Notice d'utilisation
ADL03Y1-ABPP_NO_(FR)_V01
01/2025

APP

Référence : ADL03Y1-100

Test pour la détection d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* 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
Biopsie/tissu	✓	3
Brossette/écouvillon	✓	3
Fluide oral	✓	✗
Culture bactérienne	✓	✗

* 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 ADL03Y1 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)
APP CTL+	Contrôle positif *Actinobacillus pleuropneumoniae*	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
NF-Water	Eau Nucléase Free	1 x 1000 µL tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

Historique de révision

Date	Version	Modifications
01/2025	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

Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) est l'agent étiologique de la pleuropneumonie hémorragique du porc ou actinobacillose. Cette maladie est à l'origine de pertes économiques dans de très nombreux élevages industriels.

Le sérotypage des souches *d'A. pleuropneumoniae* est basé sur les antigènes de la capsule polysaccharidique (Mittal *et al.*, 1983). Il a permis la distinction de 15 sérotypes, les sérotypes 1 et 5 étant respectivement subdivisés en 1a, 1b et 5a, 5b (Nielsen, 1986 - Jolie *et al.*, 1994). Il existe 4 cytotoxines protéiques (apxI, apxII, apxIII et apxVI). La combinaison des toxines rend le sérotype plus ou moins virulent. La prévalence des sérotypes varie entre les pays et au cours du temps (Gottschalk, 2015). La bactérie est fréquemment isolée au niveau des cavités nasales, des amygdales et des poumons.

Le diagnostic par PCR permet d'identifier la présence de la bactérie quel que soit le sérotype.

B. Principe du test

Le test ADIALYO™ APP repose sur l'amplification génique de fragments d'ADN spécifiques d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*. Il détecte simultanément en monocupule :

- *Actinobacillus pleuropneumoniae* – sérotypes 1 à 15 (sonde marquée en FAM).
- RNAse P : un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ADN endogène (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 (sur demande) pour Adoption de méthode et PCR (U47-600)

- **LD_{PCR} Positive Control – APP (Réf. : ADC03LD)**

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	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 définis 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
APP 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	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 du CTL+

- Ajouter **200 µL** de **« NF-Water »** par tube.
- Homogénéiser le tube par aspiration refoulement, puis 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.

Etape 1 : Répartir **10 µL** de réactif d'amplification A6 dans chaque puits PCR.
Étape 2 : Distribuer **5 µL** d'acides nucléiques extraits.
Utiliser 5 µL de NF-Water pour le témoin réactif.
Étape 3 : Fermer les puits avec un film ou des barrettes adaptés. Centrifuger brièvement (recommandé).
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.

Contacter 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
APP CTL+	Oui	Oui/Non	Amplification de la cible
Témoin négatif d'extraction	Non	Non	Absence de contamination pour l'extraction
Témoin positif d'extraction	Oui	Oui/Non	Etapes 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	*Actinobacillus pleuropneumoniae*
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 1/10ème en eau Nucléase-free ;
Refaire l'extraction des acides nucléiques si le test n'est toujours pas valide ou redemander un autre prélèvement.

Bibliographie

- Gottschalk, M. (2015) The challenge of detecting herds sub-clinically infected with Actinobacillus pleuropneumoniae. The Veterinary Journal 206,30–38.
- Jolie R. A., Mulks M. H. and Thacker B. J. (1994) Antigenic differences within Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 1. Vet. Microbiol. 38 (4): 329-349.
- Mittal K. R., Higgins R. and Larivière S. (1983) Detection of type-specific antigens in the lungs of Haemophilus pleuropneumoniae-infected pigs by coagglutination test. J. Clin. Microbiol. 18 (6): 1355-1357.
- Nielsen R. (1986) Serological characterization of Actinobacillus pleuropneumoniae strains and proposal of a new serotype: serotype 12. Acta Vet. Scand. 27: 453-455.

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 *in vitro* uniquement – Pour usage animal uniquement
	Conserver à l'abri de la lumière
	Conserver au sec

Notes

1 Extraire les acides nucléiques avec

Adia X Pure → Scan me to discover Adiapure™

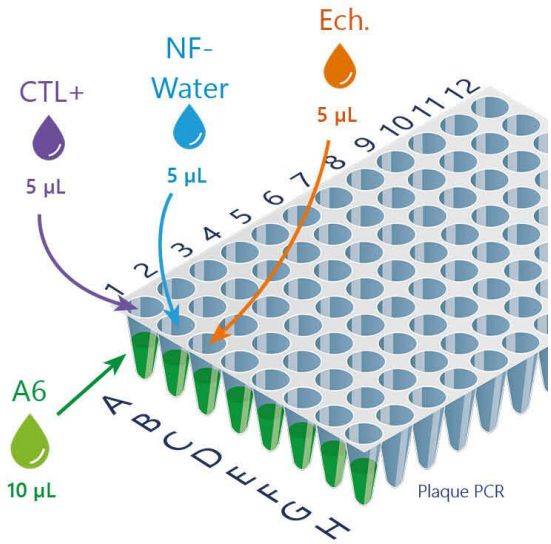
ou

Adia X Mag → Scan me to discover Adiamag™

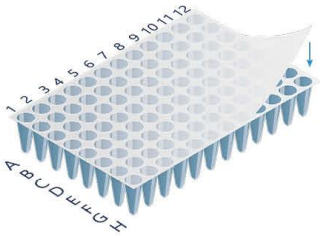
2 Ajouter **1000 µL** de Rehydration buffer au réactif d'amplification **A6**

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

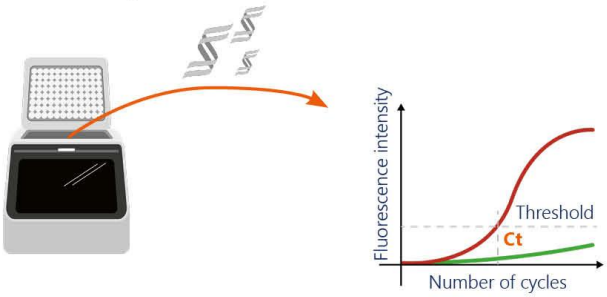
4 Distribuer **5 µL d'acides nucléiques**, **CTL+** et **NF-Water**



5 Sceller les puits



6 Démarrer l'analyse PCR



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

Contact us
support.pcr@biox.com
www.biox.com +32 (0) 84 32 23 77
Bio-X Diagnostics
38, rue de la Calestienne
5580 Rochefort (Belgium)