

## MANUEL D'UTILISATION

# Bio-T kit<sup>®</sup> AIV genotypes H5 & H7

Cat. N° BIOTK082-50 - 50 réactions

Cat. N° BIOTK082-100 - 100 réactions

**Détection des génomes des virus de l'Influenza Aviaire de type A et de sous-types H5 et H7 par RT-PCR en temps réel avec contrôle positif interne (IPC) endogène**

### AVIAIRES

#### Types de prélèvements

- Ecouvillons Trachéaux ou Oropharyngés
- Ecouvillons Cloacaux
- Organes ou Surnageants de broyats d'organes
- Analyses individuelles ou en mélange jusqu'à 5 selon le type de prélèvement et, sauf indication contraire, selon l'espèce animale, l'origine géographique et la date de prélèvement.

#### Extractions des acides nucléiques (AN) recommandées par BioSella

- Billes magnétiques (ex : BioSella – BioExtract<sup>®</sup> SuperBall<sup>®</sup> Cat. N° BES384)
- Colonnes de silice (ex : BioSella – BioExtract<sup>®</sup> Column Cat. N° BEC050 ou BEC250)

*Réservé à l'usage vétérinaire*



## GESTION DES DOCUMENTS

Le Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7 dispose de deux manuels techniques :

- Un manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® Avian & Swine Influenza Virus, AIV genotypes H5 & H7 et AIV genotype H9, détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions validées par BioSella.
- Un manuel d'utilisation du Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7, détaillant les différentes étapes de préparation de la RT-PCR.

Les dernières versions en vigueur de chacun des deux documents figurent dans le certificat d'analyse (CA) fourni avec le Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7.

En plus de ces 2 manuels, le dossier de validation ainsi que le manuel de vérification des performances du Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7 sont disponibles sur demande, contacter BioSella ([contact@biosellal.com](mailto:contact@biosellal.com)).

## GESTION DES REVISIONS

BioSella indique les modifications apportées à ce document en les surlignant selon les règles présentées dans le tableau ci-dessous:

Gestion des révisions			
Type de modification Couleur de Surlignage	Modifications mineures	Modifications majeures 1	Modifications majeures 2
Impact sur la révision/version	Changement de la date de révision du document Pas de changement de version	Changement de la date de révision du document + changement de version	Changement de la date de révision du document + changement de version
Impact sur l'adoption de la méthode autorisée	Aucun <i>(sauf en cas d'adoption de nouvelle matrice)</i>	Aucun	Nouvelle adoption nécessaire
Exemples de modifications	Corrections : typographique, grammaticale ou de mise en forme	Changement de référence d'un EPC	Modification de la recette du Master Mix
	Ajout de nouvelles matrices pour l'extraction	Changement de référence d'un IPC exogène	Modification du protocole d'extraction validé
	Ajout d'informations donnant plus de détails ou alternative à un protocole		
	Ajout/Suppression d'informations optionnelles		

## PRESENTATION

### Recommandations pour le prélèvement, l'envoi et la conservation des échantillons

La technique de RT-PCR en temps réel permet de révéler la présence de très faibles quantités de génome du pathogène. Celui-ci peut être plus ou moins rapidement dégradé selon la nature du pathogène (bactéries/parasites, virus enveloppés ou non...), la nature de son génome (ADN/ARN) et le type de prélèvement (présence de DNase/RNase). Ainsi, BioSellal recommande de suivre les préconisations suivantes pour garantir un diagnostic optimal.

#### Prélèvements

Afin de prévenir les contaminations croisées entre échantillons pouvant conduire à un résultat faussement positif, il est important d'utiliser du matériel de prélèvement à usage unique et d'éviter un contact direct entre chaque prélèvement.

#### Envoi

Le prélèvement et la conservation des échantillons doivent répondre aux dispositions indiquées dans la norme NF U47-210

#### Conservation après réception

La conservation des échantillons est recommandée à  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  pendant 24h maximum et  $\leq -65^{\circ}\text{C}$  au-delà.

