



ADIAVET™ AIV H5-H7 REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION DES VIRUS DE L'INFLUENZA AVIAIRE sous-types H5 et H7 de Type A PAR AMPLIFICATION ENZYMATIQUE EN TEMPS REEL (TEST RT-PCR Temps réel)

Références :

ADI531-50 (50 réactions)
ADI531-100 (100 réactions)



La surveillance de la grippe aviaire est réglementée au plan international. En France, la surveillance de cette maladie, classée en catégorie 1, à prophylaxie et déclaration obligatoires est gérée par l'État (DGAI) . Pour les laboratoires réalisant des analyses officielles, se conformer à la législation en vigueur.

ADIAVET™ AIV H5-H7 REAL TIME

I.	HISTORIQUE DES REVISIONS	3
II.	INFORMATIONS GENERALES	4
1.	Objet du test – Domaine d'application	4
2.	Pathogène	4
3.	Description et principe du test.....	5
4.	Mesures de biosécurité.....	6
5.	Étapes critiques de la réaction RT-PCR	6
III.	MATERIEL ET REACTIFS	7
1.	Réactifs fournis dans le kit.....	7
2.	Validité et conservation.....	7
3.	Utilisation des témoins	7
4.	Matériel nécessaire mais non fourni.....	7
IV.	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS	9
1.	Précautions.....	9
2.	Conservation des échantillons et des extraits d'ARN	9
3.	Préparation des prélèvements dans le cas d'analyses officielles ou d'autocontrôle	9
A.	<i>Ecouvillons</i>	9
B.	<i>Tissus</i>	10
4.	Préparation des autres prélèvements pour les autres domaines d'application	10
A.	<i>Ecouvillons</i>	10
B.	<i>Tissus</i>	10
C.	<i>Fiente</i>	10
D.	<i>Plumes immatures</i>	10
E.	<i>Cartes FTA</i>	11
5.	Témoins à inclure.....	11
V.	EXTRACTION ET PURIFICATION	12
1.	Avec le Kit RNeasy®Mini kit	12
2.	Avec le Kit NucleoSpin® RNA	13
3.	Avec le Kit QIAamp® Viral RNA.....	14
4.	Avec le Kit Billes magnétiques ARN/ADN	14
VI.	AMPLIFICATION	15
VII.	INTERPRETATION DES RESULTATS	16
1.	Définitions	16
2.	Validation et interprétation des résultats	16
A.	<i>Validation de l'essai</i>	16
B.	<i>Interprétation des résultats</i>	17
VIII.	INDEX DES SYMBOLES	18

I. Historique des révisions

N/A	Non Applicable (première publication)
Correction	Correction des anomalies du document
Modification technique	Addition, révision et/ou suppression d'information liée au produit
Administratif	Modifications non techniques notables pour l'utilisateur

NB : toute modification mineure, typographique, grammaticale et de mise en page ne figurent pas dans l'historique des révisions.

Date d'édition	Référence	Type de révision	Révision apportée
2017/11	NF531-01		Création

II. Informations générales

1. Objet du test – Domaine d'application

Ce test RT-PCR temps réel permet la détection des sous-types H5 et H7 du virus influenza aviaire.
Ce test est applicable :

- 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 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 méthodes officielles et d'autocontrôles ont été caractérisées selon la norme AFNOR NF U47 600-2 et le cahier des charges pour le contrôle initial de conformité établi par le laboratoire national de référence pour l'influenza aviaire de l'Anses Ploufragan – France (sept 2017).

2. Pathogène

Les virus de la grippe aviaire appartiennent au genre Influenza virus A (AIV) de la famille des Orthomyxoviridae comprenant 5 genres : Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C, Thogotovirus et Isavirus. Ce sont des ARN simple brin négatif, divisés en deux sous-types basés sur deux glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine (H) et la neuraminidase (N). A ce jour 16 sous type d'hémagglutinines (H1-H16) et 9 sous type de neuraminidase (N1-N9) sont décrits.

Seul l'Influenzavirus de type A (IA) infecte les oiseaux d'élevage (poulets, dindes, cailles, pintades, etc.), ainsi que les oiseaux d'ornement et les oiseaux sauvages. Les mammifères, y compris les humains, peuvent occasionnellement contracter l'influenza aviaire.

