



ADIAVET™ PRV REAL TIME
TEST POUR LA DETECTION DU PSEUDORABIES VIRUS
(Maladie d'Aujeszky)
PAR AMPLIFICATION ENZYMATIQUE DE GENE EN TEMPS REEL (PCR TEST)

Référence :
ADI072-100 (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™ PRV REAL TIME

I.	HISTORIQUE DES REVISIONS	2
II.	INFORMATIONS GENERALES	3
1.	But de l'essai	3
2.	Pathogène	3
3.	Description et principe du test	3
III.	MATERIEL ET REACTIFS	4
1.	Réactifs fournis dans le kit	4
2.	Validité et conservation	4
3.	Utilisation des contrôles	4
A.	Utilisation du « PRV CTL+ »	4
B.	Utilisation de l' « EPC-Ext »	4
4.	Matériel nécessaire mais non fourni	4
IV.	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS	5
1.	Précautions	5
2.	Conservation des échantillons et des extraits d'ADN	5
3.	Témoins à inclure	5
V.	EXTRACTION ET PURIFICATION	6
1.	Avec le QIAamp® DNA mini kit	6
2.	Avec le NucleoSpin® Tissue kit	7
VI.	AMPLIFICATION	8
VII.	INTERPRETATION DES RESULTATS	9
1.	Définitions	9
2.	Validation et interprétation des résultats	9
A.	Validation de l'essai	9
B.	Interprétation des résultats	10
VIII.	INDEX DES SYMBOLES	11

I. Historique des révisions

N/A	Non Applicable (première publication)
Correction	Correction des anomalies du document
Modification technique	Addition, révision et/ou suppression d'information liée au produit
Administratif	Modifications non techniques notables pour l'utilisateur

NB : toute modification mineure, typographique, grammaticale et de mise en page ne figurent pas dans l'historique des révisions.

Date d'édition	Référence	Type de révision	Révision apportée
2012/05	NF072-05	N/A	Première publication
2015/12	NF072-06	Modification technique	Ajout du tableau des pictogrammes, en page 11.
2015/12	NF072-06	Modification technique	Suppression de la référence ADI072-50 (50 réactions)
2016/07	NF072-07	Administratif	Modification des logos
2016/07	NF072-07	Administratif	Ajout des exigences légales Biosearch
2016/07	NF072-07	Administratif	Ajout tableau « types de prélèvements » §I.3

II. Informations générales

1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ PRV REAL TIME permet de détecter le Pseudorabies Virus (PRV), également appelé Virus de la Maladie d'Aujeszky, par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir d'écouvillon nasal, de prélèvements de tissu et d'encéphale de chien, de cochon et de sanglier.

2. Pathogène

Le Pseudorabies virus est l'agent responsable de la maladie d'Aujeszky. Ce virus à ADN double brin, appartenant à la famille des *Herpesviridae* (sous-famille *Alphaherpesvirinae*), a pour hôte principal le porc. Il peut également affecter de manière plus occasionnelle d'autres mammifères, tels que les bovins, les petits ruminants, les carnivores et les rongeurs. En revanche, il n'est pas pathogène pour l'homme.

PRV affecte le système nerveux central ainsi que les organes du système respiratoire. Chez le porc, la maladie d'Aujeszky se manifeste sous trois formes selon l'âge de l'animal : une forme nerveuse, une forme respiratoire et une forme génitale. Chez les autres mammifères, elle se traduit par une infection du système nerveux central conduisant très rapidement à la mort de l'animal.

Le diagnostic de la maladie d'Aujeszky peut être établi par la détection du virus (par culture ou par PCR) à partir des amygdales, des ganglions lymphatiques, des poumons, de l'encéphale, de la moelle épinière, d'écouvillons nasaux. Un test sérologique peut également être mis en œuvre pour la mise en évidence d'anticorps.

3. Description et principe du test

Ce test repose sur l'amplification enzymatique de gène ou technique PCR.

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

Le kit ADIAVET™ PRV REAL TIME permet de détecter simultanément :

- PRV (sonde marquée en FAM),
- un contrôle exogène « 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 de même spectre que VIC ou HEX).