## Gamme AVIAN

Ce kit appartient à la gamme AVIAN qui regroupe un ensemble de kits partageant des protocoles d'extraction et de RT-PCR communs, sauf exceptions.

## Description du Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7

La technique de RT-PCR en temps réel permet de révéler la présence d'acides nucléiques (AN) cibles de façon précise et rapide.

Le **Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7** (Cat. N° BIOTK082-50/BIOTK082-100) contient un **Master Mix RT-PCR one-step prêt à l'emploi**, permettant de **détecter dans le même puit réactionnel**, la présence :

- **des génomes des virus de l'Influenza Aviaire de type A et de sous-types H5** en ciblant le gène H5 (segment 4), grâce à un marquage 6-FAM,
- **des génomes des virus de l'Influenza Aviaire type A de sous-types H7** en ciblant le gène H7 (segment 4), grâce à un marquage VIC,
- **d'un contrôle positif endogène ARNm IPC (beta actine)**, grâce à un marquage Cy5, qui permet de confirmer la présence de cellules de l'hôte en quantité suffisante, de valider l'intégrité des acides nucléiques dans l'échantillon et la qualité de l'extraction ainsi que l'absence d'inhibition de la réaction d'amplification.

### Domaine d'application du Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7

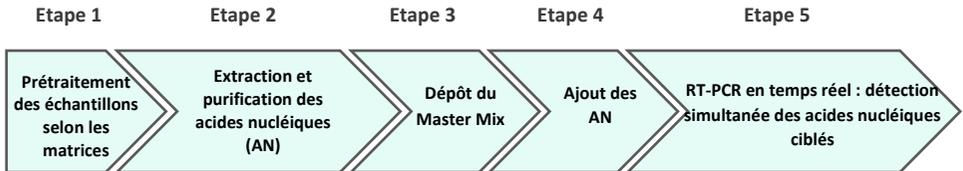
Ce kit est basé sur une détection qualitative des sous-types H5 et H7 des génomes viraux de l'Influenza Aviaire de type A (détecté ou non détecté).

Le **Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7** a été développé et validé suivant les prescriptions de la norme **NF U47-600-2** éditée par l'AFNOR et selon le cahier des charges du Laboratoire National de Référence (LNR) de l'Influenza aviaire (ANSES Ploufragan-Plouzané, unité VIPAC). Il a fait l'objet d'une validation initiale par le LNR de l'IA pour une utilisation :

- Dans un contexte d'autocontrôle à partir de surnageants d'écouvillons trachéaux/oropharyngés et d'écouvillons cloacaux provenant d'espèces aviaires.
- Dans un contexte d'analyses officielles à partir de surnageants d'écouvillons trachéaux/oropharyngés, d'écouvillons cloacaux et de broyats d'organes provenant d'espèces aviaires.

L'utilisation de toute autre matrice et dans tout autre contexte (suivi épidémiologique, etc.) n'a pas fait l'objet de validation par le LNR IA.

## Description des étapes à suivre de l'échantillon jusqu'au résultat de RT-PCR



Manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® Avian & Swine Influenza Virus, Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7 et Bio-T kit® AIV genotype H9		Manuel d'utilisation du Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7		
Ecouillons Trachéaux ou Oropharyngés* Ecouillons Cloacaux * Organes ou Surnageants de broyats d'organes	BioExtract® SuperBall®‡  BioExtract® Column	Master Mix prêt à l'emploi MMH5H7-A	Echantillons NC/NCS Témoin positif de processus EPC (EPCASIV-B)§	Détecteurs : FAM/VIC/Cy5 Référence passive : ROX <b>Programme : Spécifique H5&amp;H7</b> en ramping Standard ou Fast

\* prétraitement obligatoire

‡ Validé en association avec le programme classique 38 minutes sur l'ensemble des prélèvements et en programme court 19 minutes uniquement sur les écouillons trachéaux, oropharyngés ou cloacaux.

§ L'EPC est commun aux Bio-T kit® Avian & Swine Influenza Virus et Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7.

