparition en 2009 de la souche pandémique d'influenza A H1N1 et de l'épidémie en 2013 du sous-type H7N9 de faible pathogénicité au sud de la Chine. La sensibilité analytique de la PCR pour le gène M traditionnel était compromise pour cette souche, la séquence sur laquelle reposait la spécificité de l'essai ayant muté. Dans de nombreux pays, de nouvelles amorces ont été introduites et utilisées soit comme un nouveau test, soit, en combinaison avec les amorces pour le gène M traditionnel, sous forme de test combiné.

Le pouvoir discriminant de l'essai doit être contrôlé en testant des organismes apparentés au virus de l'IA. Cela doit inclure des agents pathogènes responsables de syndromes cliniques similaires, par exemple la maladie de Newcastle ou la maladie de Gumboro, ainsi que d'autres organismes susceptibles d'être présents dans l'échantillon cible (pour en démontrer le caractère exclusif).

### 1.3. Sensibilité analytique (SeA)

Il existe deux approches courantes pour évaluer la sensibilité analytique, également appelée limite de détection. La première est d'utiliser une série de dilutions de l'agent pathogène cible (dans le cas présent, le virus de l'IA), diluées dans la matrice de l'échantillon et non tamponnées. La série de dilutions sera généralement testée avec l'essai en cours de validation ainsi qu'avec une méthode normalisée. Pour l'IA, la méthode normalisée peut être l'isolement du virus ou une autre méthode interne normalisée de détection. Cette approche fournit une mesure comparative des deux méthodes (voir Chapitre 2.2.5). La seconde approche consiste à utiliser une construction plasmidique contenant la séquence cible et à l'analyser sous forme d'une série de dilutions dans la matrice de l'échantillon. De cette manière, le nombre de copies détectables du génome selon cette méthode de test peut être estimé.

### 1.4. Comparaison des méthodes de test de référence avec la méthode de test candidate

Parfois, il n'est pas possible d'effectuer un exercice de validation complet, soit parce que les échantillons dont la teneur d'analyte est connue sont rares (p. ex. maladies exotiques), soit parce qu'il s'agit d'une situation d'urgence et que l'essai doit pouvoir être utilisé avant d'être entièrement validé. Une reconnaissance provisoire peut être obtenue à condition que les résultats de l'étape 1 du processus de validation soutiennent la comparaison avec les résultats d'une méthode de test normalisée ou d'une méthode bien établie et, de préférence, publiée. La méthode utilisée en routine dans le laboratoire peut constituer un autre choix de méthode normalisée. Il est important de reconnaître que différentes méthodes permettent d'identifier différentes entités morphologiques et fonctionnelles de l'organisme. Il est donc possible que la comparaison entre une méthode normalisée basée sur une culture et une nouvelle technique de détection de l'acide nucléique donne lieu à des résultats discordants (voir Section B.2, étape 2, ci-dessous, pour la description de la manière de concilier ces divergences). Le choix du panel d'évaluation est également très important et doit être aussi large que possible (voir Chapitre 2.2.6). Si l'on ne dispose que d'un panel restreint pour l'évaluation, il est utile de déterminer si l'essai répond aux attentes en matière de reproductibilité et s'il est donc à même de résister aux rigueurs d'une utilisation dans d'autres laboratoires. Cela nécessite que les deux laboratoires utilisent le même protocole, les mêmes réactifs, le même panel d'échantillons et un équipement similaire (sinon identique).

- Le nouveau test a-t-il fonctionné de manière satisfaisante par rapport à une méthode normalisée de comparaison ?
- Les données préliminaires de reproductibilité sont-elles acceptables ?
- L'essai mérite-t-il que l'on passe aux études pour sa validation complète (étapes 2-4) ?

Si le manque d'échantillons empêche de passer au stade suivant du processus de validation (performance diagnostique de l'essai), il est admissible d'utiliser un essai de détection de l'acide nucléique, provisoirement reconnu après avoir été parfaitement validé selon l'étape 1 du processus de validation (voir la Norme de validation de l'OMSA, Section B.2.6). La reconnaissance de la validation

provisoire est entièrement dépendante de l'approbation par les autorités locales ou d'accords bilatéraux entre pays.