Il existe de nombreuses souches du virus de l'influenza aviaire, classées en deux catégories, faiblement pathogène ou hautement pathogène. Un virus IA est classé comme hautement pathogène si l'un des deux critères suivants est vérifiés :

- Détermination d'un index de pathogénicité par voie intraveineuse (IPIV) supérieur à 1,2
- Présence d'une séquence en acides aminés du site de clivage de l'hémagglutinine semblable à une séquence déjà observée pour des isolats IA hautement pathogènes (présence de plusieurs acides aminés basiques)

Tous les H5/H7 (IAHP ou IAFP) sont à déclaration obligatoire à l'OIE. Tous 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.

3. Description et principe du test

Ce test repose dans un premier temps sur la transcription réverse (RT) de l'ARN en ADN complémentaire. L'ADNc obtenu est dans un second temps amplifié (PCR) par une ADN polymérase qui utilise des amorces spécifiques. Les deux réactions enzymatiques se font dans un seul tube (One-step RT-PCR). Les produits amplifiés sont détectés en temps réel grâce au marquage spécifique de sondes d'hydrolyse (technologie 5'-exonucléase).

Le kit ADIAVET™ AIV H5-H7 REAL TIME peut détecter simultanément

- Virus influenza sous-types H5 (sonde marquée en FAM)
- Virus Influenza sous-types H7 (sonde marquée en Cy5)
- GAPDH un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ADN endogène (sonde marquée avec un fluorochrome lu dans le même spectre que VIC et HEX).

Le test amplifie une séquence du gène HA2 spécifique des Influenzae Virus sous-types H5 et H7, il utilise les mêmes sondes et amorces que celles 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 la triplex H5-H7 est réalisé avec une température d'hybridation et d'élongation à 54°C.

Adiagène a validé ce test avec différents kits de purification d'ARN (Qiagen, Macherey-Nagel). D'autres kits de purification peuvent être utilisés s'ils sont validés par l'utilisateur.

Domaine d'application : analyses officielles en matière de diagnostic de l'influenza aviaire par méthodes de biologie moléculaire, selon les textes réglementaires en vigueur, en laboratoire agréé par le ministère de l'Agriculture :

Ce test peut être utilisé pour la détection du génome de virus Influenza aviaire de type A provenant d'oiseaux sauvages ou captifs ou de volailles à partir de :

Prélèvement	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Ecouvillon (trachéal, oropharyngé, cloacal...)	<input checked="" type="checkbox"/>	5**
Tissu (foie-rate-rein-pancréas-cœur, intestin, poumon-trachée, encéphale)	<input checked="" type="checkbox"/>	5***

* traitement individuel de chaque échantillon avant de faire les mélanges volume à volume.

**selon le type de prélèvement, et sauf indication différente selon l'espèce d'oiseau, le lieu géographique, la date de prélèvement.

*** mélange de 5 organes identiques de même espèce, même lieu géographique et même lieu de prélèvement.

Domaine d'application : analyses d'autocontrôle en matière de diagnostic de l'influenza aviaire par méthodes de biologie moléculaire, selon les textes réglementaires en vigueur, en laboratoire reconnu par le ministère chargé de l'Agriculture :

Ce test peut être utilisé pour la détection du génome de virus Influenza aviaire de type A provenant de volailles à partir de :

Prélèvement	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Ecouvillon (trachéal, oropharyngé, cloacal...)	<input checked="" type="checkbox"/>	5**

* traitement individuel de chaque échantillon avant de faire les mélanges volume à volume.

**selon le type de prélèvement, et sauf indication différente selon l'espèce d'oiseau, le lieu géographique, la date de prélèvement.

Domaine d'application hors analyses officielles et d'autocontrôles : étude pour recherche et étude épidémiologique :

Domaine non soumis à la validation par le LNR.

