Ordre de méthode

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
ET DE
L'ALIMENTATION

Direction générale de l'alimentation **Service de l'alimentation** **Sous-direction de la politique de l'alimentation** **Bureau de l'évaluation scientifique, de la recherche et des laboratoires** **251 rue de Vaugirard** **75 732 PARIS CEDEX 15** **0149554955**	**Instruction technique** **DGAL/SDPAL/2018-573** **26/07/2018**

Date de mise en application : Immédiate
Diffusion : Tout public

Cette instruction n'abroge aucune instruction.
Cette instruction ne modifie aucune instruction.
Nombre d'annexes : 1

Objet : Modalités de dépistage de la peste porcine africaine (PPA) par les méthodes sérologique (ELISA) et virologique (PCR), dans le cadre des analyses officielles.

Destinataires d'exécution
Laboratoires agréés pour le dépistage de la peste porcine classique (PPC) et de la peste porcine africaine (PPA) par méthodes sérologique (ELISA) et virologique (RT-PCR) ADILVA AFLABV LNR : ANSES - Laboratoire de Ploufragan/Plouzané DDPP/DD(CS)PP

Résumé : La présente note précise les dispositions applicables au réseau de laboratoires agréés pour la réalisation des analyses officielles pour le dépistage de la peste porcine africaine (PPA) par méthodes sérologique (ELISA) et virologique (PCR).

Textes de référence :- Directive communautaire : 2001/89/CE du Conseil du 23 octobre 2001 relative à des mesures communautaires de lutte contre la peste porcine classique.
- Directive communautaire : 2002/60/CE du Conseil du 27 Juin 2002 établissant des dispositions spécifiques pour la lutte contre la peste porcine africaine et modifiant la directive 92/119/CEE, en

ce qui concerne la maladie de Teschen et la peste porcine africaine.
- Décision de la Commission n° 2002/106/CE du 1er février 2002 portant approbation d'un manuel diagnostique établissant des procédures de diagnostic, des méthodes d'échantillonnage et des critères pour l'évaluation des tests de laboratoire de confirmation de la peste porcine classique.
- Décision de la Commission n° 2003/422/CE du 26 mai 2003 portant approbation du manuel de diagnostic de la peste porcine africaine.
- Règlement (CE) n° 882/2004 du 29 avril 2004 du Parlement européen et du Conseil relatif aux contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires et avec les dispositions relatives à la santé animale et au bien-être des animaux.
- Articles L. 202-1, R.200-1 et R. 202-8 à R. 202-21 du code rural et de la pêche maritime.
- Arrêté du 23 juin 2003 fixant les mesures de lutte contre la peste porcine classique.
- Arrêté du 11 septembre 2003 fixant les mesures de lutte contre la peste porcine africaine.
- Arrêté du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux.
- Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales.

MOTS-CLES : maladies du porc –peste porcine africaine– laboratoire - agrément

I - Base réglementaire du contrôle officiel

Au sens de l'article R. 200-1 du code rural et de la pêche maritime (CRPM), une analyse officielle est définie comme *« toute analyse [effectuée] par un laboratoire, d'un échantillon prélevé dans le cadre d'un contrôle officiel ».*

Le terme contrôle officiel s'applique à tout audit, inspection, vérification, prélèvement, examen, ou toute autre forme de contrôle par les services de l'Etat compétents ou leurs délégataires, en vue d'assurer le respect des dispositions des titres II, III et V du livre II du CRPM.

L'article R. 202-8 du CRPM prévoit que seuls les laboratoires nationaux de référence (LNR) et les laboratoires agréés à cette fin par le ministre chargé de l'agriculture peuvent réaliser les analyses officielles.

II - Objectifs du réseau de laboratoires agréés

La peste porcine africaine (PPA) est un danger sanitaire de première catégorie en France, selon l'arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales. Par conséquent, d'après l'article L. 201-7 du CRPM, tout résultat d'analyse conduisant à suspecter ou constater sa présence doit être communiqué immédiatement à l'autorité administrative compétente.

Le réseau de laboratoires agréés en cours de constitution, visé par cette instruction technique, a pour mission d'assurer la réalisation des analyses officielles de détection de la PPA par les deux méthodes :

- méthode sérologique ELISA,
- méthode d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) dès lors qu'au moins un kit commercial aura été validé par le LNR et officialisé par le ministère en charge de l'agriculture. Cette méthode doit être mise en œuvre sur l'une des matrices suivantes :
    - ↘ sang, rate, amygdale/ganglions dans tous les cas,
    - ↘ écouvillons secs pour la faune sauvage, les porcs en élevage plein air ou les sangliers d'élevage.

