

ADIAVET™ IPNV REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION DE LA NECROSE PANCREATIQUE INFECTIEUSE
PAR AMPLIFICATION ENZYMATIQUE EN TEMPS REEL (TEST RT-PCR)

Référence :

ADI641-100 (100 réactions)



ADIAVET™ IPNV REAL TIME

HISTORIQUE DES REVISIONS	3
I. INFORMATIONS GENERALES	4
1. But de l'essai	4
2. La nécrose pancréatique infectieuse.....	4
3. Description et principe du test.....	4
II. MATERIELS ET REACTIFS	6
1. Réactifs fournis dans le kit.....	6
2. Validité et conservation.....	6
3. Utilisation des contrôles.....	6
A. « IPNV CTL+ »	6
B. « EPC-Ext »	6
4. Matériels nécessaires non fournis dans le kit.....	6
III. 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>Pool d'organes, semences ou oeufs</i>	8
B. <i>Liquide coelomique</i>	9
C. <i>Surnageant de culture virale</i>	9
4. Préparation des témoins.....	9
A. <i>Témoin négatif d'extraction (obligatoire)</i>	9
B. <i>Témoin positif « cible » d'extraction (recommandé)</i>	9
IV. EXTRACTIONS ET PURIFICATIONS DES ARN	10
1. Kit QIAamp® Viral RNA.....	10
2. Kit NucleoSpin® RNA Virus	11
3. Kits ADIAMAG - Billes magnétiques ARN/ADN.....	11
V. AMPLIFICATION	12
VI. INTERPRETATION DES RESULTATS	14
1. Définitions.....	14
2. Validation et interprétation des résultats.....	14
A. <i>Validation de l'essai</i>	15
B. <i>Interprétation des résultats</i>	15
VII. INDEX DES SYMBOLES	16

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 mise en page, ne figurent pas l'historique des révisions

Date d'édition	Référence	Type de révision	Révision apportée
2021-01	NF641-01	N/A	Première publication

I. Informations générales

1. But de l'essai

Ce test RT-PCR temps réel permet la détection du virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (NPI) à partir d'organes de poisson, de semences et de surnageants de culture virale.

2. La nécrose pancréatique infectieuse

La nécrose pancréatique infectieuse (NPI) est une maladie virale hautement infectieuse touchant les piscicultures. Elle apparaît principalement chez les jeunes salmonidés ainsi que chez les alevins de brochet, mais presque tous les poissons d'eau douce et d'eau de mer sont sensibles à la maladie, de même que les mollusques (moules). La nécrose pancréatique infectieuse est présente dans certaines régions d'Europe, d'Amérique et d'Asie.

La sensibilité à la NPI est variable selon l'âge : plus les poissons sont jeunes, plus ils sont prédisposés à la maladie. Le frai et les juvéniles sont les plus sensibles. Les géniteurs porteurs asymptomatiques ainsi que les œufs contaminés sont les principaux réservoirs de la NPI. L'agent infectieux est enrichi à l'intérieur des œufs et de la semence et il se transmet aux alevins. Les poissons peuvent être porteurs de l'agent infectieux sur plusieurs générations sans manifester de symptômes et peuvent même le porter et le transmettre durant plusieurs années.

Les poissons atteints nagent en spirales ou en tire-bouchon, ou sont trouvés sur le flanc au fond du bassin. Ils présentent une coloration foncée, une exophtalmie, un ventre gonflé et des cordons d'excréments blanchâtres.

