



Méthodes

Validation de kits commerciaux de RT-PCR en temps réel pour la détection des virus Influenza A chez le porc et la différenciation du virus pandémique (H1N1) 2009 dans cette espèce

F. Pol, S. Gorin, S. Quéguiner, C. Deblanc, G. Simon. Anses, Laboratoire de Ploufragan - Plouzané, LNR Virus Influenza Porcins, Ploufragan, France

F. Pol, S. Gorin, S. Quéguiner, C. Deblanc, G. Simon (2010). Validation de kits commerciaux de RT-PCR en temps réel pour la détection des virus Influenza A chez le porc et la différenciation du virus pandémique (H1N1) 2009 dans cette espèce, EuroReference, No. 4, ER04-10M01. <http://www.anses.fr/euroreference/numero4/PN7001.htm>



Le porc étant très susceptible au virus Influenza pandémique (H1N1) 2009, on peut craindre une adaptation de cet agent infectieux à l'espèce. Le porc constituerait alors un réservoir et un hôte chez lequel ce virus pourrait subir des réassortiments avec d'autres virus Influenza A. Dans le cadre d'un renforcement de la surveillance des virus grippaux chez le porc, le Laboratoire national de référence (LNR) pour les virus Influenza porcins a proposé le développement de nouveaux outils (i) pour la détection des virus Influenza A chez le porc, (ii) pour la distinction du virus pandémique dans cette espèce. Cinq kits commerciaux de RT-PCR en temps réel ont été validés et recommandés aux laboratoires vétérinaires d'analyses.

La grippe du porc est une maladie respiratoire contagieuse devenue enzootique dans les zones de forte production. Elle peut entraîner des pertes économiques importantes, notamment lorsque les infections à virus Influenza porcine (ou SIV pour *swine influenza virus*) surviennent en association avec d'autres pathogènes à tropisme respiratoire (Olsen *et al.*, 2006). Les SIV sont des agents zoonotiques, même si la transmission à l'Homme est généralement bénigne (Myers *et al.*, 2007). Ce sont des virus Influenza de type A, famille des Orthomyxoviridae, transmis au porc depuis les espèces aviaire et humaine. Des sous-types viraux sont définis en fonction de la nature des principaux déterminants antigéniques, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). Trois sous-types (H1N1, H3N2, H1N2) circulent simultanément chez le porc et de nombreux lignages se différencient au sein de chaque sous-type, variant en fonction des continents (Kuntz-Simon & Madec, 2009). Les SIV sont en effet soumis à des modifications génomiques et antigéniques, notamment par le biais de réassortiments rendus possibles en raison de la nature segmentée du génome viral à ARN simple brin. Bien que n'ayant jamais été identifié chez le porc avant d'être détecté chez l'Homme, le virus H1N1 responsable de la pandémie de 2009 (pH1N1/09) est un virus multi-réassortant présentant une constellation inédite de gènes issus de plusieurs SIV (Smith *et al.*, 2009). Depuis son émergence, de nombreux élevages ont été infectés partout dans le monde et des inoculations expérimentales ont confirmé la grande susceptibilité de l'espèce porcine (Brookes *et al.*, 2009; Brookes *et al.*, 2010). On peut donc craindre que le pH1N1/09 ne s'y adapte, comme ce fut le cas des virus pandémiques de 1918 et 1968. Le porc servirait alors de réservoir et constituerait un hôte chez lequel le pH1N1/09 pourrait subir des réassortiments avec les SIV enzootiques, voire d'autres virus Influenza d'origines humaine ou aviaire. De tels réassortiments pourraient conduire à l'émergence de souches de virulence et/ou de potentiel de transmission inter-espèces accrus. Il apparaît donc important

de renforcer la surveillance des virus en circulation chez le porc, tant d'un point de vue de la santé animale que de la santé publique.

