

FLU A

Référence : ADL28Y1-100

Test pour la détection du virus Influenza A par amplification enzymatique de gène en temps réel
Test PCR –100 réactions

Usage *in vitro* et strictement vétérinaire



Espèce	Echantillon	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
	Ecouvillon (Cloacal, trachéal, oropharyngé)	✓	10
	Tissu (foie-rate-rein-pancréas-cœur, intestin, poumon-trachée, encéphale)	✓	10
	Plume	✓	
	Fientes	✓	
	Prélèvement environnemental (chiffonnette)	✓	
	Ecouvillon nasal	✓	5
	Tissu	✓	
	Lavage trachéo-bronchique	✓	
	Fluides oraux	✓	
	Prélèvement environnemental	✓	
	Ecouvillon nasal	✓	
	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).

Composition du kit

Matériel fourni		Kit ADL28Y1 100 réactions
A6	Solution d'amplification	1 flacon lyophilisé (1000 µL après reconstitution)
Rehydration buffer	Solution de réhydratation	1 x 6 mL flacon (Réactif prêt à l'emploi)
FLU A CTL+	Contrôle positif Influenza A	1 tube à bouchon violet (200 µL après reconstitution)
EPC-Ext	Contrôle exogène non-cible d'extraction ou d'amplification	1 flacon à bouchon jaune (1000 µL après reconstitution)
NF-Water	Eau Nucléase Free	2 x 1000 µL tubes à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

Historique de révision

Date	Version	Modifications
06/2022	V01	Création
09/2022	V01	Correction du tableau « Programme ADN/ARN »
01/2023	V02	Modification du conditionnement du kit (100 réactions au lieu de 200 réactions) Ajout matrices « Prélèvements environnementaux »

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 grippaux de type A, notamment les sous-types H5, H7 et H9. Ces souches sont classées en deux catégories, faiblement pathogène ou hautement pathogène. Tous les H5/H7 sont à déclaration obligatoire auprès de l'OIE.

Chez le porc, trois sous-types H1N1, H3N2 et H1N2 peuvent être retrouvés. Ils sont enzootiques en Europe.

Chez les chevaux ce sont les sous-type H3N8, et H7N7, qui sont retrouvés.

Le test ADIALYO™ FLU A amplifie une séquence conservée du gène M spécifique des Influenzae Virus et ainsi détecte tous les sous-types trouvés chez les animaux.

B. Principe du test

Le test ADIALYO™ FLU A 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 Influenza A. Il détecte simultanément en monocouple :

- Virus Influenza A (sonde marquée en FAM).
- Un contrôle interne d'extraction et/ou d'amplification d'ARN exogène (sonde marquée en HEX ou équivalent).

C. Conditions de stockage

A réception, stocker le kit à +2/8 °C et au sec.

Les réactifs reconstitués doivent être aliquotés et stockés à une température inférieure à -15 °C jusqu'à la date de péremption du kit. Stocker à l'abri de la lumière.

Ne pas décongeler plus de 3 fois.

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 (Réf. : ADC28EPC).**
Matériel de référence fournisseur utilisé comme sentinelle (Calibré entre 1 et 100xLD_{Méthode})
- **LDpccr Positive Control FLU A (Réf. : ADC28YLD)**
Confirmation des performances – LDpccr 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 inhaler ; ne pas inhaler).

F. Extraction des acides nucléiques

Pour la recherche du virus Influenza aviaire, les matrices utilisables, leurs traitements et la préparation des mélanges 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.

Les données de caractérisation de la méthode commerciale à partir de prélèvements porcins et équins, communiquées dans le dossier de caractérisation soumis, n'ont pas été examinées dans le cadre du contrôle initial de conformité réalisé par le LNR IA.

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
ADIAPURE Lysis Flex ¹	Lyse directe à partir d'écouvillons aviaires	500 mL : réf. ADPLF1-500

¹Recommandé uniquement dans le cas d'étude de recherche ou d'étude épidémiologique.

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 à +2/8 °C pendant quelques heures avant utilisation. 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
FLU A CTL+	Amplification de la cible Influenza	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	Etapes d'extraction et d'amplification	1 extraction (Echantillon positif entre 1 et 100X LD _{Méthode}) par série d'extraction

G. Mode opératoire

1. Préparation de la solution d'amplification A6

- Ajouter **1000 µL** de « **Rehydration buffer** » par tube de A6.
- Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex > 20 secondes.
- 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 l'utilisation, se reporter au § « Amplification », Etape 1.

