



Kylt[®]

V

À n'utiliser que pour le diagnostic vétérinaire *in vitro*.

Kylt[®] IVA beta

Kit de détection par RT-PCR en temps réel
pour la détection du virus Influenza de type A

www.kylt.eu

Kylt® IVA beta

Kit de détection par RT-PCR en temps réel pour la détection du virus Influenza de type A

25 / 100 réactions,
diagnostic *in vitro* pour oiseaux et cochons

A. Généralités

- Le Kylt® IVA beta a été développé selon les exigences de la norme NF U47-600-2 et du cahier des charges du Laboratoire national de référence pour l'influenza aviaire (référence 170858) pour permettre la détection du génome viral des virus influenza de type A dans différentes matrices aviaires par RT-PCR en temps réel. Le Kylt® IVA beta a fait l'objet d'un contrôle initial de conformité par le Laboratoire national de référence pour l'influenza aviaire (Anses, laboratoire de Ploufragan-Plouzané) pour la détection du gène M du virus de l'influenza aviaire de type A dans le cadre d'analyses officielles à partir de surnageants d'écouvillons trachéaux/oropharyngés, d'écouvillons cloacaux et de surnageants de broyats d'organes provenant uniquement d'espèces aviaires, et dans le cadre d'autocontrôles à partir de surnageants d'écouvillons trachéaux/oropharyngés et cloacaux provenant uniquement d'espèces aviaires. L'utilisation du Kylt® IVA beta à partir de toute autre matrice (notamment suidés et excréments) ou dans tout autre contexte (recherche, étude épidémiologique, etc.), bien que n'ayant pas fait l'objet d'une évaluation par le Laboratoire national de référence pour l'influenza aviaire, a été validée par le producteur. Le Kylt® IVA beta a été validé par le producteur avec des échantillons de poulets, de dindes, d'ois, de canards et de porcins.
- Kylt® IVA beta contient tous les réactifs et contrôles pour la détection de l'ARN du virus Influenza de type A. La détection qualitative de Kylt® IVA beta est basée sur une RT-PCR duplex en temps réel: Les deux gènes cibles, d'une part pour le virus Influenza de type A, d'autre part pour le gène «Housekeeping» β -actine, sont tout d'abord soumis dans un mélange réactionnel commun à une transcription inverse (processus de transcription inverse (RT)), puis parallèlement amplifiés dans la réaction en chaîne par polymérase (PCR) à l'aide des paires d'amorces spécifiques correspondantes. Les fragments de gènes cibles amplifiés sont détectés en temps réel pendant la réaction de PCR en cours grâce à des sondes fluorescentes. Les sondes spécifiques pour la détection des fragments de gènes cibles amplifiés d'influenza A ou de β -actine sont marquées avec les fluorochromes FAM ou HEX. Le thermocycleur de PCR en temps réel détecte de manière optique les fluorescences spécifiques émises respectivement. À partir de ces deux analyses indépendantes dans le même mélange réactionnel, des contrôles négatif et positif, il est possible d'obtenir pour chaque échantillon, un résultat qualitatif valide révélant son statut spécifique sur l'influenza A. De cette façon, des résultats peuvent être obtenus en l'espace de quelques heures après la réception de l'échantillon.
- Le kit a été développé selon des procédés standardisés pour l'utilisation par un personnel de laboratoire formé. Cette notice est à suivre rigoureusement.

B. Réactifs et matériaux

- Kylt® IVA beta contient les réactifs suivants:

réactif	code couleur couvercle	quantité dans le kit avec 25 / 100 réactions	stockage
2x RT-qPCR-Mix	○ transparent	1 x / 4 x 280 µl	-18 °C à -20 °C
Mélange de détection	● vert	1 x / 4 x lyophilisat (final respectivement 150 µl)	-18 °C à -20 °C
Contrôle positif (CP)	● rouge	2 x / 4 x lyophilisat (final respectivement 50 µl)	-18 °C à -20 °C
Contrôle négatif (CN)	● bleu	1 x 1 ml	-18 °C à -20 °C