Adiagène a validé ce test avec différents kits de purification d'ADN (MACHEREY-NAGEL et QIAGEN). 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
Ecouvillon nasal	<input checked="" type="checkbox"/>
Tissu (amygdale, ganglion, poumon...)	<input checked="" type="checkbox"/>
Encéphale	<input checked="" type="checkbox"/>

III. Matériel et réactifs

1. Réactifs fournis dans le kit

Désignation	Réactif	ADI072-100
A5	Solution d'amplification	2 x 1000 µl tubes verts
PRV CTL+	Contrôle positif <i>Pseudorabies Virus</i>	1 tube violet
EPC-Ext	Contrôle exogène non cible d'extraction	2 x 300 µl tubes jaunes

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 des contrôles

A. Utilisation du « PRV CTL+ »

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

Ajouter **200 µl** d'eau Nuclease-free au « PRV 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 « PRV CTL+ » dans un des puits.

B. Utilisation de l'« EPC-Ext »

L'EPC-Ext suivra l'ensemble du processus d'extraction.

Aliquoter et conserver cette solution à <-15°C (au-delà de 3 décongélations, « EPC-Ext » peut se dégrader ; aliquoter par 50 µl).

Pour chaque extraction, nous recommandons d'ajouter 5 µl de témoin « EPC-Ext » dans chaque échantillon.

4. Matériel nécessaire mais non fourni

Attention : le consommable utilisé doit être Nuclease-free ou autoclavé deux fois 25 minutes à +120°C ou une fois 60 minutes à +121°C.

- Un thermocycleur avec son consommable pour PCR Temps réel : tubes PCR de 0,2 ml ou plaques PCR 96 puits fermés de qualité optique
- Une centrifugeuse pour microtubes
- Microtubes Nuclease-free de 1,5 ml et 2 ml
- Un bain-marie ou bloc chauffant
- Ethanol 96-100 %
- Eau physiologique stérile (NaCl 8,5g/l)
- Gants latex non poudrés
- Appareil d'homogénéisation pour tubes
- Pipettes de 1-10 µl, 20 - 200 µl et 200 - 1000 µl
- Embouts Nuclease-free avec filtres pour micropipettes
- Billes de métal 3 mm (Qiagen réf. 69997)
- Vibrobroyeur à billes
- Lames de scalpel

- Kit d'extraction d'ADN en colonne individuelle

- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, 50 tests : réf. 51304 ou 250 tests : réf. 51306)

- NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, 50 tests : réf.740952.50 ou 250 tests : réf. 740952.250)

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'ADN des sociétés 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 (25 minutes à +120°C) et de changer de tube d'eau lors de chaque manipulation afin d'éviter toute contamination.

Nous vous recommandons de prévoir plusieurs témoins négatifs d'extraction (= extraction sans échantillon) par série d'extractions.

Un échantillon positif en PRV (culture ou échantillons terrain) peut être inclus et extrait dans chaque série, il sera considéré comme un témoin positif d'extraction.

2. Conservation des échantillons et des extraits d'ADN

Les tissus et les écouvillons nasaux 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 ADN extraits sont des molécules sensibles. Les extraits d'ADN peuvent être stockés dès la fin de l'extraction à +2/8°C pendant 24 heures, puis doivent être conservés à <-15°C.

3. Témoins à inclure

L'emploi de témoins permet de contrôler la fiabilité des résultats.

Les témoins sont à inclure par série d'analyse. Une série est définie comme un ensemble d'échantillons pour lesquels chaque étape a été réalisée dans les mêmes conditions.

L'ensemble des étapes du processus analytique (extraction+amplification), quelques soient les matrices, est validé grâce à la combinaison des témoins inclus dans le kit

- L'ajout de l'EPC-Ext à chaque échantillon permet de vérifier l'extraction et l'amplification de chaque échantillon.
- Le témoin « PRV CTL+ » (ou le Témoin positif « cible » d'extraction) permet de valider l'amplification de la cible.

D'autres témoins doivent ou peuvent être ajoutés.

- **au moins 1 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, ce témoin pourra être réalisé avec une matrice négative, 200 µl de tampon de dilution par exemple de l'eau physiologique.

- **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 Pseudorabies Virus. Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou d'un prélèvement négatif dopé par une solution de Pseudorabies Virus. Ce témoin positif cible (parfois nommé sentinelle) devra être proche de la LD_{METHODE}. Il 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 QIAamp® DNA mini kit

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.
Avant le début de l'extraction, allumer un ou deux systèmes chauffants aux températures indiquées ci-après.

