



## ADIAVET™ CSFV REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION DU VIRUS DE PESTE PORCINE CLASSIQUE PAR  
AMPLIFICATION ENZYMATIQUE EN TEMPS REEL (TEST RT-PCR)

Référence :  
ADI223-100 (100 réactions)



# ADIAVET™ CSFV REAL TIME

<b>I.</b>	<b>HISTORIQUE DES REVISIONS .....</b>	<b>3</b>
<b>II.</b>	<b>INFORMATIONS GENERALES.....</b>	<b>4</b>
1.	But de l'essai .....	4
2.	Pathogène.....	4
3.	Description et principe du test.....	4
<b>III.</b>	<b>MATERIEL ET REACTIFS .....</b>	<b>5</b>
1.	Réactifs fournis dans le kit.....	5
2.	Validité et conservation.....	5
3.	Utilisation des contrôles.....	5
	<i>A. Utilisation du CSFV CTL+.....</i>	<i>5</i>
	<i>B. Utilisation du CSFV CTL-.....</i>	<i>5</i>
4.	Matériel nécessaire mais non fourni.....	5
<b>IV.</b>	<b>TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS.....</b>	<b>7</b>
1.	Précautions.....	7
2.	Conservation des échantillons et des extraits d'ARN .....	7
3.	Préparation des prélèvements .....	7
4.	Témoins à inclure .....	7
<b>V.</b>	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION.....</b>	<b>9</b>
1.	Avec le Kit RNeasy® .....	9
2.	Avec le Kit NucleoSpin® RNA.....	10
3.	Avec le Kit QIAamp® Viral RNA.....	11
4.	Avec le kit NucleoSpin® 96 Virus.....	12
5.	Avec le kit NucleoSpin® RNA Virus.....	14
6.	Extraction avec le kit ADIAMAG - Billes magnétiques ARN/ADN.....	15
<b>VI.</b>	<b>AMPLIFICATION .....</b>	<b>16</b>
<b>VII.</b>	<b>INTERPRETATION DES RESULTATS .....</b>	<b>17</b>
1.	Définitions.....	17
2.	Validation et interprétation des résultats.....	17
	<i>A. Validation de l'essai.....</i>	<i>17</i>
	<i>B. Interprétation des résultats.....</i>	<i>18</i>
<b>VIII.</b>	<b>INDEX DES SYMBOLES.....</b>	<b>19</b>

## 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
2017-01	NF223-01	N/A	Création
2018-09	NF223-02	Modification technique	Révision de la conservation des échantillons §IV.2. Ajout de la référence du Kit NucleoSpin® RNA Virus §III.4. Modification des températures d'utilisation des kits d'extraction 18-25°C au lieu de de température ambiante §V. Ajout du protocole NucleoSpin® RNA Virus §V.5 Actualisation des références de kits d'extraction en billes magnétiques
2018-09	NF223-02	Administratif	Changement d'adresse de production

## II. Informations générales

---

### 1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ CSFV REAL TIME permet de détecter le Virus de la Peste Porcine Classique (CSFV) par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir de prélèvements de tissu, d'écouvillon, de sang total et de sérum de porc et de sanglier, ainsi qu'à partir de culture virale.

### 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) et de la peste porcine classique (PPC ou CSFV). Le virus de la PPC est classé dans la liste A de l'OIE, il provoque des épizooties graves chez les suidés, et représente donc un risque pour l'environnement. D'une manière générale, toutes les précautions doivent être prises pour éviter que les particules virales ne puissent sortir du laboratoire. Se référer au LNR pour connaître les exigences demandées en matière de biosécurité (manipulations dans un laboratoire confiné agréé par la DGAL).

### 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™ CSFV REAL TIME peut détecter simultanément

- Virus PPC (sonde marquée en FAM)
- GAPDH un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ARN endogène (sonde marquée en HEX ou équivalent)).

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	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Tissu (rate, amygdale, ganglion...)	<input checked="" type="checkbox"/>	10
Sang total	<input checked="" type="checkbox"/>	20
Sérum	<input checked="" type="checkbox"/>	20
Culture virale	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Ecouvillon de sang ou exsudat	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

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

**Note :** les écouvillons de sang et exsudat n'ont été validés que sur le Nucleospin® RNA Virus de chez Macherey-Nagel.

### III. Matériel et réactifs

---

#### 1. Réactifs fournis dans le kit

Désignation	Réactif	ADI223-100
A5	Solution d'amplification	2 x 1000 µl tubes verts
CSFV CTL+	Contrôle positif Virus PPC	1 tube violet
CSFV CTL-	Contrôle négatif Virus PPC	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 décongelations.