## 1.5. Précision analytique

Les outils analytiques conçus pour fournir des informations destinées à la caractérisation des échantillons détectés avec un test de dépistage ne nécessitent qu'une validation de leurs caractéristiques de performance analytique. Il n'est ainsi pas requis de déterminer la sensibilité diagnostique ou la spécificité diagnostique dans ces cas. Des exemples de ces approches comprennent les essais d'identification par PCR pour déterminer si une souche d'influenza A matrice positive est une souche H5 ou H7 ou les méthodes pour déterminer la résistance aux antibiotiques, qui s'appliquent uniquement aux bactéries cultivées. Certains tests de détection de l'acide nucléique employés pour ce type d'approches incluent les techniques de nanoréseau, méthodes qui comportent leurs propres défis en raison de la grande quantité de données générées pour chaque échantillon testé. Avant de mettre en œuvre ce genre d'essais, il faut réfléchir à la manière dont l'analyse peut être effectuée. Une approche plus simple est de comparer les résultats d'un nouvel outil analytique avec un outil normalisé et d'autoriser son utilisation tant que les résultats de la nouvelle technique soutiennent la comparaison avec ceux de la technique existante (Anjum *et al.*, 2007 ; Batchelor *et al.*, 2008).

## 2. Étape 2 – Caractéristiques de performance diagnostique

### 2.1. Sensibilité diagnostique et spécificité diagnostique

La sensibilité (SeD) et la spécificité (SpD) diagnostiques constituent les principaux indicateurs de performance pour l'utilisation d'un essai diagnostique. Lors de la détermination de ces estimations, il est primordial de sélectionner un nombre suffisant d'échantillons représentatifs de la population pour le test en cours d'évaluation. Il peut être difficile d'obtenir un nombre élevé d'échantillons (en particulier d'échantillons positifs) pour certaines maladies exotiques ou d'échantillons négatifs dans le cas de maladies endémiques. Dans de tels cas, lorsque l'on dispose de peu d'échantillons, la marge d'erreur acceptable pour les estimations de la SeD et de la SpD peut, par nécessité, être relativement large (voir la Norme de validation de l'OMSA, Section B.2, Tableau 1). Si l'échantillonnage est bien conçu et que différentes méthodes de test indépendantes peuvent être utilisées pour analyser les échantillons, il est possible d'obtenir des estimations de la SeD et de la SpD en utilisant les méthodes bayésiennes (modèles de structure latente) (voir Chapitre 2.2.5). Les échantillons de référence négatifs sont souvent sélectionnés à partir d'animaux vivant dans des régions où la maladie est absente, les échantillons positifs étant généralement obtenus à partir d'animaux présentant des signes cliniques confirmés par les analyses de laboratoire. Cela peut conduire à des estimations trop optimistes de la SeD et de la SpD, car les échantillons ne représentent pas l'ensemble du spectre du processus pathologique et omettent, par exemple, les animaux non cliniques susceptibles d'avoir une charge pathogène très différente des animaux connaissant une maladie fulminante ou chronique.

Les échantillons sont souvent catégorisés en utilisant les méthodes de test actuelles, comme l'isolement viral (IV) ou la culture bactérienne. Cela peut toutefois s'avérer problématique lorsqu'il s'agit de valider de nouveaux tests moléculaires, les fondements de ces deux systèmes de tests étant différents. Ainsi, une culture bactérienne dépend de la présence d'un organisme viable, alors que les méthodes de détection de l'acide nucléique permettent la détection de séquences génomiques d'organismes morts ou vivants, pourvu que l'échantillon contienne de l'acide nucléique. Les méthodes d'isolement viral peuvent être particulièrement sensibles aux inhibiteurs et aux contaminants présents dans la matrice de l'échantillon et mener à une sous-estimation des « vrais positifs ». Tout cela peut se traduire par des divergences apparentes, les échantillons étant positifs selon les nouveaux tests moléculaires et négatifs selon les méthodes traditionnelles. Des stratégies diverses pour résoudre ces anomalies comprennent, sans s'y limiter, le séquençage (qui peut démontrer la présence de l'agent pathogène concerné dans un échantillon donné) ou une analyse recourant à une autre approche moléculaire.