Ce test peut être utilisé pour la détection du virus Influenza provenant de volailles à partir de :

Prélèvement	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Ecouvillon (trachéal, oropharyngé, cloacal...)	<input checked="" type="checkbox"/>	5
Tissu (foie-rate-rein-pancréas-cœur, intestin, poumon-trachée, encéphale)	<input checked="" type="checkbox"/>	5
Plume	<input checked="" type="checkbox"/>	5
Carte FTA	<input checked="" type="checkbox"/>	
Fiente	<input checked="" type="checkbox"/>	

* mélange de 1 à 5 échantillons sans traitement individuel

4. Mesures de biosécurité

En matière de sécurité microbiologique, les virus grippaux sont classés parmi les pathogènes présentant un risque pour la santé publique (arrêté du 30 avril 2012 consolidé le 14 décembre 2015). Outre les exigences prescrites par la norme ISO 17025, les laboratoires pratiquant la manipulation de ces virus doivent donc être aménagés et doivent fonctionner conformément aux exigences définies dans l'arrêté du 16 juillet 2007 pour les laboratoires manipulant des agents pathogènes classés dans ce groupe.

5. Etapes critiques de la réaction RT-PCR

Lors d'une réaction de RT-PCR, les paramètres majeurs qui peuvent altérer les performances de l'amplification génique sont la température d'hybridation et le volume de la prise d'essai. La robustesse du kit est vérifiée pour une variation de la température d'hybridation entre 53°C et 60°C et de la prise d'essai de +/- 10%.

III. Matériel et réactifs

1. Réactifs fournis dans le kit

Kits	
REF ADI531-50	Coffret de 50 tests
REF ADI531-100	Coffret de 100 tests

REF ADI531-50		
A5	solution d'amplification	1 x 1000 µl tube à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
H5-H7 CTL+	contrôle positif H5, H7 et IPC	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
Une notice téléchargeable sur www.biox.com		
REF ADI531-100		
A5	solution d'amplification	2 x 1000 µl tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
H5-H7 CTL+	contrôle positif H5, H7 et IPC	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
Une notice téléchargeable sur www.biox.com		

2. Validité et conservation

A réception, le kit doit être stocké à <-15°C.

Il est recommandé d'aliquoter le réactif « A5 » si le nombre d'analyses à effectuer nécessite plus de trois décongelations.

Ne pas décongeler plus de 3 fois.

Les réactifs temps réel sont sensibles à la lumière : les conserver à l'obscurité.

Le réactif « A5 » est prêt à être utilisé pour la réaction RT-PCR.

Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.

3. Utilisation des témoins

Ajouter **200 µl** d'eau Nuclease-free au « H5-H7 CTL+ » fourni dans le kit. Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex, au moins 20 secondes. Aliquoter cette solution par 6 ou 12 µl et conserver à <-15°C.

Pour chaque analyse, nous recommandons d'utiliser 5 µl de « H5-H7 CTL+ » dans un des puits.

4. Matériel nécessaire mais non fourni

Attention : le consommable utilisé doit être Nuclease-free (par exemple autoclavé deux fois 25 minutes à +120°C ou une fois 60 minutes à +121°C)

- Thermocycleur avec son consommable pour RT-PCR Temps réel : tubes PCR de 0,2 ml ou plaques PCR 96 puits fermées de qualité optique
- Poste de Sécurité Microbiologique de type II
- Centrifugeuse pour microtubes
- Appareil d'homogénéisation pour tubes
- Pipettes de 1 - 10 µl, 20 - 200 µl et 200 - 1000 µl
- Embouts Nuclease-free avec filtres pour micropipettes
- Microtubes Nuclease-free de 1,5 ml et 2 ml
- Gants latex non poudrés
- Scalpel
- Vibrobroyeur à billes (type Mixer Mill)
- Billes d'acier inoxydable (3 mm)
- Ethanol 96-100%
- Eau nuclease-free
- Eau physiologique stérile (NaCl 8,5g/l)
- Milieu MEM (+/- antibiotiques ; par exemple 100 IU/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine) (optionnel, en vue d'un éventuel isolement viral ultérieur)
- β-mercaptoéthanol 14,5 M

- **Kit d'extraction d'ARN :**

- RNeasy® Mini Kit (Qiagen, 50 extractions : réf. 74104 ou 250 extractions : réf. 74106)

ou

- QIAamp® Viral RNA (Qiagen, 50 extractions : réf. 52904 ou 250 extractions : réf. 52906)

ou

- NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, 50 extractions : réf. 740955.50 ou 250 extractions : réf. 740955.250)

ou

- Kit d'extraction d'ARN/ADN en billes magnétiques sur automate. Se référer à la version de notice NFKF disponible sur le site web indiqué sur le certificat d'analyse inclus dans le kit ADIAVET™ utilisé.