- Le kit et ses composants doivent être stockés à une température de -18 °C à -20 °C immédiatement après leur réception. Éviter de congeler et de décongeler le kit ou ses composants de manière répétitive. Les réactifs doivent rester le moins longtemps possible à l'état décongelé. Afin d'éviter une congélation et une décongélation répétitives, des aliquotes de volume adéquat doivent être générées après la première décongélation. Le kit et ses composants sont utilisables jusqu'à la date d'expiration indiquée pour un stockage conforme à la consigne (voir l'étiquette du carton d'emballage). Ne pas mélanger les réactifs de charges différentes entre eux.
- Le mélange de détection doit être stocké à l'obscurité à une température de -18 °C à -20 °C et ne doit pas être exposé à la lumière solaire directe. Avant la première utilisation, réhydrater le mélange de détection lyophilisé. 150 µl de contrôle négatif sont respectivement ajoutés à un lyophilisat du mélange de détection, incubés pour une courte durée et mélangés brièvement par vortex. Le mélange de détection réhydraté est aliquoté en portions de volume adéquat et stocké à une température de -18 °C à -20 °C.
- Les réactifs sont appropriés pour la préparation et l'utilisation d'un plus grand volume de Master Mix de travail, voir également le 4ème point « recommandation » dans le chapitre 3 « Procédure de la réaction, transcription inverse et amplification »
- La réhydratation du contrôle positif lyophilisé est faite avant la première utilisation en ajoutant respectivement 50 µl de contrôle négatif dans un lyophilisat de contrôle positif. Celui-ci est incubé pour une courte durée et mélangé brièvement par vortex. Le contrôle positif réhydraté est aliquoté en portions de volume adéquat et stocké à une température de -18 °C à -20 °C. Le contrôle positif contient les gènes cibles aussi bien pour le canal spécifique de détection du virus Influenza de type A que pour le canal de contrôle interne (canal de détection de la β-actine).
- Le kit peut être utilisé avec tous les thermocycleurs de PCR en temps réel commercialisés qui détectent une fluorescence émise des fluorochromes FAM (émission vers 520 nm) et HEX (émission vers 550 nm). Notez que l'option de normalisation par défaut sur ROX (par exemple, sur un cycleurs d'Applied Biosystems) doit être désactivée. Les thermocycleurs suivants ont été utilisés dans le dossier de caractérisation du kit Kylt® IVA beta: CFX 96 et CFX 384 (BioRad), Rotor-Gene Q (Qiagen), Rotor-Gene 3000 et 6000 (Corbett Research), AriaMx Pro (Agilent), ABI 7500 (Life Technologies), LightCycler® 96 et 480 (Roche), Eco™ (illumina).
- Nous recommandons d'utiliser exclusivement des matériaux consommables certifiés exempts de nucléase, ainsi que des gants en latex non poudrés. Veuillez porter des gants tout au long du processus expérimental. Changez les gants aussi souvent que possible, en particulier après avoir renversé quelque chose ou au cas où une contamination autre est suspectée. Afin d'éviter des contaminations croisées, les pointes de pipettes doivent être changées entre chaque échantillon.

- En plus du matériel consommable, les matériaux suivants sont requis (non inclus dans le kit) :
 - Kit d'extraction d'ARN /-protocole (par ex. Kylt® RNA / DNA Purification)
 - Centrifugeuse de paillasse
 - Vortexer
 - micropipettes, appropriées pour des volumes de 1 µl à 1000 µl
 - Centrifugeuse pour tubes de réaction PCR
 - Thermocycleur de PCR en temps réel

