



ADIAVET™ A/H1N1 (2009) REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION DES VIRUS DE L'INFLUENZA PANDEMIQUE
A/H1N1/04/2009 CHEZ LE PORC PAR AMPLIFICATION ENZYMATIQUE EN
TEMPS REEL (TEST RT-PCR)

Référence:

ADI441-50 (50 réactions)
ADI441-100 (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™ A/H1N1(2009)

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
4.	Mesures de biosécurité	5
III.	MATERIEL ET REACTIFS.....	6
1.	Réactifs fournis dans le kit.....	6
2.	Validité et conservation.....	6
3.	Utilisation des témoins.....	6
A.	<i>Utilisation du « A/H1N1 CTL+ ».....</i>	<i>6</i>
B.	<i>Utilisation du « SIV CTL- ».....</i>	<i>6</i>
4.	Matériel nécessaire mais non fourni.....	6
IV.	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS.....	8
1.	Précautions.....	8
2.	Conservation des échantillons et des extraits d'ARN.....	8
3.	Préparation des prélèvements	8
A.	<i>Ecouvillons nasaux.....</i>	<i>8</i>
B.	<i>Suspensions de souche virale, surnageant de culture cellulaire, liquides allantoidiens ou liquides bronchiques.....</i>	<i>9</i>
C.	<i>Organes.....</i>	<i>9</i>
4.	Témoins à inclure	9
V.	EXTRACTION ET PURIFICATION.....	10
1.	Avec le Kit RNeasy®	10
2.	Avec le Kit QIAamp® Viral RNA.....	11
3.	Avec le Kit NucleoSpin® RNA.....	12
4.	Avec le Kit NucleoSpin® RNA Virus.....	13
5.	Avec le Kit NucleoSpin® 8 RNA.....	14
A.	<i>Centrifugation uniquement.....</i>	<i>14</i>
B.	<i>Centrifugation et vacuum.....</i>	<i>15</i>
6.	Avec le Kit NucleoSpin® 96 Virus.....	16
7.	Avec le kit ADIAMAG.....	17
VI.	AMPLIFICATION.....	18
VII.	INTERPRETATION DES RESULTATS.....	19
1.	Définitions.....	19
2.	Validation et interprétation des résultats.....	20
A.	<i>Validation de l'essai.....</i>	<i>20</i>
B.	<i>Interprétation des résultats.....</i>	<i>20</i>
VIII.	INDEX DES SYMBOLES	21

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
2013/11	NF441-05	Correction	Désignation NucleoSpin® RNA II remplacée par NucleoSpin® RNA par le fournisseur, en page 7, § III-4.
2013/11	NF441-05	Modification technique	β-Mercaptoéthanol (10 µl/ml, optionnel) pour les échantillons biologiques liquides, en page 10, § V-1.
2013/11	NF441-05	Correction	Désignation RA2 remplacée par RAW2 par le fournisseur, en page 12, § V-3.
2013/11	NF441-05	Modification technique	β-Mercaptoéthanol (10 µl/ml, optionnel) pour les échantillons biologiques liquides, en page 12, § V-3.
2013/11	NF441-05	Modification technique	Ajout de définitions (page 18, § VII-1).
2015/12	NF441-06	Modification technique	Suppression de la référence ADI441-100 (100 réactions)
2015/12	NF441-06	Modification technique	Ajout du tableau des pictogrammes (page 20, § VIII).
2016/07	NF441-07	Administratif	Modification des logos
2016/07	NF441-07	Administratif	Ajout des exigences légales Biosearch
2016/07	NF441-07	Administratif	Ajout tableau « types de prélèvements » §I.3
2016/07	NF441-07	Modification technique	Ajout caractère optionnel du β-Mercaptoéthanol (10 µl/ml) pour les échantillons biologiques liquides, en page 14, § V-5.
2020/01	NF441-08	Technical change	Ajout d'un tube "NF-Water" dans le kit. Ajout du kit d'extraction ADIAMAG (billes magnétiques)
2020/05	NF441-09	Modification technique	Ajout de la référence ADI441-100 (100 réactions)

II. Informations générales

1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ A/H1N1 (2009) REAL TIME permet de détecter le Virus Influenza Pandémique A/H1N1/2009 (Virus A/H1N1) par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir d'écouvillon nasal, de prélèvements de liquide allantoïdien ou bronchique et de tissu de porc ainsi qu'à partir de culture virale.

