

Procédure de l'OIE pour l'enregistrement des kits de diagnostic

Fiche de synthèse

Nom du kit de diagnostic : VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit
Fabricant : Thermo Fischer Scientific_ LSI S.A.S.

Maladie : Peste porcine africaine (PPA)

Agent pathogène : Gène P72 du virus de la PPA (VPPA)

Type d'épreuve : PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan®

Emploi assigné à l'épreuve : Détection du virus de la peste porcine africaine dans le sang, le sérum et les tissus de porcs domestiques et sauvages (dont le sanglier).

Espèces et échantillons : Sang, sérum et tissus prélevés de porcs domestiques et sauvages (dont le sanglier)

1. Informations sur le kit

Des informations générales sur le kit sont disponibles sur la page web de Thermo Fischer : www.thermofisher.com

Tél. : +33 (0)4.72.54.82.82

Fax : +33 (0)4.72.54.82.83

2. Synthèse des études de validation

Critères de performance analytiques

Répétabilité : La répétabilité de la PCR est évaluée en trois séances conduites par le même opérateur en utilisant les mêmes matériels à chaque fois. Les essais sont réalisés avec un segment quantifié d'ADN plasmidique pASFV dilué dans une solution tampon TE 1X afin d'obtenir trois niveaux de concentration (élevée/moyenne/basse). Chaque échantillon est testé en triplicat. Le coefficient de variation de la répétabilité du kit VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit est compris entre 0,89 % et 3,01 %.

Spécificité analytique : 100 %

La spécificité analytique du kit a été évaluée en comparant les systèmes de PCR utilisés dans le kit (amorces et sondes) avec les séquences du virus de la peste porcine africaine présentes dans les bases de données publiques du National Center for Biotechnology Information.

Le caractère inclusif de la PCR a été évalué en utilisant un panel de segments d'ADN extraits de 58 échantillons (organes, sérum) positifs au VPPA provenant du Centro de Investigación en Sanidad Animal – Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CISA-INIA).

Le caractère exclusif de la PCR a été évalué en utilisant des agents pathogènes généralement présents dans les mêmes niches écologiques, ou proches sur le plan phylogénétique, ou encore responsables des mêmes signes cliniques chez les espèces cibles. « VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit » s'est révélé spécifique pour la détection du virus de la peste porcine africaine et n'a pas détecté d'autres agents pathogènes inclus dans l'essai.

Sensibilité analytique : 100 %.

On entend par limite de détection d'une PCR (LDPCR) la plus faible concentration de l'acide nucléique cible donnant lieu à un résultat positif avec un niveau de confiance de 95 % (norme NF U47-600). Afin de déterminer expérimentalement la LDPCR, il convient de tester une série de dilutions de l'acide nucléique cible à des concentrations proches de la LDPCR attendue, en considérant à la fois une détermination en termes d'intra-test (avec plusieurs répliques par test) et en termes d'inter-test (plusieurs séances de test indépendantes). La LDPCR a été déterminée en utilisant un segment quantifié d'ADN plasmidique pASFV afin d'estimer le nombre de copies de l'acide nucléique. Trois gammes de dilutions individuelles ont été préparées en procédant à six dilutions sériées de raison 2. La LDPCR attendue devrait se trouver dans cette gamme de dilutions.

La limite de détection du VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit est de 16 copies d'acide nucléique par PCR.

Au vu des résultats obtenus lors de l'analyse complète des échantillons prélevés d'animaux confirmés positifs, le CISA-INIA conclut que le VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit possède les propriétés de sensibilité et de répétabilité requises pour réaliser un diagnostic fiable de la peste porcine africaine basé sur la détection du génome viral.

Caractéristiques diagnostiques

Détermination du seuil : la détermination du seuil consiste à assigner une valeur de seuil du cycle (C_t) pour chaque échantillon, laquelle dépend de la conception de la PCR et du thermocycleur utilisé pour l'amplification. La valeur du seuil de cycle est déterminée par le témoin positif externe (EPC) au milieu de la phase exponentielle de l'amplification, conformément à la norme NF U 47-600 :

Type de réaction	VPPA cible (colorant FAM™)	IPC cible (colorant VIC™)	Interprétation
Témoin positif	$C_t = C_{tQC} ASFV \pm 3 C_t$	$C_t < 45$ ou $C_t > 45$	Validation de la PCR
Témoin d'extraction	$C_t > 45$	$C_t = C_{tQC} IPC \pm 3 C_t$	Validation de l'extraction de l'ADN
Témoin sans matrice	$C_t > 45$	$C_t > 45$	Validation des réactifs de la PCR

