



## ADIAVET™ BTV REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION DU VIRUS DE LA BLUETONGUE PAR  
AMPLIFICATION ENZYMATIQUE EN TEMPS REEL (TEST RT-PCR)

**Références :**

ADI352-100 (100 réactions)

ADI352-500 (500 réactions)



NOTE

Version française

NF352-06

2017/01

L'achat de ce produit donne à l'acheteur une licence de certains brevets de Roche limitée au droit d'utiliser le produit pour réaliser des tests de diagnostic in vitro vétérinaires. Aucune licence générale, de brevets ou autre, n'est concédée, autre que ce droit spécifique d'utiliser le produit acheté.

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™ BTV REAL TIME

<b>I.</b>	<b>HISTORIQUE DES REVISIONS .....</b>	<b>4</b>
<b>II.</b>	<b>INFORMATIONS GENERALES .....</b>	<b>5</b>
1.	But de l'essai .....	5
2.	Pathogène.....	5
3.	Description et principe du test.....	6
<b>III.</b>	<b>MATERIEL ET REACTIFS.....</b>	<b>7</b>
1.	Réactifs fournis dans le kit.....	7
2.	Validité et conservation.....	7
3.	Utilisation du « BTV CTL+ ».....	7
4.	Matériel nécessaire mais non fourni par AdiaGène.....	7
<b>IV.</b>	<b>TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS.....</b>	<b>9</b>
1.	Précautions.....	9
2.	Conservation des échantillons et des extraits d'ARN .....	9
3.	Préparation des prélèvements .....	9
4.	Témoins à inclure .....	9
<b>V.</b>	<b>EXTRACTION ET PURIFICATION.....</b>	<b>11</b>
1.	Avec le Kit QIAamp® Viral RNA.....	11
2.	Avec le Kit NucleoSpin® RNA Virus .....	12
3.	Avec le Kit QIAamp® 96 DNA Blood .....	13
4.	Avec le Kit Nucleospin® 96 Virus.....	15
5.	Avec le kit Billes magnétiques ARN/ADN.....	17
<b>VI.</b>	<b>AMPLIFICATION.....</b>	<b>18</b>
<b>VII.</b>	<b>INTERPRETATION DES RESULTATS.....</b>	<b>20</b>
1.	Définitions.....	20
2.	Validation et interprétation des résultats .....	20
A.	<i>Validation de l'essai (40 cycles)</i> .....	20
B.	<i>Interprétation des résultats</i> .....	22
<b>VIII.</b>	<b>INDEX DES SYMBOLES.....</b>	<b>23</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
2012/05	NF352-03	Modification technique	Ajout de la référence ADI352-500 (500 réactions), § III.1.
2012/05	NF352-03	Modification technique	Ajout du paragraphe « Extraction avec le kit Billes magnétiques ARN/ADN », § V-5.
2014/12	NF352-04	Modification technique	Ajout du tableau des pictogrammes
2016/07	NF352-05	Administratif	Modification des logos
2016/07	NF352-05	Administratif	Ajout des exigences légales Biosearch
2016/07	NF352-05	Administratif	Ajout tableau « types de prélèvements » §I.3
2017/01	NF352-06	Modification technique	Modification § VI.b DMSO optionnel Modification § VI.f programme PCR Révision § VII-2-B interprétations résultats

## II. Informations générales

---

### 1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ BTV REAL TIME permet de détecter les 27 sérotypes du virus de la Fièvre Catarrhale Ovine (BTV) par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir de prélèvement de sang total de bovin et d'ovin.

### 2. Pathogène

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 Culicoïdes. Cette maladie cosmopolite des régions tropicales et sub-tropicales est présente depuis des années dans le pourtour méditerranéen. Elle induit des syndromes graves chez les ovins (fièvre, œdème, dermatite, amaigrissement, mortalité 1 à 30%), mais elle passe le plus souvent inaperçue chez les caprins et les grands ruminants domestiques ou sauvages (cerfs, antilopes...) qui servent de réservoir au virus.