IV. Traitement des échantillons et des témoins

Avant de commencer l'essai, lire l'ensemble du protocole et le respecter scrupuleusement.

1. Précautions

Adiagène a validé ce test avec les kits d'extraction d'ARN des sociétés Qiagen, Macherey-Nagel. D'autres kits d'extraction peuvent être utilisés avec une validation préalable.

Respecter les recommandations des fabricants pour la conservation, la préparation et l'utilisation des réactifs contenus dans les kits d'extraction et assurer le suivi des versions des notices.

Certains kits contiennent et/ou nécessitent l'utilisation de composés toxiques. Ces produits doivent être manipulés avec des gants et sous hotte chimique.

Nous conseillons vivement que cet essai soit réalisé par des personnes ayant reçu une formation appropriée. Vérifier l'exactitude et la précision des micropipettes utilisées. La qualité des résultats dépend du respect scrupuleux des bonnes pratiques de laboratoire.

La réaction RT-PCR génère de grandes quantités d'ADN amplifié. Quelques molécules de produits amplifiés peuvent générer des résultats positifs. Il est donc important de bien séparer la zone d'analyse des produits amplifiés de la zone où sont manipulés les échantillons à analyser et de ne pas ouvrir les tubes après amplification.

Les échantillons à analyser doivent être manipulés et éliminés comme des déchets biologiques. **Prendre toutes les dispositions de sécurité et de confinement requises pour la manipulation des agents biologiques concernés.**

Nous vous recommandons de faire des fractions aliquotées d'eau déminéralisée, de les autoclaver (deux fois 25 minutes à +120°C ou une fois 60 minutes à +121°C) et de changer de tube d'eau lors de chaque manipulation afin d'éviter toute contamination.

2. Conservation des échantillons et des extraits d'ARN

Une conservation des échantillons sous couvert du froid est recommandé. Si les échantillons ne peuvent pas être traités dans les 24 heures, il est recommandé de les stocker à <-15°C.

Les ARN extraits sont des molécules sensibles. L'extraction est réalisée à température ambiante et doit donc être aussi rapide que possible pour éviter les dégradations. Il est conseillé de lire la totalité du protocole et bien préparer chaque manipulation avant de débiter l'extraction d'ARN. Les lysats peuvent être stockés dès la fin de l'extraction sur glace ou à +2/8°C pendant quelques heures, puis doivent être conservés à <-15°C.

3. Préparation des prélèvements dans le cas d'analyses officielles ou d'autocontrôle

Domaine d'application : analyses officielles en matière de diagnostic de l'influenza aviaire par méthodes de biologie moléculaire, selon les textes réglementaires en vigueur, en laboratoire agréé par le ministère de l'Agriculture

Et

Domaine d'application : analyses d'autocontrôle en matière de diagnostic de l'influenza aviaire par méthodes de biologie moléculaire, selon les textes réglementaires en vigueur, en laboratoire reconnu par le ministère chargé de l'Agriculture

A. Ecouvillons

Mettre 1 écouvillon dans 1 ml de milieu MEM (+/-antibiotiques) ou de solution tamponnée phosphate (STP).

Pour les mélanges de 5 écouvillons (selon le type de prélèvement, et sauf indication différente selon l'espèce d'oiseau, le lieu géographique, la date de prélèvement), mélanger volume à volume chaque surnageant.

Prélever 200 µl d'échantillon ou de mélange.

NB : Conserver le reste à <-65°C.

Cf. § V pour l'extraction et la purification des ARN.

B. Tissus

Placer **0,1 à 0,2 g** d'organe dans un tube de 2 ml contenant 1 ml de solution tamponnée phosphate (STP), soit 10-20% poids/volume.

Ajouter 1 bille d'acier inoxydable.

Broyer 2 minutes à 30 Hertz (Mixer Mill).

Centrifuger 2 minutes à 6 000 g.

Pour les mélanges de 5 organes identiques de même espèce, même lieu géographique et même lieu de prélèvement, mélanger volume à volume chaque surnageant.

Prélever **200 µl** de solution obtenue ou de mélange.

NB : Conserver le reste à <-65°C.

Cf. § V pour l'extraction et la purification des ARN en suivant le protocole d'extraction dédié aux échantillons biologiques liquides.

