MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
ET DE LA SOUVERAINETÉ
ALIMENTAIRE
Liberté
Égalité
Fraternité

Information

Direction générale de l'alimentation **Sous-direction du pilotage des ressources et des services** **Bureau des laboratoires** **251 rue de Vaugirard** **75 732 PARIS CEDEX 15** **0149554955**	**Instruction technique** **DGAL/SDPRS/2023-421** **03/07/2023**

Date de mise en application : Immédiate
Diffusion : Tout public

Cette instruction n'abroge aucune instruction.
Cette instruction ne modifie aucune instruction.
Nombre d'annexes : 2

Objet : Dispositions applicables au réseau de laboratoires agréés pour la détection de génome de virus de l'influenza aviaire par méthode de transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase en temps réel (RT-PCR temps réel).

Destinataires d'exécution
Laboratoires agréés pour le dépistage de l'influenza aviaire ADILVA AFLABV LNR influenza aviaire - Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort - site de Ploufragan DD(ETS)PP DRAAF DAAF

Résumé : La présente instruction précise les dispositions applicables au réseau de laboratoires agréés pour la réalisation des analyses officielles de détection de génome de virus de l'influenza aviaire par méthode de transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase en temps réel (RT-PCR temps réel).

Textes de référence :- Règlement (UE) 2016/429 du Parlement Européen et du Conseil du 9 mars 2016 relatif aux maladies animales transmissibles et modifiant et abrogeant certains actes dans le

domaine de la santé animale (« législation sur la santé animale ») ;

- Règlement (UE) 2017/625 du Parlement européen et du Conseil du 15 mars 2017 concernant les contrôles officiels et les autres activités officielles servant à assurer le respect de la législation alimentaire et de la législation relative aux aliments pour animaux ainsi que des règles relatives à la santé et au bien-être des animaux, à la santé des végétaux et aux produits phytopharmaceutiques, modifiant les règlements du Parlement européen et du Conseil (CE) n° 999/2001, (CE) n° 396/2005, (CE) n° 1069/2009, (CE) n° 1107/2009, (UE) n° 1151/2012, (UE) n° 652/2014, (UE) 2016/429 et (UE) 2016/2031, les règlements du Conseil (CE) n° 1/2005 et (CE) n° 1099/2009 ainsi que les directives du Conseil 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE et 2008/120/CE, et abrogeant les règlements du Parlement européen et du Conseil (CE) n° 854/2004 et (CE) n° 882/2004, les directives du Conseil 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE et 97/78/CE ainsi que la décision 92/438/CEE du Conseil (règlement sur les contrôles officiels) ;

- Règlement délégué (UE) 2018/1629 de la Commission du 25 juillet 2018 modifiant la liste de maladies figurant à l'annexe II du règlement (UE) 2016/429 du Parlement européen et du Conseil relatif aux maladies animales transmissibles et modifiant et abrogeant certains actes dans le domaine de la santé animale (« législation sur la santé animale ») ;

- Règlement d'exécution (UE) 2018/1882 de la Commission du 3 décembre 2018 sur l'application de certaines dispositions en matière de prévention et de lutte contre les maladies à des catégories de maladies répertoriées et établissant une liste des espèces et des groupes d'espèces qui présentent un risque considérable du point de vue de la propagation de ces maladies répertoriées ;

- Règlement délégué (UE) 2020/687 de la Commission du 17 décembre 2019 complétant le règlement (UE) 2016/429 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les règles relatives à la prévention de certaines maladies répertoriées et à la lutte contre celles-ci ;

- Règlement délégué (UE) 2020/689 de la Commission du 17 décembre 2019 complétant le Règlement 2016/429 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les règles applicables à la surveillance, aux programmes d’éradication et au statut « indemne » de certaines maladies répertoriées et émergentes ;

- Règlement délégué (UE) 2023/361 de la Commission du 28 novembre 2022 complétant le règlement (UE) 2016/429 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les règles applicables à l’utilisation de certains médicaments vétérinaires pour la prévention de certaines maladies répertoriées et la lutte contre celles-ci ;

- Articles L. 201-7, L. 202-1 et R. 202-8 et suivants du code rural et de la pêche maritime ;
- 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 30 mars 2023 désignant les laboratoires nationaux de référence dans le domaine de la santé publique vétérinaire et phytosanitaire.

