

## AIV H5-H7 REAL TIME

Référence : ADI531-100

Test pour la détection des sous-types H5 et H7 du virus de l'influenza aviaire par amplification enzymatique de gène en temps réel

Test PCR – 100 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, pédichiffonnette)              | ✓                    | ✗                                     |
| Plume   | ✓                    | 5                                     |
| Fiente  | ✓                    | ✗                                     |
| Carte FTA   | ✓                    | ✗                                     |
| Culture/liquide allantoïdien  | ✓                    | ✗                                     |

\* 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 ADI531   |
|-----------------|---|--|
|                 |   | 100 réactions  |
| A5              | Solution d'amplification                | 2 x 1000 µL tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi) |
| H5-H7 CTL+      | Contrôle positif AIV H5 & H7            | 1 tube à bouchon violet (200 µL à reconstituer)            |
| EPC-Ext         | Contrôle exogène non-cible d'extraction | 1 x 1250 µL tube 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) |

### Historique de révision

| Date    | Version  | Modifications   |
|---------|----------|---|
| 01/2020 | NF531-03 |   |
| 11/2022 | V01      | Passage au format simplifié<br>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. |

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 WOAH. 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 H5-H7 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 de des sous types H5 et H7 du virus de l'Influenza Aviaire. Il détecte simultanément en monocupule :

- Le sous-type H5 du Virus de l'influenza aviaire (sonde marquée en FAM).
- Le sous-type H7 du Virus de l'influenza aviaire (sonde marquée en Cy5).
- 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 HA2 spécifique des Influenzae Virus sous-types H5 et H7, la composition inclus les sondes et amorces publiées par Avian Influenza Community Reference Laboratory in « Eurasian H5 avian influenza Realtime PCR » et « H7 Eurasian RealTime PCRs for the detection and pathotyping of Eurasian H7 avian influenza isolates ».

Afin de garantir la spécificité qui a été démontrée par le LRUE, le programme thermique RT-PCR utilisé pour ce kit est réalisé avec une température d'hybridation et d'élongation à 54°C.

## 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>).
- **LDpcr Positive Control – AIV H5-H7 (Réf. : ADC53LD)** Confirmation des performances – LDpcr 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'écouvillons 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'écouvillons 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<br>800 tests : réf. NADI003-XL |

Pour l'extraction, se référer à la version de notice disponible sur le site web, indiquée 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 +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  |
| H5-H7 CTL+                  | Amplification des cibles H5, H7 et 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 53 à 60 °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, QuantStudio5, 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 54 °C |           |
|---------------------|-----------|
| 10 min. 45 °C       |           |
| 10 min. 95 °C       |           |
| 15 sec. 95 °C*      | 40 cycles |
| 60 sec. 54 °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           |
| Cy5               | 646             | 662           |
| 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           | Cy5 | HEX ou équivalent |   |
| Témoin réactif (NTC)        | Non           | Non | Non               | Absence de contamination pour l'amplification |
| H5-H7 CTL+                  | Oui           | Oui | Oui               | Amplification des cibles H5 et H7             |
| Témoin négatif d'extraction | Non           | Non | Oui/Non           | Absence de contamination pour l'extraction    |
| Témoin positif d'extraction | Oui           | 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, Cy5 et/ou HEX ou équivalent.

| Amplification |     |                   | Interprétation  |                 |
|---------------|-----|-------------------|-----------------|-----------------|
| FAM           | Cy5 | HEX ou équivalent | H5              | H7              |
| Non           | Non | Oui               | Non détecté     | Non détecté     |
| Oui           | Oui | Oui/Non           | Détecté         | Détecté         |
| Oui           | Non | Oui/Non           | Détecté         | Non détecté     |
| Non           | Oui | Oui/Non           | Non détecté     | Détecté         |
| Non           | Non | Non               | Ininterprétable | 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

---

- Protocol LRUE "H7 Eurasian RealTime PCRs for the detection and pathotyping of Eurasian H7 avian influenza isolates »  
Reference SOP VI. 536 edition 4 11/04/07
- Protocol LRUE « Eurasian H5 avian influenza Realtime PCR »  
Reference SOP VI792 edition 11

## 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 –<br>Pour usage animal uniquement |
|  | Conserver à l'abri de la lumière  |

1 | Extraire les acides nucléiques avec

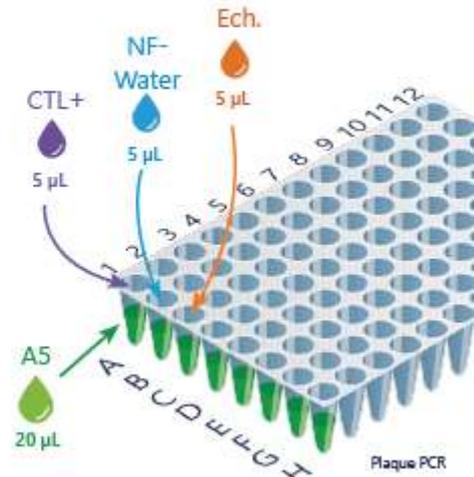
**Adia<sup>X</sup>  
Mag**



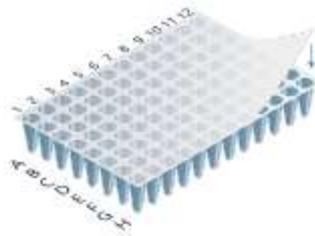
Scan me to discover Adiamag™

2 | Répartir 20 µL de réactif d'amplification A5

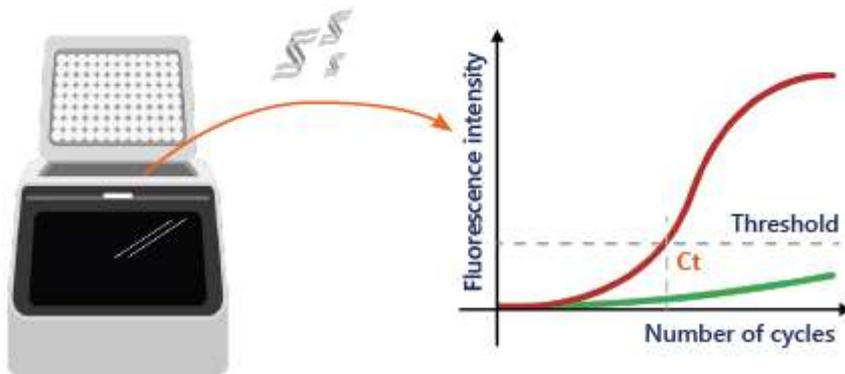
3 | Distribuer 5 µL d'acides nucléiques, CTL+ et NF-Water



4 | Sceller les puits



5 | Démarrer l'analyse PCR



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