



AIV H9

Référence : ADL69Y1-100

Test pour la détection du virus Influenza Aviaire de type A sous-type H9 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 (cloacal, trachéal, oropharyngé)	✓	10
Tissu	✓	10
Plume	✓	
Fientes	✓	
Carte FTA	✓	
Culture/liquide allantoïdien	✓	
Prélèvement environnemental	✓	

* 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 ADL69Y1-100
		100 réactions
A6	Solution d'amplification	1 flacon lyophilisé (A reconstituer)
Rehydration buffer	Solution de réhydratation	1 x 6 mL flacon (Réactif prêt à l'emploi)
H9 CTL+	Contrôle positif Influenza A sous-type H9	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
EPC-Ext	Contrôle exogène non-cible d'extraction ou d'amplification	1 flacon à bouchon jaune (A reconstituer)
NF-Water	Eau Nucléase Free	2 x 1000 µL tubes à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

Historique de révision

Date	Version	Modifications
03/2023	V01	Création

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 A de la famille des Orthomyxoviridae. Les virus de l'influenza A du sous-type H9, en particulier H9N2, sont répandus dans la nature chez de nombreuses espèces d'oiseaux dans le monde entier, entraînant des pertes économiques importantes. Il existe de nombreux lignées H9N2 selon la situation géographique (Carnaccini et Perez, 2020). Le test ADIALYO™ AIV H9 amplifie une séquence du gène HA spécifique des virus influenza de sous-type H9. Le kit permet de détecter les lignées G1-like et Y439, retrouvés au Moyen-Orient et en Europe.

B. Principe du test

Le test ADIALYO™ AIV H9 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 Aviaire de type A sous-type H9. Il détecte simultanément en monocouple :

- Virus Influenza A sous-type H9 (sonde marquée en FAM).
- EPC-Ext : 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.

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).

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

- **Extraction Positive Control AIV H9 (Réf. : ADC69EPC).** Matériel de référence fournisseur utilisé comme sentinelle (Calibré entre 1 et 100xLD_{Méthode})
- **LDpcr Positive Control AIV H9 (Réf. : ADC69YLD)**
Confirmation des performances – LDpcr du kit.

F. Extraction des acides nucléiques

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	Lyse directe à partir d'écouvillon	500 mL : réf. ADPLF1-500

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.

D'autres kits d'extraction peuvent être utilisés après validation par l'utilisateur.

Après extraction, les acides nucléiques extraits peuvent être conservés 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
H9 CTL+	Amplification de la cible	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	Étapes d'extraction et d'amplification	1 extraction (Échantillon 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. Il est ajouté soit lors de l'étape d'extraction, soit lors de l'étape d'amplification.

- 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.
- Remplacer les réactifs à une température inférieure à -15 °C, après distribution.

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. 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.

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
H9 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-Ext à l'étape d'amplification.

c. 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	Influenza A sous-type H9
Non	Oui	Non détecté
Oui	Oui	Détecté
Oui	Non	Détecté
Non	Non	Non déterminé

« **Non déterminé** » : 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.

Références bibliographiques

- Silvia Carnaccini and Daniel R. Perez. H9 Influenza Viruses: An Emerging Challenge. Cold Spring Harb Perspect Med 2020.

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:

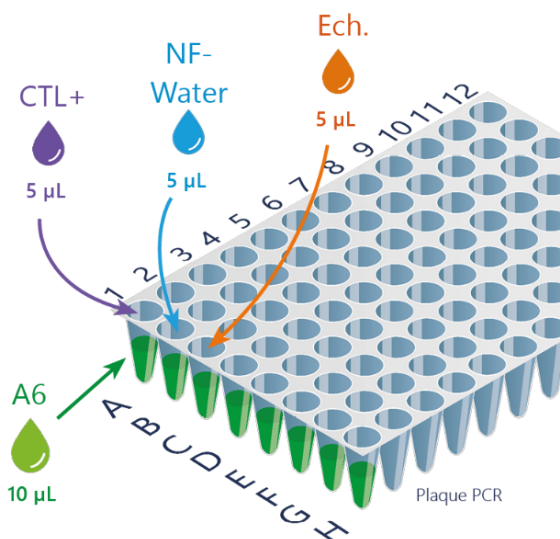
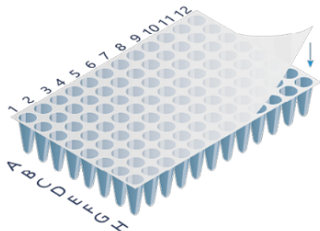
- 3 Répartir **10 µL** de réactif d'amplification **A6**

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

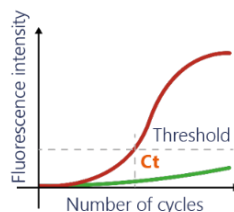
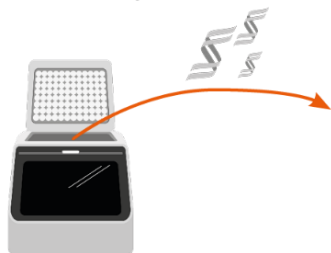
- 3 Préparer un prémélange de **10 µL** de réactif d'amplification **A6** + **0,5 µL** d'EPC
Répartir **10 µL** du prémélange

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

- 5 Sceller les puits



- 6 Démarrer l'analyse PCR



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