I - Base réglementaire du contrôle officiel

Le contrôle du respect des dispositions du livre II du code rural et de la pêche maritime (CRPM) relatives à l'alimentation, la santé publique vétérinaire et la protection des végétaux est assuré par les services de l'Etat compétents ou leurs délégataires au moyen notamment d'analyses de laboratoire, selon les dispositions de l'article L. 202-1 du code rural et de la pêche maritime (CRPM). Tout essai, analyse ou diagnostic par un laboratoire d'un échantillon prélevé dans le cadre d'un contrôle officiel ou d'une autre activité officielle, tels que les définit le règlement (UE) 2017/625 susvisé dans son article 2, est une analyse officielle, selon les dispositions de l'article R. 200-1 du CRPM.

Les analyses officielles doivent être réalisées par les laboratoires nationaux de référence et les laboratoires agréés à cette fin par le ministre chargé de l'agriculture, conformément aux dispositions prévues à l'article R. 202-8 du code rural et de la pêche maritime.

II – Contexte et objectifs du réseau de laboratoires agréés

Le règlement (UE) 2016/429 susvisé introduit le principe de catégorisation des maladies animales réglementées dans l'Union européenne. Conformément au règlement (UE) 2018/1882 susvisé, l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) appartient aux catégories ADE et nécessite une obligation de déclaration, de surveillance, de prévention, de lutte et de certification. Elle nécessite un plan d'intervention sanitaire d'urgence pour une éradication immédiate dès la détection de la maladie. L'influenza aviaire faiblement pathogène (IAFP) relève des catégories DE avec une obligation de déclaration, de surveillance et de certification.

Pour confirmer la présence d'une maladie animale, l'article 11 du règlement délégué (UE) 2020/687 susvisé, renvoie à l'article 9 du règlement délégué (UE) 2020/689 susvisé. Seules les analyses de laboratoires permettent de confirmer un foyer d'IAHP et donc, de déployer les mesures de police sanitaire nécessaires à la lutte contre cette maladie.

En outre, d'après l'article L. 201-7 du CRPM, tout résultat d'analyse conduisant à suspecter ou constater la présence de virus influenza hautement pathogène doit être communiqué immédiatement à l'autorité administrative compétente.

Le réseau de laboratoires agréés constitué, visé par cette instruction technique, a pour mission d'assurer la réalisation des analyses officielles :

- de détection du génome du virus de l'influenza aviaire (IA) de type A,
- de détection du génome du virus de l'IA des sous-types H5 ou H7,

et, le cas échéant :

- de détermination du pathotype de certaines lignées de virus de l'IAHP H5 ou H7 (ces dernières méthodes étant restreintes et adaptées aux souches contemporaines d'intérêt épidémiologique) telles que les analyses de détection du génome du virus de l'IAHP H5 appartenant au clade 2.3.4.4b de la lignée A/Goose/Guangdong/1/96.

L'ensemble de ces analyses seront réalisées par des méthodes de transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase en temps réel (RT-PCRt), développées et adaptées d'après les méthodes publiées par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour l'IA (LRUE-IA), validées pour ces adaptations par le Laboratoire National de Référence pour l'influenza aviaire (LNR IA), ou contrôlées par ce même laboratoire, et officialisées par le ministère en charge de l'agriculture.

Ces méthodes sont mises en œuvre sur les matrices suivantes pour le diagnostic en cas de suspicion d'influenza aviaire (IA) :

- écouvillons oro-pharyngés (ou trachéaux) et cloacaux d'oiseaux,
- organes (mélanges d'organes prélevés sur 5 oiseaux affectés), regroupés selon les 4 sites anatomiques suivants : encéphales, organes internes (autres que l'appareil respiratoire et le tube digestif, par exemple : foie + rate + cœur + rein), trachée + poumons, intestins + contenus intestinaux.