Traditionnellement décrite comme endémique entre les 40<sup>èmes</sup> parallèles sud et nord (Afrique, Moyen-Orient, Asie, nord de l'Australie, Etats-Unis, Amérique du Sud), la fièvre catarrhale du mouton est devenue une maladie importante à travers le monde entier.

Au cours des 10 dernières années, de graves épidémies ont eu lieu en Europe, avec des conséquences économiques importantes. L'épidémie de 2006-2008 en Europe a été causée par une souche de sérotype 8 et celle de 2014 en Grèce et dans d'autres pays de l'Europe du Sud-Est a été causée par une souche de sérotype 4. Ces extensions sont directement la conséquence de l'activité du vecteur Culicoïdes.

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.

Dans les conditions naturelles, la dissémination est exclusivement le fait de piqûre d'insectes infectés ou par la semence de mâles infectés. La diffusion de la maladie est donc grandement influencée par l'activité du vecteur : elle est maximale en périodes de fortes pluies et de chaleur favorisant la multiplication du vecteur (au printemps et en automne).

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.

### 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™ BTV REAL TIME peut détecter simultanément :

- le virus de la Bluetongue (sonde marquée en FAM)
- la GAPDH, un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ARN endogène (sonde marquée avec un fluorochrome lu dans le même spectre que VIC et HEX).

Le kit ADIAVET™ BTV REAL TIME est compatible avec les protocoles d'extraction préconisés par l'ANSES utilisant différents kits de purification (Qiagen, Macherey-Nagel). Adiaène ne garantit aucun résultat si d'autres kits d'extraction sont utilisés.

Types de prélèvements et options d'analyse correspondantes :

Prélèvement	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Sang total	<input checked="" type="checkbox"/>	5

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

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

### III. Matériel et réactifs

---

#### 1. Réactifs fournis dans le kit

Désignation	Réactif	ADI352-100	ADI352-500
A5	Solution d'amplification	2 x 1000 µl tubes verts	10 x 1000 µl tubes verts
BTV CTL+	Contrôle positif Bluetongue Virus	1 tube violet	2 tubes violets

#### 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 « BTV CTL+ »

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

Ajouter **200 µl** d'eau Nuclease-free au « BTV CTL+ » et mélanger en vortexant au moins 20 secondes. Aliquoter cette solution par 6 ou 12 µl et conserver à <-15°C.

Pour chaque analyse, utiliser 5 µl de « BTV CTL+ » par puits.

#### 4. Matériel nécessaire mais non fourni par Addiagène

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

- Thermocycleur avec son consommable pour PCR Temps réel : tubes PCR de 0,2 ml ou plaques PCR 96 puits fermées de qualité optique
- Poste de Sécurité Microbiologique de type II
- Centrifugeuse pour microtubes, plaque 96
- Etuve, bain-marie ou bloc chauffant (+56°C et/ou +70°C)
- Appareil d'homogénéisation pour tubes
- Agitateur de plaques 96 (pour extraction d'ARN en format plaque 96)
- Plaques 96 (type Elisa) (pour extraction d'ARN en format plaque 96)
- Pipettes de 1 - 10 µl, 20 - 200 µl et 200 - 1000 µl
- Pipette multicanaux 1000 µl (pour extraction d'ARN en format plaque 96)
- Embouts Nuclease-free avec filtres pour micropipettes
- Microtubes Nuclease-free de 1,5 ml et 2 ml
- Gants latex non poudrés
- Ethanol 96-100%
- Eau Nuclease-free
- Tampon PBS 1X pH 7,4
- Optionnel DMSO (dimethylsulfoxyde)
- **Kit d'extraction d'ARN en colonne individuelle**
  - QIAamp® Viral RNA (Qiagen, 50 extractions : réf. 52904 ou 250 extractions : réf. 52906)
  - NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel, 50 extractions : réf. 740956.50 ou 250 extractions : réf. 740956.250)
- **Kit d'extraction d'ARN en format plaque 96**
  - QIAamp® 96 DNA Blood Kit (Qiagen, 4x96 extractions : réf. 51161 ou 12x96 extractions : réf. 51162) + AVL-Carrier (Qiagen, 155 ml : réf. 19073) + Qiafilter (Qiagen, 24x96 extractions : réf. 120010)