IPC : témoin positif interne

Interprétation des résultats

VPPA cible (colorant FAM™)	IPC cible (colorant VIC™)	Interprétation
$C_t < 45$	$C_t < 45$ ou $C_t > 45$	Virus de la PPA détecté
$C_t > 45$	$C_t = C_t NEC \pm 3 C_t$	Virus de la PPA non détecté
$C_t > 45$	C_t en dehors de cette plage : $C_t NEC \pm 3 C_t$	Résultat invalide

NEC : témoin d'extraction négatif

Sensibilité diagnostique (SeD) et spécificité diagnostique (SpD) estimées et intervalles de confiance à 95 %

VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit		Échantillonnage
Sensibilité diagnostique	SeD = 100 %	51 essais à partir d'échantillons de tissus Se = 100 % [93,02 – 100,0 %]
Spécificité diagnostique	SpD = 100 %	1 563 essais à partir d'échantillons de sang ou de sérum Sp = 100 % [99,76 – 100,0 %] 63 essais à partir d'échantillons de tissus Sp = 100 % [94,31 – 100,0 %]

Comparaison des performances

Les résultats obtenus par le CISA-INIA lors de l'analyse d'échantillons de terrain prélevés de porcs domestiques et de sangliers infectés par le génotype II du virus de la PPA dans des pays d'Europe de l'Est ont été combinés afin de fournir une estimation globale des performances du kit pour le diagnostic de terrain de la peste porcine africaine. Au total, sur les 424 échantillons testés, 400 (94 %) ont été caractérisés comme positifs par l'UPL-PCR et 387 (91 %) ont été caractérisés comme positifs par le VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit.

Concordance et divergences

S'agissant des études réalisées par le CISA-INIA :

- L'analyse de 404 échantillons de terrain prélevés dans des zones d'épidémie en Europe de l'Est a révélé une concordance quasi parfaite entre la méthode de référence de l'UPL et le VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit, exprimée par un coefficient Kappa de 0,87.
- L'analyse basée sur un panel de 16 réactifs de référence du VPPA du Laboratoire de référence de l'Union européenne a révélé une concordance parfaite entre la méthode de référence de l'UPL et le VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit.
- L'analyse basée sur 136 échantillons de sang catégorisés en utilisant un seuil se situant en dessous d'une valeur de Ct de 30 a révélé une concordance parfaite entre la méthode de référence de l'UPL et le VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit.
- Lors de l'analyse d'échantillons de tissus, le génome du virus de la PPA a été détecté par la méthode PCR de l'UPL et par le kit PCR VetMAX™ dans 100 % des échantillons testés, révélant une concordance de 100 % entre les deux méthodes.

Reproductibilité

La robustesse de la méthode a été évaluée en vérifiant la capacité de la PCR à ne pas être affectée par des variations dans les paramètres critiques d'une réaction PCR :

Test 1 : température d'hybridation +/- 1 °C

Test 1 : durée d'hybridation +/- 10 %

Test 3 : volume du mélange de produits PCR +/- 10 %

Test 4 : volume d'ADN +/- 10 %

Le kit VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit a réussi les essais de robustesse.

L'analyse d'un panel unique constitué de 15 échantillons biologiques (11 positifs et 4 négatifs, caractérisés par une méthode du CISA-INIA ; panel de 15 échantillons de référence, inactivés et lyophilisés) par le laboratoire Thermo Fischer et par le laboratoire CISA-INIA Valdeolmos en utilisant le VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit a donné les résultats suivants : coefficients de variation (CV) des valeurs de Ct produites par les 15 échantillons compris entre 2,75 et 7,20 %.

Le kit a fourni des résultats qualitatifs cohérents qui n'ont pas été affectés par les facteurs environnementaux.

Applications

Le VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit est utilisé pour le diagnostic du virus de la peste porcine africaine (VPPA).

Il est destiné à un usage exclusivement vétérinaire et exclusivement *in vitro*.

Références

Tignon M. *et al.* (2011). Development and inter-laboratory validation of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African Swine Fever virus. *Journal of Virological Methods*, **178** (1-2): 161-170.

Gallardo C. *et al.* (2015). Assessment of African Swine Fever diagnostic techniques as a response to the epidemic outbreaks in Eastern European Union countries: How to improve surveillance and control programs. *Journal of Clinical Microbiology*, **53**(8): 2555-2565.

OIE. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 2019 – Chapter 3.8.1. African Swine Fever.

