

# Adia<sup>X</sup> Vet

Notice d'utilisation  
ADI283-AIV\_NO\_(FR)\_V01  
11/2022

## AIV REAL TIME

Référence : ADI283-100 & ADI283-500

Test pour la détection du Virus de l'Influenza Aviaire par amplification enzymatique de gène en temps réel

Test PCR – 100 & 500 réactions

### Usage *in vitro* et strictement vétérinaire



Echantillon	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Ecouvillon (trachéal, oropharyngé, cloacal...)	✓	5
Tissu (foie-rate-rein-pancréas-cœur, intestin, poumon-trachée, encéphale)	✓	5
Prélèvement environnemental (chiffonnette, pédi-chiffonnette)	✓	✗
Plume	✓	5
Fiente	✓	✗
Carte FTA	✓	✗
Culture/liquide allantoidien	✓	✗

\* Dépend de la situation épidémiologique, de la qualité de l'échantillon et des directives spécifiques qui existent dans certains pays (s'y référer). Pour la recherche du virus Influenza aviaire, les matrices utilisables, leurs traitements et la préparation des pools d'échantillon sont définies selon le domaine d'application (se référer aux recommandations du LNR et de la DGAL).

## Composition du kit

Matériel fourni		Kit ADI283	
		100 réactions	500 réactions
A5	Solution d'amplification	2 x 1000 µL tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)	10 x 1000 µL tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
AIV CTL+	Contrôle positif AIV	1 tube à bouchon violet (200 µL après reconstitution)	1 tube à bouchon violet (200 µL après reconstitution)
EPC-Ext	Contrôle exogène non-cible d'extraction	1 x 1250 µL tube à bouchon jaune (Réactif prêt à l'emploi)	2 x 1250 µL tubes à bouchon jaune (Réactif prêt à l'emploi)
NF-Water	Eau Nucléase Free	1 x 1000 µL tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)	1 x 1000 µL tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

## Historique de révision

Date	Version	Modifications
01/2020	NF283-10	
11/2022	V01	Passage au format simplifié. Modification de la composition du kit : Ajout d'un contrôle exogène non-cible d'extraction (EPC-Ext) pour les prélèvements environnementaux ou les prélèvements d'oiseaux sauvages et exotiques. Suppression du contrôle négatif « AIV CTL - ».

Note : les modifications mineures concernant la typographie, la grammaire et la mise en forme ne sont pas incluses dans l'historique des révisions.

## A. Introduction

Les virus de la grippe appartiennent au genre Influenza virus de la famille des Orthomyxoviridae. Ils affectent les volailles, les porcs, les chevaux et d'autres mammifères.

La grippe aviaire est provoquée par des virus Influenza de type A, notamment les sous-types H5, H7 et H9. Ces souches sont classées en deux catégories, faiblement pathogène (IAFP) ou hautement pathogène (IAHP).

Tous les H5/H7 (IAHP ou IAFP) sont à déclaration obligatoire au WOA. Les autres virus influenza ne sont pas à déclaration obligatoire. Le virus AIV se dissémine par contact direct (oiseau à oiseau) mais aussi par contact indirect avec le matériel ou les équipements contaminés. Le virus est excrété dans les fèces des oiseaux infectés et par les sécrétions du tractus respiratoire.

## B. Principe du test

Le test ADIAVET™ AIV REAL TIME repose sur la transcription réverse (RT) de l'ARN en ADN complémentaire. Cette réaction est suivie de l'amplification génique de fragments d'ADN spécifiques du Virus de l'Influenza Aviaire. Il détecte simultanément en monocouple :

- AIV (sonde marquée en FAM)
- GAPDH un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ADN endogène (sonde marquée en HEX ou équivalent).

Le test amplifie une séquence du gène M spécifique des Influenzae Virus, la composition inclut les sondes et amorces publiées par Avian Influenza Community Reference Laboratory in « Detection of influenza A matrix gene by real time Taqman® RT-PCR »

## C. Conditions de stockage

A réception, le kit doit être stocké à <-15 °C jusqu'à la date de péremption du kit.

