



ADIAVET™ BVDV REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION DU VIRUS DE LA DIARRHEE VIRALE BOVINE PAR AMPLIFICATION ENZYMATIQUE EN TEMPS REEL (TEST RT-PCR)

Références :

ADI105-100 (100 réactions)

ADI105-500 (500 réactions)



NOTE

Les fluorochromes présents dans ce produit sont vendus sous licence de Biosearch Technologies, Inc. et protégés par des brevets, soit délivrés, soit en cours de demande, aux Etats Unis et dans le monde entier. La licence couvre le Diagnostic Moléculaire Vétérinaire.

ADIAVET™ BVDV REAL TIME

I.	HISTORIQUE DES REVISIONS	3
II.	INFORMATIONS GENERALES	4
1.	But de l'essai	4
2.	Pathogène.....	4
3.	Description et principe du test.....	4
III.	MATERIEL ET REACTIFS.....	6
1.	Réactifs fournis dans le kit.....	6
2.	Validité et conservation.....	6
3.	Utilisation du « BVDV CTL+ ».....	6
4.	Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit.....	6
IV.	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS.....	8
1.	Précautions.....	8
2.	Conservation des échantillons et des extraits d'ARN.....	8
3.	Préparation des prélèvements.....	8
4.	Témoins à inclure.....	8
V.	EXTRACTION ET PURIFICATION.....	10
1.	Avec le Kit ADIAMAG.....	10
2.	Avec le kit ADIAPURE™ TLB (Extraction des ARN à partir de cartilages auriculaires sans purification).....	10
3.	Avec le Kit QIAamp® Viral RNA.....	11
4.	Avec le Kit NucleoSpin® RNA Virus.....	12
	A. Préparation des échantillons.....	12
	B. Extraction.....	13
5.	Avec le Kit NucleoSpin® 96 Virus.....	14
6.	Avec le Kit RNeasy®.....	15
	A. Préparation des échantillons.....	15
	B. Extraction.....	16
VI.	AMPLIFICATION.....	17
VII.	INTERPRETATION DES RESULTATS.....	18
1.	Définitions.....	18
2.	Validation et interprétation des résultats.....	18
	A. Validation de l'essai.....	18
	B. Interprétation des résultats.....	19
	Cas particulier des boucles auriculaires en lyse directe avec le tampon ADIAPURE™ TLB :.....	19
VIII.	INDEX DES SYMBOLES.....	21

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
2014/07	NF105-07	Modification technique	Ajout d'information relative à l'utilisation de ADIAPURE™ TLB, en page 9, § V-1.
2014/07	NF105-07	Administratif	Modification de l'ordre des paragraphes, pages 9 à 20, § V.
2014/12	NF105-08	Modification technique	Ajout du tableau des pictogrammes, en page 23.
2014/12	NF105-08	Modification technique	Suppression de la référence ADI105-50 (50 réactions)
2015/04	NF105-09	Modification technique	Ajout instructions de sécurité, page 8, § V.1
2016/07	NF105-10	Administratif	Modification des logos
2016/07	NF105-10	Administratif	Ajout des exigences légales Biosearch
2016/07	NF105-10	Administratif	Ajout tableau « Types de prélèvements » §I.3
2017/01	NF105-11	Administratif	Ajout de la référence ADI105-500R, §III.1 Ajout de la référence ADIAPURE™ TLB 400R, §III.4 Ajout pool de 25 avec ADIAPURE™TLB, §V.1 Modification de l'interprétation des résultats, § VII.2.B
2019/05	NF105-12	Modification technique	Modification du protocole lait en QIAamp® viral RNA (§ V-3) Suppression des protocoles d'extraction NucleoSpin RNA, QIAamp 96 DNA Blood Ajout Programme d'amplification court (§ VI)
2019/06	NF105-12	Correction	Mise à jour de la taille des mélanges de lait Mise à jour sur la référence Bio-X Diagnostics du kit Billes magnétiques ADN/ARN Correction de la notion de « positif » par « Détecté » et de « négatif » par « Non Détecté »
2020/01	NF105-13	Modification technique	Ajout d'un tube d'eau dans le kit
2020/01	NF105-13	Administratif	Modification §III. 4. Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit

II. Informations générales

1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ BVDV REAL TIME permet de détecter le Virus de la Diarrhée Bovine Virale (BVDV) et le Virus de la Maladie des Frontières (BDV), par amplification enzymatique en temps réel (PCR), à partir de prélèvements de sang total, de sérum et de tissu de bovin, d'ovin, de caprin et de cervidé sauvage, à partir de biopsie auriculaire de bovin, ainsi qu'à partir de prélèvement de lait de bovin, d'ovin et de caprin.