III – Obligations des laboratoires agréés

Le maintien de l'agrément délivré est conditionné au respect permanent des obligations listées dans les articles 37 à 39 et 42 du règlement « contrôles officiels » (règlement (UE) n°2017/625), les articles R. 202-8 à R. 202-21 du CRPM, ainsi que 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 pour la réalisation des analyses de détection de génome de virus IA par méthode de biologie moléculaire doivent :

- **Respecter l'ensemble des préconisations de biosécurité** pour la réalisation d'analyses virologiques pour le diagnostic de l'influenza aviaire, notamment hautement pathogène :
    - **la manipulation et la préparation des prélèvements issus d'animaux n'ayant pas subi de traitement préalable d'inactivation et susceptibles de contenir du virus de l'influenza aviaire hautement pathogène** (prélèvements effectués dans le cadre de la surveillance événementielle en élevage de volailles, chez les oiseaux captifs ou chez les oiseaux sauvages) **ou des virus de l'influenza aviaire des sous-types H5 ou H7** (prélèvements effectués suite à une première détection spécifique d'anticorps ou de génome) **doivent impérativement être effectuées sous poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II ou III et dans des locaux ayant un niveau de confinement au moins équivalent au niveau NSB3** ;
    - **la manipulation et la préparation d'autres types de prélèvements** issus d'animaux autres que ceux précédemment décrits, en l'absence de traitement préalable d'inactivation, doivent être **effectuées sous poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II ou III et dans des locaux ayant un niveau de confinement au moins équivalent au niveau NSB2** ;
    - **la centrifugation des prélèvements issus d'animaux ou de leurs broyats et surnageants, n'ayant pas subi de traitement préalable d'inactivation**, doit être effectuée dans des nacelles permettant une fermeture hermétique, chargées et déchargées sous PSM de type II ou III, et permettant une décontamination après utilisation ;
    - **une fois l'étape de lyse effectuée** (préalablement à l'extraction des acides nucléiques), **les échantillons correspondants peuvent être manipulés hors PSM de type II ou III, dans des locaux dédiés à la PCR ayant un niveau de confinement au moins équivalent au niveau NSB2.** Ceci sous réserve que l'inactivation complète du virus par l'étape de lyse ait été validée au préalable et que l'extérieur des contenants et les supports aient été décontaminés en sortie de PSM.
- **Garantir la qualité de réalisation de ces analyses et celle du rendu des résultats** décrit au paragraphe VI (notamment sous forme dématérialisée selon les modalités préconisées par le LNR IA en respectant le modèle fourni en annexe 1) ;
- Transmettre les résultats d'analyses via le système d'information de la DGAL ;
- **Garantir le respect des circuits et des délais de transmission des échantillons** et des résultats d'analyses, figurant au paragraphe VI et en annexe 2 ;
- **Garantir les délais de réalisation des analyses en lien avec les astreintes.**

IV - Méthodes analytiques

La liste des méthodes officielles disponibles pour la détection du virus de l'influenza aviaire de type A (détection du gène M), pour la détection de virus de l'influenza aviaire de sous-type H5 et H7 et pour la détermination du pathotype de certaines lignées de virus de l'IA H5 ou H7 HP (selon les méthodes disponibles publiées par le LRUE-IA telle que la détection du génome du virus de l'IA hautement pathogène (HP) H5 appartenant au clade 2.3.4.4b de la lignée A/Goose/Guangdong/1/96), est consultable sur le site Internet du ministère chargé de l'agriculture :

https://agriculture.gouv.fr/laboratoires-officiels-et-reconnus-en-sante-animale.

Les méthodes à mettre en œuvre, en l'état des méthodes officielles disponibles, sont réalisées à partir de mélanges de surnageants d'écouvillons initialement repris individuellement en milieu liquide (mélange par 5 maximum et par type d'écouvillon). Elles sont conduites **en trois temps :**

1. par RT-PCR temps réel gène M pour recherche de virus influenza aviaire,
2. puis, en cas de résultat positif, par RT-PCR temps réel gène H5 et RT-PCR temps réel gène H7,
3. puis, dans les cas décrits au paragraphe VI et dans le schéma diagnostic de l'annexe 2, par RT-PCR temps réel spécifique (et adaptée aux souches contemporaines d'intérêt épidémiologique) pour la détermination du pathotype de certaines lignées de virus de l'IA H5 ou H7 HP, telle que la détection du génome du virus de l'IA hautement pathogène (HP) H5 appartenant au clade 2.3.4.4b de la lignée A/Goose/Guangdong/1/96.