4. Préparation des autres prélèvements pour les autres domaines d'application

En particulier pour étude pour recherche et étude épidémiologique. Ces protocoles n'ont pas fait l'objet d'une validation par le LNR :

A. Ecouvillons

Mettre 1 à 5 écouvillons dans **2 ml** d'eau physiologique.

Vortexer et prélever **200 µl** de solution obtenue.

NB : Conserver le reste à <-15°C en vue d'une nouvelle analyse

Cf. § V pour l'extraction et la purification des ARN.

B. Tissus

Placer **0,1 à 0,2 g** d'organe dans un tube de 2 ml contenant 1 ml d'eau physiologique.

Ajouter 1 bille d'acier inoxydable.

Broyer 2 minutes à 30 Hertz (Mixer Mill).

Centrifuger 2 minutes à 6 000 g.

Pour les mélanges de 5 organes, mélanger volume à volume chaque surnageant.

Prélever **200 µl** de solution obtenue ou de mélange.

NB : Conserver le reste à <-15°C en vue d'une nouvelle analyse.

Cf. § V pour l'extraction et la purification des ARN en suivant le protocole d'extraction dédié aux échantillons biologiques liquides.

C. Fiente

Placer **1 g** de fiente ou mélange de fiente dans un tube.

Ajouter **5 ml** d'eau physiologique.

Vortexer.

Laisser sédimenter 5 minutes

Prélever **200 µl** de la solution obtenue.

NB : Conserver le reste à <-15°C en vue d'une nouvelle analyse.

Cf. § V pour l'extraction et la purification des ARN en suivant le protocole d'extraction dédié aux échantillons biologiques liquides.

D. Plumes immatures

Couper l'extrémité le calamus de 1 à 5 plumes précocieusement pour éviter toutes projections et les placer dans **2 ml** d'eau physiologique.

Vortexer et prélever **200 µl** de la solution obtenue.

NB : Conserver le reste à <-15°C en vue d'une nouvelle analyse.

Cf. § V pour l'extraction et la purification des ARN en suivant le protocole d'extraction dédié aux échantillons biologiques liquides.

E. Cartes FTA

Découper la carte FTA et transférer les morceaux dans un tube de 2 ml
Ajouter 1 ml d'eau physiologique.
Vortexer et prélever 200 µl de la solution obtenue.

NB : Conserver le reste à <-15°C en vue d'une nouvelle analyse

Cf. § V pour l'extraction et la purification des ARN en suivant le protocole d'extraction dédié aux échantillons biologiques liquides.

5. Témoins à inclure

Plusieurs témoins devront être inclus lors de chaque série d'extraction.

Le contrôle interne endogène (GAPDH) naturellement présent dans les cellules de l'animal permet de vérifier l'extraction et l'amplification de chaque échantillon. Le témoin « H5-H7 CTL+ » permet de valider l'amplification de la cible H5, de la cible H7 et de l'IPC.

La combinaison de ces différents témoins permet la validation de l'ensemble des étapes du processus analytique (extraction+amplification), quelles que soient les matrices.

D'autres témoins doivent ou peuvent être ajoutés :

- **Témoin négatif d'extraction (obligatoire)**

Afin de s'assurer de l'absence d'inter-contamination, au moins un témoin négatif doit être intégré dans chaque série d'extraction (à titre d'exemple la norme NF U47-600 recommande un témoin négatif de processus analytique par centrifugation de 24 colonnes ou 4 témoins négatifs de processus analytique par plaque 96 puits). Ce témoin pourra être réalisé avec une matrice négative ou du tampon de dilution.

- **Témoin positif « cible » d'extraction (recommandé)**

Un témoin positif « cible » peut être introduit par série d'extraction. Il s'agit d'un échantillon contenant du virus de la grippe aviaire. Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou d'un prélèvement négatif dopé par une solution du virus de la grippe aviaire. Ce témoin positif cible parfois nommé sentinelle permet d'établir un suivi, sous forme de carte de contrôle, renseignant sur la fidélité des résultats obtenus.