2. Pathogène

Les pestivirus possèdent comme matériel génétique un ARN simple brin de sens positif. De la famille des Flaviviridae comme le virus de l'Hépatite C, les pestivirus comprennent notamment le virus de la diarrhée bovine virale (BVDV), celui de la maladie des frontières (Border Disease Virus ou BDV) chez les ovins et de la peste porcine classique (Classic Swine Fever ou CSFV). Le BVDV est à l'origine de la maladie des muqueuses chez les bovins et génère des pertes économiques importantes dans les élevages.

De nombreux pays ont mis en place des plans d'éradication de cette maladie, impliquant une parfaite gestion des animaux infectés, ceux-ci devant être dépistés avec une grande précocité et fiabilité. Or l'infection prénatale d'un veau entre le 60^{ème} jour et 120^{ème} jour de gestation conduit à la naissance d'un animal infecté permanent immunotolérant (IPI). Ces animaux contagieux sont séro-négatifs toute leur vie et positifs en virologie. La détection du virus par antigénémie n'est possible que plusieurs semaines après leur naissance en raison de la persistance des anticorps colostraux. Le dépistage précoce de ces animaux IPI est donc essentiel dans le cadre des plans d'éradication.

Depuis la découverte de l'amplification *in vitro* de l'ADN en 1985 (PCR), de nombreuses équipes de chercheurs ont développé des tests de dépistage du virus par amplification génique de son ARN génomique ou RT-PCR. La plupart de ces tests permettent la détection de faibles quantités de virus BVDV dans le sang ou les organes des animaux infectés, même âgés de moins de trois mois.

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™ BVDV REAL TIME peut détecter simultanément

- Les virus BVDV, BDV et certains CSFV (sonde marquée en FAM)
- La RNaseP, un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ARN endogène (sonde marquée avec un fluorochrome lu dans le même spectre que VIC et HEX).

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

Types de prélèvements et options d'analyse correspondantes :

Prélèvement	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Sang total	<input checked="" type="checkbox"/>	50
Sérum	<input checked="" type="checkbox"/>	50
Tissu (placenta, rate, tissus fœtaux...)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Biopsie auriculaire**	<input checked="" type="checkbox"/>	25
Lait	<input checked="" type="checkbox"/>	Tank

* Pour les laboratoires réalisant des analyses dans le cadre d'une qualification d'animaux non IPI (exemple : garantie ACERSA). Les LNR autorisent des tailles de mélanges définis ainsi que des techniques d'extraction définies. Se conformer à la législation en vigueur de votre pays ou organisme certificateur.

** Les ARN des biopsies auriculaires peuvent être extraits en utilisant le kit ADIAPURE™ TLB (Bio-X Diagnostics, réf. ADIADP10E1-100 et ADIADP10E1-400).

III. Matériel et réactifs

1. Réactifs fournis dans le kit

REF ADI105-100		
A5	solution d'amplification	2 x 1000 µl tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
BVDV CTL+	contrôle positif BVDV	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
NF-Water	Eau Nuclease free	1 x 1000 µl tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)
REF ADI105-500		
A5	solution d'amplification	10 x 1000 µl tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
BVDV CTL+	contrôle positif BVDV	2 tubes à bouchon violet (A reconstituer)
NF-Water	Eau Nuclease free	1 x 1000 µl tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

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 décongélations.

Ne pas décongeler plus de 3 fois.

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

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

Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.

3. Utilisation du « BVDV CTL+ »

« BVDV CTL+ » est un témoin positif d'amplification.

Ajouter **200 µl** "NF-Water" au « BVDV CTL+ » (**recommandé**) et vortexer au moins 20 secondes.

Aliquoter cette solution par 6 ou 12 µl et conserver à **<-15°C**.