## Méthodes d'extraction des acides nucléiques

Les méthodes d'extraction validées par BioSella sont le BioExtract® Column (Cat. N° BEC050 ou BEC250) et le BioExtract® SuperBall® (Cat. N° BES384) associé au programme classique 38 minutes pour toutes les matrices et au programme court 19 minutes sur les écouvillons uniquement.

D'autres kits d'extractions peuvent être utilisés après avoir procédé à une étude d'impact à l'issue de laquelle le laboratoire déterminera s'il doit réaliser une adoption ou une validation de la méthode complète en confirmant la LD<sub>METHODE</sub> Obtenue par BioSella lors de la validation du Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7.

Dans tous les cas, les protocoles de prétraitement détaillés ci-dessous doivent être respectés :

### Prétraitement des échantillons

**A partir d'écouvillons (Trachéaux, Oropharyngés, Cloacaux) : la préparation des écouvillons doit se faire selon la norme NFU47-210, à titre d'exemple :**

1. Eluer l'écouvillon avec du PBS 1X stérile ou du milieu MEM additionné d'antibiotiques
  - Placer l'écouvillon dans un tube 1.5 ml et couper la tige de l'écouvillon.
  - Ajouter **1ml** de PBS 1X stérile ou de milieu MEM additionné d'antibiotiques (par exemple : 100 IU/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine) :
  - Fermer le tube et **vortexer 5 secondes à 2 reprises** puis centrifuger brièvement.
  - **Enlever l'écouvillon** en le pressant sur les parois pour minimiser les pertes de volume.
2. L'extraction sera réalisée à partir de **200 µl de l'éluat**.

Le reste de l'éluat devra être conservé à ≤ -65°C pour la réalisation d'analyses complémentaires éventuelles.

### **A partir d'organes**

1. **Réaliser un mélange « organes/PBS »** en respectant les **proportions poids/volume de 10% à 20%**.  
Par exemple : Prélever 100 à 130 mg d'organes (balance de précision), puis transférer dans un tube contenant 1 à 2 billes de métal de 3mm et 1000 µl de PBS.
2. **Broyer** l'organe. Adapter vos conditions de broyage (vitesse et temps) en fonction de votre broyeur et de l'organe à broyer afin que la lyse cellulaire soit optimale. BioSella propose les conditions ci-dessous :
  - 2 minutes à 30 Hz (ex Retsch™)
  - 2 x 30 secondes à 6 m/s (ex FastPrep™)
  - 2 x 90 secondes à 6800 rpm (ex Precellys™)
3. Centrifuger le broyat d'organes 15 minutes à 2000 x g.
4. Poursuivre avec l'extraction et la purification des acides nucléiques à partir **de 200 µl de surnageant de broyat** en suivant les protocoles BioExtract® Column et BioExtract® SuperBall® décrits dans le manuel d'extraction.

Le reste du surnageant de broyat devra être conservé à ≤ -65°C pour la réalisation d'analyses complémentaires éventuelles.

**Les protocoles des kits d'extraction proposés par BioSella sont détaillés dans le manuel d'extraction commun aux Bio-T Kit® Avian & Swine Influenza Virus, Bio-T Kit® AIV genotypes H5 & H7, Bio-T Kit® AIV genotype H9. En cas d'utilisation d'un autre kit d'extraction, se référer à la notice d'utilisation fournie par le fabricant. Pour plus d'informations veuillez contacter notre support technique.**

## Contenu du kit et conditions de conservation

Tableau 1. Descriptif du contenu du kit					
Description	Référence	Volume/tube		Présentation	Conservation
		BIOTK082-50 50 réactions	BIOTK082-100 100 réactions		
<b>Master Mix (MM)</b> Prêt à l'emploi	MMH5H7-A	750 µl	2x750 µl	tube bouchon gris Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
<b>External Positive Control (EPC)<sup>o</sup></b> Contrôle positif d'amplification de H5 et de H7.	EPCASIV-B		110 µl	tube bouchon rouge Sachet B	≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »
<b>Eau</b> RNase/DNase free	Aqua-A		1 ml	tube bouchon bleu Sachet B	5°C ±3 °C ou ≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »

<sup>o</sup> L'EPC est commun aux Bio-T kit<sup>®</sup> Avian & Swine Influenza Virus et Bio-T kit<sup>®</sup> AIV genotypes H5 & H7.

