



## ADIAVET™ PRRSV REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION DU VIRUS DU SYNDROME DYSGENESIQUE ET  
RESPIRATOIRE PORCIN PAR AMPLIFICATION ENZYMATIQUE EN TEMPS REEL  
(TEST RT-PCR)

**Références :**

ADI133-50 (50 réactions)  
ADI133-100 (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™ PRRSV REAL TIME

<b>I.</b>	<b>HISTORIQUE DES REVISIONS .....</b>	<b>3</b>
<b>II.</b>	<b>INFORMATIONS GENERALES .....</b>	<b>4</b>
1.	But de l'essai .....	4
2.	Pathogène.....	4
3.	Description et principe du test.....	4
<b>III.</b>	<b>MATERIEL ET REACTIFS.....</b>	<b>6</b>
1.	Réactifs fournis dans le kit.....	6
2.	Validité et conservation.....	6
3.	Utilisation du « PRRSV CTL+ » .....	6
4.	Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit.....	6
<b>IV.</b>	<b>TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS.....</b>	<b>8</b>
1.	Précautions.....	8
2.	Conservation des échantillons et des extraits d'ARN .....	8
3.	Préparation des prélèvements .....	8
4.	Témoins à inclure .....	8
<b>V.</b>	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION.....</b>	<b>10</b>
1.	Avec le Kit QIAamp® Viral RNA.....	10
A.	<i>Préparation des échantillons.....</i>	<i>10</i>
B.	<i>Extraction et purification des ARN .....</i>	<i>11</i>
2.	Avec le Kit RNeasy® .....	12
A.	<i>Préparation des échantillons.....</i>	<i>12</i>
B.	<i>Extraction et purification des ARN .....</i>	<i>13</i>
3.	Avec le Kit NucleoSpin® RNA Virus .....	14
A.	<i>Préparation des échantillons.....</i>	<i>14</i>
B.	<i>Extraction et purification des ARN .....</i>	<i>15</i>
4.	Avec le Kit NucleoSpin® RNA.....	16
5.	Avec le Kit ADIAMAG .....	16
<b>VI.</b>	<b>AMPLIFICATION.....</b>	<b>17</b>
<b>VII.</b>	<b>INTERPRETATION DES RESULTATS.....</b>	<b>18</b>
1.	Définitions.....	18
2.	Validation et interprétation des résultats.....	18
A.	<i>Validation de l'essai.....</i>	<i>19</i>
B.	<i>Interprétation des résultats.....</i>	<i>19</i>
<b>VIII.</b>	<b>INDEX DES SYMBOLES.....</b>	<b>20</b>

## I. Historique des révisions

---

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

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

Date d'édition	Référence	Type de révision	Révision apportée
2014/12	NF133-04	Correction	Désignation NucleoSpin® RNA II remplacée par NucleoSpin® RNA par le fournisseur, en page 6, § III-4.
2014/12	NF133-04	Correction	Désignation RA2 remplacée par RAW2 par le fournisseur, en page 15, § V-4.
2014/12	NF133-04	Modification technique	Ajout du tableau des pictogrammes, en page 20.
2014/12	NF133-04	Modification technique	Suppression de la référence AD133-50 (50 réactions)
2016/07	NF133-05	Administratif	Modification des logos
2016/07	NF133-05	Administratif	Ajout des exigences légales Biosearch
2016/07	NF133-05	Administratif	Ajout tableau « Types de prélèvements » §I.3
2018/09	NF133-06	Administratif	Ajout de la référence ADI133-50 (50 réactions)
2020/01	NF133-07	Modification technique	Ajout d'un tube d'eau dans le kit

## II. Informations générales

---

### 1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ PRRSV REAL TIME permet de détecter le Virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (PRRSV) de types 1 et 2 par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir d'écouvillon de tissu, de prélèvements de tissu, de fluide oral, de sang total, de sérum et de semence de porc.

### 2. Pathogène

L'agent responsable du PRRSV est un petit virus enveloppé à acide ribonucléique, appartenant à la famille des Artéviridés.

