



ADIAVET™ SCHMALLEMBERG REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION DU VIRUS DE SCHMALLEMBERG PAR AMPLIFICATION ENZYMATIQUE

Référence :

ADI491-100 (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.

Version française
NF491-08
2019/04

ADIAVET™ SCHMALLENBERG 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 « SBV CTL+ ».....	5
4.	Matériel nécessaire mais non fourni.....	5
IV.	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS	6
1.	Précautions.....	6
2.	Conservation des prélèvements et des extraits d'ARN.....	6
3.	Préparation des prélèvements.....	6
	<i>A. Les organes.....</i>	<i>6</i>
	<i>B. Le sang.....</i>	<i>6</i>
	<i>C. Le sérum.....</i>	<i>6</i>
4.	Témoins à inclure.....	7
V.	EXTRACTION ET PURIFICATION	8
1.	Avec le Kit QIAamp® Viral RNA.....	8
2.	Avec le Kit NucleoSpin® RNA Virus.....	9
3.	Avec le Kit Nucleospin® 96 Virus.....	10
4.	Avec le Kit Billes magnétiques ARN/ADN.....	11
VI.	AMPLIFICATION	12
VII.	INTERPRETATION DES RESULTATS	13
1.	Définitions.....	13
2.	Validation et interprétation des résultats.....	13
	<i>A. Validation de l'essai.....</i>	<i>13</i>
	<i>B. Interprétation des résultats.....</i>	<i>14</i>
VIII.	INDEX DES SYMBOLES	15

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
2012/05	NF491-05	Modification technique	Ajout du paragraphe « Extraction avec le kit Nucleospin® 96 Virus », en page 11, § V-3.
2012/05	NF491-05	Modification technique	Ajout du paragraphe « Extraction et purification de l'ARN avec le kit Billes magnétiques ARN/ADN », en page 12, § V-4.
2014/12	NF491-06	Modification technique	Ajout du tableau des pictogrammes, en page 16.
2014/12	NF491-06	Modification technique	Suppression de la référence ADI491-50 (50 réactions)
2016/07	NF491-07	Administratif	Modification des logos
2016/07	NF491-07	Administratif	Ajout des exigences légales Biosearch
2016/07	NF491-07	Administratif	Ajout tableau « types de prélèvements » §I.3
2016/07	NF491-07	Modification technique	Ajout de la référence ADI491-50 (50 réactions)
2019/04	NF491-08	Modification technique	Ajout du programme thermique court

II. Informations générales

1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ SCHMALLEMBERG REAL TIME permet de détecter le Virus de Schmallenberg (SBV) par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir de prélèvements de tissu, d'encéphale, de sang total et de sérum de bovin, d'ovin et de caprin

2. Pathogène

Le virus de Schmallenberg a été isolé pour la première fois en Allemagne en 2011 par le FLI à partir de sang de vaches infectées. Le nom reflète l'origine géographique du virus (village de Rhénanie du nord-Westphalie). Les premières études phylogénétiques montrent que le génome viral présente le plus de similitude avec les virus Shamonda qui appartiennent au séro-groupe Simbu. Ces données suggèrent qu'il s'agit d'un virus « Shamonda-like » au sein du genre Orthobunyavirus.

Les signes cliniques de l'infection par le virus de Schmallenberg de ruminants adultes sont faibles ou non-existants bien qu'une fièvre transitoire, une perte d'appétit, une réduction de la production de lait et une diarrhée puissent être observées. Les principaux signes cliniques du virus de Schmallenberg sont les malformations congénitales (arthrogrypose sévère, torticolis, brachygnathie, hydrocéphalie et d'autres malformations cérébrales graves) chez les animaux nouveaux-nés. Ces signes sont similaires à ceux observés lors d'infection par le virus Akabane, le virus le plus connu de ce genre.

