



Adia^X Vet

Notice d'utilisation
ADI451-BESN_NO_(FR)_V01
09/2023

BESNOITIA REAL TIME

Référence : ADI451-100

Test pour la détection de *Besnoitia besnoiti* par amplification enzymatique de gène en temps réel

Test PCR – 100 réactions

Usage *in vitro* et strictement vétérinaire



Echantillon	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Sang	✓	✗
Peau – Biopsie cutanée	✓	✗

* Dépend de la situation épidémiologique, de la qualité de l'échantillon et des directives spécifiques qui existent dans certains pays (s'y référer).

Composition du kit

Matériel fourni		Kit ADI451 100 réactions
A5	Solution d'amplification	2 x 1000 µL tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
Bb CTL+	Contrôle positif <i>Besnoitia besnoiti</i>	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
NF-Water	Eau Nucléase Free	1 x 1000 µL tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

Historique de révision

Date	Version	Modifications
04/2021	NF451-07	Modification prise d'essai biopsie cutanée (peau). Ajout kit d'extraction ADIAMAG, 800 tests, Ref. NADI003-XL
09/2023	V01	Passage au format simplifié.

Note : les modifications mineures concernant la typographie, la grammaire et la mise en forme ne sont pas incluses dans l'historique des révisions.

A. Introduction

Besnoitia besnoiti est un protozoaire responsable de la Besnoitiose bovine, souvent appelée « anasarque des bovins ». Cette maladie sévit en particulier dans le sud de la France et affecte surtout les jeunes bovins. La transmission du parasite d'un bovin infecté à un bovin sain par l'intermédiaire d'insectes piqueurs (tabanidés, stomoxes) semble actuellement prépondérante.

Des tests sérologiques sont disponibles pour la détection des anticorps spécifiques de *Besnoitia besnoiti* présents en phase chronique.

Cependant afin de limiter les transferts d'animaux contaminés et ainsi contrôler la propagation de la Besnoitiose Bovine en France, il est important d'avoir des outils de diagnostic précoce.

La méthode PCR permet de détecter le parasite précocement dans les monocytes du sang lors des phases fébriles. La présence de kystes à bradyzoïtes dans la peau peut être confirmée par ce test lors des phases d'œdèmes et de sclérodémie.

B. Principe du test

Le test ADIAVET™ BESNOITIA REAL TIME repose sur l'amplification génique de fragments d'ADN spécifiques de *Besnoitia besnoiti*. Il détecte simultanément en monoculture :

- *Besnoitia besnoiti* (sonde marquée en FAM)
- GAPDH un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ADN endogène (sonde marquée en HEX ou équivalent).

C. Conditions de stockage

A réception, le kit doit être stocké à <-15 °C jusqu'à la date de péremption du kit.

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

Ne pas décongeler plus de 3 fois.

Stocker à l'abri de la lumière.

Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.

D. Matériel supplémentaire et réactifs requis non fournis

- Thermocycleur avec son consommable pour PCR Temps réel.
- Appareil d'homogénéisation pour tubes.
- Pipettes de 1 - 10 µL, 20 - 200 µL et 200 - 1000 µL.
- Embouts Nucléase-free avec filtres pour micropipettes.
- Microtubes Nucléase-free de 1,5 mL et 2 mL.
- Gants latex ou nitrile non poudrés.
- Eau Nucléase-free.
- Kit d'extraction des acides nucléiques.

Kits complémentaires pour Adoption de méthode et PCR (U47-600)

- LDpccr Positive Control – BESNOITIA (Réf. : ADC45LD)
- Confirmation des performances – LDpccr du kit.

E. Précautions d'utilisation et de sécurité

- Pour usage vétérinaire *in vitro* uniquement.
- Pour usage animal uniquement.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Lire l'ensemble du protocole avant de commencer et le respecter scrupuleusement.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption du kit.
- Ne pas utiliser les réactifs dont l'emballage est détérioré.
- Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.
- Ne pas ouvrir les tubes PCR après amplification.
- Éliminer le matériel utilisé en respectant la législation en vigueur en matière de protection de l'environnement et de gestion des déchets biologiques.

- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer ; ne pas inhaler).