Les réactifs du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le sachet, sous réserve du bon respect des conditions de conservation.

### Liste des réactifs de vérification des performances

Pour les adoptions de RT-PCR et de méthode, les ARN transcrits de ASIV (Avian & Swine Influenza Virus), H5 et H7, (titrés en nombre de copies/RT-PCR) et des suspensions virales de virus inactivés de sous-types H5 et H7 (titrés en équivalent LD<sub>METHODE</sub> du LNR IA) utilisés par BioSella dans le dossier de validation sont requis. Ces matériaux sont disponibles auprès du LNR de l'IA. Un matériel de référence interne (MRI) de la matrice écouvillon trachéal (titré en équivalent LD<sub>METHODE</sub> de BioSella), permettant de suivre la bonne maîtrise des procédures analytiques, est proposé par BioSella. Ce MRI est commun aux Bio-T kit<sup>®</sup> Avian & Swine Influenza Virus

et Bio-T kit<sup>®</sup> AIV genotypes H5 & H7. BioSella commercialise ce réactif sous la référence suivante :

Tableau 2. Réactif en option			
Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
<b>MRI écouvillon trachéal</b>	Écouvillon trachéal positif pour ASIV et doublement positif pour H5 et H7 Titré à 20 LD <sub>METHODE</sub> BioSella pour ASIV, 1 LD <sub>METHODE</sub> BioSella pour H5 et 10 LD <sub>METHODE</sub> BioSella pour H7 <sup>z</sup>	BioSella	MRI-AIV-001

¥ Pour la valence H7, le MRI est titré à 10 LD<sub>METHODE</sub> BioSella pour les méthodes d'extraction BioExtract® Column et BioExtract® SuperBall® avec le programme classique 38 minutes et à 1 LD<sub>METHODE</sub> BioSella pour les méthodes d'extraction BioExtract® SuperBall® avec le programme court 19 minutes.

Pour les MRI sur des matrices autres que les écouvillons trachéaux, contacter BioSella ([contact@biosella.com](mailto:contact@biosella.com)).

## Liste des consommables et réactifs non fournis dans le kit

Tableau 3. Consommables et réactifs non fournis dans le kit			
Consommable / Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (50)	BioSella	BEC050
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (250)	BioSella	BEC250
BioExtract® SuperBall®	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques (4 x 96)	BioSella	BES384
Consommables et réactifs dédiés à chaque poste de travail	Cônes à filtres RNase/DNase free 0.5µL-10µL ; 0.5µL-20µL, 10µL-100µL et 100µL-1000µL	Fournisseur de votre choix	
	Microtubes RNase-free de 1.5mL, 2mL		
	Gants non poudrés		
	Protections individuelles		
	PBS 1X stérile ou eau RNase/DNase free		
Petit matériel dédié à chaque poste de travail	Vortex de paillasse	Fournisseur de votre choix	
	Centrifugeuse pour microtubes		
	Micropipettes 0.5µL-10µL ; 0.5µL-20µL, 10µL-100µL et 100µL-1000µL		
	Portoir réfrigéré		
Matériel	Thermocycleur en Temps réel avec son consommable : Plaque 96 avec film optique ou tubes PCR avec capuchon optique.		

## MODALITES D'ELIMINATION DES REACTIFS

La mise en œuvre du protocole de RT-PCR associé au Bio-T Kit® AIV genotypes H5 & H7 ne génère aucun risque pour le manipulateur et l'environnement.