L'une ou l'autre ou les deux méthodes pourront être réalisées selon les instructions du ministre en charge de l'agriculture.

III – Obligations des laboratoires agréés

Le maintien de l'agrément délivré est conditionné au respect permanent des obligations listées dans les articles R. 202-8 à R. 202-21 du CRPM, ainsi celles listées dans l'arrêté du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique et de la protection des végétaux. Par ailleurs, les laboratoires agréés doivent :

- être également agréés pour les analyses virologiques (par RT-PCR) et sérologiques (par ELISA) de la peste porcine classique (PPC) ;
- respecter l'ensemble des préconisations du cahier des charges biosécurité pour la réalisation d'analyses sérologiques ou virologiques pour le diagnostic de la peste porcine classique et de la peste porcine africaine, cahier des charges qui figure en annexe de cette instruction ;
- garantir la qualité de réalisation de ces analyses et celle du rendu des résultats (sous forme dématérialisée), ainsi que le respect des délais de transmission des résultats.

IV - Méthodes analytiques

Les méthodes et kits officiels pour la détection de la PPA sont consultables sur le site internet du ministère chargé de l'agriculture depuis :

http://agriculture.gouv.fr/laboratoires-agrees-et-methodes-officielles-en-sante-animale

En cas d'évolution ultérieure de ces méthodes, selon la nature des modifications apportées, les délais de mise en œuvre par les laboratoires du réseau sont les suivants :

a. toute nouvelle version avec modification mineure de la méthode est d'application immédiate, c'est-à-dire à compter du 1er jour du mois suivant celui figurant sur la première page de la méthode publiée par le LNR ;

b. toute nouvelle version avec modification majeure de la méthode devra être mise en œuvre au plus tard le 1er jour du 6ème mois après le mois figurant en première page de la version de la méthode publiée par le LNR."

V - Portée de l'accréditation

Les laboratoires agréés pour les analyses de dépistage de la PPA doivent être accrédités pour une méthode officielle de détection de la PPA par méthode sérologique ELISA, ainsi que pour une méthode officielle de détection de la PPA par méthode PCR.

VI - Modalités et délais de rendu des résultats

Le laboratoire agréé réalise les analyses officielles de façon prioritaire et s'organise pour pouvoir réceptionner les échantillons et les traiter dans les délais appropriés, le cas échéant, précisé par instruction technique du ministère en charge de l'agriculture, en organisant un service d'astreinte. Ce service d'astreinte doit notamment permettre d'analyser les prélèvements en cas de suspicion de PPA en élevage dans les 24 heures suivant leur réception, l'envoi des prélèvements étant effectué dès la suspicion posée.

De plus, tout résultat positif ou non négatif par PCR et/ou ELISA doit être communiqué sans délai (par téléphone puis confirmation par mail, en s'assurant de la réception effective de l'information), à la DD(ec)PP du département concerné par l'élevage, l'abattoir, ou le cadavre de sanglier suspect, et les échantillons correspondants transmis sans délai au LNR PPA/PPC, que le laboratoire aura prévenu (mail et/ou téléphone).

Au regard des conséquences de la mise en évidence du virus de la PPA ou PPC en France, en dehors des horaires d'ouverture de la DD(ec)PP, le laboratoire contactera le cadre d'astreinte de la DD(ec)PP *via* le standard de la préfecture du département concerné par le cas suspect sans délais.

Les laboratoires sont tenus de transmettre les résultats d'essais sous forme dématérialisée au système d'information de la DGAL (SIGAL/RESYTAL) dans les 6 mois suivant la publication du référentiel et des fiches de plan PPA.

Les résultats sont saisis au fur et à mesure de leur obtention dans les systèmes d'information conformément aux consignes formulées lors de la qualification réalisée entre les laboratoires et le système d'échanges de données informatiques du ministère en charge de l'agriculture.