F. Extraction des acides nucléiques

1. Kits d'extractions

Les acides nucléiques doivent être extraits à partir des échantillons avant d'utiliser le kit. Les kits d'extraction ADN/ARN listés ci-dessous sont recommandés et fournis par Bio-X Diagnostics :

Nom du produit	Technologie d'extraction	Nombre de tests et référence
ADIAMAG	Billes magnétiques	200 tests : réf. NADI003 800 tests : réf. NADI003-XL

Pour l'extraction, se référer à la version de notice disponible sur le site web, indiqué sur le certificat d'analyse inclus dans le kit PCR utilisé.

Les protocoles d'extraction validés sont décrits dans le dossier de validation du kit. D'autres kits d'extraction peuvent être utilisés après validation par l'utilisateur.

Après extraction, les acides nucléiques extraits peuvent être conservés à +2/8°C pendant quelques heures avant utilisation. Pour une conservation plus longue, ils doivent être conservés à une température inférieure à -15 °C ou -65 °C.

2. Témoins

L'emploi de témoins permet de contrôler la fiabilité des résultats. Les témoins sont inclus par série d'analyse selon les recommandations définies par les normes en vigueur (Cf. AFNOR U47-600...).

Contrôles	Validation de	Mode opératoire
Témoin réactif (NTC)	Absence de contamination pour l'amplification	5 µL NF-Water dans un puits par série PCR
Bb CTL+	Amplification de la cible	5 µL CTL+ dans un puits par série PCR
Témoin négatif d'extraction	Absence de contamination pour l'extraction et l'amplification	1 extraction (eau ou tampon de lyse) par série d'extraction
Témoin positif d'extraction	Etapes d'extraction et d'amplification	1 extraction (Echantillon positif entre 1 et 100X LD _{Méthode}) par série d'extraction

G. Mode opératoire

1. Préparation du contrôle CTL+

Ajouter **200 µL** de « NF-Water » par tube.

Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex > 20 secondes jusqu'à dissolution complète du culot bleu.

Après reconstitution, aliqoter et stocker la solution à une température inférieure à -15 °C jusqu'à la date de péremption du kit. Ne pas décongeler plus de 3 fois.

Pour chaque analyse, utiliser **5 µL** du CTL+ dans un des puits dédiés (se reporter au § « Amplification », Etape 2).

2. Amplification

Attention :

- Avant de commencer, décongeler les réactifs à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Homogénéiser tous les réactifs et échantillons avant utilisation.
- Replacer les réactifs à une température inférieure à -15 °C, après distribution.

Étape 1 : Répartir **20 µL** de réactif d'amplification A5 dans chaque puits PCR.

Étape 2 : Distribuer **5 µL** d'acides nucléiques extraits des échantillons et **5 µL** de contrôles dans chaque puits dédié.

Utiliser le NF-Water pour le témoin réactif.

Étape 3 : Fermer les puits avec un film ou des barrettes adaptés.

Étape 4 : Démarrer l'analyse PCR.

Le programme suivant a été développé pour les appareils ABI Prism (type 7500, QuantStudio5, Step-one...) d'Applied Biosystems, pour les Mx3000 et Mx3005P, AriaMx d'Agilent, pour les LightCycler de Roche Diagnostics, pour le Rotor-Gene Q de Qiagen, pour le CFX96 et Chromo 4 de Biorad, pour le MIC de BioMolecular System.

Programme ADN standard	
2 min. 50 °C	
10 min. 95 °C	
15 sec. 95 °C**	45 cycles
60 sec. 60 °C*	

**30 sec. 95°C pour MX3000 et MX3005P

*Lecture et paramètres pour l'acquisition de la fluorescence :

Fluorochrome	Absorbance (nm)	Emission (nm)
FAM	494	520
HEX ou équivalent	538	554
ROX	575	602

Note : Le Quencher est non fluorescent. Le mélange contient une référence passive lue dans le spectre du ROX pour les appareils ABI Prism.

Contactez votre représentant commercial ou le service client pour tout autre modèle de thermocycleur.

H. Interprétation des résultats

Afficher l'ensemble des courbes et positionner la ligne de seuil pour chaque fluorochrome.

1. Validation de l'essai

L'amplification est valide si les résultats suivants sont obtenus.