2. Pathogène

La grippe porcine est une maladie d'élevage importante car elle peut entraîner des symptômes respiratoires aigus. Elle se caractérise généralement par un grand nombre d'animaux malades, mais une très faible mortalité. Elle est causée par un virus du genre Influenza type A. Le premier isolement de virus influenza répertorié chez le porc remonte à 1930 (Influenza type A, H1N1). Contrairement à la grippe humaine, la grippe porcine peut apparaître dans les élevages toute l'année. Trois sous-types de virus influenza type A peuvent habituellement infecter les porcs : H1N1, H3N2 et H1N2, ils sont enzootiques en Europe. Les sous-types de virus influenza porcins (Swine Influenza Virus ou SIV) les plus fréquemment isolés ces dernières années en France sont les sous-types H1N1 et H1N2 de lignées génétiques européennes.

Apparue début 2009, la pandémie grippale due au nouveau variant du virus influenza A(H1N1) s'est rapidement propagée dans la population humaine mondiale. Aussi, il est important, tant d'un point de vue de santé animale que de santé publique, d'identifier parmi les infections grippales que connaissent périodiquement les élevages porcins, celles liées à la pandémie grippale A/H1N1 afin de limiter la propagation de la maladie.

La mise en évidence du virus au laboratoire est généralement réalisée sur des écouvillons nasaux par la mise en culture du virus. Des prélèvements de tissus pulmonaires au niveau des lésions peuvent également être réalisés soit pour un examen histologique avec une mise en évidence du virus par immunofluorescence, soit pour une culture virale. La culture virale doit être réalisée de façon précoce car le virus ne persiste que quelques jours au niveau des lésions.

La PCR temps-réel peut être une méthode alternative pour obtenir un résultat en une journée avec une haute spécificité et sensibilité à partir d'écouvillons nasaux ou tissus pulmonaires prélevés sur des animaux dès les premiers signes cliniques : fort abattement, hyperthermie, baisse d'appétit, difficultés respiratoires (dyspnée, toux, jetage).

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™ A/H1N1 (2009) REAL TIME peut détecter simultanément

- virus influenza pandémique A/H1N1/04/2009 (sonde marquée en FAM)
- GAPDH 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).
-

Ce test est recommandé par l'ANSES aux laboratoires agréés par la DGAL pour suivre la circulation des virus de la grippe porcine et détecter la présence du virus influenza A/H1N1 (2009) pandémique au sein des élevages porcins. Dans un premier temps, le test ADIAVET™ SIV REAL TIME (ADI282-100) indiquera la présence ou non de virus Influenza de type A. Dans un second temps, la présence du virus A/H1N1(2009) sera déterminée dans les échantillons positifs en SIV, à partir du même extrait et avec le même programme PCR, en utilisant un test spécifique ADIAVET™ A/H1N1 (2009) REAL TIME.

Adiagène a validé ce test avec différents kits de purification d'ARN (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	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Ecouvillon nasal	<input checked="" type="checkbox"/>	3
Liquide allantoïdien ou bronchique	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tissu (poumon)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Culture virale	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

* Dépend de la situation épidémiologique et de la qualité de l'échantillon. Non recommandé dans le cas de diagnostic clinique de syndrome grippal.

4. Mesures de biosécurité

En matière de sécurité microbiologique, les virus grippaux sont classés parmi les pathogènes du groupe 2 (arrêté du 18 juillet 1994 modifié en 1998). Outre les exigences prescrites par la norme ISO 17025, les laboratoires pratiquant la manipulation de ces virus doivent donc être aménagés et doivent fonctionner conformément aux exigences définies dans l'arrêté du 16 juillet 2007 pour les laboratoires manipulant des agents pathogènes classés dans ce groupe.