Pour chaque analyse, utiliser 5 µl de « BVDV CTL+ » dans un des puits.

4. Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit

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 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, tubes de 15 ml, plaque 96
- Vibrobroyeur à billes (Mixer Mill, Fast Prep ou Rybolyser)
- Etuve, bain-marie ou bloc chauffant
- Appareil d'homogénéisation pour tubes
- Pipettes de 1 - 10 µl, 20 - 200 µl et 200 - 1000 µl
- Embouts Nucléase-free avec filtres pour micropipettes
- Microtubes Nucléase-free de 1,5 ml et 2 ml
- Tubes stériles de 5, 10 ou 15 ml
- Gants latex ou nitrile non poudrés
- Billes de métal (tungsten ou inox) 3 mm
- Lames de scalpel
- Ethanol 96-100%
- Ethanol 70%
- β-mercaptoéthanol 14,5 M

Kits complémentaires disponibles pour l'adoption de méthode et de PCR (AFNOR NF U47-600) :
 Se référer au Laboratoire National de Référence (LNR) afin d'obtenir les matériaux de références pour l'adoption des méthodes selon les Niveaux de Détection Exigés du LNR.
 ADIAGENE met à la disposition de ses clients un kit ADIAVET™ BVDV Extraction Positive Control (Réf. : ADI105-8), matériel de référence fournisseur pouvant être utilisé comme sentinelle.
 ADIAVET™ LDpcc Positive Control – BVDV (réf. : ADI105-LD) Confirmation des performances – LDpcc du kit ADIAVET™ BVDV REAL TIME.

- Matériel nécessaire selon le protocole d'extraction

Références kit d'extraction		Références supplémentaires	Sang EDTA	Sangs sur anticoagulant (héparine, citrate)	Sérum	Lait	Tissus (ganglion, muqueuse buccale, rate ...)	Cartilages auriculaires
			Taille maximale des pools					
			50	50	50	tank	1	25
ADIAMAG Billes magnétiques ARN/ADN	<u>Bio-X Diagnostics</u> Réf. NADI003	- <u>Lysis Buffer LB3</u> (pour les mélanges de cartilages auriculaires) : Bio-X Diagnostics : réf. NADI004	+		+	+	+	+
Sans purification des ARN : ADIAPURE™ TLB	<u>Bio-X Diagnostics</u> réf. ADIADP10E1-100 réf. ADIADP10E1-400							+
QIAamp® Viral RNA	<u>Qiagen</u> 50 extractions : réf. 52904 ou 250 extractions : réf. 52906		+		+	+	+	+
NucleoSpin® RNA Virus	<u>Macherey-Nagel</u> 50 extractions : réf. 740956.50 ou 250 extractions : réf. 740956.250	- <u>Tampon RL1</u> (facultatif, pour les cartilages auriculaires) : Macherey-Nagel, 50 ml : réf.740385.50 Ou Bio-X Diagnostics réf.740385	+		+	+		+
Nucleospin® 96 Virus	<u>Macherey-Nagel</u> 2x96 extractions : réf. 740691.2 ou 4x96 extractions : réf. 740691.4	- <u>MN Square-well Block</u> : Macherey-Nagel, 4 plaques : réf. 740476	+		+			
RNeasy® Mini Kit	<u>Qiagen</u> 50 extractions : réf. 74104 ou 250 extractions : réf. 74106	- <u>Tampon EL</u> : Qiagen : réf. 79217 (pour les sangs sur anticoagulant)	+	+	+	+	+	+

Pour les laboratoires réalisant des analyses dans le cadre d'une qualification d'animaux non IPI (exemple : garantie ACERSA en France).
 Les Laboratoires Nationaux de Référence autorisent des tailles de mélanges définis ainsi que des techniques d'extraction définies. Se conformer à la législation en vigueur de votre pays ou auprès de l'organisme certificateur.

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 et Bio-X Diagnostics. 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.

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 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

Les échantillons se conservent un ou deux jours à +2/8°C. Au-delà de 2 jours, il est conseillé de les conserver à <-15°C. **Exception** faite du **sang** avec anticoagulant qui ne doit pas être congelé et les **cartilages auriculaires** doivent être stockés à <-15°C à réception.