C. Réactions de contrôle

- Le contrôle négatif contenu dans le kit permet l'exclusion de contaminations provenant des réactifs. Le contrôle positif contenu dans le kit permet de contrôler la spécificité et l'efficacité des réactifs utilisés, de la transcription inverse, de la PCR en temps réel, ainsi que du thermocycleur de PCR en temps réel. L'ensemble du test ne peut être évalué comme étant valide dans l'évaluation finale que lorsque le contrôle négatif et le contrôle positif sont effectués dans chaque réaction de RT-PCR en temps réel et vérifiés comme étant valides.
- Le kit contient un système d'amorces et de sondes pour la détection de la β-actine comme contrôle interne. Dans le cas d'une préparation d'ARN réussie, de l'absence d'inhibition de la transcription inverse et de la PCR en temps réel et d'un prélèvement correct des échantillons, la β-actine sera détectée dans le canal de contrôle interne (HEX). Ce canal sert ainsi à confirmer les résultats véritablement négatifs par la vérification d'une préparation d'ARN réussie, ainsi que de l'exclusion d'inhibiteurs de RT-PCR et de PCR en temps réel dans les préparations d'ARN.
- Il est obligatoire d'utiliser un ou plusieurs contrôle(s) d'isolement d'ARN (RIC) par processus de préparation d'ARN, en fonction du nombre total d'échantillons d'une analyse. Le RIC ne doit comporter que le tampon stérile, également utilisé pour la purification des échantillons. Le RIC est placé au hasard parmi les échantillons, il est traité comme un échantillon normal et permet la détection de contaminations potentielles dans les réactifs utilisés (en plus du contrôle négatif), ainsi qu'une détection d'éventuelles contaminations croisées ou de propagation entre les échantillons individuels pendant la préparation d'ARN.
- Il est conseillé de réaliser un Contrôle Positif d'extraction pour chaque processus de purification.

D. Protocole (> voir également la notice abrégée à la fin de la notice d'utilisation)

- L'ensemble de la méthode de détection IVA beta comporte les étapes suivantes :
 1. Préparation des échantillon
 2. Préparation de l'ARN
 3. procédure de la réaction, transcription inverse et amplification (PCR)
 4. Évaluation des données – validité et résultat qualitatif
- Nous recommandons de travailler rapidement et sans interruption afin d'éviter une dégradation potentielle des échantillons et des réactifs. Si nécessaire, il est possible de stocker la préparation d'ARN finale à une température de -18 °C à -20 °C ou -70 °C à -80 °C jusqu'à la détection IVA suivante. Éviter des congélations et décongélations répétitives des préparations d'ARN.

1. Préparation des échantillons

- Pour la préparation des échantillons, les règlements de l'UE pertinents sont à respecter (par ex. pour les échantillons aviaires 2005/734/EC et 2006/437/EC). Pour autant qu'une mise en pool de plus de cinq échantillons ou d'échantillons provenant de plus de cinq animaux soit prévue, la préparation des échantillons doit être validée par l'utilisateur dans le laboratoire en interne conformément aux exigences de son système d'assurance de la qualité. Pour Kylt® IVA beta, on a pu démontrer que dix échantillons ou des échantillons provenant de dix animaux maximum pouvaient être mis en pool par préparation d'ARN sans avoir une perte de la sensibilité.
- Préparation des échantillons dans le cadre d'analyses officielles (par exemple, suspicion clinique) et d'autocontrôles:
 - A partir d'écouvillons trachéaux/oropharyngés, d'écouvillons cloacaux :
 - Chaque écouvillon est repris individuellement dans du PBS stérile 1X ou du MEM (Milieu Essentiel Minimum) additionné d'antibiotiques selon les recommandations de la NFU 47-210
 - Agiter vigoureusement au vortex
 - Selon le contexte, constitution d'un mélange de 5 écouvillons maximum par type de prélèvement en prélevant des volumes équivalents dans chaque surnageant d'écouvillon.
 - A partir d'organes aviaires :
 - Chaque type ou mélange d'organe(s) est broyé afin d'obtenir une suspension d'environ 10-20 % poids/volume en STP (ou similaire) après centrifugation.
- Le volume d'éluat ou de broyat d'organes restant de chaque écouvillon devra être conservée à $\leq -65^{\circ}\text{C}$ pour la réalisation d'analyses complémentaires.
- Quelle que soit la matrice, il devra rester un minimum de 500 μl de chaque surnageant individuel, afin de répondre aux exigences du manuel de diagnostic européen en permettant la réalisation des analyses complémentaires (isolement viral).