Si l'infection a lieu avant la gestation, il est vraisemblable que la gestation se déroule normalement. Les malformations du fœtus pourraient survenir lorsque l'infection se produit durant des phases de vulnérabilité de la gestation. Par analogie avec le virus Akabane, les phases vulnérables pourraient être entre les 28^{ème} et 36^{ème} jours de gestation des ovins et entre les 75^{ème} et 110^{ème} jours chez les bovins.

Les virus du séro-groupe Simbu sont transmis par des insectes (moucheron Culicoïdes et moustiques). Il est probable que le virus de Schmallenberg soit également transmis par ces insectes, mais cela n'a pas encore été confirmé. Ce mode de transmission est conforté par les signes cliniques de l'infection des ruminants adultes par le virus de Schmallenberg qui ont été observés à partir du mois d'août. Cela coïncide avec le pic de densité du vecteur putatif. En considérant la période de gestation de 5 mois pour les ovins et caprins et de 9 mois pour les bovins, il faut s'attendre à ce que la majorité des malformations congénitales survienne entre les mois de décembre et février pour les ovins et les caprins, et entre les mois de mars et mai pour les bovins.

Il n'existe actuellement aucun vaccin ni aucun traitement connu contre le virus. A l'heure actuelle, il n'y a pas de test sérologique disponible pour la détection d'anticorps. La culture virale et la PCR sont les seules techniques qui permettent de détecter le virus.

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'-exonuclease assay).

Le kit ADIAVET™ SCHMALLEMBERG REAL TIME est une PCR duplex qui peut détecter simultanément :

- Le virus de Schmallenberg (sonde marquée en FAM)
- une séquence d'ARN (gène codant la GAPDH) naturellement trouvée dans le génome des cellules bovines, caprines et ovines. Cette séquence est mise en évidence avec une sonde marquée avec un fluorophore lu dans le même spectre que VIC et HEX.

Adiagène a validé ce test avec différents kits de purification d'ARN (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
Tissu (rate, amygdale, ganglion...)	<input checked="" type="checkbox"/>
Encéphale	<input checked="" type="checkbox"/>
Sang total	<input checked="" type="checkbox"/>
Sérum	<input checked="" type="checkbox"/>

III. Matériel et réactifs

1. Réactifs fournis dans le kit

Désignation	Réactif	ADI491-100
A5	Solution d'amplification	2 x 1000 µl tubes verts
SBV CTL+	Contrôle positif Virus de Schmallenberg	1 tube violet

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 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 « SBV CTL+ »

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

Ajouter **200 µl** d'eau Nuclease-free au « SBV CTL+ » et mélanger en vortexant au moins 20 secondes.

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

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

4. Matériel nécessaire mais non fourni

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
- Vibrobroyeur à billes (Mixer Mil ou Fast Prep)
- 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
- Tubes Lysing Matrix D (MP Biomedicals, 100 extractions : réf. 116913.100) uniquement pour vibrobroyeur à billes Fast Prep
- Gants latex non poudrés
- Billes de tungsten ou inox 3 mm (par exemple, Qiagen, 200 extractions : réf. 69997) uniquement pour vibrobroyeur à billes Mixer Mill
- Lames de scalpel
- Ethanol 96-100%
- Eau déminéralisée stérile
- Tampon PBS 1X pH 7,4

- Kit d'extraction d'ARN en colonne individuelle

- QIAamp® Viral RNA (Qiagen, 50 extractions : réf. 52904 ou 250 extractions : réf. 52906)

ou

- NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel, 50 extractions : réf. 740956.50 ou 250 extractions : réf. 740956.250)

ou

- Kit d'extraction d'ARN en format plaque 96

- Nucleospin® 96 Virus (Macherey-Nagel, 2x96 extractions : réf. 740691.2 ou 4x96 extractions : réf. 740691.4) + MN Square-well Block (Macherey-Nagel, 4 plaques : réf. 740476).
- MN Square-well Block (Macherey-Nagel, 4 plaques : réf. 740476), optionnel.

ou

- Kit d'extraction d'ARN/ADN en billes magnétiques sur automate

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.