Les ARN extraits sont des molécules sensibles. 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

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

4. Témoins à inclure

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

Le contrôle interne endogène (RNaseP) naturellement présent dans les cellules de l'animal permet de vérifier l'extraction et l'amplification de chaque échantillon. Le témoin « BVDV CTL+ » permet de valider l'amplification de la cible.

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 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 BVDV. 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 BVDV. 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.

ADIAGENE peut fournir un témoin positif cible d'extraction constitué d'une culture virale inactivée et lyophilisée, calibrée entre 1 et 100xLD méthode. (ADIAVET™ BVDV Extraction Positive Control Réf. : ADI105-8).

Ce témoin, ajouté à une matrice négative (sang ou sérum), peut être utilisé comme **sentinelle**.

V. Extraction et purification

1. Avec le Kit ADIAMAG

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.

2. Avec le kit ADIAPURE™ TLB (Extraction des ARN à partir de cartilages auriculaires sans purification)

Ejecter le cartilage auriculaire dans le tube collecteur à code-barre de la boucle d'oreille.

Ajouter

- 280 µl de lysis buffer L1 ADIAPURE™ TLB
- 20 µl de lysis buffer L2 ADIAPURE™ TLB*.

**Un pré-mix contenant les 2 réactifs peut être réalisé.*

Distribuer alors 300 µl du pré-mix par échantillon.

Ce pré-mix est stable jusqu'à 5 jours à +2/8°C.

Filmer et homogénéiser.

Incuber :

- 20 minutes à +65°C
- 15 minutes à +95°C
- Laisser refroidir les échantillons pour assurer l'exactitude des pipetages ultérieurs (par exemple, 15-30 minutes à température ambiante ou 5-20 minutes à +2/8°C, selon le nombre d'échantillons analysés)

Possibilité de faire des pools, jusqu'à 25, en mélangeant, par exemple, 50 µl de chaque solution obtenue individuellement. Homogénéiser.

En vue d'une nouvelle analyse, chaque solution obtenue individuellement peut être conservée à +2/8°C pendant 24 heures, au-delà stocker à <-15°C.

Poursuivre directement par l'amplification en §VI.

* Réactif contenant une substance à une concentration considérée dangereuse : Proteinase K ,1,00%
Mention d'avertissement : **DANGER**



H334

P261 / P280 / P342 + P311

Mention du danger :

H334 : Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation : Sensibilisation respiratoire Catégorie 1

Conseil de prudence :

P261 : Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P342+P311 : En cas de symptômes respiratoires : Appeler un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.

Note :



Une forme de diamant noir peut apparaître sur l'étiquettes. Lorsqu'il se trouve à côté d'un symbole de danger, lire le symbole de danger et les phrases standardisées H de risque et P de conseils de prudence. Autrement, ne pas le considérer comme un symbole.

3. Avec le Kit QIAamp® Viral RNA

La détection sur pools de prélèvements est possible. Se référer au tableau page 6 pour la taille maximale des pools selon le type de prélèvement.

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

	Sang sur EDTA	Sérum	Organe	Lait	Cartilage auriculaire
Echantillon préparé dans un microtube	100 µl	140 µl	0,1 g	100 µl	1 cartilage auriculaire
Lyse	Ajouter 560 µl de tampon AVL + Carrier RNA .				Ajouter 350 µl de tampon AVL + Carrier RNA .
	Homogénéiser 15 secondes et incubé 10 minutes à température ambiante.	Broyer. ¹ Centrifuger 2 minutes à 6 000 g. Transférer le surnageant dans un microtube.	Homogénéiser 15 secondes jusqu'à remise en suspension du culot.	Homogénéiser 15 secondes et incubé 10 minutes à température ambiante. ² Transférer 100 µl de surnageant ou de mélange ³ dans microtube.	
Préparation de la fixation	Ajouter 560 µl d' éthanol 100% . Mélanger par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes).				
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. Déposer du 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.				

¹ Par exemple, à l'aide d'un Mixer Mill : ajouter 1 bille de métal (3 mm), broyer 2 minutes à 30 Hz.

² En vue d'une nouvelle analyse, chaque solution obtenue individuellement doit être conservée **rapidement** à <-15°C. Si la solution individuelle doit être ré-utilisée, la décongeler et stocker immédiatement après le prélèvement à <-15°C.

