



ADIAVET™ BESNOITIA REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION *BESNOITIA BESNOITI* PAR AMPLIFICATION
ENZYMATIQUE DE GENE EN TEMPS REEL (TEST PCR)

Référence:

ADI451-100 (100 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™ BESNOITIA 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.....	5
1.	Réactifs fournis dans le kit.....	5
2.	Validité et conservation.....	5
3.	Utilisation du témoin « Bb CTL+ ».....	5
4.	Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit.....	5
IV.	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS.....	6
1.	Précautions.....	6
2.	Conservation des échantillons et des extraits d'ADN.....	6
3.	Témoins à inclure	6
V.	EXTRACTION ET PURIFICATION.....	8
1.	Avec le kit QIAamp® DNA Mini kit.....	8
2.	Avec le kit NucleoSpin® Tissue	9
3.	Avec le Kit ADIAMAG	10
VI.	AMPLIFICATION.....	11
VII.	INTERPRETATION DES RESULTATS.....	12
1.	Définitions.....	12
2.	Validation et interprétation des résultats.....	12
	A. <i>Validation de l'essai</i>	12
	B. <i>Interprétation des résultats</i>	13
VIII.	INDEX DES SYMBOLES.....	14

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
2012/03	NF451-03	Modification technique	Ajout du paragraphe « Traitement des échantillons et des témoins », en page 6, § IV.
2012/03	NF451-03	Modification technique	Ajout du paragraphe « Extraction et purification », en page 7, § V.
2014/12	NF451-04	Modification technique	Ajout du tableau des pictogrammes, en page 12.
2014/12	NF451-04	Modification technique	Suppression de la référence ADI451-50 (50 réactions)
2016/07	NF451-05	Administratif	Modification des logos
2016/07	NF451-05	Administratif	Ajout des exigences légales Biosearch
2016/07	NF451-05	Administratif	Ajout tableau « Types de prélèvements » §1.3
2016/07	NF451-05	Modification technique	Modification des températures de centrifugation §V.1. et §V.2.
2020/01	NF451-06	Modification Technique	Ajout d'un tube d'eau dans le kit Ajout protocole d'extraction en billes magnétiques ADIAMAG

II. Informations générales

1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ BESNOITIA REAL TIME permet de détecter *Besnoitia besnoiti* par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir de prélèvements de peau et de sang total de bovin.

2. Pathogène

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.

Lors d'une infection, on observe une phase d'incubation de 3 à 6 jours qui sont suivis de trois phases cliniques successives :

- Une phase fébrile, d'une durée de 3 à 7 jours, où l'on observe une augmentation de la température de l'animal due à la multiplication de tachyzoïtes dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins.
- Une phase d'œdèmes d'une durée de 1 à 2 semaines, des œdèmes sous-cutanés provoqués par des kystes à bradyzoïtes sont alors observés.
- Une phase chronique de dépilations et de sclérodémie, qui peut durer plusieurs mois. On observe alors le plissement et l'épaississement de la peau, des kystes parasitaires sur la conjonctive et la sclère. Cette dernière phase conduit généralement à la mort de l'animal ou à son euthanasie.

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.

3. Description et principe du test

Ce test repose sur l'amplification enzymatique de gène ou technique PCR.

Les produits amplifiés sont détectés en temps réel grâce au marquage spécifique de sondes d'hydrolyse (technologie 5'-exonucléase).

Le kit ADIAVET™ BESNOITIA REAL TIME peut détecter simultanément

- *Besnoitia besnoiti* (sonde marquée en FAM)
- la GAPDH, un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ADN endogène (sonde marquée avec un fluorochrome de même spectre que VIC ou HEX).

Adiagène a validé ce test avec différents kits de purification d'ADN (Bio-X Diagnostics, Qiagen, 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
Peau	<input checked="" type="checkbox"/>
Sang total	<input checked="" type="checkbox"/>

III. Matériel et réactifs

1. Réactifs fournis dans le kit

REF ADI451-100

A5 solution d'amplification
Bb CTL+ contrôle positif *Besnoitia besnoiti*
NF-Water Eau Nuclease free

2 x 1000 µl tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
1 x 1000 µl tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

Une notice téléchargeable sur www.biox.com

2. Validité et conservation

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

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

Ne pas décongeler plus de 3 fois.

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

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

Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.

3. Utilisation du témoin « Bb CTL+ »

Ajouter 200 µl de "NF-Water" au tube « Bb CTL+ » fourni dans le kit. Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex, au moins 20 secondes. Aliqoter cette solution par 6 ou 12 µl et conserver à <-15°C.