Dans les cas prévus par instruction technique de la DGAL, l'analyse peut être conduite **en deux temps,** la première étape consistant à rechercher de façon simultanée soit les gènes M, H5 et H7, soit directement les gènes H5 et H7 (sans recherche du gène M).
L'étape de confirmation éventuelle de détermination du pathotype (PCR clade) reste inchangée.

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 IA ;

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 IA.

V - Portée de l'accréditation

Les laboratoires agréés pour les analyses de détection du virus de l'influenza aviaire doivent être accrédités pour les méthodes officielles de RT-PCRt pour la détection du virus de l'influenza aviaire de type A (détection du gène M), de RT-PCRt pour la détection de virus de l'influenza aviaire de sous-type H5 et H7 et de RT-PCRt pour la détermination du pathotype de certaines lignées de virus de l'IA H5 HP (selon les méthodes disponibles publiées par le LRUE-IA).

VI - Modalités et délais de transmission des résultats et des échantillons pour analyses complémentaires

Le laboratoire agréé réalise les analyses officielles de façon prioritaire et s'organise pour pouvoir réceptionner les animaux ou les prélèvements et les traiter dans les délais appropriés (selon l'annexe 2), en organisant un service d'astreinte. Ce service d'astreinte doit notamment permettre d'analyser sans délai les prélèvements lors de suspicion d'influenza dans un élevage situé hors zones réglementées, l'envoi des prélèvements étant effectué dès la suspicion posée.

Les laboratoires sont tenus de transmettre tous les rapports ou résultats d'essais sous forme dématérialisée ;

- pour le LNR IA et la DGAL Mission des urgences sanitaires (MUS), par mail, selon le modèle fourni par le LNR IA aux laboratoires agréés pour l'influenza aviaire, figurant en annexe 1, accompagné des rapports d'essais ;
- pour les DD(ETS)PP par transmission à la fois par mail des rapports d'essais et *via* SIGAL.

De plus, **tout résultat positif pour la détection de virus influenza aviaire doit respecter le schéma diagnostic et de transfert d'information suivant** :

- Lorsque les résultats d'analyses sont **M+/H5+ ou M+/H5-/H7- avec Ct>30 en RT-PCRt gène M ou H5+** (pour l'ensemble des ARN testés d'une même demande d'analyse, dans ce dernier cas) :
  1. La recherche par RT-PCR temps réel de génome du virus de l'IA H5 HP appartenant au clade 2.3.4.4b de la lignée A/Goose/Guangdong/1/96 est réalisée sans délai par le laboratoire agréé, sur l'ensemble des ARN de la demande d'essai correspondante (à l'exception éventuelle des ARN M-/H5-/H7- ou M-/H5 et H7 non testés) ;
  2. Le résultat doit être transmis immédiatement à la DD(ETS)PP du lieu d'implantation de l'élevage ou de l'abattoir, ou de découverte du cadavre d'oiseau suspect (par téléphone[1] puis confirmation par mail, en s'assurant de la réception effective de l'information), à la DGAL **(boite alertes : alertes.dgal@agriculture.gouv.fr et à la boite guichet unique : iahp-gu.dgal@agriculture.gouv.fr)** ainsi qu'au LNR IA (adresse générique **LNR_influenza_aviaire@anses.fr**) ;
  3. Quel que soit le résultat de la RT-PCRt H5 HP, les ARN sont envoyés deux fois par semaine au LNR IA, donc **dans les 48h jours ouvrés** pour analyses complémentaires.
- Lorsque les résultats d'analyses sont **M+/H7+ ou H7+** :
  1. Le LNR IA doit être informé immédiatement et les ARN de ces échantillons doivent être transmis au LNR IA sans délai pour analyses complémentaires ;
  2. Le résultat doit être transmis immédiatement à la DD(ETS)PP du lieu d'implantation de l'élevage ou de l'abattoir, ou de découverte du cadavre d'oiseau suspect (par téléphone[1] puis confirmation par mail, en s'assurant de la réception effective de l'information), à la DGAL **(boite alertes : alertes.dgal@agriculture.gouv.fr et à la boite guichet unique : iahp-gu.dgal@agriculture.gouv.fr)** et au LNR IA (adresse générique **LNR_influenza_aviaire@anses.fr**).
- Lorsque les résultats d'analyses sont **M+/H5-/H7- avec Ct<30 pour le gène M** (pour l'un au moins des ARN testés d'une même demande d'analyse) :
  1. Le LNR IA doit être informé immédiatement ;
  2. Les ARN de ces échantillons lui sont transmis avec une périodicité **hebdomadaire** pour analyses complémentaires.