## Principales précautions à appliquer

- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (à minima : blouse, gants jetables, voire lunettes de protection, masque FFP3 selon les risques zoonotiques...).
- Travailler dans des zones dédiées et séparées afin d'éviter toute contamination : « Extraction » (stockage des échantillons non extraits, zone avec matériel d'extraction), « MIX » (stockage des Master Mix prêts à l'emploi, préparation de plaques PCR en temps réel), « Ajout d'AN » (stockage et addition des acides nucléiques extraits et des contrôles dans la plaque PCR en temps réel), « PCR » (zone finale, contenant le(s) thermocycleur(s)).
- Utiliser des équipements dédiés pour chaque zone de travail (gants, blouse, pipettes, vortex ...).
- Décongeler tous les réactifs stockés à  $\leq -16^{\circ}\text{C}$  avant utilisation.
- Vortexer et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse) tous les réactifs juste avant utilisation.
- **Les Master Mix pour RT-PCR one-step sont plus fragiles que les Master Mix pour PCR. Afin de garantir le maintien de leurs performances, il est obligatoire de décongeler les tubes extemporanément avant leur utilisation, de bien les vortexer juste avant emploi, de les conserver à  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  lors du dépôt et de les recongeler aussitôt après.**
- Utiliser des pointes à filtre.
- Il est recommandé de ne pas excéder 3 cycles de congélation-décongélation des réactifs, des échantillons, des lysats, et des acides nucléiques extraits. Suivant votre utilisation, nous vous préconisons de faire des fractions aliquotes de volume adéquat.
- Les génomes des pathogènes détectés par les kits de la **gamme AVIAN** sont à ADN ou à ARN. **Travailler avec de l'ARN étant plus exigeant que de travailler avec de l'ADN** (instabilité de l'ARN et omniprésence des RNases), **il est recommandé d'appliquer par défaut les précautions liées à l'utilisation de l'ARN:**
  - o Toujours porter des gants et les changer fréquemment notamment après tout contact avec la peau, les paillasses ou le matériel.
  - o Traiter toutes les surfaces et les équipements avec des agents d'inactivation des RNases (disponibles dans le commerce).
  - o Après avoir mis des gants et décontaminé le matériel, minimiser les contacts avec les surfaces et les équipements pour éviter la réintroduction des RNases.
  - o Utiliser des consommables « RNases free ».
  - o Il est recommandé de conserver les ARN réfrigérés pendant la manipulation puis de les congeler dès que possible de préférence à  $\leq -65^{\circ}\text{C}$  ou à défaut à  $\leq -16^{\circ}\text{C}$ .
  - o Ouvrir et refermer individuellement les tubes au fur et à mesure et limiter les durées d'ouverture afin d'éviter le contact avec les RNases présentes dans l'environnement (peau, poussières, surfaces de travail...).

# DETECTION DES SOUS TYPES H5 ET H7 DE L'INFLUENZA AVIAIRE PAR RT-PCR AVEC LES BIOTK082-50/BIOTK082-100

## Procédure globale à suivre

### 1) Etablir un plan de plaque définissant la position de chaque échantillon et **incluant les contrôles** décrits ci-dessous :

- **Contrôle négatif de processus (NCS)** : l'eau (ou PBS) remplace l'échantillon depuis le stade initial d'extraction voir de prétraitement.  
Ce contrôle est obligatoire pour chaque série d'extraction.
  
- **Contrôle négatif d'amplification (NC)** : 5 µl d'eau RNase/DNase free remplace les 5 µl d'extrait d'acides nucléiques au moment du dépôt sur la plaque RT-PCR. Le tube Aqua-A (bouchon **bleu**) fourni peut être utilisé.  
Ce contrôle est recommandé lors de la 1ère utilisation du kit ou pour vérifier l'absence de contamination du Master Mix suite à un résultat non conforme avec le NCS.
  
- **Contrôle positif d'amplification des sous types H5 et H7 (EPC)** : il s'agit d'ADN synthétique (tube **EPCASIV-B**, bouchon **rouge** ), contenant les séquences cibles spécifiques de **H5** et de **H7**. Il contient également les séquences spécifiques ciblées par le Bio-T Kit® Avian & Swine Influenza Virus. L'EPC est donc commun à ces deux kits.  
Ce contrôle est obligatoire sauf en cas d'utilisation d'un témoin positif de processus.