Afin de pouvoir répondre aux objectifs de surveillance des SIV, le LNR pour les virus Influenza porcins a proposé le développement de nouveaux outils de diagnostic moléculaire rapide (i) pour la détection des virus Influenza de type A (y compris le pH1N1/09) chez le porc, (ii) pour la distinction, parmi les SIV enzootiques européens, du pH1N1/09 dans cette espèce. Des fabricants de kits commerciaux ont été sollicités pour la mise au point de trousse de RT-PCR en temps réel prêtes à l'emploi permettant de répondre à ces deux objectifs. Il était demandé que les méthodes incluent des contrôles internes positifs (IPC), c'est-à-dire des contrôles permettant l'amplification de cibles cellulaires appropriées pour la validation des étapes d'extraction des ARN viraux à partir d'échantillons biologiques de porc.

Deux producteurs, LSI (Laboratoire Service International, F-Lissieu) et Adia-gène (F-Saint-Brieuc) ont soumis cinq kits à la validation du LNR (Tableau 1). Deux kits permettent l'amplification d'une région conservée du gène codant la protéine de matrice (gène M) des virus Influenza de type A. Deux kits permettent l'amplification d'une séquence spécifique du gène HA (H1) du virus pH1N1/09. Enfin, un kit est dédié à la détection d'une région spécifique du gène NA (N1) du virus pH1N1/09. Tous les kits proposent la mise en œuvre d'une double RT-PCR en une seule étape. Les mélanges réactionnels prêts à l'emploi contiennent notamment les amorces et les sondes TaqMan® spécifiques du gène viral et du gène cellulaire endogène ciblés (IPC). Les kits de LSI ciblent le gène de la bêta-actine dans une région conservée chez de nombreuses espèces animales, tandis que les kits d'Adia-gène ciblent le gène de la GAPDH porcine. Chaque kit propose en outre un contrôle positif externe (EPC) à extraire (kits LSI) ou déjà extrait (kits Adia-gène).



Méthodes

Tableau 1. Kits de RT-PCR en temps réel validés pour des détections dans des échantillons biologiques de porc

Gène viral ciblé	Fabricant	Kit (nom et référence)
M des virus Influenza A	LSI	TaqVet™ Swine Influenza A, A/H1N1/2009 included INFAP-Swine
	Adiagène	ADIAVET® SIV REALTIME ADI282
H1 du pH1N1/09	LSI	TaqVet™ Swine Influenza A/H1N1 2009 – H1 detection SIH1-2009
	Adiagène	ADIAVET® A/H1N1(2009) ADI441
N1 du pH1N1/09	LSI	TaqVet™ Swine Influenza A/H1N1 2009 – N1 detection SIN1-2009

Le processus de validation des kits a été mené selon les principes du protocole recommandé par l'OIE (OIE, 2008), incluant un essai inter-laboratoire. Les analyses mises en œuvre au LNR ont été réalisées conformément aux notices fournies par les fabricants. Ne sont pas présentés les résultats non concluants obtenus avec certains prototypes n'ayant pas répondu aux critères de spécificité.

Un premier panel constitué de 14 souches virales, multipliées en cultures de cellules MDCK ou sur œufs de poule embryonnés, a été confectionné à partir de la souchothèque du LNR pour évaluer la spécificité des RT-PCR dédiées à l'amplification des gènes viraux (Tableau 2). Ce panel comporte des souches représentatives des différents lignages de SIV européens, dont le lignage « avian-like swine H1N1 » qui a fourni ses gènes

N1 et M au virus pandémique (Kuntz-Simon & Madec, 2009; Kyriakis *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009). Le panel comprend également une souche du lignage « classical swine H1N1 », lequel a fourni son gène HA au virus pandémique, une souche pH1N1/09 de référence (A/California/04/09) et une ancienne souche humaine également d'origine porcine. Les deux kits gène M détectent toutes les souches de virus Influenza A, y compris le virus pH1N1/09, et les kits « gène H1 » et « gène N1 » ne détectent que le virus pH1N1. Les fabricants ont par ailleurs vérifié l'absence d'amplification des virus Influenza B et d'autres espèces virales responsables de maladies respiratoires chez le porc (données non présentées).