- Eau RNase-free (Qiagen, 5x100 ml : réf. 129114), optionnel
- S-Block (Qiagen, 24 plaques : réf. 19585), optionnel.
- Nucleospin® 96 Virus (Macherey-Nagel, 2x96 extractions : réf. 740691.2 ou 4x96 extractions : réf. 740691.4)
- MN Square-well Block (Macherey-Nagel, 4 plaques : réf. 740476), optionnel.

- **Kit d'extraction d'ARN/ADN en billes magnétiques sur automate (Bio-X Diagnostics, 2x96 tests, réf. OC-MNPACKKF96)**

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

## IV. Traitement des échantillons et des témoins

---

### 1. Précautions

La RT-PCR ADIAVET™ BTV REAL TIME est compatible avec les protocoles d'extraction préconisés par l'ANSES. Adia-gène ne garantit aucun résultat si d'autres kits d'extraction sont utilisés.

**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.

Avant de commencer l'essai, lire l'ensemble du protocole et le respecter scrupuleusement.

### 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

**Le sang doit avoir été impérativement prélevé dans un tube d'anticoagulant (EDTA) sous un poste de sécurité microbiologique.**

*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 (GAPDH) présent naturellement dans les cellules de l'animal permet de vérifier l'extraction et l'amplification de chaque échantillon. Le témoin « BTV 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 BTV. 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 BTV. Ce témoin positif cible parfois nommé sentinelle permet d'établir un suivi, sous forme de carte de contrôle, renseignant sur la fidélité intermédiaire des résultats obtenus.

## V. Extraction et purification

### 1. Avec le Kit QIAamp® Viral RNA

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

	<b>Sang dans un tube d'anticoagulant (EDTA)</b>
<b>Lyse</b>	Placer <b>100 µl</b> d'échantillon (individuel ou pool de 5) dans un microtube. Pour les témoins négatifs d'extraction, placer <b>100 µl</b> de <b>tampon PBS 1X</b> dans un microtube.
	Ajouter <b>560 µl</b> de <b>tampon AVL + Carrier RNA</b> . Homogénéiser ~15 secondes, vérifier si le mélange est bien homogène. Incuber 10 minutes à température ambiante. Centrifuger brièvement.
<b>Préparation de la fixation</b>	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). Centrifuger brièvement.
<b>Transfert sur colonnes et fixation à la membrane</b>	Identifier les colonnes, déposer <b>630 µl</b> de mélange sur la colonne correspondante. Centrifuger 1 minute à 6 000 g. Augmenter les temps de centrifugation en cas de mélange de nature visqueuse, difficile à pipeter et susceptible de colmater la colonne. Changer le tube collecteur, déposer le reste du mélange et centrifuger 1 minute à 6 000 g.
<b>1<sup>er</sup> lavage</b>	Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl</b> de <b>tampon AW1</b> . Centrifuger 1 minute à 6 000 g.
<b>2<sup>ème</sup> lavage</b>	Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl</b> de <b>tampon AW2</b> . Centrifuger 3 minutes à 20 000 g.
<b>Séchage de la colonne</b>	Changer le tube collecteur. Centrifuger 1 minute à 14 000 g.
<b>Elution</b>	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer <b>40 µl</b> de <b>tampon AVE</b> . Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 2 minutes à 6 000 g.
<b>Conservation</b>	Fermer les tubes, identifier et conserver sur glace si utilisation immédiate ou à <-15°C.

## 2. Avec le Kit NucleoSpin® RNA Virus

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.  
 Avant le début de l'extraction, préchauffé le tampon RAV1 + Carrier RNA à +56°C maximum 5 minutes. Pas plus de 4 préchauffages.