La NPI est causée par le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (IPNV) qui appartient à la famille des Birnaviridae. Il s'agit d'un virus encapsidé, composé de 2 segments d'ARN double brins. Le segment A code pour une protéine de la capsid virale (VP2), une protéine interne (VP3), une protéase virale (VP4) et une protéine non structurale VP5. Le segment B code pour une RNA polymérase (VP1) (Dobos, 1995). Les aquabirnavirus sont répartis en 2 sérogroupes basés sur des tests de cross-neutralisation : le séro groupe A (A1-A9) regroupe la plupart des isolats associés avec la maladie, le séro groupe B inclus exclusivement les sérotypes B1 (Hill & Way, 1995). Un classement phylogénique plus récent, basé sur le gène VP2 permet de réduire les 9 sérotypes de séro groupe A en 6 génogroupes (Blake and all, 2001). En Europe, on retrouve majoritairement les génogroupes 2 et 5.

La méthode de diagnostic de référence a longtemps été la culture virale suivie d'une seroneutralisation ou RT-PCR. Cette méthode nécessite 2 semaines pour certifier la non détection du virus dans la culture. L'utilisation de la RT-qPCR permet de connaître le statut d'un élevage plus rapidement sans passer par la culture virale.

3. Description et principe du test

Ce test repose dans un premier temps sur la transcription inverse (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-qPCR).

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

Le kit ADIAVET™ IPNV REAL TIME peut détecter simultanément

- Le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (sonde marquée en FAM)
- Un contrôle exogène « Extraction Positive Control » (EPC-Ext) qui, ajouté au moment de l'extraction, permet de valider le bon déroulement de cette étape ainsi que de la réaction PCR (sonde marquée avec un fluorophore lu dans le même spectre que HEX et VIC).

ADIAGENE a validé ce test avec différents kits de purification d'ARN (Bio-X Diagnostics, Qiagen et Macherey-Nagel). D'autres kits de purification peuvent être utilisés s'ils sont validés par l'utilisateur.

Types de prélèvements et options d'analyses correspondantes :

Prélèvement	Analyse individuelle	Analyse en mélange*
Pool organes rate, rein, cœur ou encéphale	Oui	Oui, jusqu'à 10 poissons
Semences, œufs, liquide coelomique	Oui	Non
Surnageant de culture	Oui	Non

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

II. Matériels et réactifs

1. Réactifs fournis dans le kit

REF	ADI641-100	
A5	Solution d'amplification	2 x 500 µl tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
IPNV CTL+	Contrôle positif IPNV d'amplification	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)
NF-Water	Eau Nuclease free	1 x 1000 µl tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

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. « IPNV CTL+ »

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

Ajouter **200 µl** « NF-Water » au « IPNV CTL+ » et mélanger en vortexant au moins 20 secondes.

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

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

B. « EPC-Ext »

L'EPC-Ext est un témoin d'extraction non cible. Il permet de contrôler les étapes d'extraction, de purification et d'amplification.

Lors de la première utilisation, aliquoter la solution selon la taille des séries d'extraction et conserver à **<-15°C**.

Pour chaque extraction, ajouter 5 µl « EPC-Ext » par échantillon.

Cet EPC-ext non cible est le même que celui fourni dans les kits ADIAVET™ IHNV REAL TIME (ADI571-100) et ADIAVET™ VHSV REAL TIME (ADI581-100).

4. Matériels nécessaires non fournis dans le kit

Attention : le consommable utilisé doit être Nucléase-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 50 ml, plaque 96
- Vibrobroyeur à billes (Mixer Mill, Fast Prep ou Rybolyser)
- Vortex
- 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, 15 ou 30 ml
- Gants latex ou nitrile non poudrés
- Billes de tungstène ou inox 3-5 mm ou Tubes Fast Prep
- Lames de scalpel
- Ethanol 96-100%

- Eau Nucléase-free
- Tampon PBS 1X pH 7,4 (composition recommandée, NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, KH₂PO₄ 1,7mM, sans Ca²⁺, sans Mg²⁺ - une composition différente peut être utilisée après validation par l'utilisateur)

- Kit d'extraction d'ARN/ADN :

- Kit d'extraction d'ARN en colonne individuelle

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

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

- ADIAMAG (Bio-X Diagnostics ; 200 extractions : réf. NADI003) ou ADIAMAG XL (Bio-X Diagnostics ; 800 extractions : réf. NADI003-XL).

