MANUEL D'INSTRUCTION

ADIAVET™ PIF FAST TIME

TEST POUR LA DETECTION DU CORONAVIRUS FELIN RESPONSABLE DE LA PERITONITE INFECTIEUSE FELINE PAR AMPLIFICATION ENZYMATIQUE EN TEMPS REEL (TEST RT-PCR)

Références :
ADI521-50 (50 réactions)
ADI521-100 (100 réactions)

VET

Version française
NF521-01
2019-01

ADIAVET™ PIF FAST 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 de l' « EPC-Ext » 5
4. Utilisation du « PIF CTL+ » 5
5. Matériel nécessaire mais non fourni 5

IV. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS 6

1. Précautions 6
2. Conservation des échantillons et des extraits d'ARN 6
3. Préparation des prélèvements 6
4. Témoins à inclure 6

V. EXTRACTION ET PURIFICATION 7

1. Avec le Kit QIAamp® Viral RNA 7
2. Avec le Kit NucleoSpin® RNA Virus 8

VI. AMPLIFICATION 9

VII. INTERPRETATION DES RESULTATS 10

1. Définitions 10
2. Validation et interprétation des résultats 10
   A. Validation de l'essai 10
   B. Interprétation des résultats 11

VIII. INDEX DES SYMBOLES 12

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
2019/01	NF521-01	N/A	Création

II. Informations générales

1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ PIF FAST TIME permet de détecter le coronavirus félin, par amplification enzymatique en temps réel (PCR), à partir de prélèvements de sang total, d'ascite, de tissu et d'écouvillon de fèces.

2. Pathogène

Le Coronavirus est un virus présent dans le monde entier. Il infecte particulièrement les mammifères et les oiseaux. Le Coronavirus félin (FCoV) est un virus ARN. Il touche en majorité les jeunes chats. Le virus infecte le félin sous une forme entérique dite Feline Enteric CoronaVirus (FeCV) qui entraine des problèmes digestifs. Cette forme peut ensuite muter et devenir infectieuse (FIPV : Feline Enteric CoronaVirus). Le virus muté est à l'origine de la Péritonite Infectieuse Féline (PIF). La PIF est l'une des plus grandes causes de mortalité chez le chat. Le diagnostic PCR est l'une des méthodes les plus efficaces pour détecter la présence du pathogène car elle est rapide, sensible et spécifique.

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 polymerase 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™ PIF FAST TIME peut détecter simultanément :

- Le coronavirus félin (sonde marquée en FAM)
- La β-actine, 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). Dans le cadre d'analyse d'écouvillon de selle de chat, l'ajout d'un contrôle interne exogène est fournis dans le kit.

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 :

Prélèvement	Analyse individuelle
Sang total (tube EDTA)	☑
Ascites (épanchements de l'abdomen ou du thorax)	☑
Tissu	☑
Ecouvillon de fèces	☑

III. Matériel et réactifs

1. Réactifs fournis dans le kit

REF ADI521-50

A5	solution d'amplification	1 x 500 µl tube à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
PIF CTL+	contrôle positif Coronavirus	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
EPC-Ext	contrôle exogène non cible d'extraction	1 x 300 µl tube à bouchon jaune (Réactif prêt à l'emploi)

REF ADI521-100

A5	solution d'amplification	2 x 500 µl tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
PIF CTL+	contrôle positif Coronavirus	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
EPC-Ext	contrôle exogène non cible d'extraction	2 x 300 µl tubes à bouchon jaune (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'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 de l' « EPC-Ext »

« EPC-Ext » est un contrôle interne de purification à utiliser lors d'analyse à partir d'écouvillon de selle de chat.
Aliquoter et conserver cette solution à <-15°C en fonction de la taille des séries d'extraction. Les aliquotes ne doivent pas subir plus de 3 décongélations.
Pour chaque extraction de fèces, nous recommandons d'ajouter **5 µl d'EPC-Ext par échantillon.**

4. Utilisation du « PIF CTL+ »

« PIF CTL+ » est un témoin positif d'amplification.
Ajouter **200 µl** d'eau Nuclease-free au « PIF CTL+ » 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 « PIF CTL+ » dans un des puits.

5. 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, 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%
- Tampon PBS 1X (composition recommandée, NaCl 150 mM, Na2HPO4 5 mM, KH2PO4 1,7mM, sans Ca2+, sans K+ - une composition différente peut être utilisée après validation par l'utilisateur)

- Kit d'extraction d'ARN en colonne individuelle

- QIAamp® Viral RNA (Qiagen, 50 extractions : réf. 52904 ou 250 extractions : réf. 52906)
- NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel, 50 extractions : réf. 740956.50 ou 250 extractions : réf. 740956.250)

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 Adiagène. 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.
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. § 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 (beta actine) naturellement présent dans les cellules de l'animal permet de vérifier l'extraction et l'amplification de chaque échantillon. Le témoin « PIF 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 Coronavirus. 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 Coronavirus. 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

1. Avec le Kit QIAamp® Viral RNA

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

	Sang sur EDTA, Ascite	**Ecouvillon de fèces**	**Tissu**
Echantillon préparé	Prélever **140 µl** du liquide dans un microtube	Vortexer l'écouvillon dans 2 mL de PBS 1X. Transférer **140 µl** du liquide dans un microtube contenant **5µl d'EPC-Ext**	Transférer **20 mg** d'échantillon dans un microtube
Lyse	Ajouter **560 µl** de **tampon AVL + Carrier RNA**.		
	Homogénéiser 15 secondes. Incuber **10 min** à température ambiante.		Broyer [1] Centrifuger 2 minutes à 6 000 g. Transférer le surnageant dans un microtube.
Préparation de la fixation	Ajouter **560 µl** d'**éthanol 100%**. Mélanger 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.		
1er lavage	Changer le tube collecteur et ajouter **500 µl** de **tampon AW1**. Centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
2ème 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 1minute 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. Avec le Kit NucleoSpin® RNA Virus

