



Adia^X
Lyo

Notice d'utilisation
ADL65Y1-IBV_NO_(FR)_V01
01/2023

IBV

Référence : ADL65Y1-100

Test pour la détection du virus de la bronchite infectieuse 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)	✓	6
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 ADL65Y1 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)
IBV CTL+	Contrôle positif IBV	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
01/2023	V01	Première publication

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

La bronchite infectieuse est une maladie virale hautement contagieuse provoquant des problèmes respiratoires, de reproduction ou rénaux chez le poulet. Elle est principalement caractérisée par des signes respiratoires chez les poulets en croissance. Chez les poules, on peut observer une diminution de la production et de la qualité des œufs. Plusieurs souches du virus sont néphropathogènes et peuvent entraîner une néphrite interstitielle et la mort.

La maladie se transmet par voie aérienne, par contact direct entre poulet ou indirectement par propagation mécanique.

Le virus de la bronchite infectieuse (IBV) est un coronavirus appartenant au genre gammacoronavirus et à l'espèce Avian coronavirus. Le génome de l'IBV est constitué d'un ARN simple brin positif d'environ 27,5 kb.

Les souches vaccinales et sauvages d'IBV peuvent persister dans les amygdales caecales du tractus intestinal et être excrétées dans les fèces pendant des semaines ou plus chez les poulets cliniquement normaux.

B. Principe du test

Le test ADIALYO™ IBV repose sur la transcription inverse (RT) de l'ARN en ADN complémentaire. Cette réaction est suivie de l'amplification génique de fragments d'ADN spécifiques du virus de la bronchite infectieuse. Il détecte simultanément en monoculture :

- Virus de la bronchite infectieuse (IBV) (sonde marquée en FAM).
- Un contrôle interne exogène (sonde marquée en HEX ou équivalent) :
 - Soit d'extraction et d'amplification si l'EPC-Ext est ajouté à l'échantillon au cours de l'extraction des acides nucléiques.
 - Soit d'amplification si l'EPC-Ext est ajouté à la solution d'amplification.

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.
- Poste de Sécurité Microbiologique de type II.
- Centrifugeuse pour microtubes, tubes de 15 mL, plaque 96.
- 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.
- Tubes stériles de 5, 10 ou 15 mL.
- Gants latex ou nitrile non poudrés.
- Ethanol 96 -100 %.
- Eau déminéralisée stérile.
- Tampon PBS 1X (pH = 7,4).
- Kit d'extraction des acides nucléiques.

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

- **LD_{PCR} Positive Control – IBV (Réf. : ADC65YLD)**
Confirmation des performances – LD_{PCR} 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

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'écouvillons	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.

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 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
IBV CTL+	Amplification de la cible	5 µL CTL+
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 _{METHODE}) par série d'extraction

G. Mode opératoire

1. Préparation de la solution d'amplification A6

- Ajouter **1000 µL** de « **Rehydratation 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 doit être ajouté dans tous les échantillons et les témoins d'extraction.

- 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 utilisation de l'EPC-Ext à l'étape d'extraction :

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

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

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	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

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
IBV CTL+	Oui	Non/Oui *	Amplification de la cible
Témoin négatif d'extraction	Non	Non/Oui *	Absence de contamination pour l'extraction
Témoin positif d'extraction	Oui	Oui	Étapes d'extraction et d'amplification

*« Oui » si l'EPC-Ext a été ajouté lors de l'extraction ou avant l'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	IBV
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.

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:

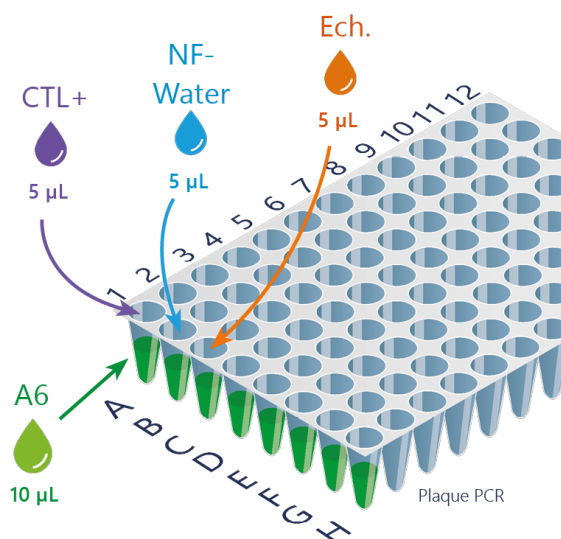
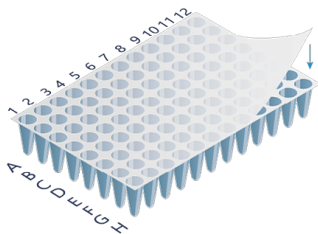
- 3 | Répartir **10 µL** de réactif
d'amplification **A6**

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

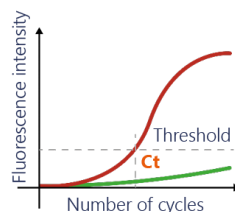
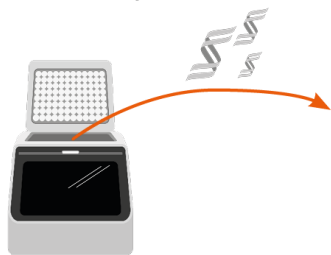
- 3 | Préparer un prémélange de **10 µL** de réactif
d'amplification **A6** + **0,5 µL** d'EPC
Répartir **10 µL** du prémélange

- 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.