VII - Laboratoire national de référence

Le laboratoire national de référence pour la PPA et la PPC figure dans l'annexe de l'arrêté du 29 décembre 2009 modifié, désignant les LNR dans le domaine de la santé publique vétérinaire et phytosanitaire. Cet arrêté est consultable en suivant le lien :

http://agriculture.gouv.fr/laboratoires-agrees-et-methodes-officielles-en-sante-animale

VIII - Laboratoires agréés

La liste des laboratoires agréés pour la détection de la PPA par méthode sérologique ELISA et par méthode PCR sera consultable sur le site internet du ministère chargé de l'agriculture depuis :

http://agriculture.gouv.fr/laboratoires-agrees-et-methodes-officielles-en-sante-animale

Le directeur général adjoint de l'alimentation
Chef du service de la gouvernance
et de l'international
CVO
Loïc EVAIN

Laboratoire de Ploufragan-Plouzané

Ploufragan, le 22 juin 2018

Unité
Virologie et Immunologie
Porcines

Cahier des charges biosécurité à respecter par un laboratoire demandant un agrément / agréé pour la réalisation d'analyses sérologiques ou virologiques pour le diagnostic de la peste porcine classique et/ou de la peste porcine africaine.

Laboratoire National de Référence :

Peste Porcine Africaine

Peste Porcine Classique

Influenza Porcin

Maladie d'Aujeszky (laboratoire OIE)

Dossier suivi par:
Marie-Frédérique
LE POTIER

Ligne directe:
02 96 01 62 90
Fax direct :
02 96 01 62 94

E- mail:
marie-frederique.lepotier@anses.fr

N. Réf. :18MFLP033

La peste porcine classique (PPC) est due à un virus à ARN du genre pestivirus de la famille des *Flaviviridae*. La peste porcine africaine (PPA) est due à un virus à ADN, c'est le seul représentant de la famille des *Asfarviridae*. Ces deux infections virales, à l'origine d'épizootie grave des suidés, sont classées comme danger sanitaire de catégorie 1. L'expression clinique de ces deux infections étant semblable, seul un diagnostic de laboratoire permet de les différencier. Ces deux virus ne sont pas zoonotiques. Que le pays en soit indemne ou pas, il est important d'empêcher toute dissémination de ces virus en dehors des laboratoires, ces virus étant considérés comme à risque pour l'environnement (classe Ea3). Les conditions décrites dans ce document s'appliquent à tout laboratoire susceptible de détenir du virus vivant ou des échantillons biologiques pouvant en contenir. L'ensemble du laboratoire ou une zone au sein du laboratoire doit respecter un niveau de confinement de type L3 et respecter le présent cahier des charges. Dans la suite du document le terme de « zone confinée» sera utilisé qu'il représente une pièce confinée au sein du laboratoire ou tout ou partie du laboratoire où peuvent être manipulés ou stockés du virus ou des échantillons biologiques susceptibles d'en contenir.

Résistances des virus :

Résistance	Virus de la PPC	Virus de la PPA
Survie	Résistant mais ne persiste pas dans l'environnement si soumis à dessication et ultra-violets. Survie très bien en élevage dans des conditions froides (jusqu'à 4 semaines en hiver). Survie 3 jours à 50°C et 7 à 15 jours à 37°C. Survie des mois dans de la viande réfrigérée ou congelée. Survie dans les produits de salaison (salage et fumage) : 17 à >180 jours quel que soit le procédé. Le virus persiste 3–4 jours dans des organes en décomposition et jusqu'à 15 jours dans du sang décomposé ou de la moelle osseuse.	Reste viable sur de longues périodes (plusieurs semaines) dans le sang, les fèces, les organes, la moelle osseuse,… Survie des mois dans de la viande réfrigérée ou congelée. Survie dans les produits de salaison (salage et fumage) : 17 à >180 jours quel que soit le procédé. Les produits de charcuterie non cuits (jambon sec) ou peu cuits (saucisses, etc..) Peut se multiplier chez certaines tiques molles du genre Ornithodoros
Température	Très résistant à température modérée. Notamment en présence de sérum : peut rester viable plusieurs jours à une température de 20-25°C, peut résister au traitement habituel de « 56°C /30minutes » Inactivé par la cuisson à cœur : 65,5°C pendant 30 minutes ou 71°C pour une minute.	Très résistant à température modérée. Résiste dans du sérum au traitement habituel de « 56°C /30minutes »
pH	Stable à pH 5-10. Rapidement inactivé à un pH <3.0 ou pH >11.0.	Inactivé à un pH <3.9 ou >11.5 en milieu de culture sans sérum. La présence de sérum augmente la résistance du virus. Par exemple, le virus peut survivre à pH 13.4 jusqu'à 21 heures sans sérum et 7 jours en présence de sérum.
désinfectants	Sensible à l'éther, au chloroforme, à la ß-propiolactone (0.4%). Inactivé par des désinfectants à base de Chlore, cresol (5%), hydroxide de sodium (2%), formol (1%), sodium carbonate (4% anhydre ou 10% crystalline, avec 0.1% détergent), détergents ionique et non-ionique, Composés iodés forts (1%) dans de l'acide phosphorique.	Sensible à l'éther et au chloroforme. Il est inactivé par contact pendant 30 minutes avec une solution de: • hydroxyde de sodium au 8/1000, • 2.3% chlore • 3/1000 formol • 3% ortho-phenylphenol • Composés iodés.