III. Matériel et réactifs

1. Réactifs fournis dans le kit

REF ADI441-50

A5solution d'amplification	1 x 1000 µl tube à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
A/H1N1 CTL+ contrôle positif <i>Virus pandémique A/H1N1/04/2009</i>	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
SIV CTL-contrôle négatif Swine Influenza Virus	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
NF-Water Eau Nuclease free	1 x 1000 µl tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

REF ADI44-110

A5solution d'amplification	2 x 1000 µl tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
A/H1N1 CTL+ contrôle positif <i>Virus pandémique A/H1N1/04/2009</i>	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
SIV CTL-contrôle négatif Swine Influenza Virus	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
NF-Water Eau Nuclease free	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'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 témoins

Ces témoins peuvent être remplacés par un témoin positif approprié et calibré permettant la validation de l'ensemble du processus analytique (extraction et RT-PCR) à chaque essai.

A. Utilisation du « A/H1N1 CTL+ »

« A/H1N1 CTL+ » est un témoin positif d'amplification.

Ajouter **200 µl** "NF-Water" au « A/H1N1 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 « A/H1N1 CTL+ » dans un des puits.

Une gamme de 10^{-1} à 10^{-5} peut-être réalisée à partir de ce témoin positif remis en solution.

B. Utilisation du « SIV CTL- »

« SIV CTL- » est un témoin négatif d'amplification.

Ajouter **200 µl** "NF-Water" au « SIV 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 « SIV 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 à billes (Mixer Mill ou Fast Prep)
 - Etuve, bain-marie ou bloc chauffant
 - Appareil d'homogénéisation pour tubes
 - Agitateur de plaque 96
 - Pipettes de 1 - 10 µl, 20 - 200 µl et 200 - 1000 µl
 - Pipette multicanaux 100 µl
-

- Embouts Nucléase-free avec filtres pour micropipettes
- Microtubes Nuclease-free de 1,5 ml et 2 ml
- Plaque 96 puits (type ELISA)
- Gants latex non poudrés
- Billes de tungsten ou inox 3 mm
- Ethanol 96-100%
- Eau nuclease-free
- Eau physiologique stérile (NaCl 8,5g/l)
- β -mercaptoéthanol 14,5 M
- Milieu MEM + antibiotique (100 IU/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine)

- Kit d'extraction d'ARN en colonne individuelle

- RNeasy® Mini Kit (Qiagen, 50 extractions : réf. 74104 ou 250 extractions : réf. 74106)
- ou
- QIAamp® Viral RNA (Qiagen, 50 extractions : réf. 52904 ou 250 extractions : réf. 52906)
- ou
- NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, 50 extractions : réf. 740955.50 ou 250 extractions : réf. 740955.250)
- 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).

ou

- Kit d'extraction d'ARN en barrette de 8 puits

- Nucleospin® 8 RNA (Macherey-Nagel, 12x8 extractions : réf. 740698 ou 60x8 extractions : réf. 740698.5)

ou

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

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

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 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. 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. 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. Ecouvillons nasaux

Ajouter **2 ml** de milieu MEM+antibiotique (en vue d'un éventuel isolement viral ultérieur) ou d'eau physiologique directement dans le tube de transport de l'écouvillon.

Masser l'écouvillon à travers le tube de transport et/ou homogénéiser.

Transférer le liquide obtenu dans un microtube de 2 ml.

Essorer chaque écouvillon pour recueillir le maximum de liquide.

Prélever **200 µl d'échantillon**.

NB1 : Conserver le reste à -70°C +/-10°C en vue d'une nouvelle analyse ou d'un isolement viral.

NB2 : Un pool de 3 écouvillons est possible mais dans le cas de diagnostic clinique de syndrome grippal les pools ne sont pas recommandés.

Cf. § IV pour l'extraction et la purification des ARN en suivant le protocole d'extraction dédié aux échantillons biologiques liquides.