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

<table>
<tr><th></th><th>Sang sur EDTA, Ascite</th><th>Ecouvillon de fèces</th><th>Tissu</th></tr>
<tr><td>Echantillon préparé</td><td>Prélever 140 µl du liquide dans un microtube.</td><td>Vortexer l'écouvillon dans 2 mL de PBS 1X.
Transférer 140 µl du liquide dans un microtube contenant 5µl d'EPC-Ext</td><td>Transférer 20 mg d'échantillon dans un microtube.</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Lyse</td><td colspan="3">Ajouter 560 µl de tampon RAV1 + Carrier RNA.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Homogénéiser 15 secondes
Incuber 10 min à température ambiante.</td><td>Broyer [1]
Centrifuger 2 minutes à 6 000 g.
Transférer le surnageant dans un microtube.</td></tr>
<tr><td>Préparation de la fixation</td><td colspan="3">Ajouter 560 µl d'éthanol 100%.
Mélanger à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes).</td></tr>
<tr><td>Transfert sur colonnes et fixation à la membrane</td><td colspan="3">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.</td></tr>
<tr><td>1er lavage</td><td colspan="3">Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RAW.
Centrifuger 1 minute à 10 000 g.</td></tr>
<tr><td>2nd lavage</td><td colspan="3">Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RAV3.
Centrifuger 1 minute à 10 000 g.</td></tr>
<tr><td>Séchage de la colonne</td><td colspan="3">Changer le tube collecteur. Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.</td></tr>
<tr><td>Elution</td><td colspan="3">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.</td></tr>
<tr><td>Conservation</td><td colspan="3">Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate,
ou à <-15°C.</td></tr>
</table>

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

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 **10 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 **10 µl** de réactif « A5 ».
Pour le CTL+, ajouter **5 µl** de la solution (§ II.3.) aux 10 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 cylceur soit programmé et démarrer le run rapidement après la mise en place de la plaque ou des tubes dans le cycleur.

La cible coronavirus félin 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 :
Le programme suivant a été développé pour les appareils **ABI Prism (**type ABI7500, Step-one, QS5...) d'**Applied Biosystems** (cocher l'option « emulation 9600 » lorsqu'elle existe), pour les **MX3005P**, **AriaMx** d'Agilent et pour le **CFX96** de **Biorad** :

Programme standard		**Programme court**	
10 min. 45°C		10 min. 45°C	
10 min. 95°C		10 min. 95°C	
15 sec 95°C**	40 cycles	5 sec 95°C	40 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.

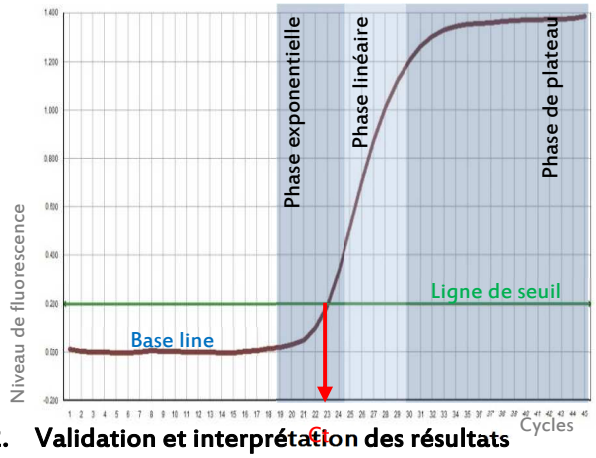
Le terme **« courbe d'amplification caractéristique »** qualifie une courbe de fluorescence avec une phase exponentielle, une phase linéaire et une phase de plateau.

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.

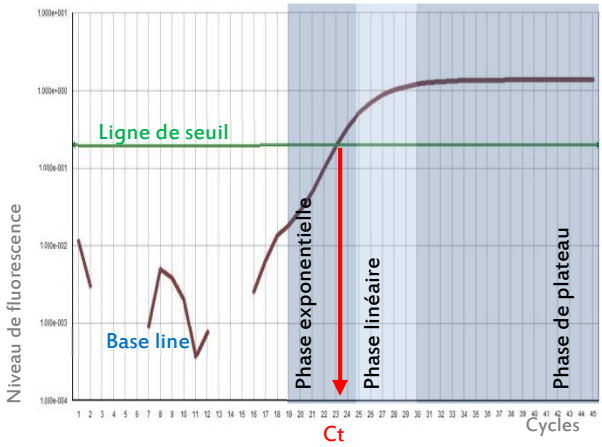
Le **« cycle seuil »** ou **« threshold cycle » (Ct)** d'un puits correspond, pour chaque fluorophore détecté, à l'abscisse du point d'intersection entre la ligne de seuil et la courbe d'amplification. La valeur de Ct exprimée par l'appareil pour chaque puits dépend ainsi de la position de la ligne seuil et de la charge d'analytes initialement présents dans le tube PCR.

Exemple d'une courbe d'amplification caractéristique :

Ordonnées en échelle arithmétique



Ordonnées en échelle logarithmique



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)	PIF CTL+	Témoin négatif d'extraction	Témoin positif d'extraction *
Amplification FAM	non	oui	non	oui
Amplification VIC/HEX	non	oui	non	non/oui
Validation de	Absence de contamination lors de l'amplification	Amplification de la cible et du contrôle interne	Absence de contamination lors de l'extraction	Etapes d'extraction et d'amplification

* optionnel

Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM et VIC/HEX pour le témoin positif (« PIF 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 Coronavirus (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
Resultat	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 1/10ème 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 jusque
	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