Le virus se réplique dans les macrophages alvéolaires des poumons, les macrophages ou cellules dendritiques des amygdales, des noeuds lymphatiques, du thymus, de la rate, des plaques de Peyer, du foie, des reins, des glandes surrénales et du coeur. Deux symptômes prédominants : des troubles de la reproduction (avortements tardifs, allongement anormal de la durée de gestation, mortalité néonatale élevée, baisse de la fertilité) et des troubles respiratoires associés à de l'inappétence et de l'hyperthermie. En élevage, ce virus s'installe généralement pour plusieurs années.

Le problème du diagnostic clinique est qu'aucune lésion ou aucun signe n'est spécifique de PRRSV. Tous les signes sont caractéristiques mais non différentiels. La confirmation ne peut venir que du laboratoire.

Les techniques actuellement utilisées sont l'isolement viral (méthode fastidieuse), la sérologie ou la RT-PCR. Jusqu'à présent, le virus reste difficile à contrôler malgré la disponibilité de plusieurs vaccins. Cette difficulté est en partie liée aux différences génomiques et antigéniques des virus PRRSV.

Le virus a été identifié presque simultanément en Europe et aux Etats-Unis. Sur chacun de ces continents, les souches virales présentent des particularités génomiques et antigéniques qui ont conduit à distinguer deux génotypes : le génotype Européen (EU ou type 1) et le génotype Nord Américain (NA ou type 2). Depuis, chaque génotype a colonisé différentes zones géographiques, a évolué génétiquement et a donc acquis différentes caractéristiques génotypiques et phénotypiques. L'évolution du génotype Européen conduit à différencier les virus PRRSV en trois sous-types. Le sous-type 1 est lui-même sub-divisé en Clades. Une évolution similaire est observée pour les virus de type 2 qui sont divisés en dix lignages.

Le contrôle efficace du PRRSV nécessite de prendre en considération les différences génétiques et antigéniques du virus. Le virus doit dans un premier temps être détecté. Puis une caractérisation génétique des souches peut être réalisée, pour des campagnes de vaccination ou des surveillances épidémiologiques par exemple. La stratégie de caractérisation génétique des souches de virus PRRSV est basée sur l'analyse du polymorphisme de l'ORF5 et/ou ORF7 principalement par séquençage.

### 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™ PRRSV REAL TIME peut détecter simultanément

- Les virus PRRSV de type 1 et 2 (sonde marquée en FAM)
- La RNaseP, un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'un ADN endogène (sonde marquée avec un fluorochrome lu dans le même spectre que VIC et HEX).

ADIAGENE 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 :

<b>Prélèvement</b>	<b>Analyse individuelle</b>	<b>Analyse en mélange*, possible jusqu'à</b>
Ecouvillon de tissu (poumon)	<input checked="" type="checkbox"/>	3
Tissu (poumon)	<input checked="" type="checkbox"/>	3
Fluide oral	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Sang total	<input checked="" type="checkbox"/>	3
Sérum	<input checked="" type="checkbox"/>	3
Semence	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

\* Dépend de la situation épidémiologique et de la qualité de l'échantillon.

### III. Matériel et réactifs

---

#### 1. Réactifs fournis dans le kit

---

**REF ADI133-50**

A5 .....	solution d'amplification	1 x 1000 µl tube à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
PRRS CTL+ .....	contrôle positif Virus PRRSV de type 1 et 2	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 ADI133-100**

A5 .....	solution d'amplification	2 x 1000 µl tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
PRRS CTL+ .....	contrôle positif Virus PRRSV de type 1 et 2	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)

---

#### 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 du « PRRSV CTL+ »

Ajouter **200 µl** "NF-Water" au « PRRSV CTL+ » fourni dans le kit. Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex, au moins 20 secondes. Aliquoter cette solution par 6 ou 12 µl et conserver à **<-15°C**.

Pour chaque analyse, nous recommandons d'utiliser 5 µl de « PRRSV CTL+ » dans un puits.