B. Suspensions de souche virale, surnageant de culture cellulaire, liquides allantoïdiens ou liquides bronchiques

Centrifuger brièvement l'échantillon si nécessaire pour éliminer les débris des liquides bronchiques.

Prélever **200 µl d'échantillon**.

NB : Conserver le reste à -70°C +/-10°C en vue d'une nouvelle analyse ou d'un isolement viral.

Cf. § IV pour l'extraction et la purification des ARN en suivant le protocole d'extraction dédié aux échantillons biologiques liquides.

C. Organes

Les organes peuvent être traités selon le protocole dédié dans les tableaux ci-après (*cf. § IV pour l'extraction et la purification des ARN*).

En cas de colmatages ou d'inhibitions, ils peuvent également être extraits selon le protocole dédié aux échantillons biologiques liquides après le traitement suivant :

Placer **0,1 g** d'organe dans un tube de 2 ml contenant **1 ml** de milieu MEM+antibiotique (en vue d'un éventuel isolement viral ultérieur) ou d'eau physiologique

Ajouter **1 bille de tungstène ou inox** de 3 mm.

Broyer 2 fois 3 minutes à 30 Hertz (Mixer Mill).

Centrifuger 2 minutes à 6 000 g.

Prélever **200 µl de la solution obtenue**.

NB : Conserver le reste à -70°C +/-10°C en vue d'une nouvelle analyse ou d'un isolement viral.

Cf. § IV pour l'extraction et la purification des ARN en suivant le protocole d'extraction dédié aux échantillons biologiques liquides.

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 « A/H1N1 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.

Un témoin positif d'extraction Influenza porcine est disponible après du LNR (ANSES-Ploufragan).

Ce matériel doit être extrait comme un échantillon biologique liquide et utilisé tel quel sans aucune dilution préalable.

V. Extraction et purification

1. Avec le Kit RNeasy®

Ce protocole a été validé par l'ANSES.

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

	Echantillons biologiques liquides	Organes (poumons...)
Lyse	<p>Ajouter 350 µl de tampon RLT+ β-Mercaptoéthanol (10 µl/ml, optionnel) aux 200 µl d'échantillon préparé comme décrit précédemment.</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>Placer 20-30 mg d'échantillon dans un microtube.</p> <p>Ajouter 350 µl de tampon RLT+ β-Mercaptoéthanol (10 µl/ml) et 1 bille de tungstène ou inox.</p> <p>Broyer 2 minutes à 30 Hz.</p> <p>Centrifuger brièvement le lysat.</p> <p><i>Déposer si besoin le surnageant sur les colonnes de filtration QIAshredder et centrifuger 2 minutes à 14 000 g. Récupérer le filtrat.</i></p>
Préparation de la fixation	<p>Ajouter 350 µl d'éthanol à 70%.</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>	
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	<p>Identifier les colonnes, déposer 700 µl de mélange sur la colonne correspondante.</p> <p>Centrifuger 1 minute à 8 000 g.</p>	<p>Identifier les colonnes, déposer la totalité du mélange sur la colonne correspondante.</p> <p>Centrifuger 1 minute à 8 000 g.</p>
1^{er} lavage	<p>Changer le tube collecteur et ajouter 700 µl de tampon RW1.</p> <p>Centrifuger 1 minute à 8 000 g.</p>	
2nd lavage	<p>Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RPE.</p> <p>Centrifuger 1 minute à 8 000 g.</p>	
3^e lavage	<p>Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RPE.</p> <p><i>Facultatif : centrifuger 1 minute à 8 000 g, changer le tube collecteur.</i></p> <p>Centrifuger 1 minute à 10 000 g.</p>	
Elution	<p>Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 50 µl d'eau Nuclease-free.</p> <p>Incuber ~2 minutes à température ambiante et centrifuger 1 minute à 8 000 g.</p>	
Conservation	<p>Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate ou à <-15°C.</p>	

2. Avec le Kit QIAamp® Viral RNA

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

	Echantillons biologiques liquides	Organes (poumons...)
Lyse	Ajouter 560 µl de tampon AVL+ Carrier RNA aux 200 µl d'échantillon préparé comme décrit précédemment. Homogénéiser (~15 secondes).	Placer 20-30 mg d'échantillon dans un microtube. Ajouter 560 µl de tampon AVL+ Carrier RNA et 1 bille de tungstène ou inox . Broyer 2 minutes à 30 Hz.
	Incuber 10 minutes à température ambiante. Centrifuger brièvement.	
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. Changer le tube collecteur, déposer le 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.	