³ Possibilité de faire des pools, jusqu'à 25, en mélangeant, par exemple, **50 µl** de chaque solution obtenue individuellement. Homogénéiser.

4. Avec le Kit NucleoSpin® RNA Virus

A. Préparation des échantillons

La détection sur pools de prélèvements est possible. Se référer au tableau page 6 pour la taille maximale des pools selon le type de prélèvement.

a) A partir de sang sur EDTA

Prélever **100 µl** de sang ou de mélange de sangs dans un microtube.
Continuer en suivant le tableau ci-après.

b) A partir de sérum

Prélever **140 µl** de sérum ou de mélange de sérums dans un microtube.
Continuer en suivant le tableau ci-après.

c) A partir de lait

Prélever **6 ml** de lait ou de lait de mélange dans un tube de 15 ml.
Centrifuger 15 minutes à 3 500 g, à +2/8°C.
Éliminer la crème à l'aide d'une spatule et le petit-lait.
NB : le culot peut être conservé à <-15°C jusqu'à l'extraction.
Continuer en suivant le tableau ci-après.

d) A partir de cartilage auriculaire

L'une ou l'autre des possibilités suivantes peut être utilisée pour l'extraction d'ARN à partir de cartilage auriculaire.

Possibilité N°1

Ejecter le cartilage auriculaire dans le tube collecteur à code-barre de la boucle d'oreille.
Continuer en suivant le tableau ci-après

Possibilité N°2

Ejecter le cartilage auriculaire dans le tube collecteur à code-barre de la boucle d'oreille
Ajouter **350 µl** de **tampon RL1**.
Homogénéiser.

Incuber 15 minutes à température ambiante.

Transférer **100 µl** de surnageant dans un microtube

NB1 : Possibilité de faire des pools, jusqu'à 25, en mélangeant, par exemple, 50 µl de chaque solution obtenue individuellement. Homogénéiser puis prélever 100 µl du mélange dans un microtube.

NB2 : Avec cette possibilité N°2, chaque solution obtenue individuellement peut être conservée à température ambiante ou +2/8°C en vue d'une nouvelle analyse pendant 24 heures. Au-delà de 24 heures, stocker à <-15°C.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

B. Extraction

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

	Cartilages auriculaires Possibilité N°1	Cartilages auriculaires Possibilité N°2	Sang sur EDTA	Sérum	Lait
Echantillon préparé	1 cartilage auriculaire	100 µl de surnageant	100 µl	140 µl	Culot cellulaire
Lyse	Ajouter 350 µl de tampon RAV1 + Carrier RNA .	Ajouter 560 µl de tampon RAV1 + Carrier RNA .			
	Homogénéiser 15 secondes et incuber 10 minutes à température ambiante. ¹ Tansférer 100 µl de surnageant ou de mélange ² dans un microtube	Homogénéiser 15 secondes et incuber 10 minutes à température ambiante.			Homogénéiser 15 secondes jusqu'à remise en suspension du culot.
Préparation de la fixation	Ajouter 560 µl d' éthanol 100% . Mélanger par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes).				
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer de 630 µl de mélange sur la colonne correspondante. Centrifuger 1 minute à 10 000 g. Déposer du reste du mélange et centrifuger 1 minute à 10 000 g.				
1 ^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RAW . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.				
2 nd lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RAV3 . 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 d' eau Nuclease-free . 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.				

¹En vue d'une nouvelle analyse, chaque solution obtenue individuellement doit être conservée **rapidement** à <-15°C. Si la solution individuelle doit être ré-utilisée, la décongeler et stocker immédiatement après le prélèvement à <-15°C.

²Possibilité de faire des pools, jusqu'à 25, en mélangeant, par exemple, **50 µl** de chaque solution obtenue individuellement. Homogénéiser.

5. Avec le Kit NucleoSpin® 96 Virus

La détection sur pools de prélèvements est possible. Se référer au tableau page 6 pour la taille maximale des pools selon le type de prélèvement.

Trois plaques MN square well block sont fournies dans chacun des kits. Elles servent de plaque de mélange et de récupération. Une fois utilisées, elles peuvent être vidées, décontaminées avec HCl 0,4 M pendant 1 minute, lavées à l'eau distillée et autoclavées.