	Tissus/encéphale		Ecouvillons nasaux
	Sans broyage	Avec broyage	
Préparation de l'échantillon	Placer 20-30 mg de tissu lacéré dans un microtube.	Placer 0,1 g de tissu lacéré dans un microtube de 2 ml.	Ajouter 2 ml de d'eau physiologique stérile ou de milieu MEM directement dans le tube de transport de l'écouvillon.
Lyse	Ajouter 180 µl de tampon ATL, 20 µl de protéinase K et 5 µl d'EPC-Ext. Homogénéiser. Incuber 30 minutes à +70°C (ou une nuit à 56°C).	Ajouter 1 bille de tungsten . Ajouter 1 ml d'eau physiologique stérile ou de milieu MEM. Broyer 2 fois 3 minutes à 30 Hz avec un intervalle (par exemple d'1 minute) entre les 2 broyages . Centrifuger 2 minutes à 6 000 g.	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. (*)
	Ajouter 200 µl de tampon AL. Incuber 10 minutes à +70°C .	Transférer 200 µl de surnageant. Ajouter 180 µl de tampon AL, 20 µl de protéinase K et 5 µl d'EPC-Ext. Homogénéiser. Incuber 10 minutes à +70°C . Centrifuger 1 minute à 10 000 g (<i>facultatif pour les écouvillons nasaux</i>). Transférer le surnageant dans un nouveau microtube.	
Préparation de la fixation	Ajouter 210 µl d'éthanol 100%. Homogénéiser le mélange 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 la totalité du mélange sur la colonne correspondante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
Lavage au tampon AW1	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW1. Centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
Lavage au tampon AW2	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW2. Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.		
Séchage de la colonne	Changer le tube collecteur. Centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 200 µl de tampon AE. Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver les à +2/8°C si l'analyse est réalisée dans les 24h, ou à < -15°C .		

(*) En fin d'extraction, conserver à -70°C +/-10°C en vue d'une nouvelle analyse ou d'un isolement viral.

2. Avec le NucleoSpin® Tissue kit

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.
Avant le début de l'extraction, allumer un ou deux systèmes chauffants aux températures indiquées ci-après.

	Tissus/encéphale		Ecouvillons nasaux
	Sans broyage	Avec broyage	
Préparation de l'échantillon	Placer 20-30 mg de tissu lacéré dans un microtube.	Placer 0,1 g de tissu lacéré dans un microtube de 2 ml.	Ajouter 2 ml de d'eau physiologique stérile ou de milieu MEM directement dans le tube de transport de l'écouvillon.
Lyse	Ajouter 180 µl de tampon T1, 25 µl de protéinase K et 5 µl d'EPC-Ext. Homogénéiser. Incuber 30 minutes à +70°C (ou une nuit à +56°C).	Ajouter 1 bille de tungsten . Ajouter 1 ml d'eau physiologique stérile ou de milieu MEM. Broyer 2 fois 3 minutes à 30 Hz avec un intervalle (par exemple d'1 minute) entre les 2 broyages . Centrifuger 2 minutes à 6 000 g.	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. (*)
	Ajouter 200 µl de tampon B3. Incuber 10 minutes à +70°C .	Transférer 200 µl de surnageant. Ajouter 180 µl de tampon B3, 25 µl de protéinase K et 5 µl d'EPC-Ext. Homogénéiser. Incuber 10 minutes à +70°C . Centrifuger 1 minute à 10 000 g (<i>facultatif pour les écouvillons nasaux</i>). Transférer le surnageant dans un nouveau microtube.	
Préparation de la fixation	Ajouter 210 µl d'éthanol 100%. Homogénéiser le mélange 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 la totalité du mélange sur la colonne correspondante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
Lavage au tampon AW1	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon BW. Centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
Lavage au tampon AW2	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon B5. Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.		
Séchage de la colonne	Changer le tube collecteur. Centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 200 µl de tampon BE. Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver les à +2/8°C si l'analyse est réalisée dans les 24h, ou à <-15°C .		

(*) En fin d'extraction, conserver à **-70°C +/-10°C** en vue d'une nouvelle analyse ou d'un isolement viral.

VI. Amplification

a- Déterminer le nombre de tubes PCR nécessaires pour vos échantillons. Il est recommandé d'ajouter en plus du témoin négatif d'extraction, un témoin positif (« CTL+ ») et un témoin réactif (sans échantillon : 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 nucléase-free.

