

Adia^X Vet

Notice d'utilisation
ADI352-BTVA_NO_(FR)_V01
02/2024

BTV REAL TIME

Références : ADI352-100 & ADI352-500

Test pour la détection du virus de la Fièvre Catarrhale Ovine (BTV) par amplification enzymatique de gène en temps réel
Test PCR – 100 & 500 réactions

Usage in vitro et strictement vétérinaire



Echantillon	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Sang	✓	✓
Organe (rate et tissus d'avortons)	✓	✓

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

Composition du kit

Matériel fourni		Kit ADI352-100	Kit ADI352-500
		100 réactions	500 réactions
A5	Solution d'amplification	2 x 1000 µL tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)	10 x 1000 µL tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
BTV CTL+	Contrôle positif Bluetongue Virus	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)	2 tubes à bouchon violet (A reconstituer)
NF-Water	Eau Nucléase Free	1 x 1000 µL tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)	1 x 1000 µL tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

Historique de révision

Date	Version	Modifications
01/2020	NF352-07	Ajout d'un tube NF Water dans le kit. Modification §III. 4. Matériel nécessaire mais non fourni par AdiaGène dans le kit.
02/2024	V01	Passage au format simplifié. Ajout matrice Organe (rate et tissu d'avortons).

Note : les modifications mineures concernant la typographie, la grammaire et la mise en forme ne sont pas incluses dans l'historique des révisions.

A. Introduction

La fièvre catarrhale du mouton (ou Bluetongue) est une maladie virale infectieuse non contagieuse due à un Orbivirus (famille Reoviridae, virus ARN) vectorisé par des arthropodes, essentiellement des mouches hématophages du genre Culicoides.

L'expression clinique est largement dépendante des conditions d'environnement (état nutritionnel, parasitisme et infections bactériennes concomitantes) et de la sensibilité individuelle. Il existe 26 sérotypes distincts induisant des protections croisées partielles ou nulles entre eux. La transmission par transfert d'embryons à partir de brebis gestantes a également été décrite. La transmission par injection de sang contaminé peut être possible lors de réutilisation d'aiguilles et de seringues.

Les prélèvements de choix pour la mise en évidence du virus sont le sang d'animaux fébriles prélevés sur anticoagulant (EDTA). La présence du virus est mise en évidence par isolement sur œufs embryonnés, culture cellulaire *in vitro*, immunofluorescence en monocouche cellulaire infectée ou par PCR.

B. Principe du test

Le test ADIAVET™ BTV REAL TIME repose sur la transcription réverse (RT) de l'ARN en ADN complémentaire. Cette réaction est suivie de l'amplification génique de fragments d'ADN spécifiques du virus de la Bluetongue. Il détecte simultanément en monocouple :

- Virus de la Bluetongue (sonde marquée en FAM)
- GAPDH : un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ADN endogène (sonde marquée en HEX ou équivalent).

Aucune réaction croisée n'a été observée avec les souches EHDV.

C. Conditions de stockage

A réception, le kit doit être stocké à <-15 °C jusqu'à la date de péremption du kit.

Il est recommandé d'aliqoter le réactif « A5 » si le nombre d'analyses à effectuer nécessite plus de trois décongelations.

Ne pas décongeler plus de 3 fois.

Stocker à l'abri de la lumière.

Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.

D. Matériel supplémentaire et réactifs requis non fournis

- Thermocycleur avec son consommable pour PCR Temps réel
- Appareil d'homogénéisation pour tubes
- Pipettes de 1 - 10 µL, 20 - 200 µL et 200 - 1000 µL
- Embouts Nucléase-free avec filtres pour micropipettes
- Microtubes Nucléase-free de 1,5 mL et 2 mL
- Gants latex ou nitrile non poudrés
- Eau Nucléase-free
- Kit d'extraction des acides nucléiques

Kits complémentaires pour Adoption de méthode et PCR (U47-600)

- **Extraction Positive Control BTV (Réf. : ADC35EPC).** Matériel de référence fournisseur utilisé comme sentinelle (Calibré entre 1 et 100xLD_{Méthode})
- **LDpcr Positive Control – BTV (Réf. : ADC35LD)** Confirmation des performances – LDpcr du kit.
- Pour la confirmation des performances LD_{Méthode}, un matériel de référence au Niveau Exigé de Détection (NED) est mis à disposition par le Laboratoire National de Référence (LNR).

E. Précautions d'utilisation et de sécurité

- Pour usage vétérinaire *in vitro* uniquement.
- Pour usage animal uniquement.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Lire l'ensemble du protocole avant de commencer et le respecter scrupuleusement.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption du kit.
- Ne pas utiliser les réactifs dont l'emballage est détérioré.
- Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.
- Ne pas ouvrir les tubes PCR après amplification.
- Éliminer le matériel utilisé en respectant la législation en vigueur en matière de protection de l'environnement et de gestion des déchets biologiques.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer ; ne pas inhaler).