- Kits complémentaires disponibles pour l'adoption de méthode et de PCR (AFNOR NF U47-600) :

- ADIAVET[™] IPNV Extraction Positive Control (Réf. : ADI641-8). Matériel de référence fournisseur pour adoption de méthode pouvant également être utilisé comme sentinelle.
- ADIAVET[™] LDpccr Positive Control – IPNV (réf. : ADI641-LD). Confirmation des performances – LDpccr du kit ADIAVET[™] IPNV REAL TIME.

III. 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 et 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. Pour une conservation de longue durée, il est recommandé de conserver les ARN acides nucléiques extraits à une température <-65°C.

3. Préparation des prélèvements

A. Pool d'organes, semences ou oeufs

Homogénéiser, par stomacher, mélangeur ou mortier et pilon avec du sable stérile, re-suspendre dans le milieu de transport d'origine avec un ratio de 10% poids/volume, centrifuger 15 minutes à 4000 g.

ou

Broyer¹ ou ² 0,1 g d'échantillon avec 1 ml de tampon PBS 1X.

¹ Par exemple : avec un vibrobroyeur à billes type Mixer Mill : ajouter une bille de tungstène (3 mm), broyer 2 minutes à 30 Hz puis centrifuger 6 000 g/2 minutes.

² Par exemple : avec un vibrobroyeur à billes type Fast Prep : dans un tube Lysing Matrix D, broyer 2 fois 20 secondes à 6m/sec avec une pause de 5 minutes sur glace entre les 2 broyages, puis centrifuger 5 000 g/3 minutes.

Cf. § IV pour l'extraction et la purification des ARN.

B. Liquide coelomique

100 ou 140 µl de liquide coelomique sont prélevés selon la méthode d'extraction choisie.

Cf. § IV pour l'extraction et la purification des ARN.

C. Surnageant de culture virale

Les cultures virales sont extraites après centrifugation 15 minutes entre 2000 et 4000 g.

Cf. § IV pour l'extraction et la purification des ARN.

4. Préparation des témoins

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

L'EPC-Ext non cible, ajouté au moment de l'extraction, permet de valider le bon déroulement de cette étape ainsi que de vérifier l'amplification pour chaque échantillon. Le témoin « IPNV 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 :

A. 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.

B. Témoin positif « cible » d'extraction (recommandé)

Un témoin positif « cible » peut être introduit par série d'extraction. Il s'agit d'un échantillon contenant le virus IPNV. Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou d'un prélèvement négatif dopé par des solutions de IPNV. 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.

ADIAGENE peut fournir un témoin positif cible d'extraction constitué d'une culture virale inactivée et lyophilisée, calibrée entre 1 et 100xLD méthode. (ADIAVET™ IPNV Extraction Positive Control, réf. : ADI641-8).

Ce témoin, ajouté à une matrice négative peut être utilisé comme **sentinelle** ou comme **NED fournisseur pour adopter la méthode.**

IV. Extractions et purifications des ARN

1. Kit QIAamp® Viral RNA

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.
Préchauffer le tampon AVL + carrier à 56°C avant utilisation.

	Tissus, semences, œufs, culture virale	Liquide coelomique
Lyse	Placer 140 µl de surnageant préparé comme décrit précédemment dans un microtube.	Placer 140 µl dans un microtube.
	Ajouter 560 µl de tampon AVL + carrier + 5 µl EPC-Ext* Homogénéiser ~15 secondes et incubé 10 minutes à température ambiante.	
Préparation de la fixation	Ajouter 560 µl d' éthanol 100% . Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes).	
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer 630 µl de mélange sur la colonne correspondante. Centrifuger 1 minute à 10 000 g. Déposer du reste du mélange et centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
1 ^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW1 Centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
2 ^{ème} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW2 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
Séchage de la colonne	Changer le tube collecteur. Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.	
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 60 µl d' 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 <-65°C.	