**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 des contrôles

##### A. Utilisation du CSFV CTL+

Ajouter **200 µl** d'eau Nuclease-free au « CSFV CTL+ » fourni dans le kit. Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex, au moins 20 secondes. Utiliser cette suspension comme un extrait d'ARN d'échantillon. Aliquoter cette solution par 6 ou 12 µl et conserver à <-15°C. Pour chaque analyse, nous recommandons d'utiliser 5 µl de « CSFV CTL+ » dans un des puits.

##### B. Utilisation du CSFV CTL-

Ajouter **200 µl** d'eau Nuclease-free au « CSFV CTL- » fourni dans le kit. Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex, au moins 20 secondes. Utiliser cette suspension comme un extrait d'ARN d'échantillon. Aliquoter cette solution par 6 ou 12 µl et conserver à <-15°C. Pour chaque analyse, nous recommandons d'utiliser 5 µl de « CSFV 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, plaque 96
- Vibrobroyeur oscillant
- 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 Nuclease-free de 1,5 ml et 2 ml
- Gants latex non poudrés
- Billes d'acier inoxydable de 3 mm ou 5 mm
- Ethanol 96-100%
- Eau Nuclease-free
- Kit d'extraction d'ARN en colonne de silice :
  - RNeasy® Mini Kit (Qiagen, 50 extractions : réf. 74104 ou 250 extractions : réf. 74106)

- NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, 50 extractions : réf. 740955.50 ou 250 extractions : réf. 740955.250)
- QIAamp® Viral RNA (Qiagen, 50 extractions : réf. 52904 ou 250 extractions : réf. 52906)
- Nucleospin® 96 Virus (Macherey-Nagel, 2x96 extractions : réf. 740691.2 ou 4x96 extractions : réf. 740691.4) avec MN Square-well Block (Macherey-Nagel, 4 plaques : réf. 740476), optionnel.
- NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel, 50 tests : réf.740956.50 ou 250 tests : réf. 740956.250)

- ADIAMAG Plus (Bio-X Diagnostics : réf. NADI001 comprenant un kit NUCLEOMAG® 96 TISSUE, 1 flacon de MB2 BUFFER 200R et 1 flacon de BQ1 BUFFER 200R), kit pour 200 extractions. (Kit anciennement appelé « Billes magnétiques ADN/ADN », réf. OC-MNPACK96) pour l'ensemble des échantillons.

- Tampon RL1 (Bio-X Diagnostics : réf MN740385) en supplément pour les tissus.

Ou

- ADIAMAG Starter (Bio-X Diagnostics : réf. NADI002 comprenant un kit NUCLEOMAG® 96 TISSUE et 1 flacon de MB2 BUFFER 200R), kit pour 200 extractions pour les tissus.

- Tampon RL1 (Bio-X Diagnostics : réf MN740385) en supplément pour les tissus.

## 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. 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.*

Avant de commencer l'essai, lire l'ensemble du protocole et le respecter scrupuleusement.

### 2. Conservation des échantillons et des extraits d'ARN

Les échantillons se conservent plusieurs jours à 2/8°C et plusieurs mois à une température inférieure à -15°C après réception et acceptation par le laboratoire d'analyse. Il appartient cependant au laboratoire de s'assurer de l'état de conservation de l'échantillon en fonction du délai depuis la mort de l'animal, ainsi que des conditions de transport et de stockage des prélèvements.

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

*Cf. § IV 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 (GAPDH) naturellement présent dans les cellules de l'animal permet de vérifier l'extraction et l'amplification de chaque échantillon. Le témoin « CSFV 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 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 PPC. 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 PPC. 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.

## V. Extraction et purification

Toutes les centrifugations sont réalisées entre 18 et 25°C. Eviter de déposer les débris sur la colonne et augmenter les durées de centrifugation si le mélange semble épais ou hétérogène.