F. Extraction des acides nucléiques

1. Kits d'extractions

Les acides nucléiques doivent être extraits à partir des échantillons avant d'utiliser le kit. Les kits d'extraction ADN/ARN listés ci-dessous sont recommandés et fournis par Bio-X Diagnostics :

Nom du produit	Technologie d'extraction	Nombre de tests et référence
ADIAMAG™	Billes magnétiques	200 tests : réf. NADI003 800 tests : réf. NADI003-XL

Pour l'extraction, se référer à la version de notice disponible sur le site web, indiqué sur le certificat d'analyse inclus dans le kit PCR utilisé.

Les protocoles d'extraction validés sont décrits dans le dossier de validation du kit. D'autres kits d'extraction peuvent être utilisés après validation par l'utilisateur.

Après extraction, les acides nucléiques extraits peuvent être conservés à +2/8°C avant utilisation. Pour une conservation plus longue, ils doivent être conservés à une température inférieure à -15 °C ou -65 °C.

2. Témoins

L'emploi de témoins permet de contrôler la fiabilité des résultats. Les témoins sont inclus par série d'analyse selon les recommandations définies par les normes en vigueur (Cf. AFNOR U47-600...).

Contrôles	Validation de	Mode opératoire
Témoin réactif (NTC)	Absence de contamination pour l'amplification	5 µL NF-Water dans un puits par série PCR
BTV CTL+	Amplification de la cible	5 µL CTL+ dans un puits par série PCR
Témoin négatif d'extraction	Absence de contamination pour l'extraction et l'amplification	1 extraction (eau ou tampon de lyse) par série d'extraction
Témoin positif d'extraction	Étapes d'extraction et d'amplification	1 extraction (Échantillon positif entre 1 et 100X LD _{Méthode}) par série d'extraction

G. Mode opératoire

1. Préparation du contrôle CTL+

Ajouter **200 µL** de « NF-Water » par tube.
Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex > 20 secondes jusqu'à dissolution complète du culot bleu.

Après reconstitution, aliquoter et stocker la solution à une température inférieure à -15 °C jusqu'à la date de péremption du kit. Ne pas décongeler plus de 3 fois.

Pour chaque analyse, utiliser **5 µL** du CTL+ dans un des puits dédiés (se reporter au § « Amplification », Etape 2).

2. Dénaturation des acides nucléiques

- Pour chaque échantillon extrait et chaque contrôle, transférer minimum 10 µL d'acides nucléiques dans un tube ou plaque-96 et stocker le reste à une température inférieure à -15 °C ou -65 °C.
- Incuber 3 minutes at +95 °C dans un thermocycleur ou bloc chauffant.
- Transférer immédiatement les tubes ou plaque-96 sur glace ou bloc réfrigérant jusqu'à son utilisation (évite la renaturation de l'ARN).
- Pour l'utilisation, se reporter au § « Amplification », Etape 2.

3. Amplification

Attention :

- Avant de commencer, décongeler les réactifs à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Homogénéiser tous les réactifs et échantillons avant utilisation.
- Remplacer les réactifs à une température inférieure à -15 °C, après distribution.

Étape 1 : Répartir **20 µL** de réactif d'amplification A5 dans chaque puits PCR.

Étape 2 : Distribuer **5 µL** d'acides nucléiques extraits dénaturés et **5 µL** de contrôles dénaturés dans chaque puits dédié. Utiliser le NF-Water pour le témoin réactif.

Étape 3 : Fermer les puits avec un film ou des barrettes adaptés.

Étape 4 : Démarrer l'analyse PCR.

Les programmes suivants ont été développés pour les appareils ABI Prism (type 7500, QuantStudio5, Step-one...) d'Applied Biosystems, pour les Mx3000 et Mx3005P, AriaMx d'Agilent, pour les LightCycler de Roche Diagnostics, pour le Rotor-Gene Q de Qiagen, pour le CFX96 et Chromo 4 de Biorad, pour le MIC de BioMolecular System.

Programme ARN standard		Programme ARN FAST	
10 min. 45 °C		10 min. 45 °C	
10 min. 95 °C		10 min. 95 °C	
15 sec. 95 °C**	40 cycles	5 sec. 95 °C	40 cycles
60 sec. 60 °C*		30 sec. 60 °C*	

**30 sec. 95°C pour MX3000 et MX3005P

*Lecture et paramètres pour l'acquisition de la fluorescence :

Fluorochrome	Absorbance (nm)	Emission (nm)
FAM	494	520
HEX ou équivalent	530	549
ROX	575	602

Note : Le Quencher est non fluorescent. Le mélange contient une référence passive lue dans le spectre du ROX pour les appareils ABI Prism.

Contactez votre représentant commercial ou le service client pour tout autre modèle de thermocycleur.

H. Interprétation des résultats

Afficher l'ensemble des courbes et positionner la ligne de seuil pour chaque fluorochrome.