Les principales voies par lesquelles le virus peut s'échapper ou être transporté hors du laboratoire incluent :

- le personnel,
- l'air,
- les effluents liquides,
- les déchets solides,
- les équipements et
- les échantillons et les réactifs.

Par conséquent, les mesures générales de confinement et les procédures spécifiques suivantes doivent être respectées pour la manipulation d'échantillons contaminés *a priori* par du virus de la peste porcine classique ou africaine.

1) Les locaux :

la zone confinée où sont manipulés le virus de la PPC ou de la PPA , ou tout échantillon susceptible d'en contenir doit être en dépression stable par rapport à l'extérieur d'une valeur minimale de 5 mm de colonne d'eau et doit être pourvu d'un système de filtration absolu de l'air à la sortie (double filtration recommandée), et de sas de communication à doubles portes;

la zone confinée où est manipulé le virus de la PPC ou de la PPA doit être pourvue d'un lavabo permettant le lavage des mains et d'une douche (ou tout autre système d'aspersion équivalent) permettant une décontamination du personnel en cas de projection de matériel contaminé ;

Une pancarte mentionnant la manipulation du virus et l'interdiction d'accès à la zone confinée aux personnes non habilitées doit être apposée sur la porte d'entrée de la zone confinée où est manipulé le virus de la Peste Porcine Classique ou Africaine ;

L'organisation du travail journalier et celle des circuits doivent permettre d'éviter de manipuler du matériel non contaminé après manipulation du virus ou de l'antigène viral ;

Si d'autres pestivirus ou des prélèvements susceptibles de contenir des pestivirus, sont manipulés dans le laboratoire, ces manipulations ne doivent pas être faites en même temps que la manipulation du virus de la Peste Porcine Classique, sauf si les installations ou les procédures mises en place par le laboratoire permettent d'éviter les contaminations croisées entre pestivirus ;

Le laboratoire doit mettre en place un système et des procédures efficaces de décontamination des effluents liquides avant leur rejet, ainsi que des effluents pâteux, déchets solides et matériel contaminé avant leur élimination. Tout matériel recyclable contaminé doit faire l'objet d'une désinfection avant toute nouvelle utilisation (autoclavage à une température égale ou supérieure à 121 °C, pendant au moins 30 min, ou tout autre moyen équivalent) ;

2) Equipements :

Poste de sécurité microbiologique (classe II) destiné à toutes les manipulations de virus vivants et/ou échantillons biologiques potentiellement contaminés. L'enceinte doit disposer d'un dispositif de double filtrage HEPA de l'air évacué.

Tous les équipements nécessaires aux procédures de laboratoire doivent être disponibles à l'intérieur de la zone confinée du laboratoire.

Les procédures de décontamination des équipements doivent être décrites

3) Les échantillons et/ou les stocks de virus vivant :

Les souches de virus de la Peste Porcine Classique ou Africaine doivent obligatoirement être conservées à une température inférieure ou égale à – 65°C dans la zone confinée du laboratoire, elles doivent être identifiées, répertoriées, et manipulées dans la zone confinée.

Les manipulations de virus vivant de la PPC ou de la PPA, ou des échantillons de suidés susceptibles d'en contenir (sang ou organe provenant d'une suspicion, d'un foyer avéré ou d'une zone de protection ou de surveillance établie autour d'un foyer) doivent être réalisées dans la zone confinée du laboratoire sous un poste de sécurité microbiologique de type II ;

Toutefois , pour la détection du génome du virus de la PPC par RT-PCR ou du virus de la PPA par PCR, les acides nucléiques, une fois extraits dans la zone confinée du laboratoire de virologie, peuvent être manipulés dans les salles dédiées à la PCR, même si elles sont en dehors de la zone confinée, ceci sous réserve :

- que l'inactivation complète du virus par le processus d'extraction d'acides nucléiques ait été validée au préalable, information disponible auprès du LNR
- que la procédure de sortie de la zone confinée permette constamment la désinfection de tous les matériels, supports et contenants utilisés dans le laboratoire P3 dont entre autres l'extérieur des tubes contenant les acides nucléiques.