V. Extraction et purification

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

1. Avec le Kit RNeasy®Mini kit

	Liquides biologiques obtenus en étape IV
Lyse	Ajouter 350 µl de tampon RLT+ β-Mercaptoéthanol (10 µl/ml, optionnel) aux 200 µl d'échantillon préparé comme décrit précédemment. Homogénéiser.
Préparation de la fixation	Ajouter 350 µl d'éthanol à 70% . Homogénéiser.
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer 700 µl de mélange sur la colonne correspondante. Centrifuger 1 minute à 8 000 g.
1^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 700 µl de tampon RW1 . Centrifuger 1 minute à 8 000 g.
2nd lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RPE . Centrifuger 1 minute à 8 000 g.
3^e lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RPE . <i>Facultatif : centrifuger 1 minute à 8 000 g, changer le tube collecteur.</i> Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.
Séchage de la colonne	Changer le tube collecteur. Centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 50 µl d'eau Nuclease-free . Incuber ~2 minutes à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate ou à <-15°C.

2. Avec le Kit NucleoSpin® RNA

	Liquides biologiques obtenus en étape IV
Lyse	Ajouter 350 µl de tampon RA1+ β-Mercaptoéthanol (10 µl/ml, optionnel) aux 200 µl d'échantillon préparé comme décrit précédemment. Homogénéiser.
Préparation de la fixation	Ajouter 350 µl d'éthanol à 70% . Homogénéiser.
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer 700 µl de mélange sur la colonne correspondante. Centrifuger 30 secondes à 11 000 g.
1^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 350 µl de tampon MDB . Centrifuger 1 minute à 11 000 g.
2nd lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 200 µl de tampon RAW2 . Centrifuger 30 secondes à 11 000 g.
3^e lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 600 µl de tampon RA3 . Centrifuger 30 secondes à 11 000 g.
4^e lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 250 µl de tampon RA3 . <i>Facultatif : centrifuger 30 secondes à 11 000 g, changer le tube collecteur.</i> Centrifuger 2 minutes à 11 000 g.
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 60 µl d' eau Nuclease-free . Incuber ~2 minutes à température ambiante et centrifuger 1 minute à 11 000 g.
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate ou à < -15°C.

3. Avec le Kit QIAamp® Viral RNA

	Liquides biologiques obtenus en étape IV
Lyse	Ajouter 560 µl de tampon AVL + Carrier RNA aux 200 µl d'échantillon préparé comme décrit précédemment. Homogénéiser.
	Incuber 10 minutes à température ambiante. Centrifuger brièvement.
Préparation de la fixation	Ajouter 560 µl d' éthanol 100% . Homogénéiser.
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer 630 µl de mélange sur la colonne correspondante. Centrifuger 1 minute à 10 000 g. Changer le tube collecteur, déposer le reste du mélange et centrifuger 1 minute à 10 000 g.
1 ^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW1 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.
2 ^{ème} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW2 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Séchage de la colonne	Changer le tube collecteur. Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 60 µl de tampon AVE . Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate ou à <-15°C.

4. Avec le Kit Billes magnétiques ARN/ADN

Se référer à la version de notice NFKF disponible sur le site web indiquée sur le certificat d'analyse inclus dans le kit ADIAVET™ utilisé.

VI. Amplification

a- Déterminer le nombre d'échantillons à analyser, y compris les témoins utilisés (par exemple les témoins positif et négatif d'extraction, le témoin d'amplification (CTL+) et le témoin réactif d'amplification (NTC)).

b- Décongeler le réactif « A5 » à température ambiante. Bien homogénéiser. Répartir **20 µl** dans chacun des tubes PCR ou des puits de la plaque PCR avec une pipette munie de pointes Nuclease-free.

c- Remplacer immédiatement le tube A5 à <-15°C et à l'obscurité.

d- Pour chaque échantillon, le témoin négatif d'extraction (obligatoire) et le témoin positif d'extraction (recommandé), ajouter **5 µl** d'extrait purifié aux **20 µl** de réactif « A5 ».

Pour le témoin d'amplification, ajouter **5 µl** par puits des solutions (§ III.3.) aux 20 µl de réactif « A5 ».

Pour le témoin réactif d'amplification (NTC), ne rien ajouter au réactif « A5 ».

Remplacer immédiatement les extraits d'ARN purifiés à +2/8°C ou à <-15°C. Éliminer les bulles qui pourraient rester au fond des puits.

e- Conserver la plaque ou les tubes sur la glace en fusion ou à +2/8°C jusqu'à ce que le cycleur soit programmé et démarrer le run rapidement après la mise en place de la plaque ou des tubes dans le cycleur.