1. Validation de l'essai

L'amplification est valide si les résultats suivants sont obtenus. Les valeurs indicatives de Ct (Threshold Cycle) attendues pour le CTL+ sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

Contrôles	Amplification		Validation de
	FAM	HEX ou équivalent	
Témoin réactif (NTC)	Non	Non	Absence de contamination pour l'amplification
BTV CTL+	Oui	Non	Amplification de la cible
Témoin négatif d'extraction	Non	Non	Absence de contamination pour l'extraction
Témoin positif d'extraction	Oui	Non	Etapes d'extraction et d'amplification

2. Interprétation des résultats

L'extraction des acides nucléiques et l'amplification sont **valides** pour chacun des échantillons si au moins une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM et/ou HEX ou équivalent.

Amplification		Interprétation
FAM	HEX ou équivalent	BTV
Non	Oui, Ct < 35	Non détecté
Oui, Ct < 34	Oui	Détecté
Oui, 34 ≤ Ct < 40	Oui	Détecté en faible quantité
Non	Non/Oui Ct ≥ 35	Non déterminé

« **Détecté en faible quantité** » : Le statut de l'infection ne peut être défini (infection très récente (début de virémie) ou ancienne (le génome du virus de la BTV peut-être détecté, chez le bovin, 200 jours après infection et guérison. Le virus n'est alors plus infectieux).

« **Non déterminé** » : absence de courbe d'amplification caractéristique.

Causes possibles :

PCR défectueuse (présence d'inhibiteurs, erreur de programme, absence d'échantillon ou échantillon trop dégradé) et/ou Déficience de l'extraction des acides nucléiques (perte ou destruction des acides nucléiques).

Actions conseillées :

Refaire la PCR avec l'extrait des acides nucléiques pur et dilué au 1/5^{ème} en eau Nucléase-free ;

Si le test n'est toujours pas valide, refaire l'extraction des acides nucléiques en diluant le sang au demi dans du PBS 1X. Finalement, si aucun résultat n'est interprétable, l'échantillon est inexploitable (présence d'inhibiteurs de RT-PCR ; échantillon lysé ou putréfié...).

Table des symboles

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

1 | Extraire les acides nucléiques avec

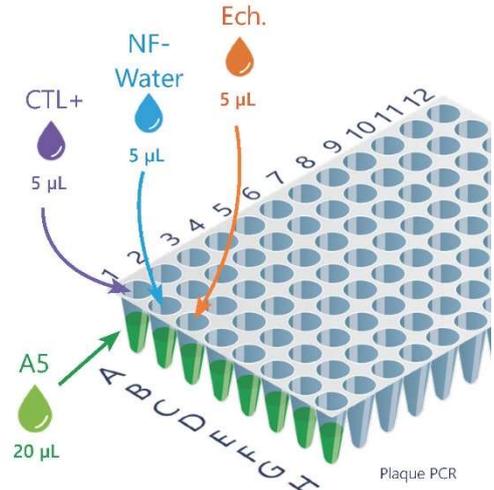
**Adia^X
Mag**



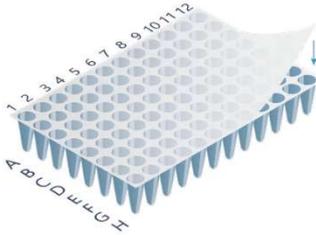
Scan me to discover Adiamag™

2 | Répartir **20 µL** de réactif d'amplification **A5**

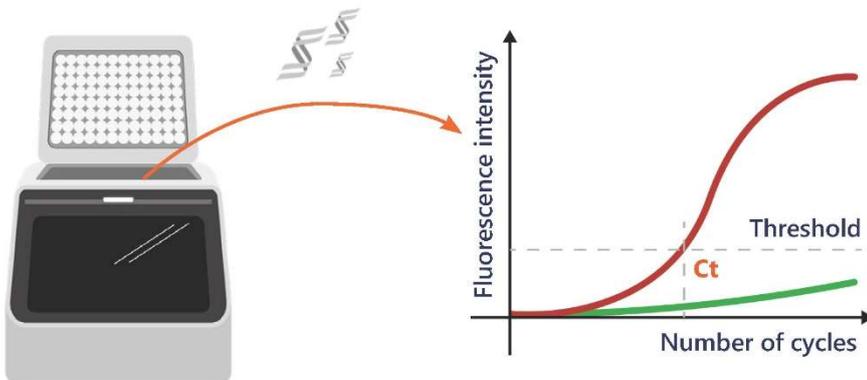
3 | Distribuer **5 µL d'acides nucléiques***, **CTL+*** et **NF-Water**
*Dénaturés préalablement 3 min. 95°C



4 | Sceller les puits



5 | Démarrer l'analyse PCR



* Les notes ne se substituent pas au mode d'emploi dont elles sont une synthèse.