**⚠ ATTENTION** : *La manipulation du tube EPC représente un risque de contamination, il est recommandé de ne l'ouvrir et de ne le manipuler que dans une zone délimitée, éloignée des autres composants et de prendre les précautions nécessaires pour éviter toute contamination croisée avec des échantillons lors du dépôt sur la plaque.*

- **Témoin positif de processus « sentinelle », MRI**, un échantillon POSITIF de la matrice d'intérêt faiblement chargé est extrait en même temps que les échantillons en un ou plusieurs exemplaires (selon le nombre d'échantillons analysés). Après RT-PCR, les valeurs de Ct de ce témoin d'extraction seront reportées et suivies dans le temps sur une carte de contrôle. Le fait d'obtenir, après extraction et RT-PCR, des valeurs de Ct attendues avec ce témoin positif valide l'ensemble de la méthode. Dans ce cas, l'utilisation de l'EPC livré avec ce kit n'est plus obligatoire.

## 2) Préparation de la plaque

Dans la zone réservée au «MIX »

1. Après décongélation, vortex et brève centrifugation, **transférer 15 µl de Master Mix MMH5H7-A** (tube bouchon gris) dans chaque puits d'intérêt (échantillons et contrôles).

⚠ Les Master-Mix pour RT-PCR one-step sont plus fragiles que les Master-Mix pour PCR. Afin de garantir le maintien de leurs performances, il est obligatoire de décongeler les tubes extemporanément avant leur utilisation, de bien les vortexer juste avant emploi, de les conserver à 5°C ± 3°C lors du dépôt et de les recongeler aussitôt après.

Dans la zone dédiée à l'ajout des acides nucléiques

2. **Ajouter 5 µl d'acides nucléiques extraits (ou NCS, eau, témoin de processus ou EPC: tube EPCASIV-B, bouchon rouge)** par puits d'intérêt, en veillant à les déposer bien au fond du puits, au contact du Master Mix et en évitant de faire des bulles.
3. Filmer la plaque avec le film optique ou fermer les tubes avec les capuchons optiques adaptés.

Dans la pièce dédiée à l'amplification PCR

4. **Paramétrer le thermocycleur** (voir Tableau 4, Tableau 5, Tableau 6)
5. Il est recommandé de **centrifuger la plaque avant de la positionner dans le thermocycleur**, ceci permettra d'éviter la présence de gouttes sur les parois et d'éliminer au maximum les bulles et de placer les acides nucléiques au contact du Master Mix.
6. Démarrer le programme. Durée de run approximative de 90 min.

## 3) Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut) et confirmé sur ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en ramping standard et fast. Pour d'autres thermocycleurs, contacter notre support technique.

Tableau 4. Configuration du thermocycleur		
	ABI PRISM® 7500 Fast	AriaMx™
<b>Mode</b>	Quantitation – Standard curve	Quantitative PCR, Fluorescence Probe
<b>Ramping</b>	Ramping Standard ou Ramping Fast	Ramping Fast par défaut
<b>Référence passive</b>	ROX	ROX

Tableau 5. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	Détecteurs		Volume final / puits
	Reporter	Quencher	
H5	FAM	NFQ-MGB ou None*	20 µl  = 15 µl Master Mix + 5 µl d'acides nucléiques ou contrôles <sup>†</sup>
H7	VIC	NFQ-MGB ou None*	
IPC endogène	Cy5	NFQ-MGB ou None*	
à attribuer aux échantillons et contrôles <sup>†</sup>			

\* Choix variable suivant le modèle de thermocycleur, si besoin contacter le Support Technique de BioSellaal (tech@biosellaal.com)

† Les contrôles sont les NC (eau), NCS (eau extraite), le témoin de processus et EPC (ADN cible de H5 et H7).

