



**Agence Fédérale
pour la sécurité
de la Chaîne alimentaire**

BU PT Schemes
Laboratoire fédéral pour la
Sécurité alimentaire
Chaussée de Namur, 22
B-5030 Gembloux

Tel. +32 (0)81 62 03 00
Fax +32 (0)81 62 03 01

BUPTSchemes@afsca.be
www.afsca.be

RAPPORT D' ESSAI INTER-LABORATOIRE

Détection des norovirus GI et GII et du virus de l'hépatite A dans une matrice végétale (oignons)

02-2015-A

Rapport final

Validé le 24/02/2016 par Alain Dubois, Coordinateur

*Ce document est confidentiel et destiné à l'usage unique des laboratoires participants. La BU PT Schemes décline toute responsabilité quant à l'utilisation que pourront faire les détenteurs dudit document, les destinataires de ce rapport étant les seuls responsables de son exploitation et de sa diffusion.
La reproduction de ce rapport n'est autorisée que sous sa forme intégrale. Il comporte 6 pages.*



TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	3
2. ORGANISATION ET PROGRAMME.....	3
3. PROCEDURE ET METHODE D'ANALYSE	4
4. EVALUATION DES PERFORMANCES	4
5. RESULTATS.....	4
5.1. Légende	4
5.2. Résultats	5
6. LISTE DES PARTICIPANTS (PAR ORDRE ALPHABETIQUE)	6
7. REMERCIEMENTS	6

1. INTRODUCTION

Dans le cadre de l'accréditation de la section Virologie pour l'analyse des norovirus GI et GII et du virus de l'hépatite A dans différentes matrices alimentaires, le LFSAGx a souhaité participer à un essai-interlaboratoire sur une matrice légume. Ce type d'essai n'était pas proposé par les organisateurs commerciaux. Selon la norme ISO 17043, l'organisateur d'un essai inter-laboratoire peut sous-traiter toutes les étapes de l'organisation à l'exception de la planification de l'essai, de l'évaluation de la performance et de l'autorisation du rapport final. La BU PT Schemes a donc contacté le fournisseur de kit analytique du LFSAGx (Ceeram) pour étudier la possibilité d'en organiser un en partenariat.

2. ORGANISATION ET PROGRAMME

En mai 2015, le Ceeram a marqué son accord à la condition de limiter le nombre de participants pour ce premier essai.

La BU PT Schemes, en charge de la gestion des essais inter-laboratoires à la DG Laboratoires de l'AFSCA, a proposé au Laboratoire National de Référence en virologie (WIV-ISP, Lab of Foodpathogens) de participer à cet essai. Le LNR a donné son accord en juin 2015.

Pour des questions organisationnelles, l'essai a été planifié en automne 2015.

La matrice choisie par les participants était l'oignon.

Les échantillons (4 x 25 g d'oignons hachés) ont été contaminés artificiellement en Norovirus (NoV) GI, GII et virus de l'hépatite A (HAV) dans le laboratoire Ceeram.

Les contaminations ont été réalisées en utilisant des selles positives en Norovirus et du virus HAV issu de surnageant de culture. Les échantillons d'oignons ont été contaminés comme suivant :

Référence échantillon	NoVGI (copies/échantillon)	NoVGII (copies/échantillon)	HAV (copies/échantillon)
1	5000	Négatif	Négatif
2	1000	500	5000
3	500	1000	1000
4	négatif	5000	500

L'objectif de cet essai interlaboratoire était de comparer les résultats obtenus par les participants par rapport aux contaminations théoriques.

Le Ceeram a analysé les 4 échantillons et les 2 autres participants, 2 échantillons (LFSAGx, échantillons 1 et 2 ; WIV-ISP, échantillons 3 et 4).

Pour des raisons logistiques, les 4 échantillons ont été envoyés ensemble au LFSAGx.

Les échantillons sont arrivés congelés (colis réfrigéré sous carboglace) au LFSAGx le 30/09/2015. Ils ont été directement transférés au congélateur. Le WIV-ISP a été immédiatement prévenu par mail de leur arrivée et est venu chercher ses échantillons le lendemain.

Le WIV-ISP a transmis ses résultats au Ceeram le 23/10/2015 et le LFSAGx le 05/11/2015.

Le bilan de l'essai a été envoyé par le Ceeram aux participants le 23/11/2015.



3. PROCEDURE ET METHODE D'ANALYSE

L'analyse consistait en l'extraction des particules virales de la matrice suivie d'une extraction des acides nucléiques et de leur amplification par RT-PCR. Chaque laboratoire a utilisé sa méthode analytique, reprise ci-dessous (comme renseignée par les participants).

Méthode Ceeram :

- Extraction du virus : Analyse selon la norme XP CEN ISO/TS 15216 ;
- Extraction des acides nucléiques : Analyse selon la norme XP CEN ISO/TS 15216 : Extraction sur Minimag (Biomérieux) en utilisant les réactifs NucliSens avec optimisation Ceeram sur la phase de lyse de la capsid virale ;
- PCR : selon protocole ceeramTools + ABI 7500 fast.

Méthode LFSAGx :

- Extraction du virus : basée sur la norme ISO 15216-2 ;
- Extraction des acides nucléiques : kits Biomérieux ;
- PCR : kits Ceeram.