** Il est possible de préparer extemporainement n x (560 µl AVL+carrier + 5 µl EPC-ext) puis d'ajouter 565 µl à chaque échantillon*

2. Kit NucleoSpin® RNA Virus

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.
Préchauffer le tampon RAV1 + carrier à 56°C avant utilisation.

	Tissus, semences, œufs, culture virale	Liquide coelomique
Lyse	Placer 140 µl de surnageant préparé comme décrit précédemment dans un microtube.	Placer 140 µl dans un microtube.
	Ajouter 560 µl de tampon RAV1 + carrier + 5 µl EPC-Ext* Homogénéiser ~15 secondes et incubé 10 minutes à température ambiante.	
Préparation de la fixation	Ajouter 560 µl d' éthanol 100% . Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes).	
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer 630 µl de mélange sur la colonne correspondante. Centrifuger 1 minute à 10 000 g. Déposer du reste du mélange et centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
1 ^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RAW . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
2 ^{ème} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RAV3 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
Séchage de la colonne	Changer le tube collecteur. Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.	
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 60 µl d' eau Nuclease-free . Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate ou à <-65°C.	

** Il est possible de préparer extemporainement n x (560 µl RAV1+carrier + 5 µl EPC-ext) puis d'ajouter 565 µl à chaque échantillon*

3. Kits ADIAMAG - Billes magnétiques ARN/ADN

Se référer à la version de notice NFKF disponible sur le site web indiqué sur le certificat d'analyse inclus dans le kit utilisé.

V. 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 (« IPNV CTL+ ») et le témoin réactif d'amplification (NTC ou No Template Control).

b - **Dénaturation des ARNs viraux (double brins) :**

L'étape de dénaturation est obligatoire et doit être réalisée extemporanément avant amplification.

Pour chaque échantillon, incluant les témoins d'extraction ainsi que pour le témoin positif d'amplification (« IPNV CTL+ »), placer un aliquot d'ARN dans un tube de 0.2 ml ou dans une plaque PCR. Centrifuger les microtubes (ou la plaque PCR).

Chauffer les microtubes (ou la plaque PCR) 3 minutes à +95°C, puis les placer immédiatement sur glace en fusion jusqu'à leur utilisation.

c - Décongeler le réactif « A5 » à température ambiante. Bien vortexer. Répartir **10 µl** dans chacun des tubes PCR ou des puits de la plaque PCR avec une pipette munie de pointes Nucléase-free.

d- **Replacer immédiatement le tube « A5 » à <-15°C et à l'obscurité.**

e- Pour chaque échantillon, le CTL+, le témoin négatif d'extraction (obligatoire) et le témoin positif d'extraction (recommandé), ajouter **5 µl** d'extrait purifié et dénaturé 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 sur glace, à +2/8°C ou <-65°C. Eliminer les bulles qui pourraient rester au fond des puits (centrifuger la plaque PCR).

f- Conserver la plaque sur glace en fusion ou à +2/8°C jusqu'à ce que le thermocycleur soit programmé et démarrer le run rapidement après la mise en place de la plaque ou des tubes dans le thermocycleur.

La cible IPNV est lue en FAM. Le contrôle interne est lu en HEX ou équivalent (VIC...). 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).

Les programmes suivants ont été développés pour les appareils **ABI Prism** (type 7500, QS5...) d'**Applied Biosystems** (cocher l'option « emulation 9600 » lorsqu'elle existe), pour les **MX3005P**, **AriaMx** d'**Agilent**, pour les **LightCycleur** de **Roche Diagnostics** et pour le **CFX96** de **Biorad** :

Programme standard	
10 min. 45°C	
10 min. 95°C	
15 sec 95°C*	45 cycles
1 min. 60°C	

* Mettre 30 secondes pour le MX3005P

Pour les appareils Applied ABI7500 et QS5, régler les quenchers sur « none ».