### 1. Avec le Kit RNeasy®

	Echantillons biologiques liquides (sangs, cultures virales, sérums...)	Organes (rate, ganglions, amygdales...)
<b>Lyse</b>	<p><b>100 µl d'échantillon</b> (individuel ou mélange) + <b>400 µl de tampon RLT</b> dans un microtube.</p> <p>Homogénéiser ~15 secondes.</p> <p>Incuber 10 minutes à température ambiante.</p>	<p><b>20-30 mg d'échantillon</b> (individuel ou mélange) + <b>500 µl de tampon RLT</b> + <b>1 bille</b> d'acier inoxydable dans un microtube.</p> <p>Broyer 2 minutes à 30 Hz.</p> <p>Centrifuger 2 minutes à 6 000 g.</p> <p>Transférer <b>300 µl de surnageant</b> dans un microtube de 1,5 ml.</p>
<b>Préparation de la fixation</b>	<p>Ajouter <b>500 µl d'éthanol à 70%</b>.</p> <p>Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes).</p> <p>Centrifuger brièvement.</p>	<p>Ajouter <b>300 µl d'éthanol à 70%</b>.</p> <p>Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes).</p> <p>Centrifuger brièvement.</p>
<b>Transfert sur colonnes et fixation à la membrane</b>	<p>Identifier les colonnes, déposer <b>700 µl</b> de mélange sur la colonne correspondante.</p> <p>Centrifuger 2 minutes à 10 000 g.</p>	
<b>1<sup>er</sup> lavage</b>	<p>Changer le tube collecteur et ajouter <b>700 µl de tampon RW1</b>.</p> <p>Centrifuger 2 minutes à 10 000 g.</p>	
<b>2<sup>ème</sup> lavage</b>	<p>Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl de tampon RPE</b>.</p> <p>Centrifuger 2 minutes à 10 000 g.</p>	
<b>Séchage de la colonne</b>	<p>Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl de tampon RPE</b>.</p> <p>Centrifuger 5 minutes à 10 000 g.</p>	
<b>Elution</b>	<p>Transférer la colonne sur un microtube. Déposer <b>50 µl d'eau Nuclease-free</b>.</p> <p>Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 2 minutes à 10 000 g.</p>	
<b>Conservation</b>	<p>Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate ou à &lt;-15°C.</p>	

## 2. Avec le Kit NucleoSpin® RNA

	Echantillons biologiques liquides (sangs, cultures virales, sérums ...)	Organes (rate, ganglions, amygdales...)
<b>Lyse</b>	<p>100 µl d'échantillon (individuel ou mélange) + 350 µl de <b>tampon RA1</b> dans un microtube.</p> <p>Homogénéiser ~15 secondes.</p> <p>Incuber 10 minutes à température ambiante.</p>	<p>20-30 mg d'échantillon (individuel ou mélange) + 350 µl de <b>tampon RA1</b> + 1 bille d'acier inoxydable dans un microtube.</p> <p>Broyer 2 minutes à 30 Hz.</p> <p>Centrifuger 2 minutes à 6 000 g.</p> <p>Transférer 300 µl du <b>surageant</b> dans un microtube.</p>
<b>Centrifugation (optionnel)</b>	<p>Dans le cas où le mélange obtenu est de nature visqueuse, difficile à pipeter et susceptible de colmater la colonne, déposer la totalité du mélange sur une colonne « Nucleospin® Filter L » avec un microtube en collecteur.</p> <p>Centrifuger 1 minute à 11 000 g.</p> <p>Conserver l'éluat pour poursuivre le protocole de purification.</p>	
<b>Préparation de la fixation</b>	<p>Ajouter 450 µl d'<b>éthanol à 70%</b>.</p> <p>Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes).</p>	<p>Ajouter 300 µl d'<b>éthanol à 70%</b>.</p> <p>Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes).</p>
<b>Transfert sur colonnes et fixation à la membrane</b>	<p>Identifier les colonnes, déposer 700 µl de mélange sur la colonne correspondante.</p> <p>Centrifuger 2 minutes à 10 000 g.</p>	<p>Identifier les colonnes, déposer la <b>totalité</b> du mélange sur la colonne correspondante.</p> <p>Centrifuger 2 minutes à 10 000 g.</p>
<b>1<sup>er</sup> lavage</b>	<p>Changer le tube collecteur et ajouter 200 µl de <b>tampon RAW2</b>.</p> <p>Centrifuger 2 minutes à 10 000 g.</p>	
<b>2<sup>nd</sup> lavage</b>	<p>Changer le tube collecteur et ajouter 600 µl de <b>tampon RA3</b>.</p> <p>Centrifuger 2 minutes à 10 000 g.</p>	
<b>3<sup>e</sup> lavage</b>	<p>Changer le tube collecteur et ajouter 250 µl de <b>tampon RA3</b>.</p> <p>Centrifuger 5 minutes à 10 000 g.</p>	
<b>Elution</b>	<p>Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 60 µl d'<b>eau Nuclease-free</b>.</p> <p>Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 2 minutes à 10 000 g.</p>	
<b>Conservation</b>	<p>Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate ou à &lt;-15°C.</p>	