Méthode WIV-ISP :

- Extraction du virus : basée sur la norme ISO 15216-2 (vegetables), on 25 g followed exact the procedure described in the ISO ;
- Extraction des acides nucléiques : Minimag (Biomerieux) ;
- PCR : Surefast Norvirus Hepatitis A 3 plex kit (R-Biopharm);
- GI/GII Ceeram detection kit, HAV Ceeram detection kit, Mengo control kit Ceeram.

4. EVALUATION DES PERFORMANCES

Les participants devaient transmettre la valeur du rendement d'extraction (calculé sur le virus Mengo) et les valeur de Ct pour chaque virus sur l'extrait original et dilué (10x). Chaque virus était considéré comme non détecté lorsque le nombre de cycles maximum était atteint sans détection d'un signal significatif (pas de fluorescence au-dessus de la ligne de base).

5. RESULTATS

5.1. Légende

Terme	Définition
NoVGI	Norovirus GI.
NoVGII	Norovirus GII.
HAV	Virus de l'hépatite A.
% rdt Mengo	Rendement d'extraction du virus Mengo exprimé en pourcentage.
Ct	Cycle threshold value (= point de franchissement du cycle seuil) : point de la courbe d'amplification à partir duquel le signal de fluorescence s'élève au-dessus de la ligne de base ou franchit un seuil prédéfini.



5.2. Résultats

Les résultats obtenus par le Ceeram et les participants sont repris dans le tableau ci-dessous. Les résultats non-conformes sont indiqués en rouge.

Participants		Ceeram							LFSAGx								
Matrice	Echantillons	% rdt Mengo	Valeurs Ct Ceeram						% rdt Mengo	Valeurs Ct						Valeurs Ct Surefast R-biopharm Noro - HAV	
			NoVGI		NoVGII		HAV			NoVGI		NoVGII		HAV			
			Pur	Dilué	Pur	Dilué	Pur	Dilué		Pur	Dilué	Pur	Dilué	Pur	Dilué		
Oignons congelés	1	5,3	38,37	39,34	ND	ND	ND	ND	13,77	35,05	39,07	N/A	N/A	N/A	N/A		
			38,32	39,50	ND	ND	ND	ND									
	2	3,8	37,51	38,59	38,07	ND	35,51	ND	0,30	36,72	38,60	N/A	N/A	32,91	36,98		
			38,61	ND	37,09	ND	36,20	ND									
				Ceeram						WIV-ISP							
	3	6,4	38,95	40,00	36,51	ND	37,44	37,60	0,06	ND	ND	35,2	ND	37,43	ND	36,51	37,6
			39,47	ND	38,35	ND	37,77	ND		ND	ND	ND	ND	ND			
	4	5,6	ND	ND	34,21	ND	37,00	ND	0,06	ND	ND	ND	32,48	ND	ND	Inhibition no signal	35,88
			ND	ND	35,19	ND	36,59	ND		ND	ND	ND	33,46	ND	ND		

ND Ceeram = non détecté (pas de fluorescence au-dessus de la ligne de base jusqu'au 40^e cycle).

N/A LFSAGx = non détecté, nombre de cycle : 40 ; ND WIV-ISP = non détecté.

Commentaires du Ceeram :

Le rendement Mengo doit être supérieur à 1%, ceci est un critère défini dans la norme ISO/TS 15216.

Les résultats obtenus avec un rendement inférieur à 1% ne sont pas conformes aux exigences de la norme ISO/TS 15216. De plus, la détection des cibles recherchées dans les échantillons avec un rendement Mengo inférieur à 1% est aléatoire.

Commentaires des participants :

WIV-ISP : The recovery is very low <1% but the extraction could not be repeated because no sample anymore.

500 copies/25 g est la limite de détection théorique de notre méthode ce qui explique pourquoi nous n'avons pas pu le détecter.



Les résultats de cet essai sont mitigés.

Les résultats non conformes sont, d'une part, dus au fait que les rendements d'extraction étaient sous la limite exigée par la norme (Echantillons 2 (LFSAGx), 3 et 4 (WIV-ISP)) et, d'autre part, parce que le nombre de copies de particules virales se trouvait à la limite de détection des méthodes analytiques (500 copies) (Echantillon 2 – NoVGII (LFSAGx), échantillon 3 – NoVGI (WIV-ISP), échantillon 4 – HAV (WIV-ISP)).

Bien que les rendements d'extraction aient été trop faibles, les participants ont néanmoins pu détecter les virus lorsque leur concentration était plus importante :

- LFSAGx, échantillon 2, NoVGI et HAV ;
- WIV-ISP, échantillon 3, NoVGII et HAV et échantillon 4 NoVGII.

Selon la norme, ces résultats sont considérés comme utilisables en pratique.

Ceci témoigne d'une certaine « robustesse » des méthodes utilisées.

Ces résultats montrent également la difficulté de mise en œuvre de ces méthodes et l'utilité de ces essais pour démontrer leur bonne application.

Le kit multiple utilisé en parallèle par le WIV-ISP semble performant.

6. LISTE DES PARTICIPANTS (PAR ORDRE ALPHABETIQUE)

Ceeram, La Chapelle Sur Erdre – France.

AFSCA - LFSAGx - Section Virologie, Gembloux - Belgique

WIV-ISP - Lab of Foodpathogens, Bruxelles - Belgique

7. REMERCIEMENTS

La BU PT Schemes remercie le Ceeram pour la réalisation de toute la partie préparation et la collecte des résultats de cet essai. Elle remercie également le WIV-ISP – Lab of Foodpathogens pour sa participation à cet essai.