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

d- Pour chaque échantillon, ajouter **5 µl** d'extrait d'ADN purifié aux **20 µl** de réactif « A5 ».

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

Remplacer immédiatement les extraits d'ADN purifiés à +2/8°C à <-15°C. Éliminer les bulles qui pourraient rester au fond des puits.

e- Dès que tous les tubes ont été préparés, réaliser l'amplification par PCR Temps-réel.

Démarrer le run rapidement après la mise en place de la plaque ou des tubes dans le cycleur.

La cible Pseudorabies virus est lue en FAM et l' « EPC-Ext » 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** :

2 minutes à 50°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** :

2 minutes à 50°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. Interprétation des résultats

1. Définitions

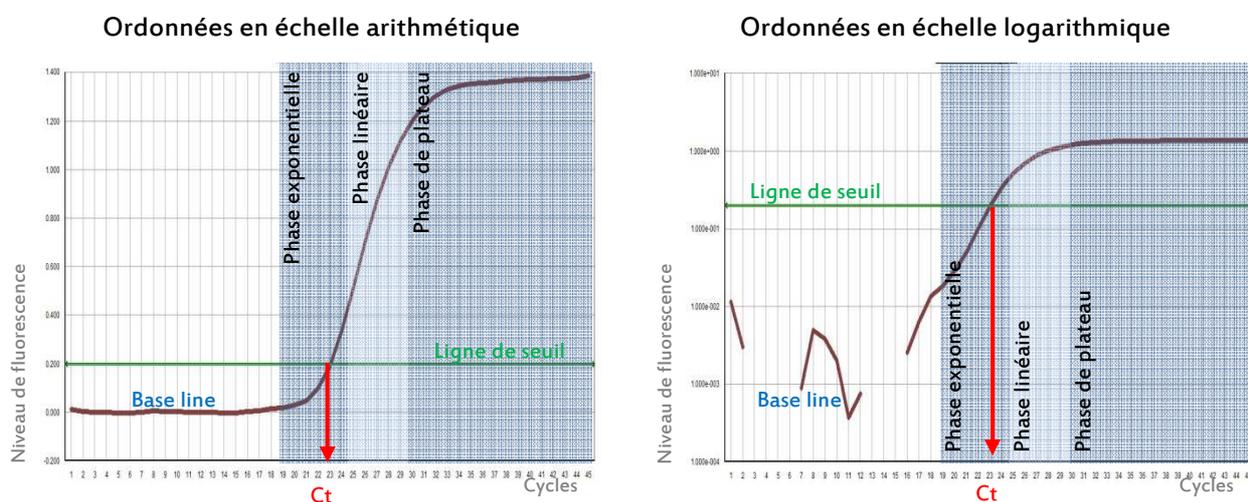
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

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 VIC ou HEX.

A. Validation de l'essai

L'extraction l'ADN et l'amplification sont considérées comme **valides** si les résultats suivants sont obtenus avec les témoins.

Témoins	PRV CTL+	Témoin réactif (NTC)	Témoin négatif d'extraction *	Témoin positif d'extraction *
Amplification VIC/HEX	Oui	Non	Oui	Oui
Amplification FAM	Oui	Non	Non	Oui
Validation de l'	Amplification de la cible PRV et de l'EPC	Absence de contamination pour l'amplification	Absence de contamination pour l'extraction	Etapes d'extraction et de l'amplification

* optionnel

Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM et VIC/HEX pour le témoin positif (« CTL+») sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

B. Interprétation des résultats

L'extraction de l'ADN et l'amplification sont considérées comme **valides** pour chacun des échantillons si au moins une courbe d'amplification caractéristique est observée en cible PRV (FAM) ou en contrôle interne (VIC/HEX).

Exemple	A	B	C
Amplification FAM	Non	Oui	Non
Amplification VIC/HEX	Oui	Oui/Non	Non
Echantillon considéré	Négatif	Positif	Non déterminé A refaire

L'échantillon est considéré comme **négatif** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en VIC/HEX sans qu'il y ait d'amplification 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.

L'absence totale de courbe d'amplification caractéristique pour un échantillon (exemple C) indique une déficience de l'extraction de l'ADN (perte ou destruction de l'ADN) ou une 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'ADN 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'ADN 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