La plaque 96 (type Elisa) est non fourni dans le kit.

Les centrifugations sont réalisées à température ambiante à 5900 tr/min (5600 à 5800 g).

Avant le début de l'extraction, préchauffer :

- le tampon RAV1 + Carrier RNA à +56°C.
- l'eau Nuclease-free à +70°C.

	Sang sur EDTA	Sérum
Echantillon préparé	Placer 100 µl de sang ou de mélange de sangs par puits d'une plaque Round-well Block.	Placer 140 µl de sérum ou de mélange de sérums par puits d'une plaque Round-well Block.
Lyse	Ajouter 560 µl de tampon RAV1 + Carrier RNA préchauffé à +56°C + 20 µl de protéinase K . Fermer la plaque avec un adhésif Self-adhering PE Foil. Agiter ~15 secondes avec un agitateur de plaques 96. Incuber 10 minutes à +70°C. Centrifuger quelques secondes pour éliminer les gouttes de condensation.	
Préparation de la fixation	Répartir 560 µl d' éthanol 100% dans une plaque MN Square-well Block. Enlever délicatement le film adhésif de la plaque Round-well Block contenant l'échantillon et transférer la totalité du mélange dans la plaque contenant l'éthanol. Homogénéiser le mélange par aspiration-refoulement 5 fois (très important) avec une pipette multicanaux p1000.	
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Placer une plaque 96 Nucleospin® Virus Binding Plate (bleue) sur une nouvelle plaque MN Square-well Block. Déposer la totalité du mélange avec une pipette multicanaux p1000 dans la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate. Placer un nouveau film adhésif Self-adhering PE Foil sur la plaque. Centrifuger 2 minutes. Si la totalité du mélange n'est pas passé, centrifuger à nouveau 3 minutes.	
1^{er} lavage	Placer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate sur une nouvelle plaque MN Square-well Block. Enlever le film adhésif de plaque Nucleospin® Virus Binding Plate Ajouter de 500 µl de tampon RAW dans chacun des puits. Placer un nouveau film adhésif Self-adhering PE Foil sur la plaque. Centrifuger 2 minutes.	
2^{ème} lavage	Enlever le film adhésif de plaque Nucleospin® Virus Binding Plate. Ajouter de 900 µl de tampon RAV3 dans chacun des puits. Placer un nouveau film adhésif Self-adhering PE Foil sur la plaque. Centrifuger 5 minutes.	
Séchage de la colonne	Déposer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate sur une plaque 96 (type ELISA) vide et sèche. Centrifuger 10 minutes.	
Elution	Placer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate sur une plaque Rack with MN Tube Strips. Enlever le film adhésif de la plaque. Déposer 100 µl d' eau Nuclease-free préchauffé à +70°C dans chaque puits de la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate. <u>Ne pas utiliser le tampon RE.</u> Centrifuger 2 minutes.	
Conservation	Retirer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate. Fermer la plaque Rack with MN Tube Strips avec des Caps for Strips. Conserver sur glace si utilisation immédiate ou à <-15°C.	

6. Avec le Kit RNeasy®

A. Préparation des échantillons

La détection sur pools de prélèvements est possible. Se référer au tableau page 6 pour la taille maximale des pools selon le type de prélèvement.

a) A partir de sang sur anticoagulant (héparine, citrate, EDTA)

Pipeter **0,5 ml** de sang ou de mélange de sangs dans un tube de 15 ml.

Ajouter **2,5 ml** de **tampon EL** et agiter pour homogénéiser.

Placer les tubes sur glace en fusion pendant 15 minutes (homogénéiser 2 fois pendant cette étape).

Centrifuger 10 minutes à 1 000 g, à +2/8°C. Éliminer le surnageant.

Ajouter **2 ml** de **tampon EL** au culot et homogénéiser pour le remettre en suspension.

Centrifuger 10 minutes à 1 000 g, à +2/8°C. Éliminer le surnageant.

NB : le culot peut être conservé à <-15°C jusqu'à l'extraction.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

b) A partir de sérum non centrifugé et non congelé

Prélever **1 ml** de sérum ou de mélange de sérums dans un microtube.