Un deuxième panel a été élaboré afin de vérifier la fonctionnalité des kits sur des matrices biologiques porcines, notamment en terme de performance des IPC. Il a également permis de vérifier la spécificité des kits. Il est constitué de 30 échantillons biologiques prélevés sur des porcs EOPS sains ou inoculés expérimentalement par du SIV (H1N1 ou H1N2 européens) et/ou *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) (Tableau 3). Tous les échantillons prélevés sur des porcs infectés par du SIV ont été trouvés positifs suite à analyse en RT-PCR gène M, et négatifs en RT-PCR H1 et N1 (données non présentées). Les échantillons prélevés sur les animaux témoins et les animaux infectés par Mhp sont trouvés négatifs avec les 5 kits. Tous les échantillons du panel sont trouvés positifs en IPC avec les 5 kits.

La sensibilité analytique des méthodes a d'abord été estimée à partir des résultats de trois répétitions d'analyses menées sur une série de dilutions d'un pas de raison 10 d'un extrait d'ARN de la souche A/California/4/09 (Tableau 4). L'extrait initial, comprenant 29 à 36 ng d'ARN/μl, a été dilué dans du milieu essentiel minimum (MEM). Pour tous les kits, la limite de détection est située entre les dilutions 10⁻⁷ et 10⁻⁸. La linéarité

Tableau 2. Évaluation de la spécificité des kits de RT-PCR en temps réel sur un panel d'ARN extraits de souches virales (valeurs des Ct ; N/A : absence de Ct ; ADIA : Adiagène)

Souches virales			Gène M Infl. A		Gène H1 pH1N1/09		Gène N1 pH1N1/09
Sous-type	Lignage	Nom	LSI	ADIA	LSI	ADIA	LSI
SIV H1N1 européen	Avian-like swine H1N1	A/Sw/Finistere/2899/82	14,7	13,5	N/A	N/A	N/A
		A/Sw/Morbihan/0070/05	14,6	12,8	N/A	N/A	N/A
		A/Sw/Cotes d'Armor/0231/06	14,2	14,9	N/A	N/A	N/A
	Reassortant swine H1N1	A/Sw/Cotes d'Armor/0190/06	14,6	13,5	N/A	N/A	N/A
		A/Sw/Cotes d'Armor/0046/08	15,9	15,6	N/A	N/A	N/A
SIV H1N2 européen	Human-like reassortant swine H1N2	A/Sw/Scotland/410440/94	14,0	13,9	N/A	N/A	N/A
		A/Sw/Cotes d'Armor/0113/06	14,4	13,9	N/A	N/A	N/A
		A/Sw/Cotes d'Armor/0214/06	14,6	14,9	N/A	N/A	N/A
	Reassortant swine H1N2	A/Sw/Cotes d'Armor/0102/08	14,7	14,6	N/A	N/A	N/A
SIV H3N2 européen	Human-like reassortant swine H3N2	A/Sw/Flandres/1/98	14,0	12,1	N/A	N/A	N/A
		A/Sw/Gent/1/84	14,9	11,8	N/A	N/A	N/A
SIV H1N1 américain	Classical swine H1N1	A/Sw/England/117316/86	15,2	12,9	N/A	N/A	N/A
H1N1 humain d'origine porcine	Swine-like human H1N1	A/New Jersey/76	13,9	10,4	N/A	N/A	N/A
		A/California/04/2009	13,0	12,1	16,1	13,0	15,0



Méthodes

Tableau 3. Évaluation des performances des kits sur un panel d'échantillons prélevés sur des porcs EOPS sains ou bien infectés par des SIV européens et/ou *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) (valeurs des Ct; N/A: absence de Ct). SIV H1N1: A/sw/Cotes d'Armor/0231/06 (avian-like swine H1N1); SIV H1N2: A/sw/Cotes d'Armor/0113/06 (human-like reassortant swine H1N2); Mhp: Souche 116. JPI: Jours post-inoculation. NI: Numéro d'identification.