La cible H5 est lue en FAM. La cible H7 est lue en Cy5. Le contrôle interne est lu en VIC ou HEX. Le Quencher est non fluorescent. Le mélange contient une référence passive ROX pour les appareils ABI. La lecture de la fluorescence s'effectue pendant l'étape d'élongation (1 minute à 54°C).

Le programme thermique utilisé par le LRUE et ANSES pour la détection du sous-type H5 préconise une température d'hybridation et d'élongation à 54°C.

Le programme thermique utilisé par le LRUE pour la détection du sous-type H7 préconise une température d'hybridation et d'élongation à 54°C (amorces HA2).

Afin de garantir la spécificité qui a été démontrée par le LRUE, la température d'hybridation et d'élongation a été fixée à 54°C pour le kit ADIAVET™ AIV H5-H7 REAL TIME.

Le programme suivant a été développé pour les appareils **ABI Prism** (type 7500, Step-one...) d'**Applied Biosystems** (cocher l'option « emulation 9600 » lorsqu'elle existe), pour le **Rotorgene** de **Qiagen**, pour les **Chromo 4** et **CFX96 Touch™** de **Biorad** et pour l'**AriaMx** d'**Agilent** :

10 minutes à 45°C

10 minutes à 95°C

15 secondes à 95°C et 1 minute à **54°C** pendant 40 cycles

Le programme ci-dessous concerne les **MX3000P** et **MX3005P** d'**Agilent** :

10 minutes à 45°C

10 minutes à 95°C

30 secondes à 95°C et 1 minute à **54°C** pendant 40 cycles

Roche diagnostic : LightCycler 2*, LightCycler 480*

*** NOTE :** L'utilisation de thermocycleurs *LightCycler* nécessite au préalable une manipulation de calibration. Nous fournissons la procédure et les réactifs nécessaires à cette calibration.

Contactez-nous si vous souhaitez utiliser d'autres appareils.

VII. Interpretation des résultats

1. Définitions

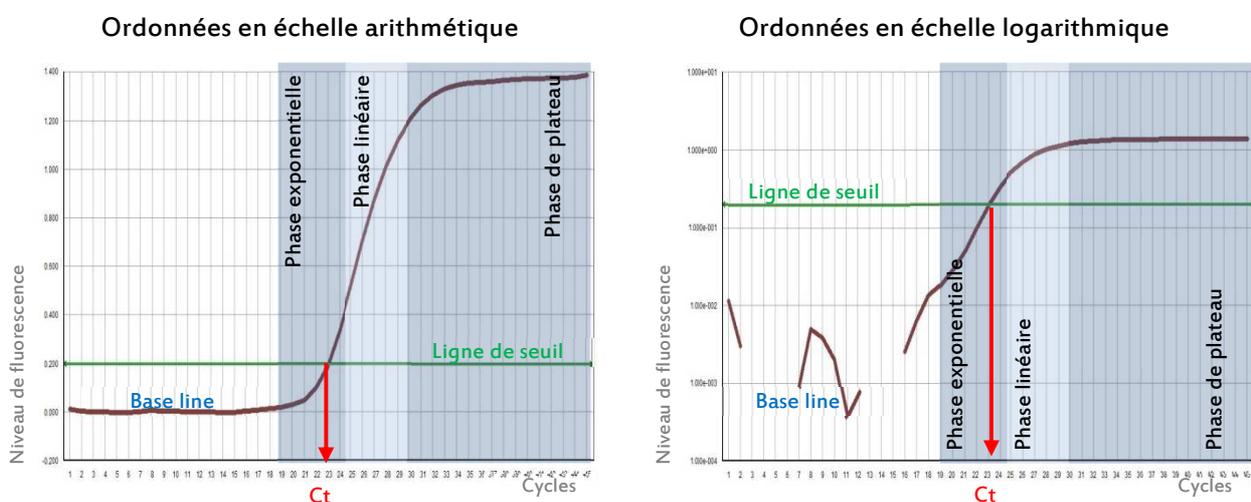
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

Le terme « **courbe d'amplification caractéristique** » qualifie une courbe de fluorescence avec une phase exponentielle, une phase linéaire et une phase de plateau.