### 3. Avec le Kit QIAamp® Viral RNA

	Echantillons biologiques liquides (sangs, cultures virales, sérums...)	Organes (rate, ganglions, amygdales...)
Lyse	<p>100 µl d'échantillon (individuel ou mélange) + 560 µl de <b>tampon AVL + Carrier RNA</b> dans un microtube.</p> <p>Homogénéiser ~15 secondes.</p> <p>Incuber 10 minutes à température ambiante.</p>	<p>20-30 mg d'échantillon (individuel ou mélange)</p> <p>+ 560 µl de <b>tampon AVL + Carrier RNA</b></p> <p>+ 1 bille d'acier inoxydable dans un microtube.</p> <p>Broyer 2 minutes à 30 Hz.</p> <p>Centrifuger 2 minutes à 6 000 g.</p> <p>Transférer <b>la totalité de surnageant</b> dans un microtube de 1,5 ml.</p>
Préparation de la fixation	<p>Ajouter <b>560 µl d'éthanol à 100%</b>.</p> <p>Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes).</p> <p>Centrifuger brièvement.</p>	
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	<p>Identifier les colonnes, déposer <b>630 µl</b> de mélange sur la colonne correspondante.</p> <p>Centrifuger 1 minute à 10 000 g. Augmenter les temps de centrifugation en cas de mélange de nature visqueuse, difficile à pipeter et susceptible de colmater la colonne.</p> <p>Changer le tube collecteur, déposer le reste du mélange et centrifuger 1 minute à 10 000 g.</p>	
1 <sup>er</sup> lavage	<p>Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl de tampon AW1</b>.</p> <p>Centrifuger 1 minute à 10 000 g.</p>	
2 <sup>ème</sup> lavage	<p>Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl de tampon AW2</b>.</p> <p>Centrifuger 1 minute à 10 000 g.</p>	
Séchage de la colonne	<p>Changer le tube collecteur.</p> <p>Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.</p>	
Elution	<p>Transférer la colonne sur un microtube. Déposer <b>60 µl de tampon AVE</b>.</p> <p>Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minutes à 10 000 g.</p>	
Conservation	<p>Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate ou à &lt;-15°C.</p>	

#### 4. Avec le kit NucleoSpin® 96 Virus

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.

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

Avant le début de l'extraction, préchauffer :

- le tampon RAV1 + Carrier RNA à +56°C maximum 5 minutes. Pas plus de 4 préchauffages.
- l'eau Nuclease-free à +70°C.

	<b>Sang dans un tube d'anticoagulant (EDTA)</b>
<b>Lyse</b>	Placer <b>100 µl</b> d'échantillon (individuel ou mélange) par puits d'une plaque Round-well Block. Pour les témoins négatifs d'extraction, utiliser <b>100 µl</b> de <b>tampon PBS 1X</b> .
	Ajouter <b>400 µl</b> de <b>tampon RAV1 + Carrier RNA + 20 µl</b> de <b>protéinase K</b> . 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.
<b>Préparation de la fixation</b>	Répartir <b>400 µl</b> d' <b>éthanol 100%</b> dans une plaque MN Square-well Block. Enlever délicatement le film adhésif de la plaque Round-well Block contenant les échantillons et transférer la <b>totalité du mélange</b> de chaque puits dans la plaque contenant l'éthanol. Homogénéiser le mélange par aspiration-refoulement 5 fois (très important) avec une pipette multicanaux p1000.
<b>Transfert sur colonnes et fixation à la membrane</b>	Placer une plaque 96 Nucleospin® Virus Binding Plate (bleue) sur une nouvelle plaque MN Square-well Block. Déposer la <b>totalité du mélange</b> 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.
<b>1<sup>er</sup> lavage</b>	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 <b>500 µl</b> de <b>tampon RAW</b> dans chacun des puits. Placer un nouveau film adhésif Self-adhering PE Foil sur la plaque. Centrifuger 2 minutes.
<b>2<sup>ème</sup> lavage</b>	Enlever le film adhésif de plaque Nucleospin® Virus Binding Plate. Ajouter de <b>900 µl</b> de <b>tampon RAV3</b> dans chacun des puits. Placer un nouveau film adhésif Self-adhering PE Foil sur la plaque. Centrifuger 5 minutes.
<b>Séchage de la colonne</b>	Déposer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate sur une plaque 96 (type ELISA) vide et sèche. Centrifuger 10 minutes.
<b>Elution</b>	Placer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate sur une plaque Rack with MN Tube Strips. Enlever le film adhésif de la plaque. Déposer <b>100 µl</b> d' <b>eau Nuclease-free</b> préchauffé à +70°C dans chaque puits de la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate. <b>Ne pas utiliser le tampon RE.</b> Centrifuger 2 minutes.