3. Avec le Kit NucleoSpin® RNA

Ce protocole a été validé par l'ANSES.

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

	Echantillons biologiques liquides	Organes (poumons...)
Lyse	<p>Ajouter 350 µl de tampon RA1+ β-Mercaptoéthanol (10 µl/ml, optionnel) aux 200 µl d'échantillon préparé comme décrit précédemment.</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>Placer 20-30 mg d'échantillon dans un microtube.</p> <p>Ajouter 350 µl de tampon RA1+ β-Mercaptoéthanol (10 µl/ml) et 1 bille de tungstène ou inox.</p> <p>Broyer 2 minutes à 30 Hz.</p> <p>Centrifuger brièvement le lysat.</p> <p><i>Déposer si besoin le surnageant sur les colonnes de filtration QIAshredder et centrifuger 1 minute à 11 000 g. Récupérer le filtrat.</i></p>
Préparation de la fixation	<p>Ajouter 350 µl d'éthanol à 70%.</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>	
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	<p>Identifier les colonnes, déposer 700 µl de mélange sur la colonne correspondante.</p> <p>Centrifuger 30 secondes à 11 000 g.</p>	<p>Identifier les colonnes, déposer la totalité du mélange sur la colonne correspondante.</p> <p>Centrifuger 30 secondes à 11 000 g.</p>
1^{er} lavage (facultatif)	<p>Changer le tube collecteur et ajouter 350 µl de tampon MDB.</p> <p>Centrifuger 1 minute à 11 000 g.</p>	
2nd lavage	<p>Changer le tube collecteur et ajouter 200 µl de tampon RAW2.</p> <p>Centrifuger 30 secondes à 11 000 g.</p>	
3^e lavage	<p>Changer le tube collecteur et ajouter 600 µl de tampon RA3.</p> <p>Centrifuger 30 secondes à 11 000 g.</p>	
4^e lavage	<p>Changer le tube collecteur et ajouter 250 µl de tampon RA3.</p> <p><i>Facultatif : centrifuger 30 secondes à 11 000 g, changer le tube collecteur.</i></p> <p>Centrifuger 2 minutes à 11 000 g.</p>	
Elution	<p>Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 60 µl d'eau Nuclease-free.</p> <p>Incuber ~2 minutes à température ambiante et centrifuger 1 minute à 11 000 g.</p>	
Conservation	<p>Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate ou à <-15°C.</p>	

4. Avec le Kit NucleoSpin® RNA Virus

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

	Echantillons biologiques liquides	Organes (poumons...)
Lyse	Ajouter 560 µl de tampon RAV1+ Carrier préalablement préchauffé à +56°C aux 200 µl d' échantillon préparé comme décrit précédemment. Homogénéiser (~15 secondes).	Placer 20-30 mg d' échantillon dans un microtube. Ajouter 560 µl de tampon RAV1+ Carrier préalablement préchauffé à +56°C et 1 bille de tungstène ou inox . Broyer 2 minutes à 30 Hz.
	Incuber 10 minutes à température ambiante. Centrifuger brièvement.	
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 8 000 g. Changer le tube collecteur, déposer le reste du mélange et centrifuger 1 minute à 8 000 g.	
1 ^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RAW . Centrifuger 1 minute à 8 000 g.	
2 ^{ème} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 600 µl de tampon RAV3 . Centrifuger 1 minute à 8 000 g.	
Séchage de la colonne	Changer le tube collecteur. Centrifuger 5 minutes à 11 000 g.	
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 50 µl d' eau Nuclease-free . Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 11 000 g.	
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate ou à <-15°C.	