	<b>Sang dans un tube d'anticoagulant (EDTA)</b>
<b>Lyse</b>	Placer <b>100 µl</b> d'échantillon (individuel ou pool de 5) dans un microtube. Pour les témoins négatifs d'extraction, placer <b>100 µl</b> de <b>tampon PBS 1X</b> dans un microtube.
	Ajouter <b>560 µl</b> de <b>tampon RAV1 + Carrier RNA</b> . Homogénéiser ~15 secondes, vérifier si le mélange est bien homogène. Incuber 10 minutes à température ambiante. Centrifuger brièvement.
<b>Préparation de la fixation</b>	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). Centrifuger brièvement.
<b>Transfert sur colonnes et fixation à la membrane</b>	Identifier les colonnes, déposer <b>630 µl</b> de mélange sur la colonne correspondante. Centrifuger 1 minute à 8 000 g. Augmenter les temps de centrifugation en cas de mélange de nature visqueuse, difficile à pipeter et susceptible de colmater la colonne. Changer le tube collecteur, déposer le reste du mélange et centrifuger 1 minute à 8 000 g.
<b>1<sup>er</sup> lavage</b>	Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl</b> de <b>tampon RAW</b> . Centrifuger 1 minute à 8 000 g.
<b>2<sup>ème</sup> lavage</b>	Changer le tube collecteur et ajouter <b>630 µl</b> de <b>tampon RAV3</b> . Centrifuger 1 minute à 8 000 g.
<b>Séchage de la colonne</b>	Changer le tube collecteur. Centrifuger 5 minutes à 11 000 g.
<b>Elution</b>	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer <b>50 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.

### 3. Avec le Kit QIAamp® 96 DNA Blood

Attention : les plaques S-Block fournies dans les kits QIAamp® 96 DNA Blood ont plusieurs fonctions. Elles servent de plaque de mélange et de récupération. Une fois utilisées, elles peuvent être vidées, décontaminées avec HCl 0,4 M pendant 1 minute, lavées à l'eau distillée et autoclavées.

Les centrifugations sont réalisées à température ambiante à 5900 tr/min (5600 à 5800 g). Avant le début de l'extraction, préchauffer le tampon AVE ou l'eau Nuclease-free à +70°C.

	<b>Sang dans un tube d'anticoagulant (EDTA)</b>
<b>Lyse</b>	Placer <b>100 µl</b> d'échantillon par puits d'une plaque Round-well Block. Pour les témoins négatifs d'extraction, utiliser <b>100 µl</b> de <b>tampon PBS 1X</b> .
	Ajouter <b>400 µl</b> de <b>tampon AVL + Carrier RNA</b> . Fermer la plaque avec un adhésif AirPore tape. Agiter ~15 secondes avec un agitateur de plaques 96. Incuber 10 minutes à température ambiante.
<b>Préparation de la fixation</b>	Répartir <b>400 µl d'éthanol 100%</b> dans une plaque S-Block. Recouvrir avec une plaque Qiafilter. Enlever délicatement le film adhésif de la plaque Round-well Block contenant l'échantillon et transférer la totalité de chaque puits dans la plaque Qiafilter. Centrifuger 2 minutes.
<b>Transfert sur colonnes et fixation à la membrane</b>	Retirer la plaque Qiafilter. Homogénéiser le mélange par aspiration-refoulement 5 fois (très important) avec une pipette multicanaux p1000. Transférer la <b>totalité du mélange</b> dans la QIAamp® 96 plate après l'avoir posée sur une nouvelle plaque S-Block. Placer un nouveau film adhésif AirPore tape sur la plaque. Centrifuger 2 minutes. Si la totalité du mélange n'est pas passé, centrifuger à nouveau 3 minutes.
<b>1<sup>er</sup> lavage</b>	Placer la plaque QIAamp® 96 plate sur une nouvelle plaque S-Block. Enlever le film adhésif de la plaque QIAamp® 96 plate. Ajouter de <b>500 µl</b> de <b>tampon AW1</b> dans chacun des puits. Placer un nouveau film adhésif AirPore tape sur la plaque. Centrifuger 2 minutes.
<b>2<sup>ème</sup> lavage</b>	Enlever le film adhésif de la plaque QIAamp® 96 plate. Ajouter de <b>900 µl</b> de <b>tampon AW2</b> dans chacun des puits. Placer un nouveau film adhésif AirPore tape sur la plaque. Centrifuger 5 minutes.
<b>Séchage de la colonne</b>	Déposer la plaque QIAamp® 96 plate sur une plaque 96 (type ELISA) vide et sèche. Centrifuger 10 minutes.
<b>Elution</b>	Enlever le film adhésif de la plaque QIAamp® 96 plate. Placer la plaque QIAamp® 96 plate sur une plaque Elution microtubes CL. Déposer <b>100 µl</b> de <b>tampon AVE</b> ou d' <b>eau Nuclease-free</b> préchauffé à +70°C dans chaque puits de la plaque QIAamp® 96 plate.