2. Préparation d'ARN

- Seul un kit qui a fait l'objet d'une validation peut être utilisé (Kylt® RNA/DNA Purification, RNeasy Mini Kit (Qiagen) ou NucleoMag Vet kit (Machery&Nagel) sur un appareil de type Hamilton Mircolab STARlet Liquid Handling System. Pour l'utilisation de tout autre kit d'extraction, une vérification des performances doit être effectuée. La concentration en ARN exclusivement terminée recommandée devrait être comprise entre 1 $\text{pg}/\mu\text{l}$ et 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Pour garantir une qualité suffisante de l'ARN purifiée, le quotient DO260/DO280 devrait être compris entre 1,8 et 2,2.
- Des informations détaillées quant à la préparation de l'ARN se trouvent dans la notice d'utilisation du kit correspondant.

3. Procédure de la réaction, transcription inverse et amplification

- Avant chaque utilisation, le mélange 2x RT-qPCR-Mix et le mélange de détection réhydraté (voir également chapitre B « Réactifs et matériaux ») doivent être mélangés brièvement au vortex et centrifugés.
- Pour déterminer le nombre total de réactions nécessaires, on compte le nombre des échantillons à examiner plus deux autres mélanges réactionnels pour les contrôles négatif et positif.

- Le Master Mix est préparé à partir du 2x RT-qPCR-Mix et du mélange de détection pour le nombre correspondant de réactions. 16 µl de Master Mix sont pipetés dans chaque puit de plaque. La RT-PCR en temps réel est préparée dans l'ordre suivant:

Réactif	Volume (µl)	
	par réaction	Exemple (n = 7)
2x RT-qPCR-Mix	10,0	70,0
Mélange de détection	6,0	42,0
Total Master Mix	16,0	112 ; pipeter 16 µl par réaction
ARN (contrôle négatif / échantillon (/ RIC) / contrôle positif)		4,0
Total réaction		20,0

- **RECOMMANDATION : Un plus grand volume de Master-Mix de travail prêt à l'emploi peut également être préparé. Ce Master Mix de travail peut être stocké à une température de -18 °C à -20 °C. Le Master Mix de travail doit être aliquoté de telle façon qu'il ne soit pas soumis à plus de trois cycles de congélation et décongélation.**

- Veillez à ce que le 2x RT-qPCR-Mix et le mélange de détection soient exposés le moins possible à la lumière du soleil et à ce que les deux réactifs soient immédiatement stockés à une température de -18 °C à -20 °C après utilisation. Éviter la formation de bulles d'air pendant le pipetage du Master Mix, des échantillons et des contrôles.
- Pipeter 4 µl du contrôle négatif dans le puits correspondante et refermer si possible chacune de ces puit.
- Pipeter 4 µl de l'ARN échantillon (préparation finale d'ARN dans le puits correspondante et refermer si possible chacune de ces puits.
- Afin de minimiser le risque de contaminations croisées potentielles, 4 µl du contrôle positif sont pipetés dans le puits correspondante seulement lorsque tous les échantillons et contrôles ont été ajoutés. Avant chaque utilisation, mélanger brièvement au vortex et centrifuger le contrôle positif (voir également chapitre B « Réactifs et matériaux »).
- Si cela n'a pas encore été fait, refermer toutes les puits. Dans tous les cas, il est recommandé de centrifuger les puits avant le démarrage de la RT-PCR en temps réel.
- Les puits sont ensuite déposées dans le thermocycleur de PCR en temps réel et le test est effectué avec les paramètres suivants:

Étape	Température	Durée
Transcription inverse	50 °C	10 min
Activation de la polymérase	95 °C	1 min
Dénaturation	95 °C	10 sec
Hybridation & élongation	60 °C	1 min
Mesure de la fluorescence	Canaux FAM et HEX	} 42 cycles

- Veuillez observer les indications spécifiques du fabricant de l'appareil concernant votre thermocycleur de PCR en temps réel.
- Les paramètres permettent une combinaison de Kylt® IVA beta avec d'autres (RT) PCR en temps réel Kylt®. Dans le cas d'une combinaison de plusieurs kits de détection, il faut veiller à enregistrer tous les canaux requis.