Centrifuger 10 minutes à 3 000 g, à +2/8°C.

Éliminer le surnageant.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

c) A partir de lait

Prélever **6 ml** de lait ou de lait de mélange dans un tube de 15 ml.

Centrifuger 15 minutes à 3 500 g, à +2/8°C.

Éliminer la crème à l'aide d'une spatule et le petit-lait.

NB : le culot peut être conservé à <-15°C jusqu'à l'extraction.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

d) A partir d'organes (poumon, rate, ganglion, muqueuse buccale...)

Transférer **0,1 g** d'échantillon lacéré dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

e) A partir de cartilage auriculaire

Ejecter le cartilage auriculaire dans le tube collecteur à code-barre de la boucle d'oreille.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

B. Extraction

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

	Sang sur anticoagulant (héparine, citrate, EDTA) Sérum Lait	Organes (poumon, rate, ganglion, muqueuse buccale...)	Cartilage auriculaire
Echantillon préparé	Culot cellulaire	0,1 g d'organe lacéré	1 cartilage auriculaire
Lyse	Ajouter 350 µl de tampon RLT+ β-Mercaptoéthanol à 10 µl/ml.		Ajouter 350 µl de tampon RLT.
	Homogénéiser 15 secondes jusqu'à remise en suspension du culot.	Homogénéiser et incuber 15 minutes à température ambiante.	Homogénéiser et incuber 15 minutes à température ambiante. ¹ Transférer 100 µl de surnageant ou de mélange ² dans microtube.
Préparation de la fixation	Ajouter 350 µl d'éthanol à 70% . Mélanger par flux et reflux à la pipette 10 fois minimum ou à l'aide d'un agitateur de type vortex 15 secondes.		
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer 700 µl de mélange sur la colonne correspondante. Centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
1 ^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 700 µl de tampon RW1 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
2 ^{ème} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RPE . 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 d'eau Nuclease-free . Incuber ~2 minutes à température ambiante et centrifuger à 10 000 g/1 minute.		
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate, ou à <-15°C.		

¹En vue d'une nouvelle analyse, chaque solution obtenue individuellement peut être conservée à température ambiante ou à +2/8°C pendant 24 heures, au delà, stocker à <-15°C.

²Possibilité de faire des pools, jusqu'à 25, en mélangeant, par exemple, **50 µl** de chaque solution obtenue individuellement. Homogénéiser.

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 positif 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- **Replacer 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 CTL+, ajouter **5 µl** de la solution (§ III.3.) aux 20 µl de réactif « A5 ».

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

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

e- Conserver la plaque ou les tubes sur la glace en sur-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 virus BVDV est lue en FAM. 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 (à 60°C).

Les programmes suivants ont été développés pour les appareils **ABI Prism** (type 7500, QS5...) d'**Applied Biosystems** (cocher l'option « emulation 9600 » lorsqu'elle existe), pour les **MX3005P**, **AriaMx** d'Agilent, pour les **LightCycleur** de **Roche Diagnostics** et pour le **CFX96** de **Biorad** :

Programme Standard		Programme FAST	
10 min. 45°C		10 min. 45°C	
10 min. 95°C		10 min. 95°C	
15 sec 95°C**	45 cycles	5 sec 95°C	45 cycles
1 min. 60°C		30 sec 60°C *	