- Le **seuil du cycle (Ct)** est la valeur choisie pour différencier les résultats négatifs des résultats positifs sur une échelle continue de valeurs de test.
- **Indéterminée, intermédiaire, suspecte, limite, zone grise ou équivoque** sont des termes utilisés comme synonymes pour désigner la zone où les valeurs du test tombent entre les seuils positifs et négatifs.

Pour calculer les valeurs de SeD et de SpD de l'essai candidat, les résultats de test doivent d'abord être catégorisés (positifs, négatifs ou indéterminés). Cela se fait en insérant un ou deux seuils (limites de décision) sur l'échelle continue des résultats de test. Par exemple, il est approprié, dans certaines circonstances, d'utiliser un seuil pour un essai PCR en temps réel se situant autour d'une valeur de Ct de 35, ce qui signifie que certains échantillons produisant des valeurs Ct plus élevées seront considérés comme négatifs ou douteux. Pour un autre essai PCR, il suffira qu'un échantillon s'approche de la valeur de Ct pour être considéré comme positif. La performance d'un essai donné de PCR en temps réel, les données comparatives de validation, l'utilisation finale des résultats générés ainsi que toute information vétérinaire pertinente doivent être prises en compte lorsqu'il s'agit de déterminer un seuil.

### **3. Étape 3 – Reproductibilité et estimation élargie de la répétabilité**

La reproductibilité est l'indicateur de la concordance entre les résultats obtenus dans différents laboratoires utilisant le même protocole, un équipement similaire (ou identique de préférence) et le même panel d'échantillons. Ce panel se compose idéalement de 20-30 échantillons, dont quelques-uns peuvent être présents en quatre exemplaires. Le panel doit réunir des échantillons couvrant la plage dynamique du test, dont plusieurs ont une activité proche de l'une ou l'autre des valeurs seuils du test. Le panel utilisé pour déterminer la répétabilité pourra être utilisé pour cette évaluation, mais avec un nombre de copies plus important. Les mesures de la précision peuvent être estimées tant pour les données de répétabilité que pour celles de reproductibilité (voir Chapitre 2.2.4 pour de plus amples explications à ce sujet et sur la manière de l'appliquer). Le Chapitre 2.2.6 fournit plus d'informations sur la sélection et l'utilisation des panels de référence.

### **4. Étape 4 – Mise en œuvre des programmes**

#### **4.1. Interprétation des résultats de test**

Les bonnes pratiques pour la mise en œuvre des programmes sont communes à tous les types d'essais (voir la Norme de validation de l'OMSA). L'un des avantages inhérent aux tests de détection de l'acide nucléique est la possibilité de suivi par séquençage génomique qu'ils offrent pour démasquer des résultats apparemment faux positifs. Les essais qui incluent la PCR sont souvent validés en utilisant le même nombre d'échantillons positifs et négatifs. Toutefois, dans les programmes de surveillance, les résultats d'essai sont souvent utilisés pour démontrer l'absence de la maladie concernée dans les endroits où la prévalence de la maladie est très basse, voire proche de zéro. Dans ces circonstances, des résultats faux positifs peuvent constituer un problème important, même si la spécificité diagnostique de l'essai concerné est élevée. Si la SpD d'un essai est de 99,5 % et que la prévalence est proche de zéro, cela signifie que l'un des 200 résultats positifs du test est faux. Si de grands nombres d'échantillons provenant d'une population où la prévalence est de zéro ou très basse sont analysés, ces résultats faux positifs peuvent être beaucoup plus nombreux que les résultats vrais positifs (voir la Norme de validation de l'OMSA, Section B.4.2, pour de plus amples explications sur les valeurs prédictives des résultats de test en fonction de la prévalence de la maladie). Pour les essais de détection de l'acide nucléique utilisés dans ces circonstances, il serait de bon aloi de confirmer les résultats positifs à la PCR par un séquençage.