5. Avec le Kit NucleoSpin® 8 RNA

Ces protocoles ont été validés par l'ANSES.

A. Centrifugation uniquement

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

Pour être centrifugées, les barrettes de colonnes sont disposées sur un support métallique nommé « Column Holder C ».

	Echantillons biologiques liquides	Organes (poumons...)
Lyse	<p>Ajouter 300 µl de tampon RA1+ β-Mercaptoéthanol (10 µl/ml, optionnel) aux 200 µl d'échantillon préparé comme décrit précédemment.</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>Placer 20-30 mg d'échantillon dans un microtube.</p> <p>Ajouter 300 µl de tampon RA1+ β-Mercaptoéthanol (10 µl/ml) et 1 bille de tungstène ou inox.</p> <p>Broyer 2 minutes à 30 Hz.</p> <p>Centrifuger brièvement le lysat.</p> <p><i>Déposer si besoin le surnageant sur les barrettes de filtration et centrifuger 1 minute à 6 000 g. Récupérer le filtrat.</i></p>
Préparation de la fixation	<p>Ajouter 300 µl de tampon RA4 préalablement supplémenté en éthanol 100%.</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>	
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	<p>Identifier les colonnes, déposer 700 µl de mélange sur les barrettes (bleues).</p> <p>Centrifuger 2 minutes à 6 000 g.</p>	<p>Identifier les colonnes, déposer la totalité du mélange les barrettes (bleues).</p> <p>Centrifuger 2 minutes à 6 000 g.</p>
1^{er} lavage	<p>Ajouter 500 µl de tampon RA3.</p> <p>Centrifuger 2 minutes à 6 000 g.</p>	
2nd lavage	<p>Décaler les barrettes sur des puits "poubelle" non utilisés ou changer de plaque collectrice et ajouter 500 µl de tampon RA2.</p> <p>Centrifuger 2 minutes à 6 000 g.</p>	
3^e lavage	<p>Ajouter 800 µl de tampon RA3.</p> <p>Centrifuger 2 minutes à 6 000 g.</p>	
4^e lavage	<p>Décaler les barrettes sur des puits "poubelle" non utilisés ou changer de plaque collectrice et ajouter 500 µl de tampon RA4.</p> <p>Centrifuger 10 minutes à 6 000 g.</p>	
Elution	<p>Transférer les barrettes sur les barrettes de tubes prévues pour l'élution.</p> <p>Déposer 75 µl d'eau Nuclease-free.</p> <p>Incuber ~2 minutes à température ambiante et centrifuger 3 minutes à 6 000 g.</p>	
Conservation	<p>Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate ou à <-15°C.</p>	

B. Centrifugation et vacuum

Le système vacuum est composé d'une chambre à vide munie d'un récipient à caler grâce à 2 adaptateurs, d'une plaque de 96 puits en forme d'entonnoir à usage unique (MN Wash Plate) à déposer sur le récipient. Les colonnes en barrettes sont déposées sur un support métallique à placer sur la chambre à vide. Si l'extraction comporte moins de 6 barrettes, il est nécessaire de compléter le système par des barrettes spéciales avec colonnes en caoutchouc pour appliquer un vide efficace. La chambre à vide est reliée à une pompe électrique par un tuyau avec un robinet qui reste en position fermée pour protéger les échantillons de toute contamination. Le vide est appliqué en allumant la pompe à vide via un interrupteur, en réglant ensuite le vide grâce à la molette du manomètre, et enfin en ouvrant le robinet pour faire passer la pression. Quand le liquide est passé au travers de la membrane, le robinet est à fermer avant d'éteindre la pompe. Pour évacuer la pression, il faut ouvrir le robinet puis le refermer.