	Centrifuger 2 minutes.
<b>Conservation</b>	Retirer la plaque QIAamp® 96 plate. Fermer la plaque Elution microtubes CL avec des Caps for Strips. Conserver sur glace si utilisation immédiate ou à <-15°C.

#### 4. Avec le Kit Nucleospin® 96 Virus

Trois plaques MN square well block sont fournies dans chacun des kits. Elles servent de plaque de mélange et de récupération. Une fois utilisées, elles peuvent être vidées, décontaminées avec HCl 0,4 M pendant 1 minute, lavées à l'eau distillée et autoclavées.

Les centrifugations sont réalisées à température ambiante à 5900 tr/min (5600 à 5800 g).

Avant le début de l'extraction, préchauffer :

- le tampon RAV1 + Carrier RNA à +56°C maximum 5 minutes. Pas plus de 4 préchauffage.
- l'eau Nuclease-free à +70°C.

	<b>Sang dans un tube d'anticoagulant (EDTA)</b>
<b>Lyse</b>	Placer <b>100 µl</b> d'échantillon par puits d'une plaque Round-well Block. Pour les témoins négatifs d'extraction, utiliser <b>100 µl</b> de <b>tampon PBS 1X</b> .
	Ajouter <b>400 µl</b> de <b>tampon RAV1 + Carrier RNA + 20 µl</b> de <b>protéinase K</b> . Fermer la plaque avec un adhésif Self-adhering PE Foil. Agiter ~15 secondes avec un agitateur de plaques 96. Incuber 10 minutes à +70°C.
<b>Préparation de la fixation</b>	Répartir <b>400 µl d'éthanol 100%</b> dans une plaque MN Square-well Block. Enlever délicatement le film adhésif de la plaque Round-well Block contenant les échantillons et transférer la <b>totalité du mélange</b> de chaque puits dans la plaque contenant l'éthanol. Homogénéiser le mélange par aspiration-refoulement 5 fois (très important) avec une pipette multicanaux p1000.
<b>Transfert sur colonnes et fixation à la membrane</b>	Placer une plaque 96 Nucleospin® Virus Binding Plate (bleue) sur une nouvelle plaque MN Square-well Block. Déposer la <b>totalité du mélange</b> avec une pipette multicanaux p1000 dans la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate. Placer un nouveau film adhésif Self-adhering PE Foil sur la plaque. Centrifuger 2 minutes. Si la totalité du mélange n'est pas passé, centrifuger à nouveau 3 minutes.
<b>1<sup>er</sup> lavage</b>	Placer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate sur une nouvelle plaque MN Square-well Block. Enlever le film adhésif de plaque Nucleospin® Virus Binding Plate Ajouter de <b>500 µl</b> de <b>tampon RAW</b> dans chacun des puits. Placer un nouveau film adhésif Self-adhering PE Foil sur la plaque. Centrifuger 2 minutes.
<b>2<sup>ème</sup> lavage</b>	Enlever le film adhésif de plaque Nucleospin® Virus Binding Plate. Ajouter de <b>900 µl</b> de <b>tampon RAV3</b> dans chacun des puits. Placer un nouveau film adhésif Self-adhering PE Foil sur la plaque. Centrifuger 5 minutes.
<b>Séchage de la colonne</b>	Déposer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate sur une plaque 96 (type ELISA) vide et sèche. Centrifuger 10 minutes.
<b>Elution</b>	Placer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate sur une plaque Rack with MN Tube Strips. Enlever le film adhésif de la plaque.