Pour chaque analyse, nous recommandons d'utiliser 5 µl de solution « Bb CTL+ » dans l'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
- Centrifugeuse pour microtubes
- Etuve, bain-marie ou bloc chauffant
- Appareil d'homogénéisation pour tubes
- Pipettes de 1 - 10 µl, 20 - 200 µl et 200 - 1000 µl
- Embouts Nuclease-free avec filtres pour micropipettes
- Microtubes Nuclease-free de 1,5 ml et 2 ml
- Gants latex non poudrés
- Lames de scalpel
- Ethanol 96-100%
- Eau déminéralisée stérile

- Kit d'extraction d'ADN en colonne individuelle

- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, 50 tests : réf. 51304 ou 250 tests : réf. 51306)

- NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, 50 tests : réf.740952.50 ou 250 tests : réf. 740952.250)

- Kit d'extraction d'ADN en billes magnétiques

- ADIAMAG (Bio-X Diagnostics, 200 tests : réf. NADI003)

IV. Traitement des échantillons et des témoins

Avant de commencer l'essai, lisez l'ensemble du protocole et respectez-le scrupuleusement.

1. Précautions

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

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

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. La qualité des résultats dépend du respect scrupuleux des bonnes pratiques de laboratoire. Vérifier l'exactitude et la précision des micropipettes utilisées.

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 et d'eau physiologique, de les autoclaver (25 minutes à +120°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'ADN

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.

Les ADN extraits sont des molécules sensibles. Les extraits d'ADN peuvent être stockés dès la fin de l'extraction à +2/8°C pendant 24 heures, puis doivent être conservés à <-15°C.

3. Témoins à inclure

L'emploi de témoins permet de contrôler la fiabilité des résultats.

Les témoins sont à inclure par série d'analyse. Une série est définie comme un ensemble d'échantillons pour lesquels chaque étape a été réalisée dans les mêmes conditions.

L'ensemble des étapes du processus analytique (extraction+amplification), quelles que soient les matrices, est validé grâce à la combinaison des témoins inclus dans le kit

- Le contrôle interne endogène (GAPDH) présent naturellement dans le prélèvement permet de vérifier l'extraction et l'amplification de chaque échantillon.
- Le témoin « Bb CTL+ » permet de valider l'amplification de la cible.

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. Ce témoin pourra être réalisé avec une matrice négative ou tampon de dilution, par exemple de l'eau PPI.

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

Un témoin positif « cible » doit être introduit par série d'extraction. Il s'agit d'un échantillon contenant *Besnoitia besnoiti*. Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou d'un prélèvement négatif dopé par une solution de *Besnoitia besnoiti*. Ce témoin positif cible (parfois nommé sentinelle) devra être proche de la $LD_{METHODE}$. Il permet d'établir un suivi, sous forme de carte de contrôle, renseignant sur la fidélité des résultats obtenus.

V. Extraction et purification

1. Avec le kit QIAamp® DNA Mini kit

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

Avant de commencer, préparer un bloc chauffant ou un bain-marie à +56°C et/ou +70°C.

	Sang	Peau
Préparation de l'échantillon	Placer 1 ml de sang sur EDTA dans un microtube de 2 ml. Ajouter 1 ml d'eau PPI . Homogénéiser. Incuber 10 minutes sur glace en agitant de temps en temps. Centrifuger 5 minutes à 6 000 g. Éliminer le surnageant. Ajouter au culot 1 ml d'eau PPI . Homogénéiser. Centrifuger 5 minutes à 6 000 g. Éliminer le surnageant.	Placer 20 mg de peau dans un microtube.
Lyse	Ajouter 180 µl de tampon ATL et 20 µl de protéinase K . Homogénéiser. Incuber 1 nuit à +56°C <u>OU</u> 30 minutes à +70°C .	
	Ajouter 200 µl de tampon AL . Homogénéiser. Incuber 10 minutes à +70°C .	
Préparation de la fixation	Ajouter 200 µl d' éthanol 100% . Homogénéiser 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 la totalité de chaque échantillon sur une colonne. Centrifuger 1 minute à 10 000 g. <i>Si la totalité du mélange n'a pas pu être déposée en une seule fois sur la colonne, déposer le volume restant sur la colonne et centrifuger 1 minute à 10 000 g.</i>	
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 200 µl de tampon AE . Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver à +2/8°C pendant 24 heures, puis à <-15°C.	

2. Avec le kit NucleoSpin® Tissue

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

Avant de commencer, préparer un bloc chauffant ou un bain-marie à +56°C et/ou +70°C.