Il est recommandé d'aliqoter le réactif « A5 » si le nombre d'analyses à effectuer nécessite plus de trois décongelations.

Ne pas décongeler plus de 3 fois.

Stocker à l'abri de la lumière.

Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.

## D. Matériel supplémentaire et réactifs requis non fournis

- Thermocycleur avec son consommable pour PCR Temps réel
- Appareil d'homogénéisation pour tubes
- Pipettes de 1 - 10 µL, 20 - 200 µL et 200 - 1000 µL
- Embouts Nucléase-free avec filtres pour micropipettes
- Microtubes Nucléase-free de 1,5 mL et 2 mL
- Gants latex ou nitrile non poudrés
- Eau Nucléase-free
- Kit d'extraction des acides nucléiques

### Kits complémentaires pour Adoption de méthode et PCR (U47-600)

- **Extraction Positive Control AIV&H5-H7 (Réf. : ADC28EPC).** Matériel de référence fournisseur pour sentinelle (Calibré entre 1 et 100xLD<sub>Méthode</sub>).
- **LD<sub>PCR</sub> Positive Control – AIV (Réf. : ADC28LD)** Confirmation des performances – LD<sub>PCR</sub> du kit.

## E. Précautions d'utilisation et de sécurité

- Pour usage vétérinaire *in vitro* uniquement.
- Pour usage animal uniquement.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Lire l'ensemble du protocole avant de commencer et le respecter scrupuleusement.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption du kit.
- Ne pas utiliser les réactifs dont l'emballage est détérioré.
- Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.
- Ne pas ouvrir les tubes PCR après amplification.
- Éliminer le matériel utilisé en respectant la législation en vigueur en matière de protection de l'environnement et de gestion des déchets biologiques.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer ; ne pas inhaler).

## F. Extraction des acides nucléiques

Pour la recherche du virus Influenza, les matrices utilisables, leurs traitements et la préparation des pools d'échantillon sont définis selon le domaine d'application : se référer aux recommandations du LNR et de la DGAL.

- Dans le cadre des analyses officielles par un laboratoire agréé par le ministère chargé de l'Agriculture, à partir d'échantillons cloacaux, trachéaux, oropharyngés ou d'organes provenant d'oiseaux sauvages ou captifs ou de volailles.
- Dans le cadre des analyses d'autocontrôle réglementaire par un laboratoire reconnu par le ministère chargé de l'Agriculture, à partir d'échantillons cloacaux, trachéaux ou oropharyngés provenant de volailles.
- Hors analyses officielles et d'autocontrôles à partir d'autres prélèvements pour la recherche ou étude épidémiologique.

### 1. Kits d'extractions

Les acides nucléiques doivent être extraits à partir des échantillons avant d'utiliser le kit. Les kits d'extraction ADN/ARN listés ci-dessous sont recommandés et fournis par Bio-X Diagnostics :

Nom du produit	Technologie d'extraction	Nombre de tests et référence
ADIAMAG	Billes magnétiques	200 tests : réf. NADI003 800 tests : réf. NADI003-XL

Pour l'extraction, se référer à la version de notice disponible sur le site web, indiqué sur le certificat d'analyse inclus dans le kit PCR utilisé.

Les protocoles d'extraction validés sont décrits dans le dossier de validation du kit. D'autres kits d'extraction peuvent être utilisés après validation par l'utilisateur.

Après extraction, les acides nucléiques extraits peuvent être conservés sur glace ou à +4/8° C si utilisation immédiate. Pour une conservation plus longue, ils doivent être conservés à une température inférieure à -15 °C ou -65 °C.

### 2. Témoins

L'emploi de témoins permet de contrôler la fiabilité des résultats. Les témoins sont inclus par série d'analyse selon les recommandations définies par les normes en vigueur (Cf. AFNOR U47-600...).