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.

VI. Interprétation des résultats

1. Définitions

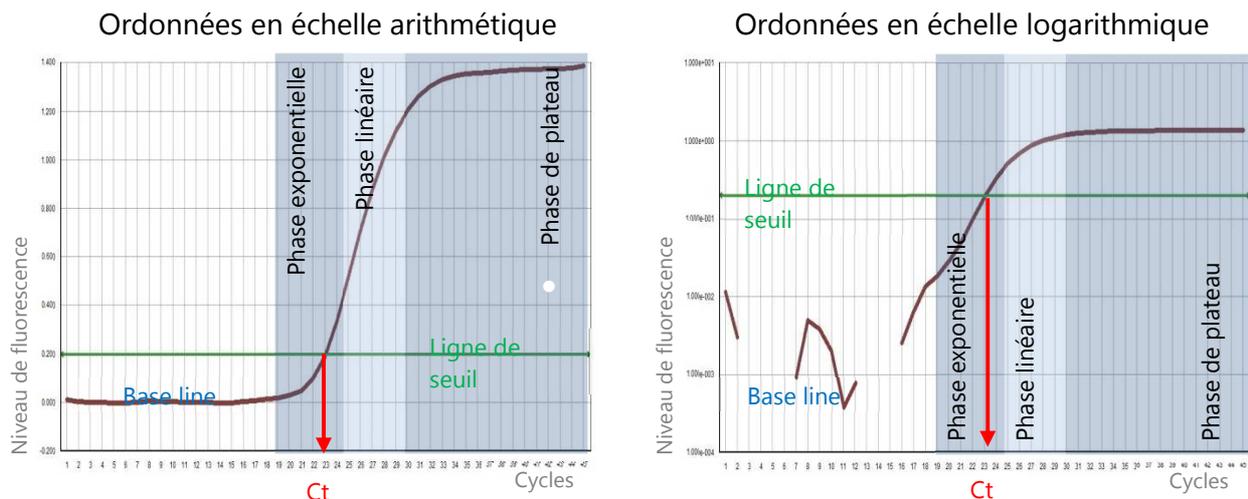
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

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

La « **ligne de seuil** » ou « **threshold line** » doit être placée au-dessus de la ligne de base, dans la phase exponentielle d'une courbe d'amplification caractéristique ou d'un ensemble de courbes d'amplification caractéristiques.

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

Exemple d'une courbe d'amplification caractéristique :



2. Validation et interprétation des résultats

Afficher l'ensemble des courbes de la plaque en FAM et positionner la ligne de seuil selon les indications ci-dessus. Procéder de la même façon pour les courbes en 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)	Témoin positif d'amplification (IPNV CTL+)	Témoin négatif d'extraction	Témoin positif d'extraction *
Amplification FAM	non	oui	non	oui
Amplification HEX	non	oui/non	oui	oui
Validation de	Absence de contamination pour l'amplification	Amplification de la cible IPNV	Absence de contamination pour l'extraction	Etapas d'extraction et d'amplification

* optionnel

Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM et HEX pour le témoin positif (« 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 IPNV (FAM) ou en contrôle interne (HEX).

Exemple	A	B	C
Amplification FAM	Non	Oui	Non
Amplification HEX	Oui	Oui/Non	Non
Résultat	Non détecté	Détecté	Non déterminé A refaire

L'échantillon est considéré comme **non détecté** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en HEX sans qu'il y ait de courbe d'amplification caractéristique en FAM (exemple A).

L'échantillon est considéré comme **détecté** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM (exemple B). Le Contrôle Interne peut être co-amplifié.

L'absence totale de courbe d'amplification caractéristique pour un échantillon (exemple C) 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.

VII. 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

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.



**ADIAGENE S.A.S.**
9, rue Gabriel Calloët-Kerbrat
22440 Ploufragan - France

RCS 417 876 299
Tel. +33 (0)2 96 68 40 20
www.biox.com