Échantillons biologiques			LSI		Adiagene		
Prélèvement	Pathogène inoculé	NI	Gène M (FAM)	IPC (VIC)	Gène M (FAM)	IPC (VIC)	
Surnageant d'écouvillon nasal	SIV H1N2 (4 JPI)	320-6	25,9	24,1	24,3	26,7	
		320-7	23,5	23,6	22,1	25,7	
		320-8	26,6	24,7	25,4	27,2	
		320-9	24,5	25,2	23,1	26,6	
		320-10	23,3	24,9	21,9	26,6	
	Sans	196-1	N/A	24,9	N/A	27,8	
		196-2	N/A	25,2	N/A	27,8	
		196-3	N/A	22,2	N/A	27,0	
		196-4	N/A	25,9	N/A	28,4	
		196-5	N/A	25,4	N/A	27,4	
	SIV H1N1 (4 JPI)	196-6	23,0	24,6	21,7	26,8	
		196-7	31,0	25,8	29,6	27,2	
		196-8	28,6	26,6	27,5	29,0	
		196-9	25,0	25,0	24,0	27,1	
		196-10	25,6	25,0	23,9	27,4	
	Poumon	Mhp (28 JPI)	217-9	N/A	16,0	N/A	26,1
		Sans	219-8	N/A	16,3	N/A	26,4
			219-9	N/A	15,9	N/A	24,6
			220-8	N/A	16,1	N/A	26,2
220-9			N/A	15,7	N/A	25,4	
Mhp (28 JPI) + SIV H1N1 (7 JPI)		207-8	29,2	17,4	30,1	24,2	
		207-9	32,7	16,6	34,1	22,9	
		208-8	30,7	15,9	32,6	24,8	
		208-9	32,0	15,2	33,0	25,0	
SIV H1N2 (7 JPI)		210-8	27,3	15,3	31,6	25,0	
		326-6	27,5	16,2	29,7	25,3	
		327-4	28,5	15,2	29,6	24,2	
		327-5	29,7	16,2	34,9	24,0	
		327-6	NT	NT	29,9	25,2	
	328-4	NT	NT	33,6	25,8		



Méthodes

est observée entre les dilutions 10^{-1} et 10^{-7} . Entre ces limites, les pentes varient de $-3,42$ à $-3,24$, les coefficients de régression linéaire (R^2) se situent entre 0,9990 et 0,9984 et les efficacités sont comprises entre 95,9 % et 103,5 %. Le coefficient de variation (CV), i.e. le rapport entre l'écart type et la moyenne des Ct multiplié par 100, a été calculé pour les dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-8} . Les CV les plus élevés obtenus pour chacun des kits ont été de 3,0 % pour le kit gène M LSI, 6,2 % pour le kit gène M Adiagène, 5,3 % pour le kit gène H1 LSI, 3,2 % pour le kit H1 Adiagène et 3,3 % pour le kit N1 LSI. À la dilution intermédiaire 10^{-5} , les Ct sont compris entre 25,7 et 30,1 et les CV varient de 1,2 % à 4,5 %.

Dans un deuxième temps, la sensibilité analytique a été évaluée à partir des résultats de trois répétitions d'analyses menées sur des prélèvements biologiques de porcs EOPS chargés en souche pH1N1/09. Brièvement, le stock viral initial a été inactivé par traitement à la β -propiolactone, puis dilué de 10 en 10 dans du MEM (10^{-1} à 10^{-8}). Chacune des dilutions de souche a ensuite été diluée au $1/10^e$, soit dans du surnageant d'écouvillon nasal, soit dans un broyat de poumon, fournissant ainsi des séries de dilutions de pH1N1/09 en matrice biologique (10^{-2} à 10^{-9}). Dans le surnageant d'écouvillon nasal, la limite de détection s'est révélée être la dilution 10^{-5} . À la dilution inférieure, considérée comme le niveau exigé de détection (NED), le CV varie entre 1,1 % à 4,4 % suivant les kits. Ces analyses ont permis d'éprouver la détection du pH1N1/09 en matrices biologiques et de confirmer la validité de l'IPC. Celui-ci a toujours été trouvé positif, pour chacun des kits. Le CV le plus élevé pour les répétitions d'échantillons est 5,3 %.