Contrôles	Validation de	Mode opératoire
Témoin réactif (NTC)	Absence de contamination pour l'amplification	5 µL NF-Water dans un puits par série PCR
AIV CTL+	Amplification de la cible AIV et de l'IPC	5 µL CTL+ dans un puits par série PCR
Témoin négatif d'extraction	Absence de contamination pour l'extraction et l'amplification	1 extraction (eau ou tampon de lyse) par série d'extraction
Témoin positif d'extraction	Etapas d'extraction et d'amplification	1 extraction (Echantillon positif entre 1 et 100X LD <sup>Méthode</sup> ) par série d'extraction

## G. Mode opératoire

### 1. Utilisation de l'EPC-Ext

L'EPC-Ext doit être ajouté dans les prélèvements environnementaux (chiffonnette, pédichiffonnette) ou les prélèvements d'oiseaux sauvages et exotiques (autres que poules, dinde, canard, oie, faisán).

Aliquoter et conserver cette solution à <-15 °C en fonction de la taille des séries d'extraction. Les aliquotes ne doivent pas subir plus de 3 décongelations.

Pour chaque extraction, ajouter **5 µL** d'EPC-Ext par échantillon dans le premier tampon de lyse.

### 2. Préparation du contrôle CTL+

Ajouter **200 µL** de « NF-Water » par tube.

Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex > 20 secondes jusqu'à dissolution complète du culot bleu.

Après reconstitution, aliquoter et stocker la solution à une température inférieure à -15 °C jusqu'à la date de péremption du kit. Ne pas décongeler plus de 3 fois.

Pour chaque analyse, utiliser **5 µL** du CTL+ dans un des puits dédiés (se reporter au § « Amplification », Etape 2).

### 3. Amplification

#### Attention :

- Avant de commencer, décongeler les réactifs à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Homogénéiser tous les réactifs et échantillons avant utilisation.
- Replacer les réactifs à une température inférieure à -15 °C, après distribution.
- Les étapes critiques de la réaction sont le volume réactionnel et la température d'hybridation – élongation. La robustesse du kit a été vérifiée pour une variation de la température d'hybridation de 60 +/- 1 °C et de la prise d'essai de 5µL +/- 10 %.

#### Étape 1 :

Répartir **20 µL** de réactif d'amplification A5 dans chaque puits PCR.

**Étape 2 :** Distribuer **5 µL** d'acides nucléiques extraits des échantillons et **5 µL** de contrôles dans chaque puits dédié.

Utiliser le NF-Water pour le témoin réactif.

**Étape 3 :** Fermer les puits avec un film ou des barrettes adaptés.

**Étape 4 :** Démarrer l'analyse PCR.

Le programme suivant a été développé pour les appareils ABI Prism (type 7500, QuantiStudio5, Step-one...) d'Applied Biosystems, pour les Mx3000 et Mx3005P, AriaMx d'Agilent, pour les LightCycler de Roche Diagnostics, pour le Rotor-Gene Q de Qiagen, pour le CFX96 et Chromo 4 de Biorad, pour le MIC de BioMolecular System.

Programme ARN standard	
10 min. 45 °C	
10 min. 95 °C	
15 sec. 95 °C*	40 cycles
60 sec. 60 °C**	

\*30 sec. 95 °C pour Mx3000 et Mx3005P

\*\*Lecture et paramètres pour l'acquisition de la fluorescence :

Fluorochrome	Absorbance (nm)	Emission (nm)
FAM	494	520
HEX ou équivalent	530	549
ROX	575	602

**Note :** Le Quencher est non fluorescent. Le mélange contient une référence passive lue dans le spectre du ROX pour les appareils ABI Prism.

Contactez votre représentant commercial ou le service client pour tout autre modèle de thermocycleur.

## H. Interprétation des résultats

Afficher l'ensemble des courbes et positionner la ligne de seuil pour chaque fluorochrome.

### 1. Validation de l'essai

L'amplification est valide si les résultats suivants sont obtenus.

Les valeurs indicatives de Ct (Threshold Cycle) attendues pour le CTL+ sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

Contrôles	Amplification		Validation de
	FAM	HEX ou équivalent	
Témoin réactif (NTC)	Non	Non	Absence de contamination pour l'amplification
AIV CTL+	Oui	Oui	Amplification de la cible et de l'IPC
Témoin négatif d'extraction	Non	Oui/Non	Absence de contamination pour l'extraction
Témoin positif d'extraction	Oui	Oui/Non	Etapas d'extraction et d'amplification

### 2. Interprétation des résultats

L'extraction des acides nucléiques et l'amplification sont **valides** pour chacun des échantillons si au moins une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM et/ou HEX ou équivalent.