Conditions de conservation et de transfert des échantillons (d'après le schéma diagnostic figurant en annexe 2) :

- Tous les ARN positifs pour envoi au LNR IA doivent être additionnés d'inhibiteurs des RNases et, s'ils ne sont pas envoyés immédiatement, doivent être conservés à T°C < - 65°C par les laboratoires agréés. Les envois correspondants ne sont pas considérés comme contenant des matières infectieuses et sont réalisés sous couvert du froid positif ;
- Tous les surnageants d'écouvillons individuels et de mélange positifs en RT-PCR temps réel pour le gène M (M+/H5-/H7-, M+/H5+ et M+/H7+) doivent être conservés pendant un délai de 3 mois minimum à T°C < - 65°C par les laboratoires agréés, avant leur transfert éventuel au LNR IA (après sélection des échantillons d'intérêt par celui-ci), sous couvert du froid en carboglace. Chaque colis de surnageants d'écouvillons individuels et de mélange, doit être affecté d'un N° UN 3373 car il s'agit de matières infectieuses envoyées à des fins de diagnostic relevant de la catégorie B et qui doivent respecter les règles de transport de cette catégorie B / UN3373.

VII - Laboratoire national de référence

Le laboratoire national de référence pour l'influenza aviaire figure dans l'arrêté du 30 mars 2023, désignant les LNR dans le domaine de la santé publique vétérinaire et phytosanitaire. Cet arrêté est consultable en suivant le lien :

---

1 Au regard des conséquences de la mise en évidence du virus de l'IA en France, en dehors des horaires d'ouverture de la DD(ETS)PP, le laboratoire contactera le cadre d'astreinte de la DD(ETS)PP via le standard de la préfecture du département concerné par le cas de suspicion sans délais.

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

VIII - Laboratoires agréés

La liste des laboratoires agréés pour la réalisation des analyses officielles de détection de génome de virus de l'IA de type A, de détection de génome de virus de l'IA des sous-types H5 ou H7 et de détermination du pathotype de certaines lignées de virus de l'IA HP H5 ou H7 est consultable sur le site internet du ministère chargé de l'agriculture depuis :

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

Maud FAIPOUX
Directrice générale de l'Alimentation

N° Dept	Nom et adresse de l'élevage ou Lieu de prelevement (faune sauvage)	Contexte de prélèvement

Annexe 1

N°dossier laboratoire criblage	N° INUAV si élevage	N° SAGIR si faune sauvage	Espèce	DAP	N° échantillon laboratoire

Nature échantillon (trachée / cloaque / T1 /organes/…)	N°plaque extraction	Position plaque extractions / Nom du tube	Résultat RT-PCR temps réel Gène M (Ct)	Résultat RT-PCR temps réel Gène H5 (Ct)	Résultat RT-PCR temps réel Gène H7 (Ct)

Résultat RT-PCR temps réel gène H5 HP Clade 2.3.4.4b

Annexe 2

Laboratoires reconnus IA en biologie moléculaire

Laboratoires agréés IA en biologie moléculaire

Répartition des analyses entre laboratoires agréés et reconnus

voir https://agriculture.gouv.fr/influenza-aviaire-repartition-des-analyses-entre-laboratoires-agrees-et-reconnus