<b>Conservation</b>	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.
---------------------	--

## 5. Avec le kit NucleoSpin® RNA Virus

Protocole d'extraction commun pour la recherche du virus de la peste porcine Africaine ADIAVET™ ASFV FAST TIME (réf. ADI551).

	Sang, sérum, culture cellulaire	Tissu	Ecouvillon de sang ou d'exsudat
Echantillon préparé	100 µl.	20-30 mg + 300 µl de PBS 1X.	Vortexer dans 1 ml de PBS 1X. Masser et verser le surnageant dans un tube.
Lyse		Ajouter une bille de tungsten et broyer 2 minutes 30 Hz. Centrifuger 3 minutes à 1 000 g. Reprendre 100 µl de surnageant dans un microtube.	Transfert 100 µl de surnageant dans un microtube.
	Ajouter 400 µl de tampon RAV1+ carrier Vortexer.		
	Incubation 10 minutes à 70°C.		
Préparation de la fixation	Ajouter 400 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 <sup>er</sup> lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RAW. Centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
2 <sup>nd</sup> 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 100 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.		

## **6. Extraction avec le kit ADIAMAG - Billes magnétiques ARN/ADN**

Protocole d'extraction commun pour la recherche du virus de la peste porcine africaine ADIAVET™ ASFV FAST TIME (réf. ADI551).

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, les témoins d'amplification positif et négatif (« CSFV CTL+ » et « CSFV 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- Remplacer 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.A.) aux 20 µl de réactif « A5 ».

Pour le témoin négatif, ajouter **5 µl** de la solution (§ II.3.B.) aux 20 µl de réactif « A5 ».

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

**Remplacer 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 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 CSFV 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.

Les programmes utilisables en fonction du thermocycleur sont :

Programme standard		Programme court	
ABI7500* -Thermofisher AriaMx - MX3005P - Agilent Agilent CFX96 Touch - Biorad LightCycler 480 - Roche Diagnostic		ABI7500* - Thermofisher AriaMx - MX3005P - Agilent 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 7500 Thermofisher

\*\*\* Mettre 30 secondes pour le MX3005P

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

## VII. Interpretation des résultats

### 1. Définitions

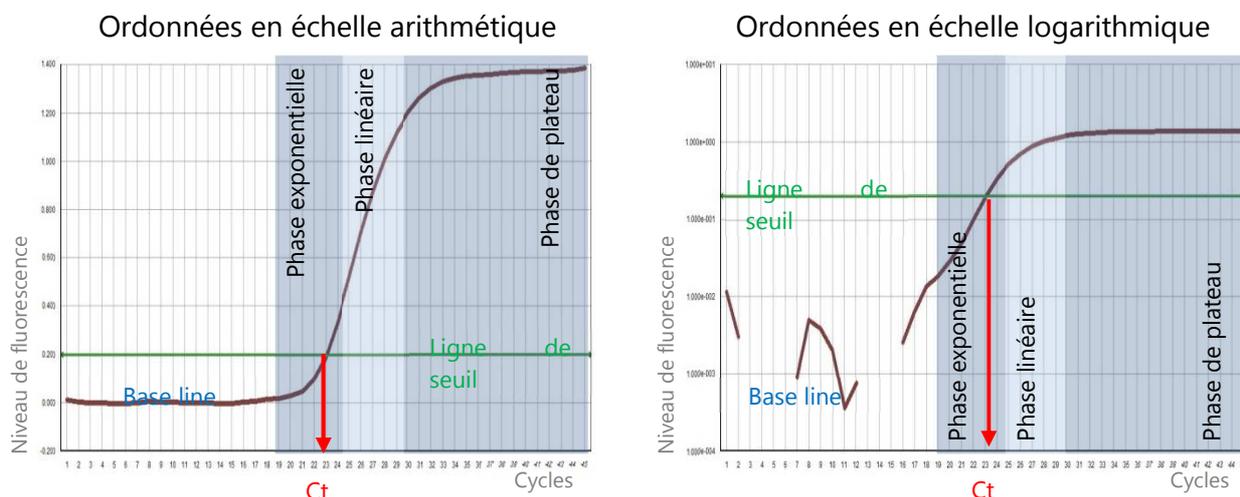
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

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)	CSFV CTL+	CSFV CTL-	Témoin négatif d'extraction	Témoin positif d'extraction *
Amplification FAM	non	oui	non	non	oui
Amplification VIC/HEX	non	non/oui	oui	non	non/oui
Validation de	Absence de contamination pour l'amplification	Amplification de la cible	Amplification du contrôle interne	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 les CSFV CTL+ et CSFV 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 PPC (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
Resultat	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<sup>ème</sup> 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.