Amplification		Interprétation
FAM	HEX ou équivalent	
Non	Oui	Non détecté
Oui	Oui	Détecté
Oui	Non	Détecté
Non	Non	Ininterprétable

« **Ininterprétable** » : absence de courbe d'amplification caractéristique.

**Causes possibles :**

PCR défectueuse (présence d'inhibiteurs, erreur de programme, absence d'échantillon ou échantillon trop dégradé) et/ou Déficience de l'extraction des acides nucléiques (perte ou destruction des acides nucléiques).

**Actions conseillées :**

Refaire la PCR avec l'extrait des acides nucléiques pur et dilué au 1/10<sup>ème</sup> en eau Nucléase-free ;

Refaire l'extraction des acides nucléiques si le test n'est toujours pas valide ou redemander un autre prélèvement.

## Références bibliographiques

---

- Detection of influenza A matrix gene by real time Taqman® RT-PCR, Avian Influenza Community Reference Laboratory. SOP VI 493 edition 14

## Table des symboles

---

Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limite supérieure de température
	Utiliser jusque
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour "n" tests
	Pour usage vétérinaire <i>in vitro</i> uniquement – Pour usage animal uniquement
	Conserver à l'abri de la lumière

1 | Extraire les acides nucléiques avec

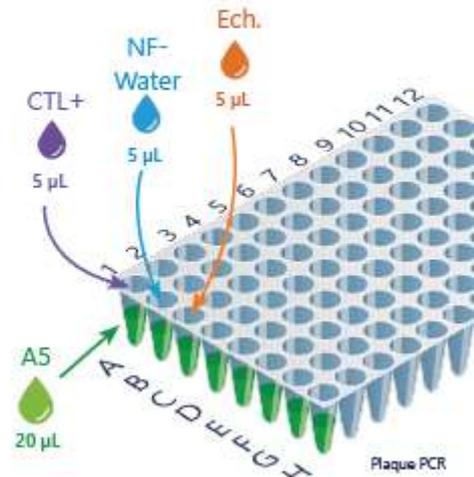
**Adia<sup>X</sup>  
Mag**



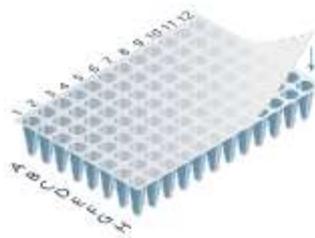
Scan me to discover Adiamag™

2 | Répartir 20 µL de réactif d'amplification A5

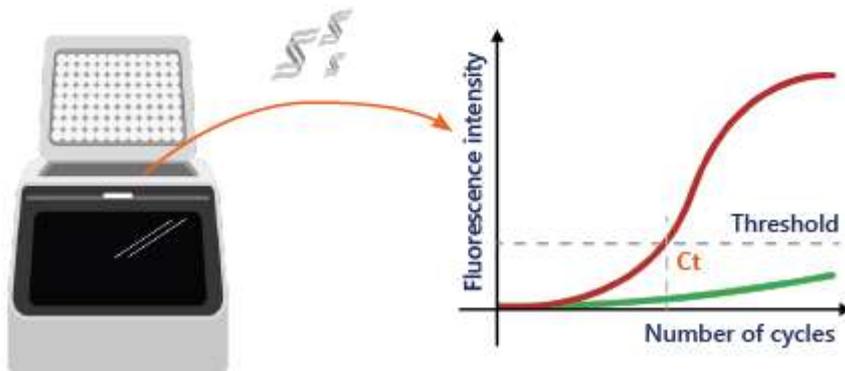
3 | Distribuer 5 µL d'acides nucléiques, CTL+ et NF-Water



4 | Sceller les puits



5 | Démarrer l'analyse PCR



\* Les notes ne se substituent pas au mode d'emploi dont elles sont une synthèse.