Cas particulier de la manipulation d'échantillons non contaminés *a priori* par du virus de la peste porcine classique ou africaine
Dans le cadre de l'épidémiosurveillance en zone indemne, les prélèvements sériques pour recherche d'anticorps anti-virus de la PPC ou de la PPA par des techniques ELISA utilisant un antigène non infectieux, peuvent être manipulés dans la partie immuno-sérologie non confinée du laboratoire associée à l'unité confinée de virologie.

4) Le personnel :

L'accès à la zone confinée est restreint à une liste positive de personnes. Ces personnes sont informées des risques liés à la manipulation de ces virus. Une liste des personnes habilitées à pénétrer dans la zone confinée doit être tenue à jour. Les consignes sur le changement de vêtements et les précautions à prendre à l'entrée et à la sortie doivent être également clairement mentionnées. Un document mentionnant l'interdiction d'avoir des

contacts avec des animaux des espèces sensibles[1] ainsi qu'avec des éleveurs dans un délai de 48 h après sortie de la zone doit être signé par les personnels habilités et par les visiteurs.

Le personnel et les visiteurs doivent quitter leurs chaussures, chaussettes et vêtements de ville, à l'exception de leurs sous-vêtements, dans le vestiaire externe de la zone confinée. Le personnel doit revêtir dans le vestiaire interne de la zone confinée des vêtements et des chaussures de travail adaptés mis à sa disposition par le laboratoire, qui en aucun cas ne doivent côtoyer les vêtements de ville. Les vêtements et les chaussures de travail doivent être lavés à l'intérieur de la zone contaminée. Ils peuvent être sortis de la zone confinée pour lavage si le laboratoire a mis en place une procédure de décontamination préalable ou toute autre procédure prévenant le risque de dissémination du virus. Les consignes sont affichées.

- **Procédure d'agrément**

L'agrément est délivré par le Ministre chargé de l'Agriculture, après instruction du dossier par les services de la Direction générale de l'alimentation en étroite collaboration avec le Laboratoire National de Référence PPA/PPC, notamment de façon à vérifier que le laboratoire candidat respecte le présent cahier des charges « biosécurité ». A cet effet, le dossier de demande d'agrément doit comporter les pièces suivantes : »

- plan des locaux,
- description du traitement de l'air et procédures de contrôle,
- procédures de traitement des déchets et des effluents, et procédures de contrôle
- procédure d'identification des stocks de virus, de stockage et d'élimination
- procédure d'identification des échantillons, de stockage et d'élimination
- organisation des circuits (personnel, matériel, prélèvements),
- habilitation des personnels,
- toutes autres pièces documentaires utiles.

Une visite sur site par un représentant du LNR, aux frais du laboratoire candidat à l'agrément, complétera l'instruction de ce dossier d'agrément initial. Le laboratoire devra être en état de fonctionnement habituel lors de cette visite.

Une visite d'inspection inopinée d'un laboratoire agréé pourra être déclenchée à tout moment, afin de vérifier la tenue en bon état de fonctionnement de la zone confinée, le maintien de procédures de fonctionnement appropriées, et de la compétence/habilitation des personnels. En cas de résultats non conformes, l'agrément pourrait être suspendu ou retiré.

Dr Marie-Frédérique Le Potier, PhD
Responsable des LNRs PPA et PPC
Chef d'unité Virologie Immunologie Porcines

[1] Les suidés domestiques et sauvages (porcs, sangliers, phacochères et potamochères).

Références normatives :

Normes OIE :

- Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres, version en vigueur en ligne :
  http://www.oie.int/fr/normes-internationales/manuel-terrestre/acces-en-ligne/

- Résistances des virus :
  - PPC :
    http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/CLASSICAL_SWINE_FEVER.pdf
  - PPA :
    http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/AFRICAN_SWINE_FEVER.pdf

Norme AFNOR :

NF U 47-025 : Recherche d'anticorps contre la peste porcine classique par la technique de neutralisation virale et immunochimie sur culture cellulaire (IF ou IP)