Les valeurs indicatives de Ct (Threshold Cycle) attendues pour le CTL+ sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

Contrôles	Amplification		Validation de
	FAM	HEX ou équivalent	
Témoin réactif (NTC)	Non	Non	Absence de contamination pour l'amplification
Bb CTL+	Oui	Oui	Amplification de la cible
Témoin négatif d'extraction	Non	Non	Absence de contamination pour l'extraction
Témoin positif d'extraction	Oui	Oui/Non	Étapes d'extraction et d'amplification

2. Interprétation des résultats

L'extraction des acides nucléiques et l'amplification sont **valides** pour chacun des échantillons si au moins une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM et/ou HEX ou équivalent.

Amplification		Interprétation
FAM	HEX ou équivalent	<i>Besnoitia besnoiti</i>
Non	Oui	Non détecté
Oui	Oui	Détecté
Oui	Non	Détecté
Non	Non	Non déterminé

« **Non déterminé** » : absence de courbe d'amplification caractéristique.

Causes possibles :

PCR défectueuse (présence d'inhibiteurs, erreur de programme, absence d'échantillon ou échantillon trop dégradé) et/ou Déficience de l'extraction des acides nucléiques (perte ou destruction des acides nucléiques).

Actions conseillées :

Refaire la PCR avec l'extrait des acides nucléiques pur et dilué au 1/10^{ème} en eau Nucléase-free ;

Refaire l'extraction des acides nucléiques si le test n'est toujours pas valide ou redemander un autre prélèvement.

Table des symboles

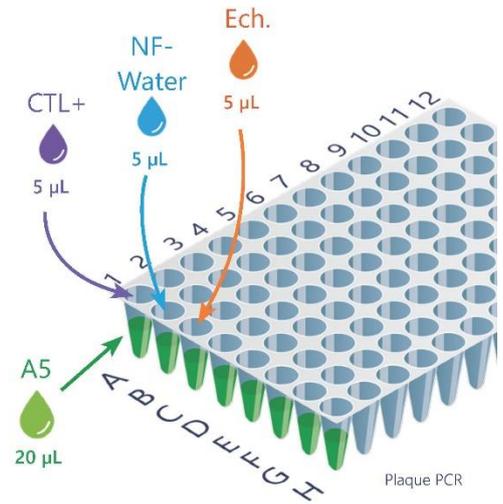
Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limite supérieure de température
	Utiliser jusque
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour "n" tests
	Pour usage vétérinaire <i>in vitro</i> uniquement – Pour usage animal uniquement
	Conserver à l'abri de la lumière

1 | Extraire les acides nucléiques avec

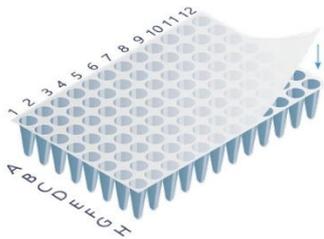


2 | Répartir 20 µL de réactif d'amplification A5

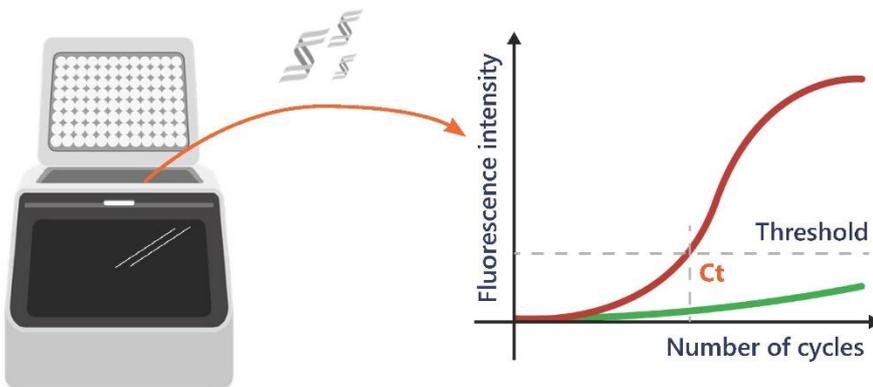
3 | Distribuer 5 µL d'acides nucléiques, CTL+ et NF-Water



4 | Sceller les puits



5 | Démarrer l'analyse PCR



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