La reproductibilité inter-laboratoires a été évaluée à l'occasion d'un essai inter-laboratoires d'aptitude auquel ont participé 12 laboratoires d'analyses vétérinaires candidats à l'agrément pour la détection des virus Influenza A chez le porc, les deux fabricants de kits et le LNR. Un troisième panel de 25 échantillons a été constitué à cette occasion, composé de surnageants d'écouvillons nasaux et de broyats de poumons de porcs EOPS chargés ou non de souches virales inactivées (Tableau 5). Les résultats qualitatifs obtenus par chacun des participants ont été conformes à ceux attendus. Les moyennes des Ct obtenus pour le NED avec les différents kits varient entre 30,6 et 33,1 et les CV varient de 1,9 % à 3,9 %.

L'ensemble de ces résultats a permis au LNR d'estimer que les cinq kits proposés répondent favorablement aux critères exigés. Ces validations sont les premières du genre concernant des kits commerciaux pour la détection des virus Influenza A chez le porc d'une part, et la détection spécifique du virus pH1N1/09 dans cette espèce d'autre part. Prêts à l'emploi, simples à utiliser et permettant d'obtenir rapidement un résultat d'analyse, ces kits constituent un nouvel outil de diagnostic pouvant être facilement mis en œuvre en laboratoire d'analyses vétérinaires et se révélant fort utile pour le renforcement de l'épidémiologie de la grippe chez le porc.

Remerciements

Le LNR Virus Influenza Porcins remercie les fabricants de kits pour leur collaboration. Ces travaux ont bénéficié du soutien financier de la Direction générale de l'alimentation.

Références bibliographiques

- Brookes S M, Irvine R M, Nunez A, Clifford D, Essen S, Brown I H, Van Reeth K, Kuntz-Simon G, Loeffen W, Foni E, Larsen L, Matrosovich M, Bublot M, Maldonado J, Beer M, Cattoli G. 2009. Influenza A (H1N1) infection in pigs. *Veterinary Record* 164: 760-761.
- Brookes S M, Nunez A, Choudhury B, Matrosovich M, Essen S C, Clifford D, Slomka M J, Kuntz-Simon G, Garçon F, Nash B, Hanna A, Heegaard P M, Queguiner S, Chiapponi C, Bublot M, Garcia J M, Gardner R, Foni E, Loeffen W, Larsen L, Van Reeth K, Banks J, Irvine R M, Brown I H. 2010. Replication, pathogenesis and transmission of pandemic (H1N1) 2009 virus in non-immune pigs. *PLoS One* 5: e9068.
- Kuntz-Simon G, Madec F. 2009. Genetic and Antigenic Evolution of Swine Influenza Viruses in Europe and Evaluation of Their Zoonotic Potential. *Zoonoses and Public Health* 56: 310-325.
- Kyriakis C S, Brown I H, Foni E, Kuntz-Simon G, Maldonado J, Madec F, Essen S C, Chiapponi C, Van Reeth K. 2010. Virological Surveillance and Preliminary Antigenic Characterization of Influenza Viruses in Pigs in Five European Countries from 2006 to 2008. *Zoonoses and Public Health*, In press.
- Myers K P, Olsen C W, Gray G C. 2007. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clinical Infectious Diseases* 44: 1084-1088.
- OIE. 2008. *Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 1.1.5:50-60.
- Olsen C W, Brown I H, Easterday B C, van Reeth K. 2006. Swine influenza. In: *Disease of swine*. Edited by Z. J. Straw BE, d'Allaire S, Taylor DJ. Oxford: Blackwell Publishing: 469-482.
- Smith G. J., Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett S J, Worobey M, Pybus O G, Ma S K, Cheung C L, Raghwani J, Bhatt S, Peiris J S, Guan Y, Rambaut A. 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459: 1122-1125.