	Déposer <b>100 µl</b> d'eau <b>Nuclease-free</b> préchauffé à +70°C dans chaque puits de la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate. <u>Ne pas utiliser le tampon RE.</u> Centrifuger 2 minutes.
<b>Conservation</b>	Retirer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate. Fermer la plaque Rack with MN Tube Strips avec des Caps for Strips. Conserver sur glace si utilisation immédiate ou à <-15°C.

## 5. Avec le kit Billes magnétiques ARN/ADN

Se référer à la version de notice NFKF 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 (« BTV CTL+ ») et le témoin réactif d'amplification (NTC)).

b - **Dénaturation des ARNs viraux :**

**L'utilisation du DMSO est optionnelle mais l'étape de dénaturation est obligatoire.**

Pour chaque échantillon, incluant les témoins négatifs d'extraction, placer 1,6 µl de DMSO dans un microtube de 0,2 ml et ajouter 16 µl d'ARN extrait. Pour le « BTV CTL+ », en fonction du volume de l'aliquot (§ II.3.), ajouter 10% de DMSO.

Centrifuger les microtubes.

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

c - 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.

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

e- Pour chaque échantillon, le « BTV CTL+ », le témoin négatif d'extraction (obligatoire) et le témoin positif d'extraction (recommandé), ajouter **5 µl** d'extrait purifié et dénaturé aux **20 µl** de réactif « A5 ».

Pour le témoin réactif d'amplification (NTC), ne rien ajouter au réactif « A5 ».

**Replacer immédiatement les extraits d'ARN purifiés à +2/8°C ou <-15°C.** Eliminer les bulles qui pourraient rester au fond des puits.

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

La cible BTV 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.

Les programmes utilisables en fonction du thermocycleur sont :

Programme standard		Programme court	
ABI7500* -Thermofisher AriaMx - MX3005P - Agilent Agilent LightCycler 480 - Roche Diagnostic		ABI7500* - Thermofisher AriaMx ; MX3005P - Agilent CFX96 Touch - Biorad	
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
1 min. 60°C		30 sec 60°C **	

\* Cocher l'option « emulation 9600 » lorsqu'elle existe.

\*\* Mettre 32 secondes pour le 7500 Thermofisher

\*\*\* Mettre 30 secondes pour le MX3005P

Contactez-nous si vous souhaitez utiliser d'autres appareils.

## VII. Interpretation des résultats

### 1. Définitions

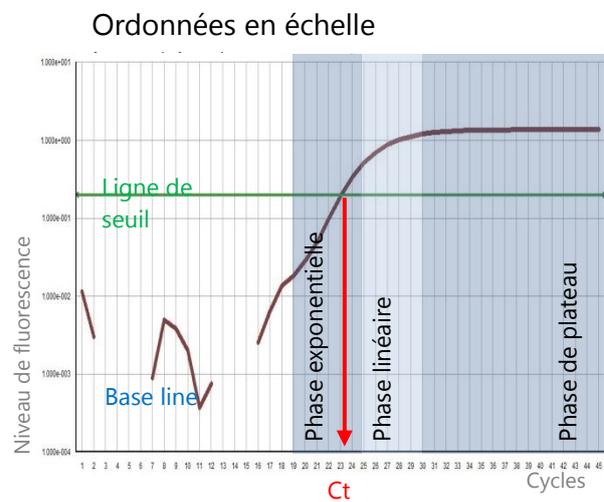
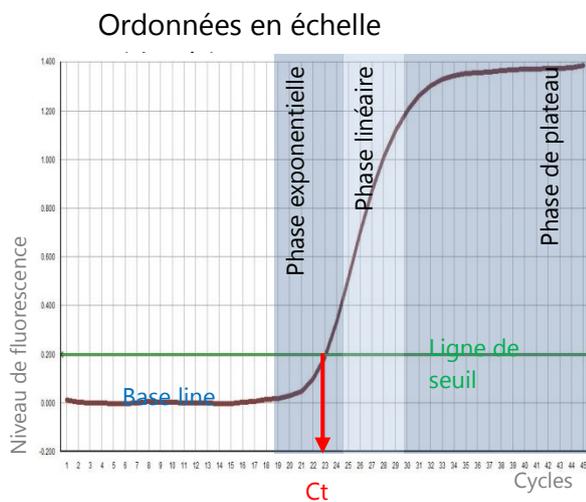
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence et qualifie la partie non caractéristique des courbes observées pendant les premiers cycles de l'amplification.