Tableau 6. Paramétrage du PROGRAMME H5 & H7		
Ramping Standard ou Fast		
Cycles	Temps	Température
1 cycle	20 min	50°C
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	10 sec	95°C
	<b>60 sec*</b> + acquisition des données	<b>54°C*</b>

¥ Les analyses de robustesse effectuées sur les étapes critiques du protocole de RT-PCR du Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7 ont montré que la variation de +/- 10% du volume d'acides nucléiques et de durée d'élongation et de +/- 1°C de la température d'hybridation, n'ont pas d'impact sur les performances du test. Cependant, l'utilisation du programme PIG/AVIAN AVEC RT, utilisé pour les Bio-T kit® Avian & Swine Influenza Virus et Bio-T kit® AIV genotype H9 ne permet pas de maintenir les performances du kit. Il est donc très important d'utiliser le programme spécifique H5 & H7.

## INTERPRETATION DES RESULTATS

Afin d'analyser et d'interpréter les signaux obtenus après RT-PCR, il est nécessaire de placer la ligne seuil ou « threshold ». Elle doit être positionnée soigneusement afin d'obtenir le résultat le plus reproductible possible entre les différentes manipulations selon les paramètres définis dans l'Annexe C de la norme NF U47-600-1. Pour cela, on utilise un ensemble cohérent de signaux positifs, *a minima* le témoin positif (EPC), et on place la ligne seuil au-dessus du bruit de fond, et dans la zone exponentielle d'amplification.

Le cycle seuil, nommé « Ct » ou « Cq » en fonction des thermocycleurs, correspond à l'intersection entre les courbes d'amplification et la ligne seuil. Il permet la mesure relative de la concentration de la cible dans la réaction de RT-PCR lorsqu'un extrait calibré est analysé dans la même série.

La série de RT-PCR est validée si les contrôles (EPC, Témoin positif de processus, NCS ou NC) fournissent des résultats valides, puis le résultat de chaque échantillon peut être interprété.

## Principaux cas de figures

### Lecture des Contrôles

Tableau 7. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles

	Cibles			Interprétation
	H5 (FAM)	H7 (VIC)	IPC endogène (Cy5)	
<b>NCS</b> Contrôle Négatif de processus  <b>OBLIGATOIRE</b>	Non détecté	Non détecté	Non détecté Ou Ct <sub>≥35</sub> °	Validé
	Au moins une des trois valences <b>Détectées</b>			Contamination avec un échantillon négatif/positif ou un contrôle de processus lors de l'extraction ou de la préparation de la plaque. °
<b>NC</b> Contrôle Négatif d'amplification  <b>FACULTATIF</b>	Non détecté	Non détecté	Non détecté Ou Ct <sub>≥35</sub> °	Validé
	Au moins une des trois valences <b>Détectées</b>			Contamination avec un échantillon négatif/positif ou un contrôle de processus lors de la préparation de la plaque ou contamination du Master Mix/eau.
<b>EPC°</b> Contrôle Positif d'amplification de H5 et de H7  <b>OBLIGATOIRE</b>  <i>EN ABSENCE DU            TEMOIN POSITIF DE            PROCESSUS</i>	Détecté*	Détecté*	Non détecté Ou Ct <sub>≥35</sub> °	Validé
	Non détecté	Non détecté	Non détecté Ou Ct <sub>≥35</sub> °	Problème lors de la RT-PCR: Erreur de Master Mix ? Oubli de l'EPC ?
	Détecté*	Détecté*	Détecté	Contamination lors de la préparation de la plaque par un échantillon ou un contrôle de processus.
<b>Témoin positif            de processus</b>  <b>OBLIGATOIRE</b> <i>SI ACCREDITATION</i> <b>RECOMMANDE</b> <i>SI DISPONIBLE</i>	Détecté †	Détecté †	Détecté ‡	Validé
	Non détecté	Non détecté	Non détecté Ou Ct <sub>≥35</sub> °	Problème lors de la RT-PCR: Erreur de Master Mix ? Oubli d'ajout des acides nucléiques ou dépôt non au contact du Master Mix lors de la préparation de la plaque ? Dérive du processus : extraction et/ou RT-PCR ? Dégradation de l'échantillon contrôle ?