### **5. Suivi de la performance de l'essai après validation initiale**

#### **5.1. Suivi de l'essai**

Le suivi de la répétabilité en reportant les valeurs Ct obtenues pour les étalons de travail apporte l'assurance que l'essai fonctionne comme prévu. De manière similaire, la participation à des programmes d'essais d'aptitude proposés par des fournisseurs externes d'échantillons pour l'assurance qualité apporte la preuve de la reproductibilité continue et permet aussi la comparaison de la précision du test si un ou plusieurs étalons de référence sont inclus dans chaque cycle pour une « normalisation » des données. La répétition de l'analyse d'une partie (en général une proportion de 1 à 5 % selon le débit) des échantillons retenus est également employée par certains laboratoires pour démontrer que l'essai fonctionne de manière constante d'un cycle à l'autre.

Il peut enfin être nécessaire de modifier l'essai parce que l'analyte a changé, par exemple dans le cas où l'essai pour l'influenza aviaire devrait être utilisé dans une autre partie du monde ou dans celui où de

nouvelles souches ou de nouvelles lignées d'un virus seraient apparues (voir Section B.1.2 ci-dessus à propos de l'évolution des nouvelles lignées pandémiques de H1N1). Les virus ARN évoluent rapidement et des mutations ponctuelles peuvent survenir ; il est donc souhaitable de confirmer régulièrement les séquences de nucléotides des sites de l'amorce et de la sonde afin de s'assurer qu'elles restent appropriées.

## 5.2. Modifications mineures d'un essai validé

### 5.2.1. Modifications techniques

Avec le temps, des modifications sont susceptibles d'être requises pour tout essai. Par exemple, l'utilisation d'équipements différents, de protocoles d'extraction différents ou l'automatisation de certaines étapes nécessiteront au minimum une comparaison de l'essai tel qu'il a été validé à l'origine avec sa version modifiée (voir Chapitre 2.2.8). Si les résultats de la version modifiée tombent en dehors de la plage de fonctionnement ou de la performance attendue de l'essai original, une revalidation peut s'avérer nécessaire.

### 5.2.2. Remplacement des réactifs épuisés

Il est important d'attribuer des numéros d'identification uniques à tous les lots de réactifs et d'enregistrer les composants utilisés pour un essai donné. Les sondes, les amorces et les enzymes sont les composants les plus importants des tests PCR. Les nouveaux lots de réactifs importants doivent être testés parallèlement aux lots en cours d'utilisation avant d'être introduits. Pour d'autres réactifs comme les tampons ou les nucléotides, il est en revanche suffisant de contrôler les lots pour résoudre d'éventuels problèmes, le cas échéant.

## 5.3. Modifications majeures de l'essai nécessitant revalidation

Il peut arriver que l'utilisation d'un essai nécessite d'être étendue au-delà de la portée initialement prévue. L'inclusion d'autres espèces hôtes ou d'une population d'animaux provenant d'une autre zone géographique en sont de bons exemples. Dans de tels cas, en raison des nouvelles considérations biologiques et de la multitude de variables associées, il est important de revalider l'essai. Les détails précis dépendront de l'ampleur des changements. Déplacer l'essai dans une nouvelle zone géographique peut signifier que les caractéristiques analytiques de l'essai restent valides mais que les critères diagnostiques nécessitent d'être redéfinis. De manière analogue, des modifications peuvent être apportées aux séquences des amorces ou des sondes PCR pour permettre la détection de nouvelles souches. Il sera alors nécessaire de démontrer comment ces nouveaux réactifs se comportent pour ce qui est de la précision analytique et diagnostique par comparaison avec la version antérieure de l'essai.