	Echantillons biologiques liquides
Lyse	Placer 200 µl d'échantillon préparé comme décrit précédemment par puits d'une plaque MN Square Well Block. Ajouter 300 µl de tampon RA1+ β-Mercaptoéthanol (10 µl/ml) . Homogénéiser par flux et reflux à la pipette 5 fois minimum.
Préparation de la fixation	Ajouter 300 µl de tampon RA4 préalablement supplémenté en éthanol 100% dans chaque puits d'une plaque MN Square Well Block. Homogénéiser par flux et reflux à la pipette 10 fois minimum.
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer 700 µl de mélange sur les barrettes (bleues). Appliquer un vide faible (50 mbar) pour obtenir un passage de l'échantillon aux gouttes à gouttes.
1 ^{er} lavage	Ajouter 500 µl de tampon RA2 . Appliquer 200 à 400 mbar de vide pendant le temps du passage de l'échantillon (~1 minute).
2 nd lavage	Ajouter 800 µl de tampon RA3 . Appliquer 200 à 400 mbar de vide pendant le temps du passage de l'échantillon (~1 minute).
3 ^e lavage	Ajouter 500 µl de tampon RA4 . Appliquer 200 à 400 mbar de vide pendant le temps du passage de l'échantillon (~1 minute).
Séchage de la plaque	Placer les barrettes de colonnes sur le portoir métallique Column Holder C qui est fixé sur une plaque MN Square Well Block (en les séparant en 2 pour équilibrer les nacelles de la centrifugeuse). Centrifuger 10 minutes à 6 000 g.
Elution	Transférer le portoir Column Holder C contenant les barrettes de colonnes sur les barrettes de tubes prévues pour l'élution (barrettes de 8 puits « Rack with Tube Strips » ou plaque 96 puits « Round Well Block Low »). Ajouter 75 µl d'eau Nuclease-free . Incuber 1 à 2 minutes à température ambiante. Centrifuger 3 minutes à 6 000 g.
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate ou à <-15°C.

6. 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 température ambiante à 5900 tr/min (5600 à 5800 g).

Avant le début de l'extraction, préchauffé

- le tampon RAV1 + Carrier RNA à +56°C.
- l'eau Nuclease-free à +70°C.

	Echantillons biologiques liquides
Lyse	<p>Placer 200 µl d'échantillon préparé comme décrit précédemment par puits d'une plaque Round-well Block.</p> <p>Ajouter 560 µl de tampon RAV1 + Carrier RNA préchauffé à +56°C + 20 µl de protéinase K.</p> <p>Homogénéiser le mélange par aspiration-refoulement 5 fois (très important) avec une pipette multicanaux p1000.</p> <p>Fermer la plaque avec un adhésif Self-adhering PE Foil.</p> <p>Incuber 10 minutes à +70°C.</p>
Préparation de la fixation	<p>Répartir 560 µl d'éthanol 100% dans une plaque MN Square-well Block.</p> <p>Enlever délicatement le film adhésif de la plaque Round-well Block contenant l'échantillon et transférer la totalité du mélange dans la plaque contenant l'éthanol.</p> <p>Homogénéiser le mélange par aspiration-refoulement 10 fois (très important) avec une pipette multicanaux p1000.</p>
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	<p>Placer une plaque 96 Nucleospin® Virus Binding Plate (bleue) sur une nouvelle plaque MN Square-well Block.</p> <p>Déposer la totalité du mélange avec une pipette multicanaux p1000 dans la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate.</p> <p>Placer un nouveau film adhésif Self-adhering PE Foil sur la plaque.</p> <p>Centrifuger 2 minutes. Si la totalité du mélange n'est pas passé, centrifuger à nouveau 3 minutes.</p>
1^{er} lavage	<p>Placer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate sur une nouvelle plaque MN Square-well Block.</p> <p>Enlever le film adhésif de plaque Nucleospin® Virus Binding Plate</p> <p>Ajouter de 500 µl de tampon RAW dans chacun des puits.</p> <p>Placer un nouveau film adhésif Self-adhering PE Foil sur la plaque.</p> <p>Centrifuger 2 minutes.</p>
2^{ème} lavage	<p>Enlever le film adhésif de plaque Nucleospin® Virus Binding Plate.</p> <p>Ajouter de 900 µl de tampon RAV3 dans chacun des puits.</p> <p>Placer un nouveau film adhésif Self-adhering PE Foil sur la plaque.</p> <p>Centrifuger 5 minutes.</p>
Séchage de la colonne	<p>Déposer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate sur une plaque 96 (type ELISA) vide et sèche.</p> <p>Centrifuger 10 minutes.</p>
Elution	<p>Placer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate sur une plaque Rack with MN Tube Strips.</p> <p>Enlever le film adhésif de la plaque.</p> <p>Déposer 100 µl d'eau Nuclease-free préchauffé à +70°C dans chaque puits de la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate. <u>Ne pas utiliser le tampon RE.</u></p> <p>Incuber ~2minutes à température ambiante. Centrifuger 2 minutes.</p>
Conservation	<p>Retirer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate.</p> <p>Fermer la plaque Rack with MN Tube Strips avec des Caps for Strips.</p> <p>Conservé sur glace si utilisation immédiate ou à <-15°C.</p>