#### 4. Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit

**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 et tubes de 15 ml
  - Vibrobroyeur à billes
  - Etuve, bain-marie ou bloc chauffant
  - Appareil d'homogénéisation pour tubes
  - Pipettes de 1 - 10 µl, 20 - 200 µl et 200 - 1000 µl
  - Embouts Nuclease-free avec filtres pour micropipettes
  - Microtubes Nuclease-free de 1,5 ml et 2 ml
  - Tubes stériles de 15 ml
  - Gants latex ou nitrile non poudrés
  - Billes de métal (tungstène ou inox) 3 mm
  - Lames de scalpel
  - Ethanol 96-100%
  - Eau déminéralisée stérile
  - Eau physiologique stérile (NaCl 8,5g/l)
  - Tampon PBS
  - β-mercaptoéthanol 14,5 M
-

**- Matériel nécessaire selon le protocole d'extraction**

			Tissu	Ecouvillon	Sang	Sérum	Semence	Fluide oraux
			Taille maximale des pools					
Références kit d'extraction		Références supplémentaires	3	3	3	3	0	0
<b>RNeasy®</b>	<u>Qiagen</u> , 50 extractions : réf. 74104 ou 250 extractions : réf. 74106	- <u>Tampon EL</u> : Qiagen : réf. 79217 (pour les sangs sur anti-coagulant)	+	+	+			
<b>QIAamp® Viral RNA</b>	<u>Qiagen</u> , 50 extractions : réf. 52904 ou 250 extractions : réf. 52906		+	+		+	+	+
<b>NucleoSpin® RNA</b>	<u>Macherey-Nagel</u> , 50 extractions : réf. 740955.50 ou 250 extractions : réf. 740955.250		+	+				
<b>NucleoSpin® RNA Virus</b>	<u>Macherey-Nagel</u> , 50 extractions : réf. 740956.50 ou 250 extractions : réf. 740956.250		+	+		+		+
<b>ADIAMAG</b>	<u>Bio-X Diagnostics</u> , 200 extractions : 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

ADIAGENE 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 et 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. Exception faite du sang avec anticoagulant qui ne doit pas être congelé.

Les ARN extraits sont des molécules sensibles. L'extraction est réalisée à température ambiante et doit donc être aussi rapide que possible pour éviter les dégradations. Les lysats peuvent être stockés dès la fin de l'extraction sur glace ou à +2/8°C pendant quelques heures, puis doivent être conservés à <-15°C.

### 3. Préparation des prélèvements

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

### 4. Témoins à inclure

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

Le contrôle interne endogène (RNaseP) naturellement présent dans les cellules de l'animal permet de vérifier l'extraction et l'amplification de chaque échantillon. Le témoin « PRRSV CTL+ » permet de valider l'amplification de la cible.

La combinaison de ces différents témoins permet la validation de l'ensemble des étapes du processus analytique (extraction+amplification), quelles que soient les matrices.

D'autres témoins doivent ou peuvent être ajoutés :

- **Témoin négatif d'extraction (obligatoire)**

Afin de s'assurer de l'absence d'inter-contamination, au moins un témoin négatif doit être intégré dans chaque série d'extraction (à titre d'exemple la norme NF U47 600 recommande un témoin négatif de processus analytique par centrifugation de 24 colonnes ou 4 témoins négatifs de processus analytique par plaque 96 puits). Ce témoin pourra être réalisé avec une matrice négative ou du tampon de dilution.

- **Témoin positif « cible » d'extraction (recommandé)**

Un témoin positif « cible » peut être introduit par série d'extraction. Il s'agit d'un échantillon contenant du virus PRRSV. 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 PRRSV. 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

#### A. Préparation des échantillons

##### a) A partir de tissu

Broyer\* **20 mg** de **tissu** ou n x 20 mg d'un pool de n tissus (3 maximum) dans **560 µl** de **tampon AVL + Carrier RNA**.

Centrifuger brièvement.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

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

##### b) A partir d'écouvillon de poumon

Ajouter **2 ml** d'**eau physiologique stérile** directement dans le tube de transport de l'**écouvillon**, homogénéiser.

*NB : possibilité de faire un pool (3 maximum). Transférer le surnageant obtenu dans le tube de transport de l'écouvillon suivant.*

Essorer chaque écouvillon pour récupérer le maximum de liquide.

Transférer le liquide obtenu dans un microtube de 2 ml.

Placer **140 µl** d'**échantillon** dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

##### c) A partir de sérum

Placer **140 µl** de **sérum** ou de pool de sérum (3 maximum) dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

##### d) A partir de semence

Placer **1 ml** de **semence** (pas de pools possibles) dans un microtube.