\* La valeur de Ct obtenue doit être conforme à la valeur donnée sur le certificat d'analyse (CA).

† Les valeurs de Ct doivent être comprises dans les limites de la carte de contrôle.

‡ La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extractions utilisées. Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes validées par Biosellal, sont présentées dans le dossier de validation du Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7. Biosellal recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum de l'IPC tolérée en fonction de sa méthode d'extraction et de son thermocycleur.

° L'EPC est commun aux Bio-T kit® Avian & Swine Influenza Virus et Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7.

α : L'IPC endogène a pour cible un ARNm d'un gène exprimé par les cellules des espèces suivantes : galliformes, ansériformes ou columbiformes. Il ne devrait donc pas être détecté en RT-PCR à partir des NCS, NC et EPC. Cependant, un léger signal peut être observé pour l'IPC dans les témoins négatifs et dans l'EPC en raison d'une réaction croisée entre la β-actine aviaire et la β-actine humaine. Ce signal ne doit pas être inférieur à Ct 35.

## Lecture des Echantillons extraits

Tableau 8. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons			
H5 (FAM)	Cibles		Interprétation
	H7 (VIC)	IPC endogène (Cy5)	
Non détecté	Détecté	Détecté*	<b>Détecté</b> Présence de génome viral de l'Influenza Aviaire type A et de sous-types H7
Détecté	Non détecté		<b>Détecté</b> Présence de génome viral de l'Influenza Aviaire type A et de sous-types H5
Détecté	Détecté		<b>Détecté</b> Présence des génomes viraux de l'Influenza Aviaire type A et de sous-types H5 et H7
Détecté	Détecté	<b>Non détecté ou Ct&gt;35</b>	<b>Détecté</b> Compétition avec la cible ? Problème lors de l'extraction ? Présence d'inhibiteurs <sup>†</sup> ? Problème de prélèvement : quantité de cellules insuffisante ?
Une des deux valences <b>Non détecté</b>		<b>Non détecté ou Ct&gt;35</b>	<b>Détecté pour la valence positive</b> <b>Ininterprétable pour la valence négative</b> Risque de non détection d'un échantillon faiblement positif = analyse à refaire Compétition avec la cible ? Problème lors de l'extraction ? Présence d'inhibiteurs <sup>†</sup> ? Dégradation des acides nucléiques dans l'échantillon ? Problème de prélèvement : quantité de cellules insuffisante ?
Non détecté	Non détecté	<b>Non détecté ou Ct&gt;35</b>	<b>Ininterprétable</b> Risque de non détection d'un échantillon faiblement positif = analyse à refaire Oubli d'addition des acides nucléiques extraits ou dépôt non au contact du Master Mix lors de la préparation de la plaque ? Présence d'inhibiteurs <sup>†</sup> ? Dégradation des acides nucléiques dans l'échantillon ? Problème de prélèvement : quantité de cellules insuffisante ? Problème lors de l'extraction ?

\* La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extractions utilisées. Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes validées par BioSella, sont présentées dans le dossier de validation du Bio-T kit® AIV genotypes H5 & H7. BioSella recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum de l'IPC tolérée en fonction de sa méthode d'extraction et de son thermocycleur.

† En cas de suspicion d'inhibition, 1) Répéter la RT-PCR en prédiluant les acides nucléiques extraits au 1/10 voire au 1/100 dans de l'eau DNase/RNase free ou 2) Reprendre l'analyse depuis l'extraction.

Notes :



[www.biosellal.com](http://www.biosellal.com)

### Support Technique

[tech@biosellal.com](mailto:tech@biosellal.com)

+33 (0) 4 26 78 47 62

### Renseignements et commandes

[contact@biosellal.com](mailto:contact@biosellal.com)

+33 (0) 4 26 78 47 60