7. 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, les témoins d'amplification (« A/H1N1 CTL+ » et « SIV négative 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 les témoins d'amplification, ajouter **5 µl** par puits des solutions (§ 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 cycler soit programmé et démarrer le run rapidement après la mise en place de la plaque ou des tubes dans le cycler.

La cible A/H1N1 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** :

10 minutes à 45°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** :

10 minutes à 45°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. Interpretation des résultats

1. Définitions

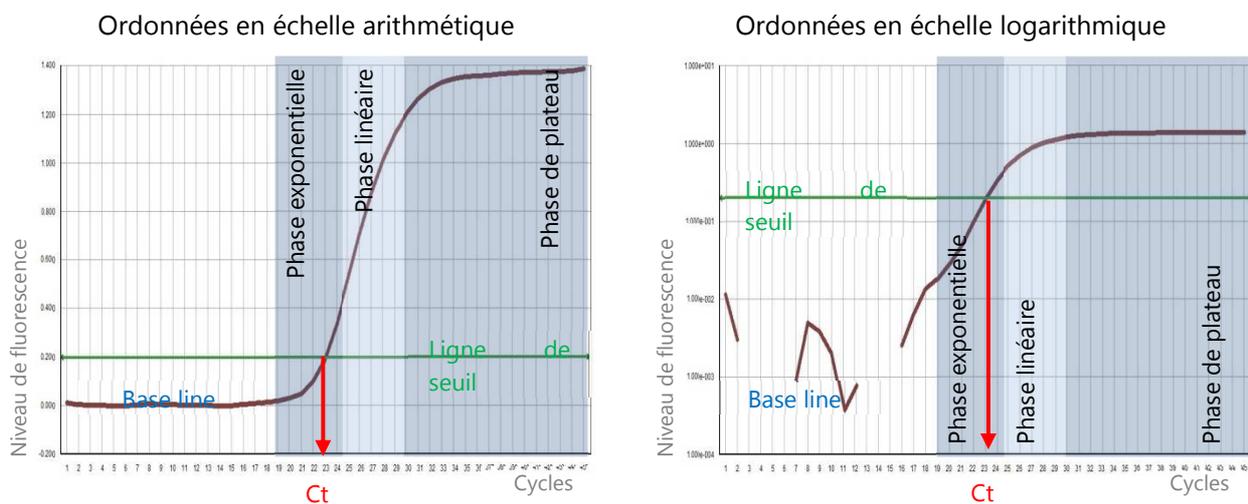
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

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)	A/H1N1 CTL+*	SIV 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 de l'IPC	Absence de contamination pour l'extraction	Etapes d'extraction et d'amplification

*dans le cas de leur remplacement par un témoin positif d'extraction approprié et calibré, validation si le résultat est conforme à celui attendu par le laboratoire pour les gènes de la cible et du contrôle interne.

** optionnel

Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM et VIC/HEX pour le témoin positif (« A/H1N1 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 A/H1N1 (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^{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