Méthodes

Tableau 4. Évaluation des performances des kits sur une série de dilutions d'ARN de A/California/04/09 (pH1N1/09) dans du MEM et sur des séries de dilutions de la souche virale dans des matrices biologiques de porc EOPS (Ct: moyenne de Ct, σ : écart type, CV: coefficient de variation).

Échantillons	Critère	Gène M Infl. A		Gène H1 pH1N1		Gène N1 pH1N1
		LSI	Adiagène	LSI	Adiagène	LSI
ARN de pH1N1/09 dans du MEM	Domaine de linéarité	10^{-1} à 10^{-8}	10^{-1} à 10^{-7}	10^{-1} à 10^{-7}	10^{-1} à 10^{-7}	10^{-1} à 10^{-7}
	Pente	- 3,36	- 3,42	- 3,27	- 3,38	- 3,24
	Coefficient de régression linéaire	0,9995	0,9999	0,9990	0,9994	0,9984
	Efficacité	98,5 %	95,9 %	101,8 %	97,60 %	103,5 %
	Ct/ σ /CV à la dilution 10^{-5} (n=3)	25,7/0,3/1,2	29,2/1,3/4,5	30,1/0,8/2,7	27,7/0,7/2,4	29,9/1,0/3,3
Souche pH1N1/09 dans du surnageant d'écouvillon nasal	Ct/ σ /CV à la dilution 10^{-4} (n=3)	30,6/0,4/1,4	34,8/1,5/4,4	31,8/0,6/1,8	36,0/1,3/3,7	31,6/0,4/1,1
	Ct/ σ /CV de l'IPC (n=10)	22,5/0,2/1,0	27,7/0,2/0,7	22,6/0,2/1,0	27,8/0,2/0,8	23,9/0,2/0,9
Souche pH1N1/09 dans du broyat de poumon	Ct/ σ /CV de l'IPC (n=10)	17,2/0,3/1,8	25,5/0,8/3,5	16,9/0,4/2,2	26,8/1,4/5,3	18,3/0,3/1,8

Tableau 5. Panel de l'essai inter-laboratoires et résultats qualitatifs attendus (P: positif; N: négatif). Les souches virales sont inactivées et diluées dans du surnageant d'écouvillon nasal de porc EOPS.

N°	Échantillon Nature	Résultat attendu		
		Gène M Influenza A	Gène H1 pH1N1/09	Gène N1 pH1N1/09
1	Surnageant d'écouvillon nasal, porc EOPS N° 1	N	N	N
2	Surnageant d'écouvillon nasal, porc EOPS N° 2	N	N	N
3	Surnageant d'écouvillon nasal, porc EOPS N° 3	N	N	N
4	Surnageant d'écouvillon nasal, porc EOPS N° 4	N	N	N
5	Surnageant d'écouvillon nasal, porc EOPS N° 5	N	N	N
7	Surnageant de culture de cellules MDCK	N	N	N
8	Surnageant d'écouvillon nasal, pool négatif	N	N	N
9	Liquide allantoïdien d'œufs embryonnés non infectés	N	N	N
10	A/Sw/Scotland/410440/94 (H1N2) dilution 10^{-3}	P	N	N
11	A/Sw/Morbihan/0070/05 (H1N1) dilution 10^{-3}	P	N	N
12	A/Sw/Flandres/1/98 (H3N2) dilution 10^{-3}	P	N	N
13	A/California/04/09 (pH1N1) dilution 10^{-2}	P	P	P
14	A/California/04/09 (pH1N1) dilution 10^{-3}	P	P	P
15, 26-28	A/California/04/09 (pH1N1) dilution 10^{-4}	P	P	P
16-20	A/California/04/09 (pH1N1) dilution 10^{-5}	P/N	P/N	P/N
21	A/California/04/09 (pH1N1) dilution 10^{-6}	P/N	P/N	P/N
22	A/California/04/09 (pH1N1) dilution 10^{-7}	N	N	N
23	A/California/04/09 (pH1N1) dilution 10^{-8}	N	N	N
24-25	Leurres (échantillons 1 à 23 distribués de façon aléatoire)	P ou N		