Centrifuger 2 minutes à 3 000 g à +4°C.

Placer **140 µl** de **surnageant** dans un microtube.

##### e) Fluides oraux

Placer **140 µl** de **fluides oraux** dans un microtube.

*NB : **optionnel** - un EPC-extraction peut être ajouté ; nous contacter pour plus d'information.*

Continuer en suivant le tableau ci-après.

## B. Extraction et purification des ARN

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante, sauf indication contraire.

	Tissu	Ecouvillon Sérum Semence Fluides oraux
Lyse	A partir du <b>broyat</b> obtenu comme décrit précédemment.	A partir des <b>140 µl</b> d'échantillon obtenus comme décrit précédemment.
		Ajouter <b>560 µl</b> de <b>tampon AVL + Carrier RNA</b> . Homogénéiser ~15 secondes. Incuber 10 minutes à température ambiante.
Préparation de la fixation	Ajouter <b>560 µl</b> d' <b>éthanol 100%</b> . 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 <b>630 µl</b> 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 <sup>er</sup> lavage	Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl</b> de <b>tampon AW1</b> . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
2 <sup>ème</sup> lavage	Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl</b> de <b>tampon AW2</b> . 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 <b>60 µl</b> de <b>tampon AVE</b> . 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.	

## 2. Avec le Kit RNeasy®

### A. Préparation des échantillons

#### a) A partir de tissu

Broyer\* **0,1 g** de **tissu** ou n x 0,1 g d'un pool de n tissus (3 maximum) dans **1 ml d'eau physiologique**.

Centrifuger 2 minutes à 830 g.

Transfert **140 µl** de **surnageant** dans un microtube

Continuer en suivant le tableau ci-après.

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

#### b) A partir d'écouvillon

Placer un **écouvillon** ou un pool d'écouvillons (3 maximum) dans un microtube de 2 ml.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

#### c) A partir de sang

Placer **500 µl** de **sang** ou 500 µl d'un pool de sangs (3 maximum) dans un tube de 15 ml.

Ajouter **2,5 ml** de **tampon EL**, homogénéiser.

Incuber sur glace pendant 15 minutes (homogénéiser 2 fois pendant cette étape de lyse des hématies).

Centrifuger 10 minutes à 1 000 g à + 4°C.

Éliminer le surnageant.

Ajouter **2 ml** de **tampon EL** au culot et homogénéiser pour le remettre en suspension.

Centrifuger 10 minutes à 1 000 g à + 4°C.

Éliminer le surnageant.

*NB : Le culot cellulaire peut être conservé à -70°C +/- 10°C pendant plusieurs mois.*

Continuer en suivant le tableau ci-après.

## B. Extraction et purification des ARN

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante, sauf indication contraire.

	Sang	Écouvillon	Tissu
<b>Lyse</b>	Suspendre le culot cellulaire avec <b>300 µl</b> de <b>tampon RLT + β-mercaptoéthanol</b> à 10 µl/ml.	Ajouter <b>300 µl</b> de <b>tampon RLT + β-mercaptoéthanol</b> à 10 µl/ml. Agiter. Essorer chaque écouvillon pour récupérer le maximum de liquide et éliminer l'écouvillon.	Ajouter <b>300 µl</b> de <b>tampon RLT + β-mercaptoéthanol</b> à 10 µl/ml.  Incuber 15 minutes à température ambiante en homogénéisant de temps en temps.
<b>Préparation de la fixation</b>	Ajouter <b>300 µl</b> d' <b>éthanol 70%</b> . Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes).		
<b>Transfert sur colonnes et fixation à la membrane</b>	Identifier les colonnes, déposer <b>la totalité</b> du mélange sur la colonne correspondante. Centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
<b>1<sup>er</sup> lavage</b>	Changer le tube collecteur et ajouter <b>700 µl</b> de <b>tampon RW1</b> . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
<b>2<sup>ème</sup> lavage</b>	Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl</b> de <b>tampon RPE</b> . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
<b>Séchage de la colonne</b>	Changer le tube collecteur. Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.		
<b>Elution</b>	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer <b>60 µl</b> d' <b>eau Nuclease-free</b> . Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
<b>Conservation</b>	Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate ou à <-15°C.		