## RÉFÉRENCES

- ANJUM M.F., MAFURA M., SLICKERS P., BALLMER K., KUHNERT P., WOODWARD M.J. & EHRIGHT R. (2007). Pathotyping of *Escherichia coli* by using miniaturized DNA microarrays. *App. Environ. Microbiol.*, **73**, 5692–5697.
- BALLAGI-PORDANY A. & BELAK S. (1996). The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol. Cell. Probes*, **10**, 159–164.
- BATCHELOR M., HOPKINS K.L., LIEBANA E., SLICKERS P., EHRIGHT R., MAFURA M., AERESTRUP F., MEVIUS D., CLIFTON-HADLEY F.A., WOODWARD M.J., DAVIES R.H., THRELFALL E.J. & ANJUM M.F. (2008). Development of a miniaturised microarray based assay for the rapid identification of antimicrobial resistance genes in Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **31**, 440–451.
- BURKHARDT H.J. (2000). Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **38**, 87–91.
- HUGGETT J., DHEDA A.K., BUSTIN S. & ZUMLA A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.*, **6**, 279–284 (Review).

JUNGKIND D. (2001). Automation of laboratory testing for infectious diseases using the polymerase chain reaction – our past, our present, our future. *J. Clin. Virol.*, **20**, 1–6.

LAUERMAN L.H. (2004). Advances in PCR technology. *Anim. Health Res. Rev.*, **5**, 247–248 (Review).

LEIJON M., ULLMAN K., THYSELIUS S., ZOHARI S., PEDERSEN J.C., HANNA A., MAHMOOD S., BANKS J., SLOMKA M.J. & BELAK S. (2011). Rapid PCR-based molecular pathotyping of H5 and H7 avian influenza viruses. *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 3860–3873.

LIU L., HOFFMANN B., BAULE C., BEER M., BELÁK S. & WIDEN F. (2009). Two real-time RT-PCR assays of classical swine fever virus, developed for the genetic differentiation of naturally infected from vaccinated wild boars. *J. Virol. Methods*, **159**, 131–133.

PRICKETT J., CHRISTOPHER-HENNINGS J., YOON K.-J., EVANS R.B. & ZIMMERMAN J.J. (2008). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **20**, 156–163.

SAWYER J., WAKELEY P., WEST D., FEARNLEY C., ANDERSON S., FLOWERS M., WEBSTER K., ERINGTON J. & WILLIAMS R. (2006). Practical experiences of moving molecular diagnostics into routine use at the Veterinary Laboratories Agency. *Dev. Biol. (Basel)* **126**, 89–97.

SUBCOMMITTEE OF ANIMAL HEALTH LABORATORY STANDARDS (SCAHLs) (2008). Veterinary Laboratory Guidelines for nucleic acid detection techniques ([http://www.scahls.org.au/procedures/other\\_procedures](http://www.scahls.org.au/procedures/other_procedures))

VILJOEN G.J., NELL H. & CROWTHER J.R. (2005). Molecular Diagnostic PCR Handbook. IAEA-FAO, Springer, Dordrecht, The Netherlands.

WAKELEY P.R., ERRINGTON J., HANNONS S., ROESTH I., CARSON T., HUNT B., SAWYER J. & HEATH P. (2006). Development of a real time PCR for the detection of *Taylorella equigenitalis* directly from genital swabs and discrimination from *Taylorella asinigenitalis*. *Vet. Microbiol.*, **118**, 247–254.

WAKELEY P.R., JOHNSON N., McELHINNEY L.M., MARSTON D., SAWYER J. & FOOKS A.R. (2005). Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 2786–2792.

YACOUB A., LEIJON M., McMENAMY M.J., ULLMAN K., MCKILLEN J., ALLAN G. & BELAK S. (2012). Development of a novel real-time PCR-based strategy for simple and rapid molecular pathotyping of Newcastle disease virus. *Arch. Virol.*, **157**, 833–844.

## LECTURES COMPLEMENTAIRES

BELAK S., THOREN P., LEBLANC N. & VILJOEN G. (2009). Advances in viral disease diagnostic and molecular epidemiological techniques. *Exp. Rev. Molec. Diagn.*, **9**, 367–381.

\*  
\* \*

**N. B. :** ADOPTE POUR LA PREMIERE FOIS EN 2014