IV. Traitement des échantillons et des témoins

1. Précautions

Adiagène a validé ce test avec les kits d'extraction d'ARN des sociétés Qiagen et Macherey-Nagel. D'autres kits d'extraction peuvent être utilisés avec une validation préalable.

Important : pour l'utilisation des kits MACHEREY-NAGEL et QIAGEN
Préparer les tampons contenus dans les kits conformément à la notice du fournisseur.
Les températures de stockage doivent être respectées.

Nous conseillons vivement que cet essai soit réalisé par des personnes ayant reçu une formation appropriée. Vérifier l'exactitude 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 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 lire l'ensemble du protocole avant de commencer l'essai et de le respecter scrupuleusement.

2. Conservation des prélèvements 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.

Les ARN extraits sont des molécules sensibles. L'extraction est réalisée à température ambiante et doit donc être aussi rapide que possible pour éviter les dégradations. 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

A. Les organes

L'analyse est réalisée à partir de 0,1 g d'organes (encéphales, rates). Le reste des prélèvements peut être congelé pour d'autres extractions.

a) Broyage utilisant un vibrobroyeur à billes type Mixer Mill

Placer **0,1 g** d'échantillon dans un microtube de 2 ml.
Ajouter **1 bille de tungsten** et **1 ml de tampon PBS 1X**.
Broyer **2 minutes à 30 Hz**.
Centrifuger **6 000 g/2 minutes**.
L'extraction d'ARN est réalisée à partir du surnageant (*cf. § V*).

b) Broyage utilisant un vibrobroyeur à billes type Fast Prep ou Rybolyser

Placer **0,1 g** d'échantillon dans un « Tubes Lysing Matrix D ».
Ajouter **1 ml de tampon PBS 1X**.
Broyer 2 fois **20 secondes à 6m/sec** avec une pause de 5 minutes sur glace entre les 2 broyages.
Centrifuger **2 000 g/3 minutes**.
L'extraction d'ARN est réalisée à partir du surnageant (*cf. § V*).

B. Le sang

L'extraction d'ARN est réalisée directement à partir de l'échantillon (*cf. § V*).

C. Le sérum

L'extraction d'ARN est réalisée directement à partir de l'échantillon (*cf. § V*).

4. Témoins à inclure

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

Le contrôle interne endogène (GAPDH) présent naturellement dans les cellules de l'animal permet de vérifier l'extraction et l'amplification de chaque échantillon. Le témoin « SBV 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 NF 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 200 µl de tampon de dilution.

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

Un témoin positif « cible » doit être introduit par série d'extraction. Il s'agit d'un échantillon contenant le virus de Schmallenberg.

Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou auprès du Laboratoire de Santé Animale (LSAn - ANSES – Maisons-Alfort). Ce témoin positif cible parfois nommé sentinelle permet d'établir un suivi, sous forme de carte de contrôle qualité, renseignant sur la fidélité intermédiaire des résultats obtenus.

V. Extraction et purification

1. Avec le Kit QIAamp® Viral RNA

Toutes les centrifugations sont réalisées entre 18 et 25 °C.

	Tissus (encéphale/rate)	Sang	Sérum Culture virale
Lyse	Prendre 140 µl d'échantillon, préparé comme décrit précédemment.	Placer 100 µl d'échantillon dans un microtube.	Placer 140 µl d'échantillon dans un microtube.
	Ajouter 560 µl de tampon AVL + Carrier RNA . Homogénéiser ~15 secondes et incubé 10 minutes à température ambiante.		
Préparation de la fixation	Ajouter 560 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 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.		

2. Avec le Kit NucleoSpin® RNA Virus

Toutes les centrifugations sont réalisées entre 18 et 25°C.

	Tissus (encéphale/rate)	Sang	Sérum Culture virale
Lyse	Prendre 140 µl d'échantillon, préparé comme décrit précédemment.	Placer 100 µl d'échantillon dans un microtube.	Placer 140 µl d'échantillon dans un microtube.
	Ajouter 560 µl de tampon RAV1 + carrier. Homogénéiser ~15 secondes et incuber 10 minutes à température ambiante.		
Préparation de la fixation	Ajouter 560 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 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 ^{ème} 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.		