Le terme « **courbe d'amplification caractéristique** » qualifie la présence d'une courbe de fluorescence avec une phase exponentielle, suivie d'une phase linéaire et se terminant par une phase plateau (ordonnées en échelle logarithmique). Toute courbe ne présentant pas cet aspect sera considérée comme non caractéristique, comme par exemple une courbe aplatie, en dents de scie ou trop tardive pour en observer à minima la phase linéaire.

La « **ligne de seuil** » ou « **threshold line** » doit être placée au-dessus de la ligne de base, de préférence au point d'inflexion de la phase exponentielle d'amplification (ordonnées en échelle linéaire) ou au milieu de la partie linéaire (ordonnées en échelle logarithmique) commune à l'ensemble des courbes d'amplification caractéristiques.

Le « **cycle seuil** » ou « **threshold cycle** » (**Ct**) d'un puits correspond, pour chaque fluorophore détecté, au point d'intersection de la ligne de seuil avec la courbe de fluorescence. 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 (40 cycles)

L'essai est validé si :

- Les NTC et les témoins négatifs d'extraction ont tous une valeur de Ct indéterminée (UNDET) avec la RT-PCR ciblant le virus de la BTV (en FAM) et la RT-PCR ciblant le contrôle interne (en VIC ou HEX),
- Le « **BTV CTL+** » présente des valeurs de Ct conformes aux valeurs de Ct (+/-2 Ct) du certificat qualité du kit.

## B. Interprétation des résultats

Interprétation		Cible BTV (FAM)	Contrôle interne (VIC/HEX)
<i>Cas 1</i>	Positif BTV	Ct < 34	Ct ≤ 40
<i>Cas 2</i>	Faiblement Positif BTV	34 < Ct < 40	Ct < 35
<i>Cas 3</i>	Négatif	Undet.	Ct < 35
<i>Cas 4</i>	Non déterminé	Undet.	Ct ≥ 35

**Cas 1** : Le résultat peut-être rendu comme « présence de génome du virus de BTV». Attention, un autre génotype du virus BTV peut-être présent dans l'échantillon testé.

**Cas 2** : L'échantillon est considéré comme « faiblement positif pour la cible BTV». 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).

**Cas 3** : Le résultat peut-être rendu comme « absence de génome du virus de la BTV».

**Cas 4** : Les résultats ne peuvent être interprétés pour l'échantillon correspondant. Dans ce cas, il est conseillé dans un premier temps de refaire le test PCR en double en utilisant l'extrait d'ARN pur et dilué au 1/5 dans de l'eau Nuclease-free. Dans un second temps, si le test n'est toujours pas validé, une nouvelle extraction des ARNs totaux en diluant le sang au demi dans du PBS 1X (sans calcium ni magnésium) (50 µl de sang EDTA + 50 µl de PBS). Au final, si aucun résultat n'est interprétable, l'échantillon est inexploitable (présence d'inhibiteurs de RT-PCR ; échantillon lysé ou putréfié...).

## 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**  
38 rue de Paris  
22000 Saint-Brieuc - France

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