	Sang	Peau
Préparation de l'échantillon	Placer 1 ml de sang sur EDTA dans un microtube de 2 ml. Ajouter 1 ml d'eau PPI . Homogénéiser. Incuber 10 minutes sur glace en agitant de temps en temps. Centrifuger 5 minutes à 6 000 g. Éliminer le surnageant. Ajouter au culot 1 ml d'eau PPI . Homogénéiser. Centrifuger 5 minutes à 6 000 g. Éliminer le surnageant.	Placer 20 mg de peau dans un microtube.
Lyse	Ajouter 180 µl de tampon T1 et 25 µl de protéinase K . Homogénéiser. Incuber 1 nuit à +56°C OU 30 minutes à +70°C .	
	Ajouter 200 µl de tampon B3 . Homogénéiser. Incuber 10 minutes à +70°C .	
Préparation de la fixation	Ajouter 200 µl d' éthanol 100% . Homogénéiser 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 la totalité de chaque échantillon sur une colonne. Centrifuger 1 minute à 10 000 g. <i>Si la totalité du mélange n'a pas pu être déposée en une seule fois sur la colonne, déposer le volume restant sur la colonne et centrifuger 1 minute à 10 000 g.</i>	
1 ^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon BW . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
2 ^{ème} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 600 µl de tampon B5 . 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 200 µl de tampon BE . Incuber ~1 minutes à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver à +2/8°C pendant 24 heures, puis à <-15°C.	

3. 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.

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 (« Positive control ») 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 témoin positif, ajouter **5 µl** de la solution (§ II.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'ADN purifiés à +2/8°C ou <-15°C. Eliminer les bulles qui pourraient rester au fond des puits.

e- Démarrer le run rapidement après la mise en place de la plaque ou des tubes dans le cycleur.

La cible *Besnoitia besnoiti* 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 (1 minute à 60°C).

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

2 minutes à 50°C

10 minutes à 95°C

15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C pendant 45 cycles

Le programme ci-dessous concerne les **MX3000P** et **MX3005P** de **Stratagène** :

2 minutes à 50°C

10 minutes à 95°C

30 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C pendant 45 cycles

Roche diagnostic : LightCycler 2*, LightCycler 480*

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

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

VII. Interprétation des résultats

1. Définitions

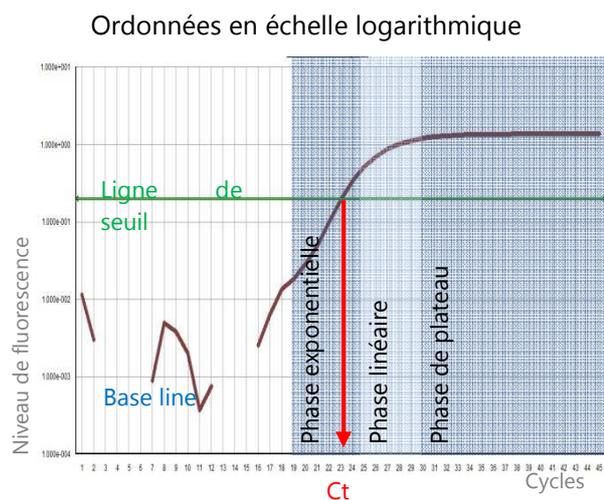
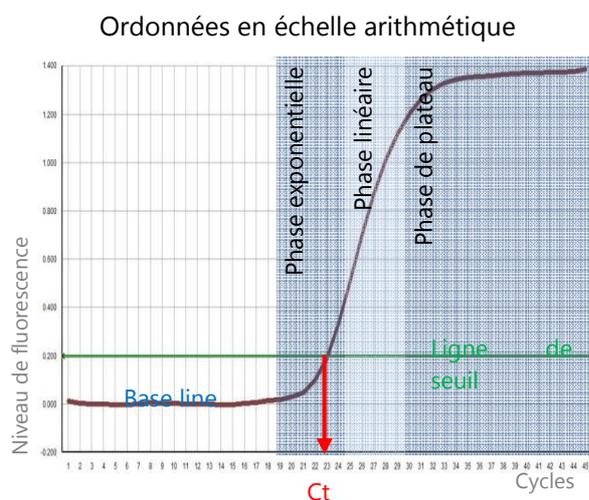
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

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)	Bb 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	Etapes d'extraction et d'amplification

* optionnel

Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM et VIC/HEX pour le témoin positif (« Bb CTL+ ») sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

B. Interprétation des résultats

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

Exemple	A	B	C	D
Amplification FAM	Non	Oui	Oui	Non
Amplification VIC/HEX	Oui	Non	Oui	Non
Résultat	Négatif	Positif	Positif	Non déterminé A refaire

L'échantillon est considéré comme **négatif** 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 A).

L'échantillon est considéré comme **positif** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM (exemple B). 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'ADN (perte ou destruction de l'ADN) ou une 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'ADN 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'ADN total de l'échantillon est souhaitable.

VIII. Index des symboles

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

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



**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