3. Avec le Kit Nucleospin® 96 Virus

Trois plaques MN square well block sont fournies dans chacun des kits. Ces plaques servent de plaques 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.

Les centrifugations sont réalisées entre 18 et 25°C, à 5900 tr/min (5600 à 5800 g).

Avant le début de l'extraction, placer le tampon RAV1+ carrier RNA et l'eau Nuclease-free à +70°C dans un système chauffant.

	Tissus (encéphale/rate) – Sang – Sérum - Culture virale
Lyse	Placer 100 µl d'échantillon (préparé comme décrit précédemment) par puits d'une plaque Round-well Block. Pour les témoins négatifs d'extraction, utiliser 100 µl de tampon PBS 1X .
	Ajouter 400 µl de tampon RAV1 + Carrier RNA (préchauffé) + 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.
Préparation de la fixation	Répartir 400 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 de chaque puits dans la plaque MN Square-well Block 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 sur 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 (préchauffée) dans chaque puits de la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate. <u>Ne pas utiliser le tampon RE.</u> Centrifuger 2 minutes.
Conservation	Éliminer 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.

4. Avec le Kit Billes magnétiques ARN/ADN

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 (« SBV 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 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'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 de Schmallenberg 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 utilisables en fonction du thermocycleur sont :

Programme standard		Programme court	
ABI7500* -Thermofisher AriaMx - MX3005P - Agilent LightCycler 480 - Roche Diagnostic CFX96 Touch - Biorad		ABI7500* - Thermofisher AriaMx - MX3005P – Agilent CFX96 Touch - Biorad	
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 **	

* Cocher l'option « emulation 9600 » lorsqu'elle existe.

** Mettre 32 secondes pour le ABI7500 Thermofisher

*** Mettre 30 secondes pour le MX3005P

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

VII. Interpretation des résultats

1. Définitions

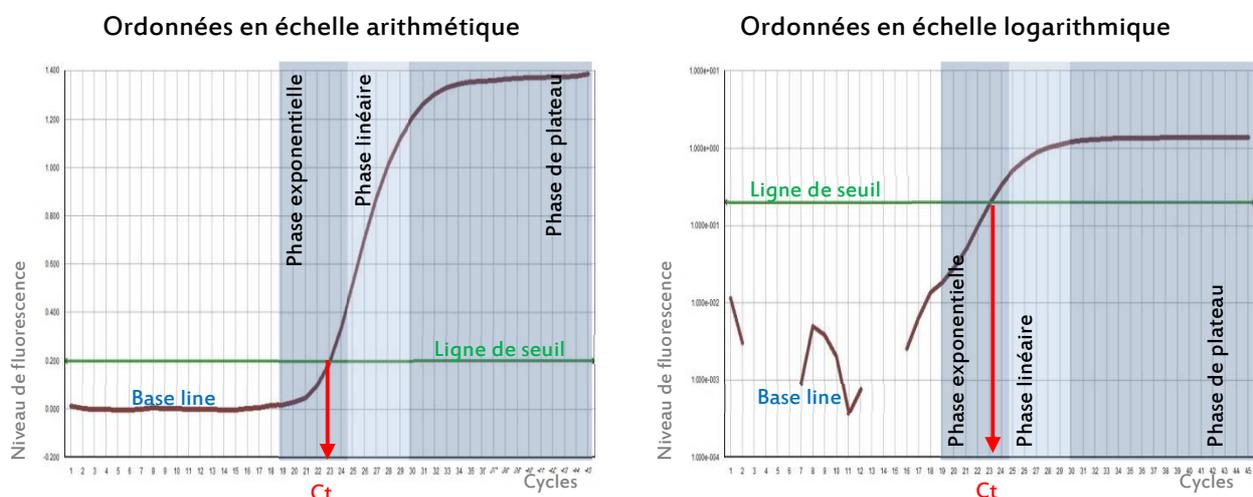
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

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)	SBV 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 (« SBV 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 cible (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'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.

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