4. Évaluation des données – Validité et résultat qualitatif

Généralités

- Les données des réactions d'amplification peuvent être traitées automatiquement avec le logiciel spécifique de votre thermocycleur de PCR en temps réel. Alternativement, la valeur seuil (Threshold) peut également être fixée manuellement, dans ce cas-là les points suivants doivent être respectés : le threshold doit couper la courbe FAM et la courbe HEX dans leur domaine linéaire de la phase de croissance (échelle log de l'axe y). Par la fixation du threshold, le point d'intersection avec la courbe respective HEX ou FAM correspond au soi-disant « Cycle of threshold » (CT) correspondant. Celui-ci est inversement corrélé à la concentration initiale des copies de gènes cibles dans la réaction de RT-PCR en temps réel.
- L'évaluation effective du test commence avec la détermination de la validité de la réaction complète de la PCR en temps réel. La validité de chaque réaction ainsi que le résultat du test peuvent être vérifiés grâce à la détection de la β -actine. Ceci a lieu à l'aide de la valeur Ct du canal de contrôle interne (HEX) pour la détection de la β -actine. Le statut spécifique de l'IVA de chacun des échantillons est ensuite déterminé (FAM).
- Le **certificat d'essai** de la charge du kit correspondante montre des **valeurs Ct attendues** pour la détection spécifique de l'IVA dans le canal FAM et pour la détection de la β -actine dans le canal HEX du contrôle positif pour les thermocycleurs de PCR en temps réel qui y sont mentionnés et utilisés dans le test. Les valeurs Ct attendues doivent être atteintes avec un écart maximal de ± 3 , dans le cas contraire, elles doivent être adaptées aux conditions spécifiques du laboratoire et des appareils par une vérification adéquate dans le cadre de la gestion de qualité.

Évaluation du test

- La **réaction de RT-PCR en temps réel** n'est **valide** que lorsque la courbe FAM du contrôle négatif est négative ($Ct > 40$) et les courbes FAM et HEX du contrôle positif sont positives ($Ct < 40$ et $Ct < 35$, respectivement) ; pour un test valide, la valeur Ct de FAM et HEX du contrôle positif doit se situer dans l'intervalle de variation autorisé de la valeur attendue.
- Dans le cas où un ou plusieurs contrôles d'isolement de l'ARN (RIC(s)) ont été introduits, il ne doit pas résulter de valeur Ct des courbes FAM et HEX correspondantes ($Ct > 40$ et $Ct > 35$, respectivement).

Courbe HEX positive ($Ct < 35$)	oui	oui	non	non
Courbe FAM positive ($Ct < 40$)	non	oui	oui	non
L'échantillon est IVA	négatif	positif	positif	invalide

- Un **échantillon est négatif** (absence d'IVA) lorsque sa courbe FAM est négative ($Ct > 40$) et la valeur Ct HEX de la détection de la β -actine est positive ($Ct < 35$).
- Un **échantillon est positif** (présence d'IVA) lorsque sa courbe FAM est positive ($Ct < 40$).
- Un **échantillon est invalide** lorsque ni sa courbe FAM ($Ct > 40$) ni sa courbe HEX ($Ct > 35$) ne sont positives.
- **Recommandation** : Dans le cas où le résultat du test est invalide, le test peut être répété avec par ex. une dilution de l'ARN correspondant de 1:4 afin d'exclure une inhibition. Le contrôle négatif sert ici de milieu de dilution. La préparation complète d'ARN de l'échantillon peut aussi préférentiellement être répétée avec moins de matériel d'origine. Une précipitation à l'éthanol peut ensuite également être effectuée pour concentrer l'ARN.
- Une saisie simple et fiable des données concernant les échantillons, le démarrage de la RT-PCR en temps réel ainsi que l'évaluation qualitative ultérieure des échantillons et la documentation des résultats peuvent être effectués à l'aide du logiciel Kylt®.