* Mettre 32 secondes pour le 7500 Thermofisher

** Mettre 30 secondes pour le MX3005P

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

VII. Interprétation des résultats

1. Définitions

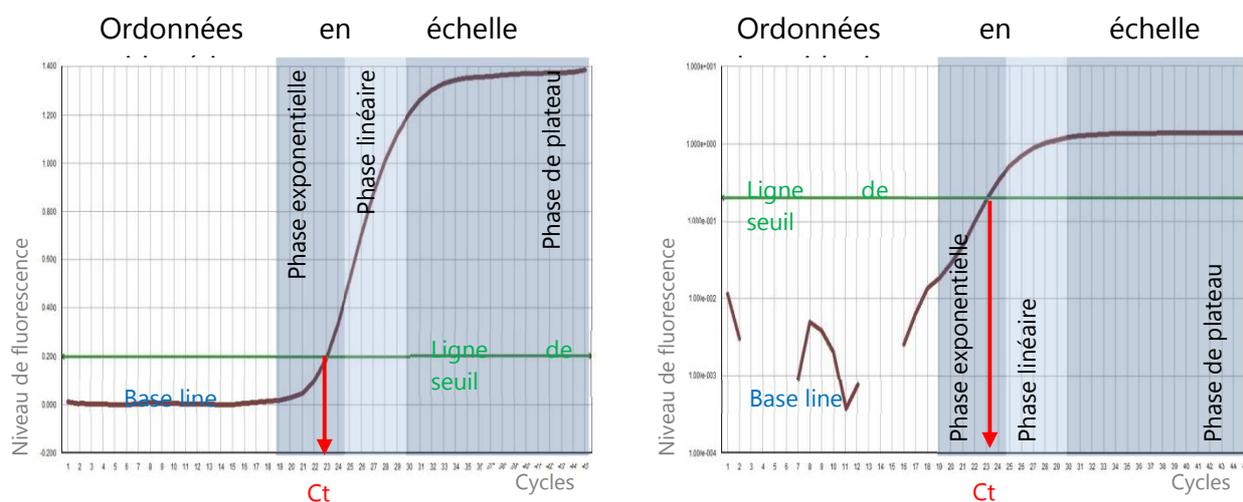
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

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)	BVDV CTL+	Témoin négatif d'extraction	Témoin positif d'extraction *
Amplification FAM	non	oui	non	oui
Amplification VIC/HEX	non	non/oui	non	non/oui
Validation de	Absence de contamination pour l'amplification	Amplification de la cible	Absence de contamination pour l'extraction	Etapas d'extraction et d'amplification

* optionnel

Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM et VIC/HEX pour le témoin positif (« BVDV 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 virus BVDV (FAM) et/ou en contrôle interne (VIC ou HEX).

Exemple	A	B	C
Amplification FAM	Non	Oui	Non
Amplification VIC/HEX	Oui	Non/Oui	Non
Résultat	Non Détecté	Détecté	Non déterminé A refaire

Exemple A : 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.

Exemple B : L'échantillon est considéré comme **Détecté** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM. Le Contrôle Interne peut être co-amplifié.

Exemple C : L'absence totale de courbe d'amplification caractéristique pour un échantillon (exemple D) 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.

Cas particulier des boucles auriculaires en lyse directe avec le tampon ADIAPURE™ TLB :

Les boucles auriculaires sont généralement analysées en mélange.

Ce mélange peut contenir des échantillons partiellement ou totalement inhibiteurs de la réaction PCR et masquer des positifs.

Ainsi pour des analyses **en lyse directe avec le tampon ADIAPURE™ TLB**, nous vous proposons le schéma d'interprétation et décisionnel ci-dessous.

Exemple	A	B	C	D
Amplification FAM	Non	Oui	Non	Non
Amplification VIC/HEX	Ct < 27*	Non/Oui	Non	Ct > 27*
Résultat	Non Détecté	Détecté	Inhibé	Potentiellement inhibé
Recommandations			Analyse d'un pool : Tester les échantillons en individuel Analyse individuelle : Tester l'échantillon pur et dilué au 1/10 ^{ème}	Analyse d'un pool : Tester les échantillons en individuel Analyse individuelle : Tester l'échantillon dilué au 1/10 ^{ème}

**La valeur de Ct du contrôle interne mentionnée ci-dessous peut varier en fonction du thermocycleur.*

Exemple A : L'échantillon est considéré comme **Non Détecté** si une courbe d'amplification caractéristique et **ayant un Ct inférieur à 27** est observée en VIC ou HEX sans qu'il y ait de courbe d'amplification caractéristique en FAM.

Exemple B : L'échantillon est considéré comme **Détecté** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM. Le Contrôle Interne peut être co-amplifié.

Exemple C : L'absence totale de courbe d'amplification caractéristique pour un échantillon (exemple D) 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).

Exemple D : Les échantillons présentant un Ct de l'IPC supérieur à 27 sont : soit partiellement inhibés, soit pauvres en cellules hôtes.

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, ADIAPURE™ 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.



**S.A.R.L. ADIAGENE**
9, rue Gabriel Calloët-Kerbrat
22440 Ploufragan - France

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