### 3. Avec le Kit NucleoSpin® RNA Virus

#### A. Préparation des échantillons

##### a) A partir de tissu

Broyer\* **20 mg** de **tissu** ou n x 20 mg d'un pool de n tissus (3 maximum) dans **560 µl** de **tampon RAV1 + Carrier** (préchauffé à +56°C).

Centrifuger brièvement.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

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

##### b) A partir d'écouvillon

Ajouter **2 ml** d'**eau physiologique stérile** directement dans le tube de transport de l'**écouvillon**, homogénéiser.

*NB : possibilité de faire un pool (3 maximum). Transférer le surnageant obtenu dans le tube de transport de l'écouvillon suivant.*

Essorer chaque écouvillon pour récupérer le maximum de liquide.

Transférer le liquide obtenu dans un microtube de 2 ml.

Placer **140 µl** d'**échantillon** dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

##### c) A partir de sérum

Placer **140 µl** de **sérum** ou de pool de sérum (3 maximum) dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

##### d) Fluides oraux

Placer **140 µl** de **fluides oraux** dans un microtube.

***NB : optionnel** - un EPC-extraction peut être ajouté ; nous contacter pour plus d'information.*

Continuer en suivant le tableau ci-après.

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

## B. Extraction et purification des ARN

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante, sauf indication contraire.

	Tissu	Ecouvillon Sérum Fluides oraux
Lyse	A partir du <b>broyat</b> obtenu comme décrit précédemment.	A partir des <b>140 µl</b> d'échantillon obtenu comme décrit précédemment.
		Ajouter <b>560 µl</b> de <b>tampon RAV1</b> + <b>Carrier</b> préchauffé à +56°C. Homogénéiser ~15 secondes. Incuber 10 minutes à température ambiante.
Préparation de la fixation	Ajouter <b>560 µl</b> 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 <b>630 µl</b> 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 <sup>er</sup> lavage	Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl</b> de <b>tampon RAW</b> . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
2 <sup>ème</sup> lavage	Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl</b> de <b>tampon RAV3</b> . 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 <b>60 µl</b> d'eau <b>Nuclease-free</b> . 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.	

#### 4. Avec le Kit NucleoSpin® RNA

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante, sauf indication contraire.

	Écouvillon	Tissu
<b>Lyse</b>	Placer un <b>écouvillon</b> ou un pool d'écouvillons (3 maximum) dans un microtube de 2 ml. Ajouter <b>300 µl</b> de <b>tampon RA1 + β-mercaptoéthanol</b> à 10 µl/ml. Homogénéiser. Essorer chaque écouvillon pour récupérer le maximum de liquide.	Broyer* <b>0,1 g</b> de <b>tissu</b> ou n x 0,1 g d'un pool de n tissus (3 maximum) dans <b>1 ml</b> d'eau physiologique. Centrifuger 2 minutes à 830 g. Transfert <b>140 µl</b> de <b>surnageant</b> dans un microtube. Ajouter <b>300 µl</b> de <b>tampon RA1 + β-mercaptoéthanol</b> . Incuber 15 minutes à température ambiante en homogénéisant de temps en temps.
<b>Préparation de la fixation</b>	Ajouter <b>300 µl</b> d' <b>éthanol 70%</b> . Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes).	
<b>Transfert sur colonnes et fixation à la membrane</b>	Identifier les colonnes, déposer <b>la totalité</b> du mélange sur la colonne correspondante. Centrifuger 1 minute à 11 000 g.	
<b>1<sup>er</sup> lavage</b>	Changer le tube collecteur et ajouter <b>350 µl</b> de <b>tampon MDB</b> . Centrifuger 1 minute à 11 000 g.	
<b>2<sup>ème</sup> lavage</b>	Changer le tube collecteur et ajouter <b>200 µl</b> de <b>tampon RAW2</b> . Centrifuger 1 minute à 11 000 g.	
<b>3<sup>ème</sup> lavage</b>	Changer le tube collecteur et ajouter <b>600 µl</b> de <b>tampon RA3</b> . Centrifuger 1 minute à 11 000 g.	
<b>4<sup>ème</sup> lavage</b>	Changer le tube collecteur et ajouter <b>250 µl</b> de <b>tampon RA3</b> . Centrifuger 5 minutes à 11 000 g.	
<b>Elution</b>	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer <b>60 µl</b> d' <b>eau Nuclease-free</b> . Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 11 000 g.	
<b>Conservation</b>	Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate ou à <-15°C.	