- Les réactifs nécessaires à la confirmation, selon les prescriptions de la norme NFU 47 600-1, de la limite de détection de la RT PCR (LD_{PCR}) et de la méthode ($LD_{méthode}$) dans les conditions de chaque laboratoire peuvent être fournis sur demande auprès du Laboratoire national de référence pour l'influenza aviaire

Méthode	Réactif
Détermination de la LD_{PCR}	Témoin positif PCR pour la détection de virus influenza aviaire selon la méthode de RT-PCR temps réel gène M (ARNt AIV-M) (catalogue Anses référence S00691)
Détermination de la $LD_{méthode}$	Témoin positif d'extraction pour la détection de virus influenza aviaire selon les méthodes de RT-PCR temps réel (virus inactivé) (catalogue Anses référence S00694)

Fabrication :

AniCon Labor GmbH | Mühlenstr. 13 | D-49685 Höltinghausen | www.anicon.eu | www.kylt.eu

Kylt® est une marque déposée.

Seulement pour un usage chez les animaux. Seulement pour un usage *in vitro*. Les exigences réglementaires peuvent varier selon le pays où le kit est utilisé et ce produit peut, le cas échéant, ne pas être disponible ou autorisé dans votre région.

La collecte et l'élimination des restes des réactifs non utilisés ne nécessitent pas de prescriptions particulières vis-à-vis des risques d'infection. Consultez les fiches de sécurité pour plus d'informations.

© 2018 AniCon Labor GmbH. Tous droits réservés. Les marques nommées dans ce document sont la propriété de la société AniCon Labor GmbH ou des propriétaires de la marque correspondants.

AVEC L'ACHAT DE CE PRODUIT, L'ACHETEUR OBTIENT LE DROIT À L'UTILISATION DE CE PRODUIT POUR DES TESTS DIAGNOSTIQUES VÉTÉRINAIRES IN VITRO SOUS CERTAINS BREVETS DE ROCHE. UNE LICENCE DE BREVET GÉNÉRALE OU AUTRE LICENCE ALLANT PLUS LOIN QUE CE DROIT D'UTILISATION DE L'ACHETEUR DE CE PRODUIT N'EST PAS ACCORDÉE.

Préparation des échantillons, préparation d'ARN et RT-PCR en temps réel

A Échantillons d'organes et de tissus, par ex. trachée, poumon, tonsilles caecales**1. Préparation des échantillons**

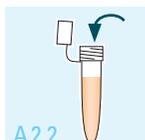
1.1 transférer les tissus dans des tubes avec solution STP (ou similaire (10-20% poids/volume))



1.2 homogénéisation

2. Centrifugation

2.1 centrifuger brièvement

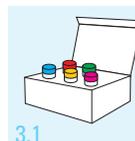


2.2 transférer le surnageant

3. Préparation de l'ARN

3.1 utilisation d'un kit de préparation d'ARN disponible dans le commerce

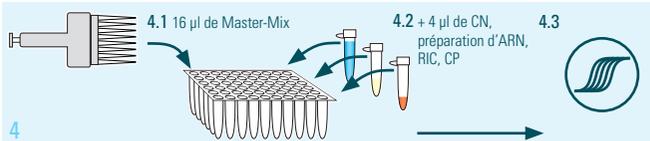
3.2 suite de la préparation selon la notice du kit correspondant

**4. Procédure de la RT-PCR en temps réel en une seule étape**

4.1 préparer et répartir le Master-Mix

4.2 Ajout de 4 µl de CN, préparation d'ARN, RIC, CP

4.3 refermer les puits et démarrer la PCR

**5. Analyse**

Fixer le threshold et évaluer les échantillons