La « **ligne de seuil** » ou « **threshold line** » doit être placée au-dessus de la ligne de base, dans la phase exponentielle d'une courbe d'amplification caractéristique ou d'un ensemble de courbes d'amplification caractéristiques.

Le « **cycle seuil** » ou « **threshold cycle** » (**Ct**) d'un puits correspond, pour chaque fluorophore détecté, à l'abscisse du point d'intersection entre la ligne de seuil et la courbe d'amplification. La valeur de Ct exprimée par l'appareil pour chaque puits dépend ainsi de la position de la ligne seuil et de la charge d'analytes initialement présents dans le tube PCR.

Exemple d'une courbe d'amplification caractéristique :



2. Validation et interprétation des résultats

Afficher l'ensemble des courbes de la plaque en FAM et positionner la ligne de seuil selon les indications ci-dessus. Procéder de la même façon pour les courbes en VIC ou HEX.

A. Validation de l'essai

L'amplification est considérée comme valide si les résultats suivants ont été obtenus pour les témoins :

Témoins	Témoin réactif (NTC)	H5-H7 CTL+	Témoin négatif d'extraction	Témoin positif d'extraction *
Amplification FAM	non	oui	non	oui
Amplification Cy5	non	oui	non	oui
Amplification VIC/HEX	non	oui	non/oui**	non/oui**
Validation de	Absence de contamination pour l'amplification	Amplification des cibles et de l'IPC	Absence de contamination pour l'extraction	Étapes d'extraction et d'amplification

* optionnel

** selon la nature du témoin

Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM, Cy5 et VIC/HEX pour le témoin d'amplification (« H5-H7 CTL+ ») sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

B. Interprétation des résultats

L'extraction de l'ARN et l'amplification sont considérées comme **valides** pour chacun des échantillons si au moins une courbe d'amplification caractéristique est observée en H5 (FAM), H7 (Cy5) et/ou en contrôle interne (VIC ou HEX).

Exemple	A	B	C	D	E
Amplification FAM	Non	Oui	Non	Oui	Non
Amplification Cy5	Non	Non	Oui	Oui	Non
Amplification VIC/HEX	Oui	Non/Oui	Non/Oui	Non/Oui	Non
Résultat	H5 et H7 Non détecté	H5 détecté H7 non détecté	H7 détecté H5 non détecté	H5 et H7 détectés	Ininterprétable A refaire

L'échantillon est considéré comme **non détecté** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en VIC ou HEX sans qu'il y ait de courbe d'amplification caractéristique en FAM et en Cy5 (exemple A).

L'échantillon est considéré comme **détecté en H5** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM (exemple B). Le Contrôle Interne peut être co-amplifié.

L'échantillon est considéré comme **détecté en H7** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en Cy5 (exemple C). Le Contrôle Interne peut être co-amplifié.

L'échantillon est considéré comme **détecté H5 et H7** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM et en Cy5 (exemple D). Le Contrôle Interne peut être co-amplifié.

L'absence totale de courbe d'amplification caractéristique pour un échantillon (exemple E) indique une déficience de l'extraction de l'ARN (perte ou destruction de l'ARN) ou une RT-PCR temps-réel défectueuse (présence d'inhibiteurs dans l'échantillon, erreur de programme ou absence d'échantillon). Dans ce cas, il est conseillé de refaire le test en utilisant l'extrait d'ARN pur et dilué au 1/10^{ème} dans de l'eau Nuclease-free. Dans un second temps, si le test n'est toujours pas validé, une nouvelle extraction de l'ARN total de l'échantillon est souhaitable.

Dans le cadre des analyses officielles ou d'autocontrôles, la transmission des résultats et des échantillons détectés positifs est traitée selon les notes de services de la DGALen vigueur.

VIII. Index 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
	Conserver à l'abri de la lumière
	Pour usage vétérinaire in vitro uniquement – Pour usage animal uniquement

Bio-X Diagnostics, les logos, ADIAGENE et ADIAVET™ sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à ADIAGENE et/ou Bio-X Diagnostics ou à l'une de ses filiales, ou à une de ses sociétés. Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document appartiennent à leurs propriétaires respectifs.



**ADIAGENE**
38 rue de Paris
22000 Saint-Brieuc - France

RCS 417 876 299
Tél. 33 (0)2 96 68 40 20
www.biox.com