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

#### 5. 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, le témoin positif d'amplification (« CTL+ ») et le témoin réactif d'amplification (No template control ou 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 le témoin positif, ajouter **5 µl** de la solution (§ 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 sur glace ou à <-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 cycleur soit programmé et démarrer le run rapidement après la mise en place de la plaque ou des tubes dans le cycleur.

La cible PRRSV 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. Interprétation des résultats

### 1. Définitions

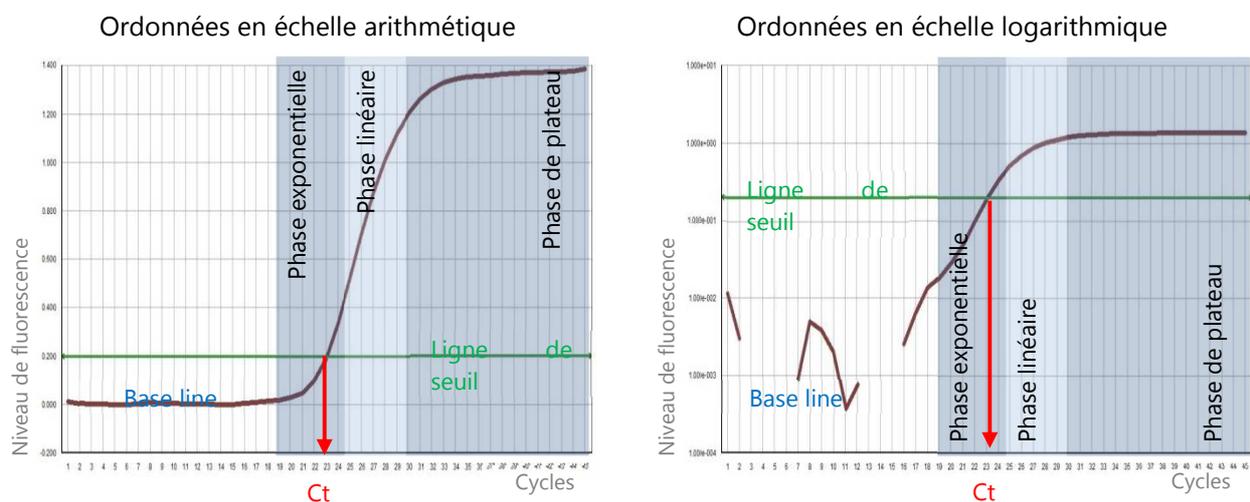
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

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'amplification est considérée comme valide si les résultats suivants ont été obtenus pour les témoins :

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

\* optionnel

Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM et VIC/HEX pour le témoin positif (« PRRSV 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 PRRSV (FAM) et/ou en contrôle interne (VIC/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/HEX sans qu'il y ait de courbe d'amplification caractéristique en FAM (exemple A).

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

L'absence totale de courbe d'amplification caractéristique pour un échantillon (exemple D) indique une déficience de l'extraction de l'ARN (perte ou destruction de l'ARN) ou une RT-PCR temps-réel défectueuse (présence d'inhibiteurs dans l'échantillon, erreur de programme ou absence d'échantillon). Dans ce cas, il est conseillé de refaire le test en utilisant l'extrait d'ARN pur et dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau Nuclease-free. Dans un second temps, si le test n'est toujours pas validé, une nouvelle extraction de l'ARN total de l'échantillon est souhaitable.

## VIII. Index des symboles

---

Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limite supérieure de température
	Utiliser jusqu'à
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour "n" tests
	Conserver à l'abri de la lumière
	Pour usage vétérinaire in vitro uniquement – Pour usage animal uniquement

Bio-X Diagnostics, les logos, ADIAGENE et ADIAVET™ sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à ADIAGENE et/ou Bio-X Diagnostics ou à l'une de ses filiales, ou à une de ses sociétés. Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document appartiennent à leurs propriétaires respectifs.



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

RCS 417 876 299  
Tél. +33 (0)2 96 68 40 20  
[www.biox.com](http://www.biox.com)