2. Préparation des contrôles

a. Utilisation de l'EPC-Ext

L'EPC-Ext est utilisé pour tous les échantillons et témoins.

- Ajouter **1000 µL** de « **NF-Water** » par tube.
- Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex > 20 secondes.
- 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 l'utilisation, 2 solutions sont possibles :
 - Soit ajouter **5 µL** d'EPC-Ext dans le premier tampon de lyse lors de l'extraction des acides nucléiques en billes magnétiques ou colonnes de silice.
 - Soit ajouter **0,5 µL** d'EPC-Ext dans chaque puits PCR (si utilisation d'extraction lyse directe). Se reporter au § « Amplification », Etape 1.

b. 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 la solution 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 °C +/- 1 °C et de la prise d'essai de 5 µL +/- 10 %.

Étape 1 :

Si ajout de l'EPC-Ext à l'étape d'extraction :

Répartir **10 µL** de réactif d'amplification A6 dans chaque puits PCR.

Si ajout de l'EPC-Ext à l'étape d'amplification :

Placer (n+1) x 10 µL de réactif d'amplification A6 dans un microtube et y ajouter (n+1) x 0,5 µL d'EPC-Ext. Répartir **10 µL** du mélange 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 5 µL de 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 ADN/ARN	
10 min. 45 °C	
2 min. 95 °C	
5 sec. 95 °C	40 cycles
30 sec. 60 °C*	

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

Fluorochrome	Absorbance (nm)	Emission (nm)
FAM	494	520
HEX ou équivalent	538	554
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/Oui*	Absence de contamination pour l'amplification
FLU A CTL+	Oui	Non/Oui*	Amplification de la cible
Témoin négatif d'extraction	Non	Oui	Absence de contamination pour l'extraction
Témoin positif d'extraction	Oui	Oui	Étapes d'extraction et d'amplification

*selon ajout ou non de l'EPC à l'étape 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^{ème} en eau Nucléase-free ;

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

Table des symboles

Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limite supérieure de température
	Utiliser jusqu'à
	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
	Conserver au sec

1 | Extraire les acides nucléiques avec

**Adia^X
Mag**



Scan me to discover Adiamag™

2 | Ajouter **1000 µL** de Rehydration buffer au réactif d'amplification **A6**

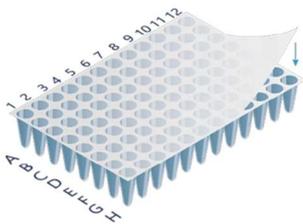


Si utilisation de l'EPC à l'étape d'extraction:

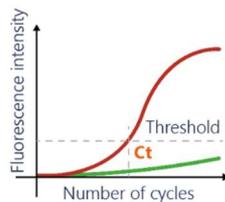
3 | Répartir **10 µL** de réactif d'amplification **A6**

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

5 | Sceller les puits

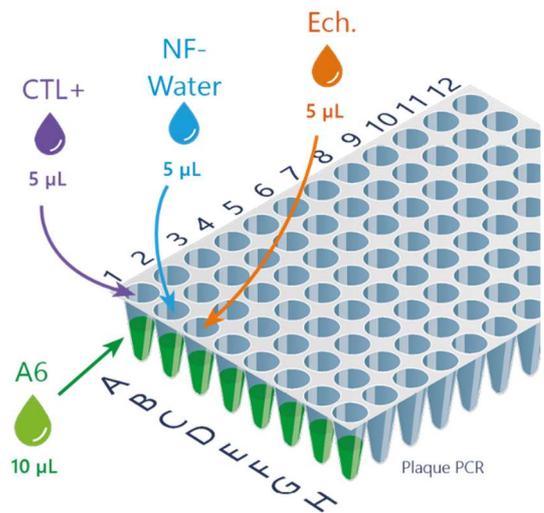


6 | Démarrer l'analyse PCR



Si non-utilisation de l'EPC à l'étape d'extraction:

3 | Préparer un prémélange de **10 µL** de réactif d'amplification **A6** + **0,5 µL** d'EPC
Répartir **10 µL** du prémélange



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